

**Untersuchungen zum Metabolismus von Furan in
Ratte und Maus, sowie zur Reaktivität und
Gentoxizität von *cis*-2-Buten-1,4-dial *in vitro* und
in Zellkultur**



Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Marco Kellert

aus

Gemünden am Main

Würzburg, 2008

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:.....

2. Gutachter:.....

der Dissertation

1. Prüfer:.....

2. Prüfer:.....

3. Prüfer:.....

des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen

Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:.....

**Meiner lieben Frau Kirsten
und meinen Kindern**

Inhaltsverzeichnis

ERLÄUTERUNGEN.....	V1
ZUSAMMENFASSUNG.....	V3
SUMMARY.....	V7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	V11
EINLEITUNG.....	1
KENNTNISSTAND.....	3
1. Bildung, Eigenschaften und Gehalte	3
2. Metabolismus von Furan zu cis-2-Buten-1,4-dial.....	4
3. Reaktivität von cis-2-Buten-1,4-dial gegenüber protein-abgeleiteten Modellnukleophilen und Glutathion.....	6
4. Reaktivität von cis-2-Buten-1,4-dial gegenüber desoxyribonukleinsäure-abgeleiteten Modellnukleophilen.....	7
5. Kanzerogenität von Furan in Ratte und Maus.....	8
6. Gentoxizität und Mutagenität von Furan.....	9
7. Gentoxizität und Mutagenität von cis-2-Buten-1,4-dial.....	10
ZIELSETZUNG.....	13
ERGEBNISSE.....	15
1. Darstellung von cis-2-Buten-1,4-dial.....	15
1.1 Einführung.....	15
1.2 Darstellung von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran.....	15
1.3 Hydrolyse 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran zu cis-2-Buten-1,4-dial.....	16
2. Identifizierung von Expositionsbiomarkern nach Furangabe an Ratten.....	19
2.1 Einführung.....	19
2.2 Tierversuch und Probenvorbereitung.....	20
2.3 Analyse der Rattenurine mit Tandemmassenspektrometrie.....	21
2.4 Datenextraktion aus den Full-Scan-Daten.....	24
2.5 Hauptkomponentenanalyse der extrahierten Datenmatrix.....	24
2.6 Verfeinerte Analyse potentieller Biomarker.....	27
2.7 Strukturaufklärung potentieller Biomarker.....	28
2.8 Kinetik der Biomarker nach Exposition.....	33
3. Dosisabhängigkeit und Kinetik der Furanbiomarker im Urin von Ratte und Maus.....	35
3.1 Einführung.....	35
3.2 Tierversuch und Datenanalyse.....	35
3.3 Ausscheidungskinetik in der höchsten Dosisgruppe.....	37
3.4 Dosisabhängigkeit der Biomarker in Ratte und Maus.....	38
4. Untersuchung des mutagenen Potentials von cis-2-Buten-1,4-dial mit dem Ames-Test....	41
4.1 Einführung.....	41

4.2 Ames-Test mit Glutathionzugabe nach der Vorinkubationsphase.....	43
4.3 Ames-Test ohne Glutathionzugabe nach der Vorinkubationsphase.....	44
5. Parallele Bestimmung gentoxischer Endpunkte in Mauslymphomzellen: Kometen-Test, Mikrokern-Test, Thymidinkinase-Mutationstest.....	47
5.1 Einführung.....	47
5.2 Test auf Gentoxizität und Mutagenität von cis-2-Buten-1,4-dial.....	50
5.3 Test auf das Potential von cis-2-Buten-1,4-dial DNS zu vernetzen.....	52
5.4 Test auf Gentoxizität und Mutagenität von Furan.....	55
6. Reaktion von Desoxycytidin mit cis-2-Buten-1,4-dial in Anwesenheit von Aminosäuren.....	59
6.1 Einführung.....	59
6.2 Inkubation von cis-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin in Gegenwart von Glutathion, N-Acetyl-L-cystein und L-Glutamin.....	60
DISKUSSION.....	63
EXPERIMENTELLES.....	67
1. Darstellung von cis-2-Buten-1,4-dial.....	67
1.1 Chemikalien und Geräte.....	67
1.2 Synthese von cis-/trans-2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran.....	67
1.3 Herstellung einer 100 mM cis-2-Buten-1,4-dial Lösung.....	68
2. Tierversuch zur Identifizierung von Furanmetaboliten im Urin von Ratten.....	69
2.1 Chemikalien, Geräte und Arbeitsweise.....	69
2.2 Tierversuch.....	69
2.3 Probenvorbereitung.....	70
2.4 Automatisierte Probenaufarbeitung und Analytik mit einer Säulenschaltung.....	70
2.5 Nicht zielgerichtete Tandemmassenspektrometrie-Methode.....	71
2.6 Datenextraktion und Hauptkomponentenanalyse.....	72
2.7 Tandemmassenspektrometrie-Methode für die quantitative Untersuchung von potentiellen Biomarkern.....	72
2.8 Inkubation von cis-2-Butene1,4-dial mit N-Acetyl-L-lysin.....	74
2.9 Inkubation von cis-2-Buten-1,4-dial mit N-Acetyl-L-lysin und N-Acetyl-L-cystein....	74
2.10 Inkubation von cis-2-Buten-1,4-dial mit Glutathion.....	75
2.11 Inkubation von cis-2-Buten-1,4-dial mit Methanthiol und Glutaminsäure.....	75
3. Tierversuch zur Untersuchung der Zeit- und Dosisabhängigkeit der Furanmetaboliten im Urin von Ratte und Maus.....	77
3.1 Tierversuch.....	77
3.2 Probenvorbereitung.....	77
3.3 Automatisierte Probenaufbereitung und Analytik mit einer Säulenschaltung.....	78
3.4 Massenspektrometrie.....	78
4. Untersuchung von cis-2-Buten-1,4-dial im Ames-Test (Stamm TA104).....	81
4.1 Chemikalien und allgemeine Arbeitsweise.....	81
4.2 Herstellung einer Bakteriensuspension.....	81
4.3 Herstellung von Lösungen und Agarplatten.....	82
4.4 Ames-Test ohne die Zugabe von Glutathion nach der Vorinkubationsphase.....	82
4.5 Ames-Test mit Zugabe von Glutathion zur Reduktion von zytotoxischen Effekten ...	83
5. Untersuchung der Gentoxizität und Mutagenität von cis-2-Buten-1,4-dial und Furan in Mauslymphomzellen.....	85
5.1 Chemikalien.....	85

5.2 Zellkultur und Vorbereitung der Zellen.....	85
5.3 Der Kometen-Test.....	86
5.4 Der Mikrokern-Test.....	86
5.5 Der Thymidinkinase-Mutationstest.....	87
5.6 Untersuchung des DNS-vernetzenden Potentials von cis-2-Buten-1,4-dial.....	87
5.7 Stabilität von Furan/Wasser-Lösungen in Zellkulturflaschen.....	88
6. Reaktion von cis-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin.....	89
6.1 Chromatographische Methode für die Analyse des Addukts von Desoxycytidin mit cis-2-Buten-1,4-dial.....	89
6.2 Tandemmassenspektrometrie-Methode für den Nachweis des Addukts von Desoxycytidin mit cis-2-Buten-1,4-dial.....	89
6.3 Inkubation von cis-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin in Gegenwart von Glutathion, N-Acetyl-L-cystein und L-Glutamin.....	90
LITERATURVERZEICHNIS.....	91
ERKLÄRUNG.....	A1
DANKSAGUNG.....	A3
PUBLIKATIONEN.....	A4

Erläuterungen

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines von der Abteilung Lebensmittelsicherheit des Bundesamtes für Gesundheit der Schweiz geförderten Projektes durchgeführt. Teile dieser Arbeit sind bereits als Artikel veröffentlicht bzw. eingereicht:

Kellert, M; Wagner, S; Lutz, U; Lutz, WK

„Biomarkers of furan exposure by metabolic profiling of rat urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis“

Chemical Research in Toxicology, **2008**, 21, 761

Kellert, M; Richter, I; Brink, A; Schlatter, J; Lutz, WK

„Tests for genotoxicity and mutagenicity of furan and its metabolite *cis*-2-butene-1,4-dial in L5178Y mouse lymphoma cells“

Revision eingereicht zur Publikation in *Mutation Research*

Die Ergebnisse zur Genotoxizität und Mutagenität von Furan und *cis*-Buten-1,4-dial in L5178Y Mauslymphomzellen wurden unter Anleitung von Herrn Dr. Andreas Brink durch die technische Assistentin Frau Ingrid Richter erarbeitet.

Zusammenfassung

Furan wird in einer Vielzahl von Speisen durch Hitzebehandlung gebildet und ist kanzerogen in der Leber von Ratte und Maus. Durch die hohe Flüchtigkeit von Furan ist eine Expositionsabschätzung auf Basis der Kontamination von Lebensmitteln nur bedingt möglich. Ein alternativer Ansatz dazu ist die Identifizierung von Furanmetaboliten als Expositionsbiomarker. Nach der Aufnahme wird Furan zunächst zum Dialdehyd *cis*-2-Buten-1,4-dial oxidiert. *cis*-2-Buten-1,4-dial besitzt mehrere elektrophile Strukturelemente, welche eine Reaktion mit Protein und DNS wahrscheinlich machen und damit zur bekannten Toxizität von Furan beitragen können. Es stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob eine Reaktion mit Protein die Reaktion mit der DNS verhindern kann und somit keine direkt genotoxischen Effekte auftreten. Für ein kanzerogenes Agens ohne direkte genotoxische Wirkung kann eine Schwellendosis unterhalb derer kein DNS-Schaden auftritt diskutiert werden. Für eine fundierte Risikobewertung bezüglich der Aufnahme von Furan über die Nahrung ist dies unabdingbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde nach der oralen Gabe von Furan im Urin von Fischer 344 Ratten nach Metaboliten gesucht. Eine Kontrollgruppe erhielt nur die Trägersubstanz Öl. Das vor und nach Exposition über jeweils zwei 24 Stunden Perioden gesammelte Urin wurde mittels einer Tandemmassenspektrometrie-Methode analysiert. Die Methode bestand aus einem Full-Scan und einer darüber gesteuerten Aufzeichnung eines Fragmentationenspektrums. Aus den Full-Scan-Daten wurden 449 Signale extrahiert und mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse untersucht. In der ersten Sammlerperiode nach der Behandlung konnten durch die erste Hauptkomponente die behandelten von den unbehandelten Tieren getrennt werden. Aus den für die Trennung verantwortlichen Variablen konnten dreizehn für eine genauere Analyse im Multi-Reaction-Monitoring Modus ausgewählt werden. Sieben davon zeigten eine signifikante Erhöhung durch die Behandlung und wurden deshalb auf ihre Struktur hin untersucht. Die Beobachtung eines Neutralteilchenverlusts von 129 u in mehreren Spektren wies auf die Bildung von Merkurstatuen hin. Die Entstehung eines Neutralteilchens von 171 u konnte auf das Vorliegen eines *N*-Acetyl-L-lysin-Addukts zurückgeführt werden. Durch den Vergleich der Fragmentationenspektren aus den *in vivo* Proben mit solchen aus *in vitro* Inkubationen mit diversen Aminosäurederivaten konnten fünf der potentiellen Biomarker strukturell aufgeklärt werden. Ein mit Hilfe der NMR-Spektroskopie charakterisierter Metabolit stammte aus dem Abbau eines Glutathionkonjugates durch β -Lyase-Spaltung und einer anschließenden Methylierung des freien Thiols. In einer weiteren Tierstudie an Ratten und Mäusen wurde die Kinetik und die Dosis-Wirkungs-Beziehung der identifizierten Biomarker untersucht. Der

Sammelzeitraum nach Behandlung erstreckte sich dabei über 72 Stunden und der Dosisbereich lag zwischen 125 µg bis 8 mg pro Kilogramm Körpergewicht. Die gezielte LC-MS/MS-Analyse der Urine auf die identifizierten Biomarker hin zeigte, dass in der Ratte alle und in der Maus alle bis auf einen dosisabhängig anstiegen. Der hohe Level einiger Metaboliten im Kontrollurin ist möglicherweise ein Hinweis auf die endogene Bildung von *cis*-2-Buten-1,4-dial. Die Kinetik der Ausscheidung lieferte wertvolle Hinweise auf die Entstehung der Biomarker. Die Ausscheidung der Biomarker mit Lysinstruktur erfolgte über mehr als 72 Stunden. Dies war ein Hinweis auf eine Freisetzung aus Protein. Die Ausscheidung der restlichen drei Verbindungen erfolgte ausschließlich in den ersten 24 Stunden. Auf Grund der teilweise bekannten Struktur konnten sie der Konjugation mit Glutathion zugeordnet werden.

Die in der Literatur vorhandenen Daten zur Genotoxizität von Furan und *cis*-Buten-1,4-dial sind unschlüssig und unvollständig. In der vorliegenden Arbeit wurde *cis*-2-Buten-1,4-dial im Ames Stamm TA104 und in L5178Y Mauslymphomzellen auf Mutagenität und Genotoxizität untersucht. Die Herstellung von *cis*-2-Buten-1,4-dial erfolgte aus 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran. Durch starke Zytotoxizität war der Konzentrationsbereich auf 4.5 µmol/Platte limitiert. Innerhalb dieses Bereich konnte mit der Vorinkubationsvariante des Ames-Tests keine Mutagenität beobachtet werden. Auch der Zusatz von Glutathion nach der Vorinkubationsphase zur Vermeidung von Zytotoxizität änderte daran nichts. Die L5178Y Mauslymphomzellen wurden mit Standardprotokollen für den Mikrokern-Test, Kometen-Test und den Thymidinkinase-Test untersucht. Der Konzentrationsbereich von *cis*-2-Buten-1,4-dial erstreckte sich bis 100 µM, konnte aber auf Grund der starken Zytotoxizität nur bis 25 µM ausgewertet werden. Dennoch konnte bereits in diesem Bereich ein 1.7- bzw. 2.2-facher Anstieg im Kometen- bzw. Thymidinkinase-Test beobachtet werden. Die Analyse von drei unabhängigen Replikaten mit einem "Linear mixed effects model" bestätigte den Anstieg mit der Dosis als signifikant. Verglichen mit der Positivkontrolle Methylmethansulfonat hatte *cis*-2-Buten-1,4-dial bei einer deutlich höheren Zytotoxizität eine ähnliche Potenz bezüglich der Mutagenität und Genotoxizität. Furan wurde ebenfalls in L5178Y Mauslymphomzellen untersucht. Hier konnte jedoch weder eine Zytotoxizität noch eine Genotoxizität oder Mutagenität beobachtet werden. Das Ergebnis war nicht unerwartet, da die Zellen keine Enzyme für eine metabolische Aktivierung besitzen. Um das DNS-vernetzende Potential von *cis*-2-Buten-1,4-dial zu bestimmen wurde eine Variante des Kometen-Tests verwendet. Es wurde dabei untersucht, ob die Vorbehandlung von Zellen mit *cis*-2-Buten-1,4-dial die durch γ -Strahlung induzierbaren Kometen reduzieren kann. Während die Positivkontrolle Glutaraldehyd die Kometen tatsächlich verringerte, blieb dieser

Effekt bei *cis*-2-Buten-1,4-dial aus. Im Gegenteil, bei einer Konzentration von ≥ 100 mM konnte durch die Zunahme von Zellen mit beginnender Apoptose ein Anstieg der Kometen beobachtet werden. Obwohl *cis*-2-Buten-1,4-dial sehr deutliche gentoxische und mutagene Effekte zeigte, beschränkte die hohe Zytotoxizität den auswertbaren Bereich. Möglicherweise kann diese Problematik einen Teil der un schlüssigen Ergebnisse erklären, sicher ist jedoch, dass für die Untersuchung der Mechanismen der Toxizität und Kanzerogenität ein Beitrag von nicht gentoxischen Effekten diskutiert werden muss.

Die ursprüngliche Idee, dass DNS-Addukte möglicherweise durch Protein-Addukte verhindert werden, wurde in einem ersten Experiment durch die Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin in Gegenwart von Glutathion, Glutamin oder *N*-Acetyl-L-cystein untersucht. Trotz der identifizierten stabilen Reaktionsprodukte von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Glutathion konnten die Addukte mit Desoxycytidin selbst durch einen Überschuss an Glutathion nicht verhindert werden. Im Gegenteil, die Zugabe von Glutathion zu den Inkubationslösungen steigerte sogar die Adduktbildung mit Desoxycytidin.

Als Fazit dieser Arbeit kann festgehalten werden, dass noch weitere Experimente nötig sind, um die Rolle von Glutathion, *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein für die Zytotoxizität, Mutagenität, Gentoxizität und Kanzerogenität von *cis*-2-Buten-1,4-dial zu bestimmen. Weiterhin ist es für eine Risikobewertung unabdingbar weitere Untersuchungen zum Auftreten der Furanmetaboliten im Urin der Kontrolltiere zu machen.

Summary

Furan has been found in a number of heated food items and is carcinogenic in the liver of rats and mice. Estimates of human exposure on the basis of concentrations measured in food are not reliable because of the volatility of furan. A biomarker approach was therefore indicated. Metabolism of furan includes the formation of an unsaturated dialdehyde, *cis*-2-butene-1,4-dial. In view of the multifunctional electrophilic reactivity of *cis*-2-butene-1,4-dial, adduct formation with protein and DNA may explain some of the toxic effects. DNA-adduction is a direct genotoxic effect. The major question was whether a direct genotoxicity of *cis*-2-butene-1,4-dial could be prevented by the reaction with protein structures. If so, the genotoxic and mutagenic effects are likely to show a threshold dose, reducing the cancer risk for low exposure levels.

We searched for metabolites excreted in the urine of male Fischer 344 rats treated by oral gavage with 40 mg furan per kg body weight. A control group received the vehicle oil only. Urine collected over two 24-hour periods both before and after treatment was analyzed by a column-switching LC-MS/MS method. Data were acquired by a full scan survey scan in combination with information dependent acquisition of fragmentation spectra by the use of a linear ion trap. Areas of 449 peaks were extracted from the chromatograms and used for principal component analysis (PCA). The first principal component fully separated the samples of treated rats from the controls in the first post-treatment sampling period. Thirteen potential biomarkers selected from the corresponding loadings plot were reanalyzed using specific transitions in the multiple reaction monitoring mode. Seven peaks that increased significantly upon treatment were further investigated as biomarkers of exposure. Fragmentation information indicated conjugation with glutathione on the basis of the characteristic neutral loss of 129 u for mercapturates. Adducts with the side chain amino group of *N*-acetyl-L-lysine were characterized by a neutral loss of 171. Analysis of products of *in vitro* incubations of the reactive furan metabolite *cis*-2-butene-1,4-dial with the respective amino acid derivatives supported five structures, including a new 3-methylthio-pyrrole metabolite probably formed by β -lyase reaction on a glutathione conjugate, followed by methylation of the thiol group. In a second animal study rats and mice were treated with seven different doses of furan in the range from 125 μ g to 8 mg per kg body weight. Dose-response and kinetic over 72 h of the seven identified biomarkers was examined by LC-MS/MS in the urine. In the rats all biomarkers showed a dose-dependent increase. In the mice one biomarker lacked of dose dependency. A high level of some biomarker in the urine of the control animals indicated endogenous formation of *cis*-2-butene-1,4-dial. Different excretion profiles were attributed to the formation of either protein adducts or glutathione conjugates. Whereas the

protein-derived biomarkers with a lysin moiety showed a slow excretion over more than 72 h, the glutathion-derived biomarkers were only excreted within the first 24 h.

Short-term tests for genotoxicity of furan in mammalian cells are inconclusive, little is known for *cis*-2-butene-1,4-dial. We investigated *cis*-2-butene-1,4-dial generated by hydrolysis of 2,5-diacetoxy-2,5-dihydrofuran for genotoxicity and mutagenicity in *Salmonella typhimurium* (Strain TA104) and in L5178Y mouse lymphoma cells. The Ames Test was negative in the preincubation assay with and without reduction of cytotoxicity by addition of glutathione after preincubation phase. Remarkable cytotoxicity limited the analysis range up to 4.5 $\mu\text{mol/plate}$. Mutagenicity and genotoxicity in L5178Y mouse lymphoma cells was evaluated using standard procedures for the comet assay, the micronucleus test, and the mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay. *cis*-2-butene-1,4-dial was tested at 0, 6.25, 12.5, 25, 50, and 100 μM . Cytotoxicity was remarkable; cell viability at 50 μM was reduced to <50%. Up to 25 μM , cell viability was >90%, and measures of comet assay and thymidine kinase mutations were increased over control about 1.7 and 2.2-fold, respectively. Analysis of three fully independent replicates with a linear mixed effects model showed a highly significant increase with concentration. Compared to methyl methanesulfonate used as positive control, *cis*-2-butene-1,4-dial was of similar potency for genotoxicity but much more cytotoxic. Furan added to the cells at concentrations of up to 60 mM was neither cytotoxic nor genotoxic. The lack of effect could be explained by deficiencies in metabolic activation of furan to *cis*-2-butene-1,4-dial. A potential cross-linking activity of *cis*-2-butene-1,4-dial was investigated by checking whether gamma radiation-induced DNA migration in the comet assay could be reduced by pretreatment with *cis*-2-butene-1,4-dial. As opposed to the effect of the positive control glutaraldehyde, *cis*-2-butene-1,4-dial treatment did not reduce the comets. On the contrary, an increase was observed at ≥ 100 μM *cis*-2-butene-1,4-dial, which was attributable to early apoptotic cells. Although *cis*-2-butene-1,4-dial was found to be a relatively potent genotoxic agent in terms of the concentration necessary to double the background measures, cytotoxicity strongly limited the concentration range that produced interpretable results. This may explain some of the inconclusive results and indicates that nongenotoxic effects must be taken into account in the discussion of modes of toxic and carcinogenic action of furan.

The initial idea that DNA adducts could be prevented by predominant adduction of *cis*-2-butene-1,4-dial with protein was examined in a first experiment by reaction of *cis*-2-butene-1,4-dial with deoxycytidine in the presence of glutathione, glutamine or *N*-acetyl-L-cysteine. Although stable reaction products of *cis*-2-butene-1,4-dial with glutathione were known from the

in vivo experiments addition of even an excess of glutathione could not prevent the reaction with deoxycytidine. On the contrary, addition of glutathione or *N*-acetyl-L-cysteine increased the concentration of adducts in the incubations.

In conclusion, further experiments will be necessary to address the role of glutathione, *N*-acetyl-L-cysteine and *N*-acetyl-L-lysine in the process of cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity. The finding of metabolites of furan in the urine of control animals should also be focused in future work on furan. An unavoidable background may be an important aspect in risk assessment for furan.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
^1H - ^1H -COSY	^1H - ^1H homonuclear correlation spectroscopy
BDA	<i>cis</i> -2-Buten-1,4-dial
BHT	Butylhydroxytoluol
δ	Verschiebung im ^1H -NMR-Spektrum nach der δ -Scala
dCyd	2'-Desoxycytidin
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EFSA	European Food Safety Authority
EMS	Enhanced Mass Spectrometry
ESI	Elektronen-Spray-Ionisation
g	Erdbeschleunigungskonstante
GC/EI-MS	Gas Chromatography/Electron Impact-Mass Spectrometry
GEMS	The Global Environment Monitoring System
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GSH	Glutathion
Gy	Gray
h	Stunde
AcOH	Essigsäure
Hz	Hertz
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDA	Information Dependent Acquisition
$J_{x,y}$	Kopplungskonstante zwischen den H-Substituenten x und y
KE	Klonierungseffizienz
LC	Liquid Chromatography
LC-MS/MS	Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry
LOQ	Limit of Quantitation
m/z	Masse-Ladungsverhältnis
MH	Mutantenhäufigkeit
min	Minute
MLA	Mouse Lymphoma Assay

Abkürzung	Bedeutung
MMS	Methyl methansulfonat
MRM	Multi-Reaction-Monitoring
MS	Massenspektrometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NTP	National Toxicology Program
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
ppm	parts per million
psi	pounds per square inch
Q1, Q2, Q3	erster, zweiter und dritter Quadrupol
SD	Standard Deviation
TD ₅₀	Tumorigene Dosis 50%
TK	Thymidinkinase
t _R	Retention time
u	unified atomic mass unit

EINLEITUNG

Die Hitzebehandlung von Speisen dient der Genießbarmachung, Haltbarmachung und Geschmacksverbesserung. Bei der Erhitzung laufen sogenannte Maillard-Reaktionen ab, welche eine Menge neuer chemischer Verbindungen freisetzen. Viele Reaktionsprodukte aus diesen nicht-enzymatischen Bräunungsreaktionen sind farbig oder haben einen intensiven Geschmack. Das Reaktionsprinzip der Maillardreaktion ist folgendes: Eine Aminosäure reagiert mit einem Zucker zu einer Schiffschen Base und kann verschiedene Umlagerungsreaktionen (z.B. Amadori- und Heynsumlagerung) oder Abbaureaktionen durchlaufen [1]. Eines der populärsten Produkte aus der Hitzebehandlung von Speisen ist das als Kanzerogen eingestufte Acrylamid [2, 3]. Hohe Konzentrationen davon fanden sich in Nahrungsmitteln wie Lebkuchen, Pommes Frites oder Knäckebrötchen und führten zu einer großen öffentlichen Diskussion. Während für die Entstehung von Acrylamid sehr hohe Temperaturen ($>170\text{ °C}$) nötig sind, gibt es auch eine große Anzahl von Maillardprodukten die bei weitaus geringeren Temperaturen entstehen. Eines dieser Produkte ist Furan, welches sich beispielsweise in Dosen- und Gläsernahrung mit Fleisch und/oder Gemüse in relativ hoher Konzentration ($>100\text{ }\mu\text{g/kg}$ Lebensmittel) befindet [4, 5]. Das Vorhandensein von Furan und auch seinen Derivaten ist seit langem bekannt und für die Aromabildung von großer Bedeutung [6]. Auch seine Kanzerogenität im Nagetier wurde bereits 1993 in einer NTP¹-Studie festgehalten [7]. Die „International Agency for Research on Cancer (IARC)“ klassifiziert Furan als mögliches humanes Kanzerogen [8]. Industriell wird Furan als Intermediat in der Polymersynthese von temperaturbeständigen Verbundwerkstoffen und als Bestandteil von Copolymeren für Spülmaschinendetergenzien verwendet. In den Blickpunkt der Öffentlichkeit geriet Furan in den letzten Jahren durch die vor allem in Gläsernahrung für Babys sehr hohen Konzentrationen. Neben einer stark emotionalen Komponente die eine Problemlösung verlangt, ist auch von wissenschaftlicher Seite die Kombination aus geringem Körpergewicht, hohem Nahrungsumsatz sowie der hohen Belastung des Nahrungsmittels sehr bedenklich und bedarf weiterer Abklärung. Bei der Diskussion von Furan als Gesundheitsrisiko müssen auch seine Derivate [6] mit einbezogen werden. Wenngleich sie sich in Siedepunkt, Löslichkeit und Konzentration unterscheiden, so ist es dennoch sehr wahrscheinlich, dass einige von ihnen mit einem ähnlichen Mechanismus wie Furan auf den Körper wirken. Die effektive auf die Organe wirkende Konzentration aller Furanderivate ist deshalb nur sehr schwierig zu erfassen. Die Aufklärung des Furanmetabolismus *in vivo* und die Kenntnis der genotoxischen und mutagenen Eigenschaften von Furan sind für eine fundierte Risikobewertung von großer Bedeutung.

1 National Toxicology Program der USA

KENNTNISSTAND

1. Bildung, Eigenschaften und Gehalte

Die Bildung von Furan in Lebensmitteln ist ein komplexer Prozess und scheint über diverse Wege möglich zu sein. Durch das Erhitzen von Gemischen aus diversen Zuckerderivaten und/oder Aminosäuren konnte eine Rangfolge für die Bildungsraten von Furan unter bestimmten Bedingungen (trocken, 250 °C) festgelegt werden [9]. Die größte Bildungsrate fand man beim Erhitzen von Ascorbinsäure gefolgt von den Gemischen bzw. Einzelsubstanzen Glycolaldehyde/Alanine, Erythrose, Ribose/Serin, Sucrose/Serin, Fructose/Serin und Glucose/Cystein. Aber auch

Tabelle 1: Übersicht über den Gehalt von Furan in den verschiedenen Lebensmittelkategorien und die daraus abgeleitete tägliche Aufnahme. Über die mittlere tägliche Aufnahme des jeweiligen Lebensmittels (LM) wurde die darüber aufgenommene Menge Furan pro Person und Tag errechnet. (Modifiziert nach [EFSA2004])

Lebensmittel- kategorie	Probenzahl n (k<LOQ ^b)	Gehalt in den (n-k) Proben		Mittlere tägliche Aufnahme des LM (GEMS/Food) (g/Tag)	Bereich der täglichen Aufnahme von Furan ^a (µg/Person)
		Min	Max		
		(µg/kg)			
Kaffee ^c	45 (4)	3	146	791	2.4 – 115.5
Babynahrung	273 (11)	1	112	234	0.2 – 26.2
Babymilch	19 (8)	2	13	870	1.7 – 11.3
Gemüse (Dose/Glas)	35 (7)	3	61	372	1.1 – 22.7
Fisch	6 (3)	5	7	47	0.2 – 0.3
Fruchtsäfte	18 (11)	1	6	69	0.07 – 0.4
Brot	13 (8)	2	30	176	0.4 – 5.3
Verschiedenes ^d	84 (11)	3	125	-	-
Fleischprodukte	11 (6)	4	39	217	0.9 – 8.5
Milchprodukte	1 (1)	<0.5		336	<0.2
Bier	12 (1)	5	195	258	1.3 – 50.3
Honig	5 (0)	3	10	1	0.003 – 0.01

^a Berechnet aus dem Min und Max der Proben über dem LOQ

^b Anzahl von Proben deren Gehalt kleiner als das Quantifizierungslimit (Limit of Quantitation; LOQ) waren .

^c Die Konzentration und die Aufnahmemenge beziehen sich auf trinkfertigen Kaffee. Die mittlere tägliche Aufnahmemenge wurde für Filterkaffee berechnet.

^d z.B. Suppen, Soßen, Tomaten- und Chili Saucen, Soya-Sauce

unter Druck und bei Anwesenheit von Wasser wurde Furan aus Zuckerderivaten gebildet [10]. Die Ausbeute war insgesamt deutlich geringer und konnte durch die Zugabe von Aminosäuren (Alanin, Serin) gesteigert werden. Ein weiterer Bildungsweg für Furan ist die Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Schlüsselintermediat ist hier das 4-Hydroxy-2-butenal, das durch Ringschluss zu Furan weiter reagieren kann [9].

Furan ist eine schwach aromatische Verbindung mit lipophilem Charakter und ist deshalb sehr gut in fett- und ölhaltigen Speisen löslich. Doch auch in reinem Wasser sind bei einer Temperatur von 25 °C 10 g/L löslich [11]. Diese zwar physikalisch geringe Löslichkeit reicht jedoch aus, dass in wässrigen, offen erhitzten Lebensmitteln wie Kaffee oder Bier trotz des geringen Siedepunktes von Furan (32 °C) relativ hohe Belastungen gefunden werden konnten (siehe Tabelle 1).

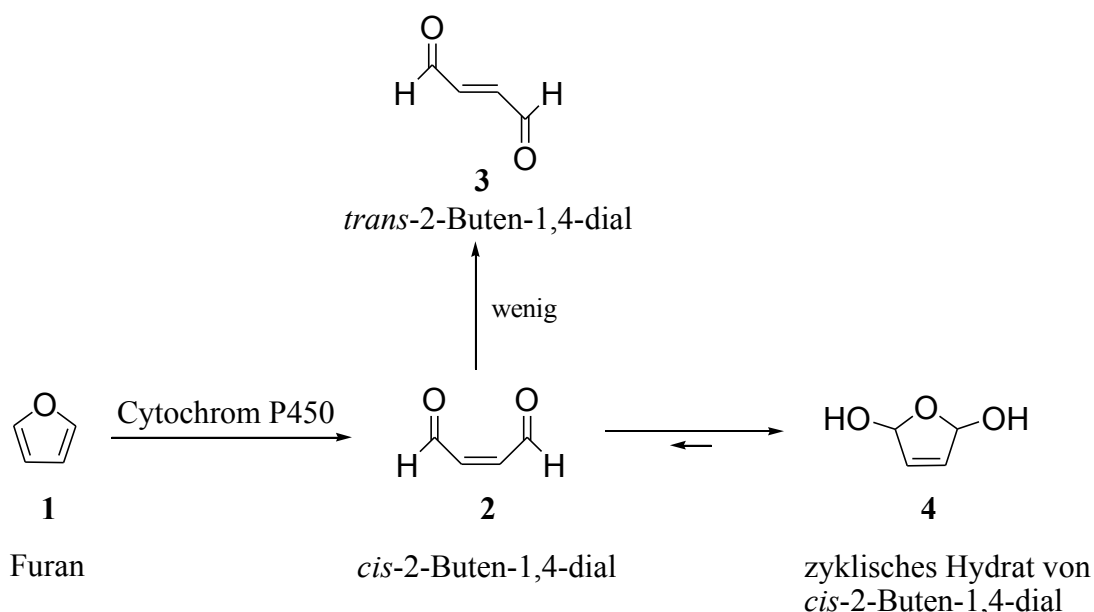
Trotz der guten Datenlage über den Gehalt in den einzelnen Lebensmitteln stellt sich die Frage, ob in Anbetracht der hohen Flüchtigkeit von Furan und einer möglichen Weiterverarbeitung und Lagerung der Nahrungsmittel eine verlässliche Expositionsabschätzung möglich ist.

2. Metabolismus von Furan zu *cis*-2-Buten-1,4-dial

Durch die einmalige Gabe von 8 mg ¹⁴C-markiertem Furan (**1**) pro kg Körpergewicht an Ratten wurde gezeigt, dass die über das Furan (**1**) verabreichte Aktivität innerhalb von 24 Stunden zu insgesamt 80% über die Lunge (14 % als Furan (**1**); 26% als CO₂), den Urin (20%) und den Faeces (22 %) ausgeschieden wird. Von der verbliebenen gewebegebundenen Radioaktivität in den untersuchten Organen entfiel der Hauptteil auf die Leber [12].

Furan (**1**) an sich ist kein Elektrophil und deshalb eher unreaktiv gegenüber endogenen Nukleophilen. Die Biotransformation von Furan (**1**) erfolgt, wie durch Inhibitions- und Induktionsexperimente gezeigt wurde, durch die Monooxidase Cytochrom P450 2E1 (siehe Schema 1). Hauptmetabolit der Oxidation mit CYP 2E1 ist der α - β -ungesättigte Dialdehyd *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**)² [13]. Der genaue Reaktionsablauf der Oxidation konnte nicht aufgeklärt werden, da weder ein intermediäres Epoxid noch andere Zwischenstufen nachzuweisen waren [14]. Ein weiterer oxidativer Abbau von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) erfolgte zu Kohlenstoffdioxid [12]. Eine Isomerisierung von *cis*- zu *trans*-2-Buten-1,4-dial könnte zwar prinzipiell stattfinden,

² Nach UPAC-Empfehlung: (Z)-Buten-1,4-dial; In der Literatur: *cis*-2-Buten-1,4-dial



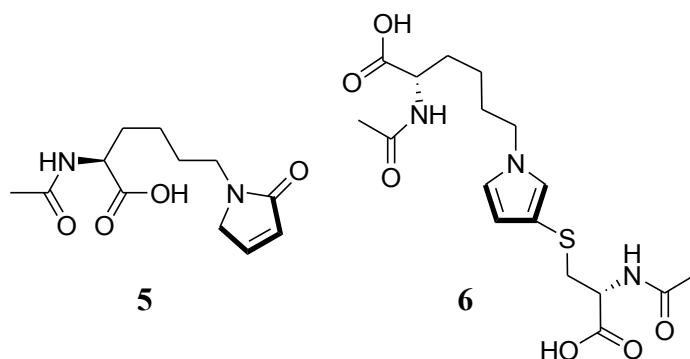
Schema 1: Oxidative Metabolisierung von Furan (1) zu cis-2-Buten-1,4-dial (2) durch die Monooxidase Cytochrom P450 2E1. Nach der Freisetzung von cis-2-Buten-1,4-dial (2) wird die Isomerisierung zu trans-2-Buten-1,4-dial in wässriger Lösung durch die Bildung des zyklischen Hydrats 4 unterdrückt.

wurde aber durch die Bildung eines zyklischen Hydrates aus dem cis-Isomer unter physiologischen Bedingungen weitgehend verhindert [14, 15].

Durch die Behandlung von Maus-, Ratten- und Humanhepatozyten mit Furan (1) konnten kinetische Parameter zur Furanbiotransformation abgeleitet werden. Durch kinetische Modelle konnte daraus für die inhalative Aufnahme errechnet werden, dass die Furanoxidation in der Maus, der Ratte und dem Menschen selbst bei Konzentrationen von 300 ppm über vier Stunden schneller abläuft, als Furan (1) über das Blut in die Leber transportiert wird [13, 16]. Da eine Atemluftkonzentration von 300 ppm bereits letal ist, kann bei oraler Aufnahme davon ausgegangen werden, dass die Furanoxidation nicht zu sättigen ist.

3. Reaktivität von *cis*-2-Buten-1,4-dial gegenüber protein-abgeleiteten Modellnucleophilen und Glutathion

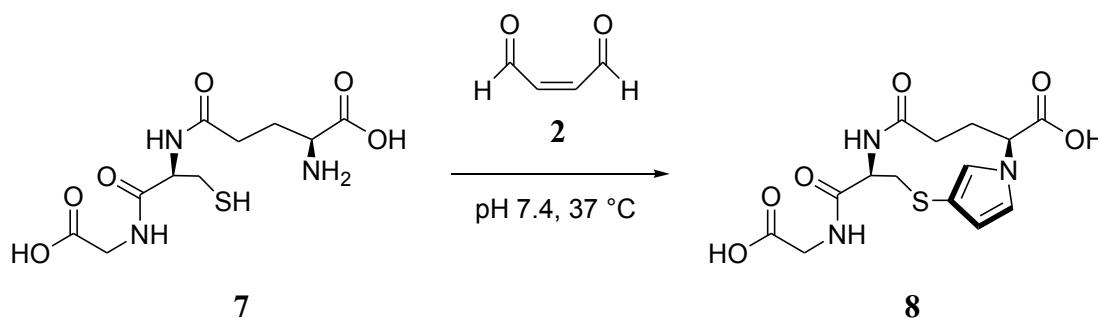
Die Reaktivität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) gegenüber Peptiden (Glutathion (**7**)) und Aminosäurederivaten (*N*-Acetyl-L-cystein und *N*-Acetyl-L-lysin) wurde *in vitro* unter physiologischen Bedingungen sehr ausführlich untersucht [15]. *N*-Acetyl-L-lysin wurde stellvertretend für die Amino-Seitenketten, *N*-Acetyl-L-cystein für die Thiol-Seitenketten eingesetzt. Es wurde auf diese Weise ein Profil der Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit einem Amin, einem Thiol oder beiden funktionellen Gruppen erstellt. Mit *N*-Acetyl-L-cystein alleine wurde unter physiologischen Bedingungen keine Reaktion beobachtet. Mit *N*-Acetyl-L-lysin hingegen bildete sich die Pyrrolin-2-on-Struktur **5**. Konnte *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit beiden Nucleophilen gleichzeitig reagieren, so erhielt man das in 3-Position schwefel-substituiertes Pyrrol **6** am Stickstoff der Lysin-Seitenkette.



Schema 2: Reaktionsprodukte von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2**) mit *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein.** *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) reagiert unter physiologischen Bedingungen mit *N*-Acetyl-L-lysin alleine zur Pyrrolin-2-on-Struktur **5**, sowie mit *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein gemeinsam zur 3-thio-substituierten Pyrrol-Struktur **6**. Die fetten Bindungen sollen die vier vom Furan (**1**) stammenden Kohlenstoffatome hervorheben.

Die Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Glutathion (**7**) stellte den Realfall nach, da Glutathion (**7**) auch *in vivo* als Reaktionspartner für *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) vorhanden ist. Glutathion (**7**) liegt in Zellen in einem Konzentrationsbereich von ca. 0.5-10 mM vor und ist für die Detoxifizierung von elektrophilen Strukturen das bedeutendste Molekül [17]. Es wurde gezeigt, dass *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Glutathion (**7**) in Abhängigkeit vom Konzentrationsverhältnis eine Vielzahl zyklischer und polymerer Strukturen bildet. All diesen Verbindungen

gemein ist die thio-substituierte Pyrrol-Struktur [15, 18]. Von besonderer Bedeutung ist das bereits im Urin von furanbehandelten Ratten nachgewiesene zyklische Glutathionkonjugat **8** in Schema 3 [19]. Weitere furanabgeleitete Metaboliten wurden zwar *in vivo* postuliert, aber bisher nicht strukturell nachgewiesen [12, 19].



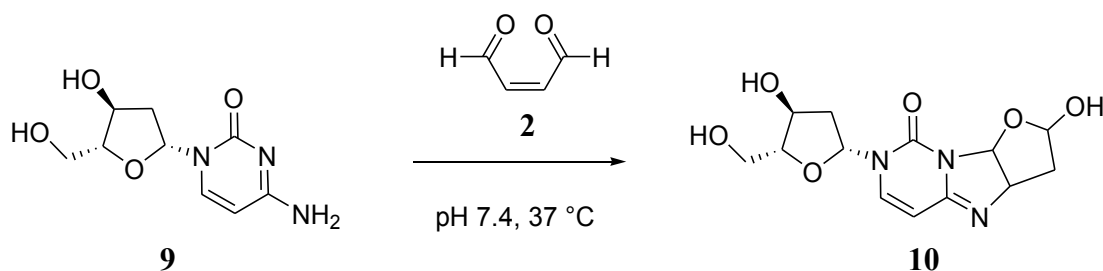
Schema 3: Reaktion von Glutathion (7) mit cis-2-Buten-1,4-dial (2). Das Glutathionkonjugat **8** entstand durch die Reaktion von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit Glutathion (7). Charakteristisch ist der thio-substituierte Pyrrolring. Die fetten Bindungen sollen die vier vom Furan (1) stammenden Kohlenstoffatome hervorheben.

4. Reaktivität von cis-2-Buten-1,4-dial gegenüber desoxyribonukleinsäure-abgeleiteten Modellnucleophilen

Ein für die toxikologische Beurteilung eines Elektrophils sehr wichtiges Detail ist die Reaktionsfähigkeit mit DNS-Nucleophilen, da dies einen Hinweis auf das genotoxische Potential dieser Substanz liefert. In diesem Zusammenhang wurde die Reaktivität von cis-2-Buten-1,4-dial (2) gegenüber den Nucleosiden³ Desoxyadenosin, Desoxycytidin (9) und Desoxyguanosin untersucht [20]. Die höchste Reaktivität unter physiologischen Bedingungen zeigte cis-2-Buten-1,4-dial (2) gegenüber Desoxycytidin (9). Bezüglich der Rangfolge der beiden anderen Nucleoside gab es unterschiedliche Ergebnisse von zwei Arbeitsgruppen [20, 21]. Die Reaktionsprodukte von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit den Nucleosiden wurden umfangreich strukturell aufgeklärt [21, 22].

Ebenfalls wurde gezeigt, dass eine Reaktion sowohl mit isolierter als auch mit im lebenden Bakterium befindlicher DNS möglich ist [23]. Es wurden dazu die Addukte von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit Desoxycytidin (9) und Desoxyadenosin nachgewiesen und quantifiziert.

³ Nucleosid ist eine mit Desoxyribose verknüpfte DNS-Base. Im Vergleich dazu hat das Nucleotid zusätzlich eine Phosphatgruppe.



Schema 4: Adduktbildung von *cis*-2-Buten-1,4-dial **2 mit Desoxycytidin (**9**). Das Addukt **10** ist das stabilste und in der DNS am meisten gebildete Nucleosid-Addukt von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**).**

Die Analyse erfolgte mittels LC-gekoppelter Tandemmassenspektrometrie. Zur Umgehung chromatographischer Probleme wurde die noch am Addukt **10** in Form eines Halbacetals vorhandene Carbonylgruppe vor dem Verdau der DNS mit *O*-Benzyl-hydroxylamin derivatisiert. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang, dass es einer anderen Gruppe möglich war zu zeigen, dass das Isomer *trans*-Buten-1,4-dial (**2**) aus dem oxidativen Abbau von phosphatgebundener Desoxyribose entstehen kann [24]. Da das *trans*-Isomer eine ungefähr zehnfach höhere Reaktivität gegenüber Desoxyribonucleosiden aufwies [21] und bei der Freisetzung aus Desoxyribose in lokaler Nähe zur DNS gebildet wird, kann nicht ausgeschlossen werden, dass im Zusammenhang mit oxidativem Stress erhöhte Adduktlevel beobachtet werden.

Für die Situation *in vivo* stellt sich die Frage, ab welchen Zellkonzentrationen die Adduktbildung *cis*-Buten-1,4-dial mit der DNS relevant wird. Die im Kenntnisstand Teil 3 diskutierte große Reaktivität mit Peptiden und Aminosäurederivaten kann möglicherweise einen Schutz der DNS darstellen.

5. Kanzerogenität von Furan in Ratte und Maus

Die Kanzerogenität von Furan (**1**) wurde in der Maus und der Ratte im Rahmen einer zwei Jahres NTP-Studie untersucht [7]. In beiden Spezies konnte ein dosisabhängiger Anstieg der hepatozellulären Adenome und Karzinome gefunden werden. Rattenspezifisch war die Induktion von Gallengangskarzinomen mit einer Inzidenz von nahezu 100% bereits bei der niedrigsten verabreichten Dosis von 2 mg Furan (**1**) pro kg Körpergewicht. Berechnet man aus der Inzidenz der Gallengangstumore die "Tumorigene Dosis 50%" (TD₅₀), d.h. die Tagesdosis bei der die Hälfte der untersuchten Tiere tumorfrei bleiben würde, so liegt diese mit ca. 0.4 mg [25]

Tabelle 2: Induktion von Tumoren in der Ratte nach der oralen Gabe (5 Tage pro Woche) von Furan (1) über zwei Jahre. Es wurden je Dosisgruppe jeweils 50 weibliche und männliche Ratten behandelt. In beiden Geschlechtern konnten Gallengang- und Leberzellkarzinome beobachtet werden.

Karzinom	♂/♀	Häufigkeit in den Dosisgruppen			
		0 mg/kg KG	2 mg/kg KG	4 mg/kg KG	8 mg/kg KG
Gallengangskarzinom	♂	0	43	48	49
	♀	0	49	50	48
Leberzellkarzinom	♂	0	5	22	35
	♀	0	2	4	7

nur ca. Faktor 400 über der Dosis die ein 10 kg schweres Baby aufnimmt, wenn es täglich 100 g eines Nahrungsmittels isst, welches mit 100 µg Furan/kg belastet ist. Dieser Sicherheitsfaktor ist sehr gering, wenn man davon ausgeht, dass die Kanzerogenität von Furan (1) über einen direkten gentoxischen Mechanismus vermittelt wird. Als direkt gentoxisch bezeichnet man Substanzen, die direkt zu einer Modifikation des genetischen Materials führen. Für die Beurteilung muss dann das Krebsrisiko zu niedrigen Dosen hin linear extrapoliert werden. Für einen nicht oder indirekt gentoxischen Mechanismus kann eine Schwellendosis für die kanzerogene Wirkung diskutiert werden, unterhalb derer kein Schaden am genetischen Material entsteht.

6. Gentoxizität und Mutagenität von Furan

Da Furan (1) an sich keine hohe Reaktivität besitzt und sehr schnell metabolisiert wird, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Kanzerogenität von Furan (1) durch den reaktiven Metaboliten *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) verursacht wird. Man erwartet folglich positive Gentoxizitätsdaten zu Furan (1) in Testsystemen welche fähig sind Furan (1) zu *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) zu oxidieren. Dies kann erreicht werden, indem entweder Zellen mit aktivem Cytochrom P 450 2E1 verwendet werden, oder die metabolische Aktivierung extrazellulär nach Zugabe von z.B. S9-mix⁴ erfolgt. In beiden Fällen ergeben sich durch die geringe Wasserlöslichkeit und hohe Flüchtigkeit von Furan (1) Probleme hinsichtlich der Testdurchführung und Bewertung. Ein weiterer Punkt

⁴ S9 mix ist eine Mischung aus verschiedenen Leberenzymen in Mikrosomen und Zytosol welche durch Zentrifugation von Leberzellhomogenat bei 9000 g gewonnen wird.

welcher bei der Bewertung von gentoxischen Daten zu Furan (1) kritisch betrachtet werden sollte, ist die mögliche Autoxidation von Furan (1). Furan (1) gelangt normalerweise mit dem Antioxidans Butylhydroxytoluol (BHT) stabilisiert in den Handel. Ist dies nicht der Fall, könnte es bei der Verwendung von sehr hohen Furankonzentrationen zu einer Beeinflussung des Tests durch die Bildung von Radikalen oder anderen Zersetzungsprodukten kommen. In Anbetracht dieser Fehlerquellen bei der Handhabung von Furan (1) ist es nicht verwunderlich, dass die Ergebnisse zur Gentoxizität von Furan (1) nicht vollkommen schlüssig sind [4, 8].

Besonders fraglich sind in diesem Zusammenhang die positiven Ergebnisse einer NTP Studie [7, 26] bezüglich der Mutation im Thymidinkinase-Gen in L5178Y Mauslymphomzellen ohne die Zugabe eines aktivierenden Systems. Ab einer Konzentration von 3 mg/L wird dort ein sprunghafter Anstieg der Mutationsrate beobachtet. Gleichzeitig findet man allerdings eine deutliche Verringerung der Zellvitalitätsparameter, was die Interpretation der Ergebnisse einschränkt. In der Publikation finden sich weder Hinweise auf die Verwendung von stabilisiertem Furan (1) noch auf die Bestimmung der effektiven Furankonzentration in der Inkubation.

Durchweg negativ waren die Untersuchungen zu Furan (1) im Ames-Test in der oben genannten Studie [7]. Die untersuchten Stämme von *Salmonella typhimurium* zeigten weder mit noch ohne die Aktivierung durch S9-mix eine Erhöhung der Mutationsrate. Lediglich ein Test zeigte sowohl mit als auch ohne S9-mix ein schwach positives Resultat für den Stamm TA100 [27]. Auf Grund des geringen Effektes kann dieses Ergebnis jedoch nicht für eine Diskussion der Gentoxizität herangezogen werden.

Eine neuere Studie untersuchte die Mikrokernbildung in Mäusen bzw. einer Humanlymphozytenzelllinie nach Furanbehandlung [28]. Weder *in vivo* noch in der Zelllinie (mit und ohne Aktivierungssystem) konnte eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz beobachtet werden.

7. Gentoxizität und Mutagenität von *cis*-2-Buten-1,4-dial

Ein Indiz für einen gentoxischen Wirkmechanismus einer Substanz ist die Reaktionsfähigkeit mit DNS-Basen. Reaktionsprodukte von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) mit DNS-Nukleosiden wurden, wie bereits im Teil 3 diskutiert, sehr ausführlich untersucht und strukturell aufgeklärt [20-22, 24, 29]. Nach der Quantifizierung der Nukleosidaddukte mit Desoxycytidin (9) und Desoxyadenosin in der Bakterien-DNS des *Salmonella Typhimurium*-Stammes TA104

[23] konnten diese im Bakterium mit der Mutationsrate eines 6 Jahre zuvor analog durchgeführten Ames-Tests korreliert werden [30]. Dieser Ames Test wurde unter Verwendung eines speziellen Protokolls zur Unterdrückung der Zytotoxizität durchgeführt [31]. Während alle anderen Stämme negativ getestet wurden, ergab sich für diesen Stamm eine sehr deutlich erhöhte Anzahl von Mutanten bei einer Konzentration von 1.4 μmol pro Platte. Kritisch hinterfragt werden muss bei diesen Ergebnissen, warum die Korrelation der DNS-Addukte mit der Mutagenität auf Basis der alten Daten vorgenommen wurde und parallel kein erneuter Test auf Mutagenität durchgeführt wurde. Darüber hinaus konnte in den Ames-Experimenten die Abwesenheit von Hydrogenperoxid aus der *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) Synthese nur über Umwege nachgewiesen werden. Die Peroxidfreiheit ist allerdings für den gegenüber oxidativen Einflüssen empfindlichen Stamm TA104 [32] von großer Bedeutung.

Einen weiteren Hinweis auf die gentoxische Wirkung einer Substanz kann die Untersuchung auf Strangbrüche und Vernetzungen an der DNS liefern. In Untersuchungen zur Gentoxizität in Eizellen des chinesischen Hamsters konnte mit dem „alkaline elution assay“⁵ gezeigt werden, dass *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) im millimolaren Konzentrationsbereich zu DNS-Strangbrüchen und Vernetzungen führt [33].

5 Der „alkaline elution assay“ ist vergleichbar mit dem Kometentest (engl. Comet assay)

ZIELSETZUNG

Ziel der Dissertation war es den im Kapitel "Kenntnisstand" gestellten Fragen nachzugehen, um die Bedeutung des Metabolismus und der Adduktbildung mit Aminosäuren und DNS für die Gentoxizität, Mutagenität und Kanzerogenität besser zu erfassen.

Für eine fundierte Risikobewertung von Furan (**1**) ist es essentiell zu klären, ob die furaninduzierte hohe Kanzerogenität in der Ratte gentoxischer Natur ist oder andere Mechanismen berücksichtigt werden müssen. Für die Abschätzung des Krebsrisikos bei niedrigerer Exposition mit der gentoxisch wirkenden Substanz wird grundsätzlich von der im Tier bestimmten Dosis-Wirkungs-Beziehung linear extrapoliert. Dadurch wird das Risiko einen Tumor zu entwickeln mit der Dosis zwar geringer aber es ist immer noch latent und berechenbar. Die Festsetzung einer „Unbedenklichkeitsschwelle“ unterhalb derer keine Wirkung zu beobachten ist, ist somit nicht möglich. Dieses Vorgehen ist darin begründet, dass gentoxische Reagenzien direkt mit dem Erbgut in Wechselwirkung treten und somit bereits die Reaktion von nur einem Molekül eine an der Tumorentstehung beteiligte Mutation hervorrufen kann. Die Annahme einer nicht linearen Dosis-Wirkungs-Kurve kann nur erfolgen, wenn dies der Wirkmechanismus rechtfertigt. Im Falle von Furan (**1**) und seinem Metaboliten *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) sind durch die Literaturdaten Indizien für einen gentoxischen Mechanismus vorhanden. Besondere Bedeutung haben der Nachweis von DNS-Addukten und die Mutagenität im Bakterium (Ames-Test). Dennoch bestehen Zweifel daran, ob und zu welchem Anteil die gentoxischen Eigenschaften in Ratte, Maus und Mensch bei der Tumorentstehung zum Tragen kommen. Beachtenswert ist in diesem Zusammenhang, dass die in Ratten mit hoher Inzidenz beobachteten Gallengangskarzinome in der Maus völlig fehlen. Möglicherweise hat *in vivo* die Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Protein und Aminosäuren eine große Bedeutung und moduliert die Entstehung der Tumoren.

Die Literaturdaten präsentieren zur Reaktivität von Furan (**1**) eine Fülle von Information. Komplexe Wechselwirkungen des Elektrophils *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit DNS, DNS-Basen und Aminosäuren sind beschrieben [15, 18] und konnten in Vorversuchen zu dieser Dissertation teilweise bestätigt werden. Dennoch ist es nicht möglich mit Hilfe der zumeist *in vitro* produzierten Daten eine Aussage über die relativen Reaktivitäten und mögliche Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Nukleophilen *in vivo* zu machen. Es sollte deshalb mit Hilfe von geeigneten *in vivo* Versuchen geklärt werden, welche Reaktionspartner von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) bevorzugt werden. Eine dafür anerkannte Methode ist die Untersuchung von Urin auf

stabile Metaboliten. Die dabei identifizierten Metaboliten sollten anschließend auf die Tauglichkeit als Biomarker für eine Furanexposition untersucht werden.

Die Literaturdaten zur *in vitro* Gentoxizität von Furan (1) und *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) werfen einige Fragen auf. Der positive Ames-Test im Stamm TA104 wird zwar durch den späteren Nachweis von DNS-Addukten im gleichen Stamm gestützt, muss allerdings auf Grund eines vagen Ausschlusses von Kontaminationen durch Peroxide und der fehlenden Reproduktion der Mutagenität bei den Studien zur DNS-Adduktbildung kritisch hinterfragt werden. Es war deshalb zum einen geplant den positiven Ames-Test im Stamm TA104 mit peroxidfreiem *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) zu reproduzieren. Zum anderen sollte bei gleichzeitiger Beobachtung der zytotoxischen Effekte das Ausmaß der DNS-Fragmentierung, die Anzahl Doppelstrangbrüche und die Mutationsrate in mit Furan (1) und *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) behandelten L5178Y Mauslymphomzellen untersucht werden.

ERGEBNISSE

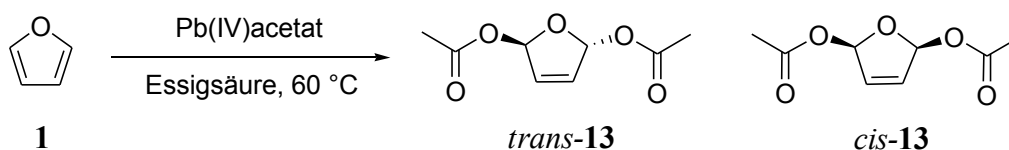
1. Darstellung von *cis*-2-Buten-1,4-dial

1.1 Einführung

Da die Lagerung von reinem *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) auf Grund der Bildung von Polymerisierungs- und Isomerisierungsprodukten nur begrenzt möglich ist, war es nötig *cis*-2-Buten-1,4-dial vor jedem Experiment frisch herzustellen. Die Literatur kennt dazu drei Synthesewege. Die Oxidation von Furan durch Dimethyldioxiran [14, 34] wirft speziell bei der Verwendung in Zellkulturen zur Bestimmung der Gentoxizität die Frage nach einer möglichen Peroxidkontamination auf. Darüber hinaus muss auf Grund der nicht quantitativen Reaktion die Konzentration von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) in der Lösung aufwendig bestimmt werden. Umgangen werden diese Probleme durch die Hydrolyse von 2,5-Dimethoxy-2,5-dihydrofuran. Da hierfür jedoch stark saure Bedingungen oder Hitze nötig sind [35, 36], ist auch diese Methode nur bedingt für eine Verwendung unter physiologischen Bedingungen geeignet. Eine Methode, welche ohne den Einsatz von Peroxiden und starken Säuren auskommt, ist die Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**) [29]. Die Verwendung von **13** hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Konzentration der Lösung durch Einwaage festgelegt werden konnte.

1.2 Darstellung von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran

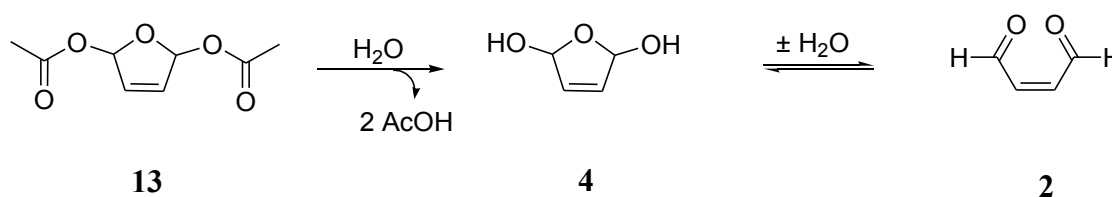
Die Darstellung von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran erfolgte im Wesentlichen nach Literaturangaben (siehe Schema 5) [29, 37]. Um den Zerfall von Pb-(IV)-acetat zu PbO₂ durch Wasser zu verhindern wurde die Essigsäure mit 4-Vol% Essigsäureanhydrid versetzt. Nach Abschluss der Reaktion wurde mit Hilfe der Säulenchromatographie aufgereinigt. Sowohl die GC-MS-Kopplung als auch die ¹H-NMR-Spektroskopie zeigten eine Reinheit von ~99%. Die Ausbeute war 80%.



Schema 5: Oxidation von Furan (1) mit Blei-(IV)-tetraacetat zu *cis*-/*trans*-2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (13).

1.3 Hydrolyse 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran zu cis-2-Buten-1,4-dial

Die Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**) zu cis-2-Buten-1,4-dial (**2**) erfolgte in Wasser. Dabei bildete sich zunächst das zyklische Hydrat **4** das mit cis-2-Buten-1,4-dial (**2**) im Gleichgewicht steht. Unter den gewählten Bedingungen liegt das Gleichgewicht vollständig auf der Seite von **4**. Für alle Experimente wurde cis-2-Buten-1,4-dial (**2**) zunächst als 100 mM Lösung hergestellt und anschließend verdünnt. Der pH-Wert der Lösung lag durch die Freisetzung von Essigsäure bei 3.



Schema 6: Darstellung von cis-2-Buten-1,4-dial (**2**) durch die Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**). Die cis-Stellung wird durch die bevorzugte Bildung des zyklischen Hydrates 2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran (**4**) stabilisiert.

Der Verlauf der Hydrolyse wurde in NMR-Experimenten untersucht. Abbildung 1 zeigt die NMR-Spektren nach zwei und nach 24 Stunden. Die dem 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**) zugeordneten Signale im Bereich von 6.3-7.0 ppm verschwinden nach 24 Stunden fast vollständig. Die Signale des 2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran (**4**) im Bereich von 5.7-6.2 ppm wurden in gleichem Maße größer. Sowohl bei Verbindung **13** als auch bei **4** lagen die cis-/trans-Isomeren im Verhältnis 1:2 vor. Für die Bestimmung des Reaktionsfortschritts wurden die Signale der Isomeren addiert. Es konnte so gezeigt werden, dass die Hydrolyse zu **4** nach 24 Stunden zu 97% komplett war. Es wurde angenommen, dass die weitere Verdünnung durch Wasser und die 37 °C warmen physiologischen Lösungen die Hydrolyse vervollständigten.

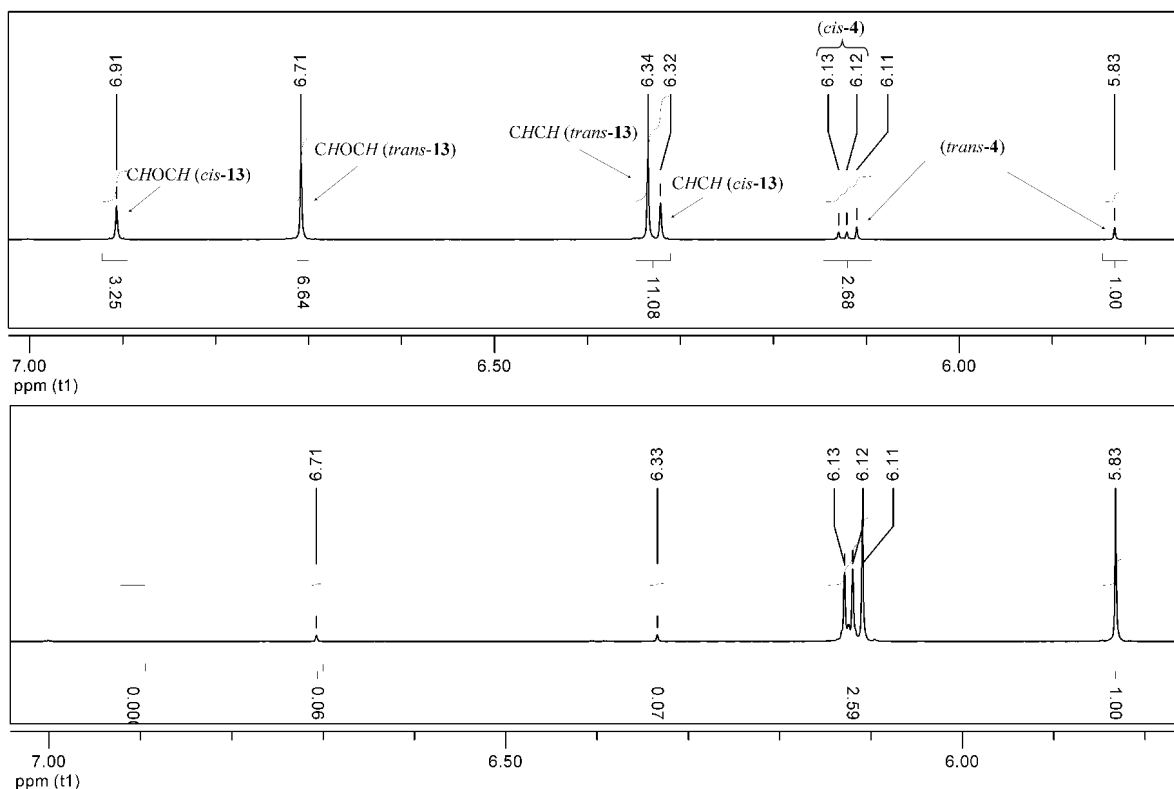


Abbildung 1: NMR-Spektren von der Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (13) zu 2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran (4) nach zwei Stunden (oben) und nach 24 Stunden (unten). Die jeweils als cis-/trans-Isomere vorliegenden Verbindungen sind anhand der unterschiedlichen Verschiebungen gut zu integrieren. Nach 24 Stunden bei Raumtemperatur war die Hydrolyse zu 97% vollständig.

2. Identifizierung von Expositionsbiomarkern nach Furangabe an Ratten

2.1 Einführung

Auf Grund der komplexen Reaktivität *in vitro* war zu erwarten, dass geeignete Biomarker einer Furanexposition im Urin von Tieren nur schwierig identifizierbar sind. Es wurde deshalb mit der statistischen Technik der Hauptkomponentenanalyse versucht, aus einer unübersehbar großen Anzahl von Substanzen im Rattenurin, diejenigen heraus zu filtern welche eindeutig mit der Exposition ihre Konzentration ändern. Diese Methode hatte sich bereits bei der Identifizierung von diversen Metaboliten bewährt [38-41]. Für die Analyse der Substanzen im Urin stellt die LC-MS/MS-Kopplung⁶ ein wichtiges Hilfsmittel dar. Sie ermöglicht es auf sehr einfachem Weg die meist hydrophilen Metaboliten ohne vorherige Derivatisierung und Extraktion mit einem Massenspektrometer zu detektieren. Das wichtigste Ionisationsverfahren dieser Kopplung ist die Elektrospray-Ionisation (ESI), welche die Analyten vom Lösungsmittel trennt (siehe Abbildung 2).

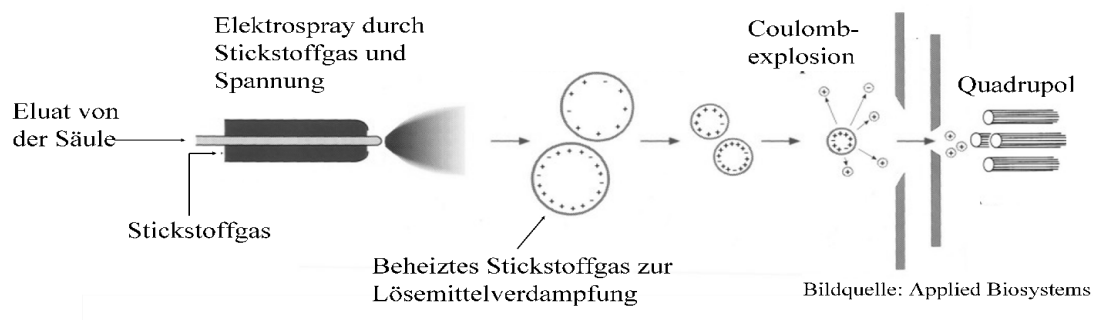


Abbildung 2: Elektrospray-Ionisation. Die Analyse von wässrigen Lösungen wird durch die Elektrospray-Ionisation unter Normaldruck ermöglicht. Dazu wird die wässrige Phase der analytischen Säule mit Stickstoffgas unter Spannung vernebelt. Die sich dabei bildenden geladenen Flüssigkeitstropfen werden dann durch Verdampfung mit beheiztem Stickstoffgas in ihrem Volumen verkleinert. Die starke Erhöhung der Ladungsdichte führt zu einer Coulomb-explosion, welche einzelne Ionen freisetzt. Diese sehr „sanfte“ Ionisierung setzt normalerweise nur die Moleküle frei die mit den nachgeschalteten Quadrupolen auf vielfältige Weise analysiert werden können.

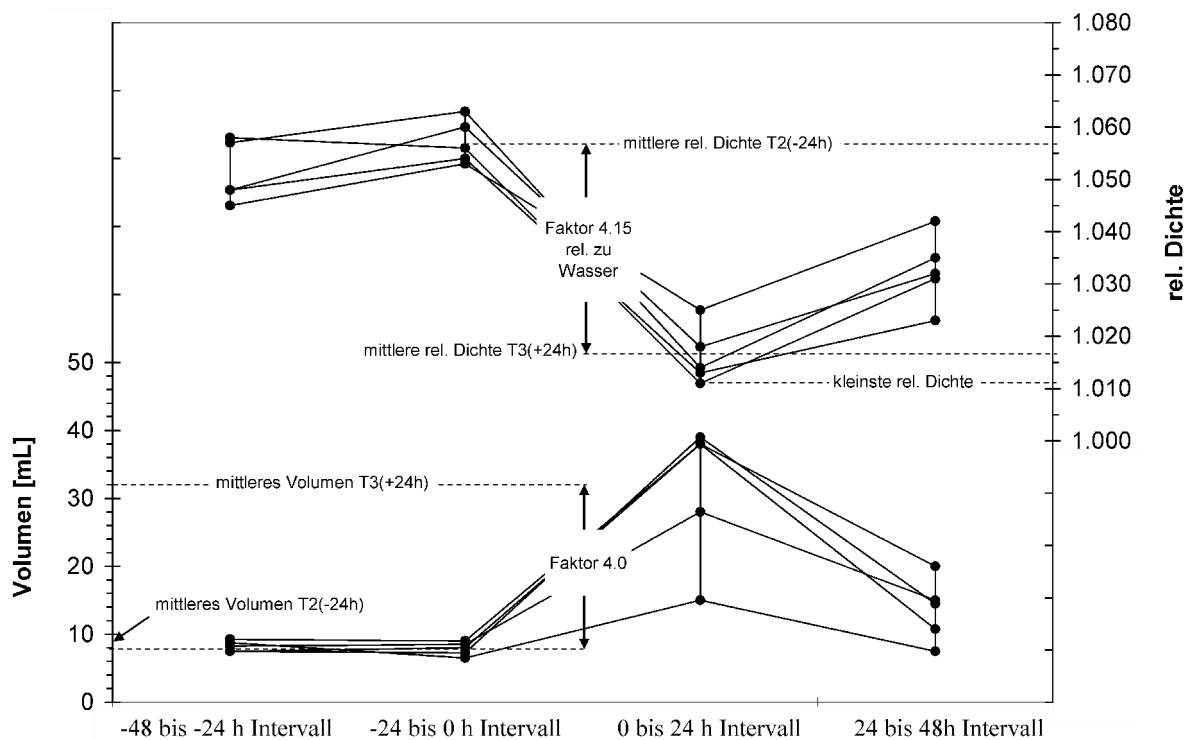


Abbildung 3: Urinausscheidung der Ratten (mL pro Tag [links] bzw. Dichte [rechts]) vor und nach der Applikation von Furan. Durch die Exposition zum Zeitpunkt $t=0$ h wurde die Urinausscheidung der behandelten Tiere im 0 bis 24 Stunden Intervall von durchschnittlich 9 mL in 24 Stunden auf 32 mL erhöht. Diese Erhöhung um Faktor 4 spiegelt sich gleichzeitig in der Verringerung der durchschnittlichen relativen Dichte um Faktor 4.15 relativ zu Wasser wieder. Die kleinste bestimmte relative Dichte lag bei 1.011.

2.2 Tierversuch und Probenvorbereitung

Der Rattenstamm Fischer 344 wurde entsprechend einer NTP-Studie [7] gewählt, um die Effekte der verwendeten Dosis besser einschätzen zu können. Die im Rahmen der NTP-Studie verwendete Einmaldosis von 40 mg Furan (1) pro kg Körpergewicht in Öl wurde auch bei wiederholter Gabe über 16 Tage gut toleriert. Das hier vorgestellte Tierexperiment bestand aus einer Dosis- und einer Kontrollgruppe zu je fünf Tieren. Die Dosisgruppe erhielt per Schlundsonde Furan (1) in Öl, die Kontrollgruppe nur Öl in gleicher Menge. Der Urin der Tiere wurde in 24 Stundenintervallen über einen Zeitraum von insgesamt 96 Stunden gesammelt. Zwei der Sammelintervalle lagen vor der Exposition, zwei danach. Nach Verabreichung konnte beobachtet werden, dass sich das Urinvolumen der mit Furan (1) behandelten Tiere im Mittel um Faktor vier erhöhte (siehe Abbildung 3), während das der Kontrolltiere im Mittel unverändert blieb. Um herauszufinden, ob mit dieser Volumenänderung auch eine Konzentrationsänderung

der im Urin enthaltenen Substanzen in gleichem Umfang verbunden ist, wurde der Kreatinin-, der Harnstoff-, der Natrium- und der Kaliumgehalt, sowie die Osmolarität und die relative Dichte jedes einzelnen Urins bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentrationen bzw. Werte nach Exposition entsprechend um ca. Faktor vier kleiner wurden. Die beobachtete Volumenänderung nach Exposition war somit einer Verdünnung mit Wasser gleichzusetzen. In Abbildung 3 wurde dieser Verdünnungseffekt exemplarisch anhand der relativen Dichte dargestellt. Um die Auswirkungen der Konzentrationsänderungen auf die Analytik zu minimieren und um die Konzentrationen von Substanzen im Urin vergleichbar zu machen, wurde jeder einzelne Urin auf eine relative Dichte von 1.01 verdünnt und durch Zugabe von 4 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt.

2.3 Analyse der Rattenurine mit Tandemmassenspektrometrie

Die auf eine einheitliche Dichte verdünnten Rattenurine wurden mittels einer HPLC⁷/Tandemmassenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS) analysiert. Den chromatographischen Teil der Methode bildete eine Säulenschaltung unter Verwendung von Säulen mit Umkehrphase. Die Säulenschaltung ist ein in die Analyse integrierter Vorgang der Probenaufreinigung und vergleichbar mit der Festphasenextraktion. In einem ersten Intervall wurde die Probe mittels eines Probengebers auf eine kurze, sogenannte „Trap-Säule“ injiziert und dann mit einem von einer HPLC-Pumpe geförderten Lösungsmittelgemisch von polaren unerwünschten Substanzen gereinigt. In einem zweiten Intervall wurden dann die auf der Säule fixierten Analyten über eine längere analytische Säule mit einer zweiten HPLC-Pumpe eluiert. Die „Verschaltung“ der Säulen untereinander, mit den Pumpen und dem Massenspektrometer erfolgt mit einem elektronisch gesteuerten Schaltventil. Der Vorteil dieser Methode ist eine reproduzierbarere Chromatographie und ein reduzierter Ionengehalt der ins Massenspektrometer transferierten Probe. Dies ist vor allem bei dem verwendeten Elektrospray-Ionisationsverfahren (siehe Abbildung 2) von großer Bedeutung, da dort die Ionisierung der Probe durch das Versprühen der wässrigen Probe unter Hochspannung erfolgt und ein hoher Gehalt an Ionen anderer Polarität diesen Prozess negativ beeinflussen kann.

Aufgezeichnet wurde mit dem Massenspektrometer der Ionenstrom in Form eines Chromatogramms (siehe Abbildung 5A), die Massen der zu einem bestimmten Zeitpunkt detektierten Molekülionen (siehe Abbildung 5B) und ein Fragmentspektrum des dominierenden Molekülions durch die Kollision mit Stickstoff (siehe Abbildung 5C). Die Methode ermöglichte es aus einer Messung heraus von einer unbekanntem Substanz die Masse, die dazugehörige

⁷ Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

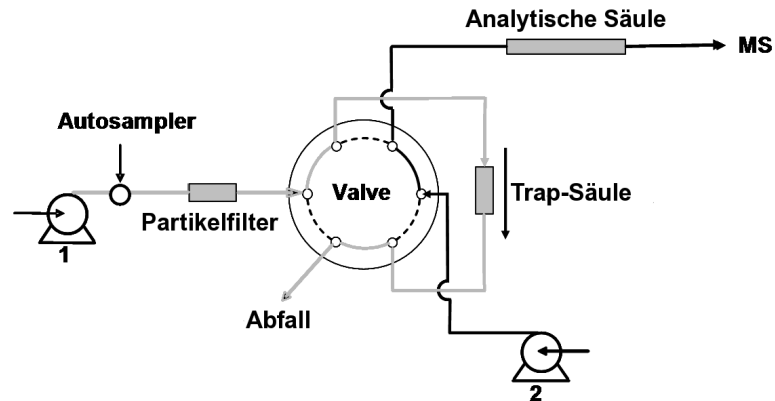
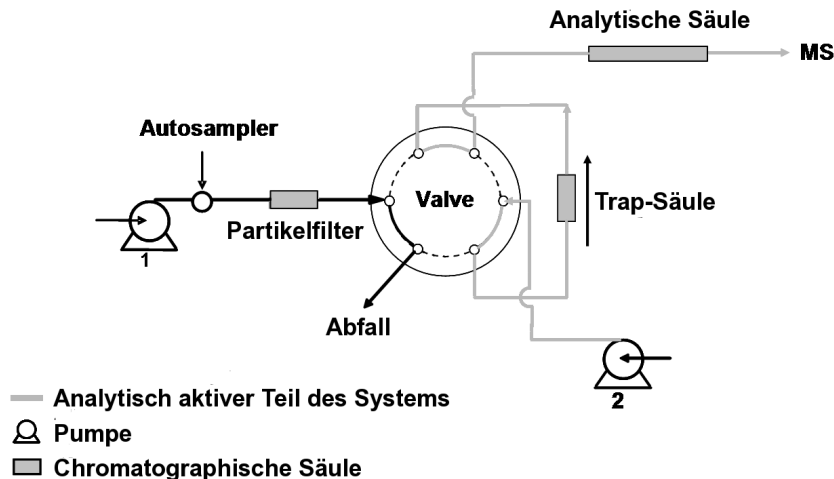
(A) Probenaufbereitungsphase**(B) Elutionsphase**

Abbildung 4: Aufbau einer Säulenschaltung. Während der Probenaufbereitungsphase (A) wurde der Urin vom Probengeber und Pumpe 1 ins System eingespeist. Während die Trap-Säule die ungeladenen Analyten zurückhielt, wurden die ionischen Komponenten in den Abfall gespült. Die analytische Säule war in dieser Zeit mit dem im Ruhemodus befindlichen Massenspektrometer verknüpft und wurde von Pumpe 2 equilibriert. Nach Abschluss der Aufbereitungsphase wurde die Trap-Säule durch ein elektronisch gesteuertes Schaltventil (Valve) mit der analytischen Säule in umgekehrter Flussrichtung verbunden. In der nun folgenden Elutionsphase (B) wurden die Analyten mit einem Gradienten durch die Pumpe 2 über die analytische Säule ins Massenspektrometer eluiert. Nachdem alle Analyten von der Trap-Säule auf die analytische Säule eluiert wurden schaltete das System in den Spülmodus (A). In diesem wurde der Gradient auf der analytischen Säule vervollständigt und die Trap-Säule durch Pumpe 1 auf die nächste Probe vorbereitet. Nach Wiederherstellung der Anfangsbedingungen auf beiden Säulen wurde die nächste Probe injiziert.

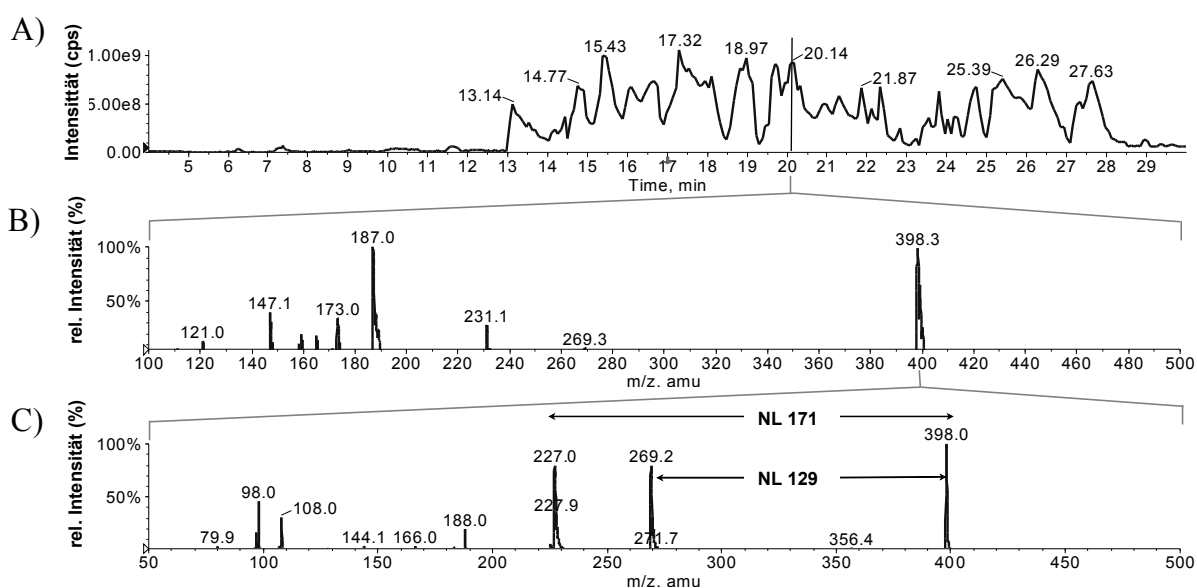


Abbildung 5: LC-MS/MS-Analyse des Urins einer furanbehandelten Ratte. (A) Chromatogramm des Full-Scans¹⁰ über einen Bereich von 100-500 u. (B) Spektrum der bei $t_R=20.14$ s aufgezeichneten Ionen. (C) Vom Ion mit der größten Intensität wurde automatisch ein Fragmentationsspektrum¹¹ aufgezeichnet. Ein NL⁹ im Fragmentationsspektrum kann, sofern er für eine bestimmte Substanzgruppe charakteristisch ist, helfen der Substanz eine Teilstruktur zuzuweisen. Eine Interpretation des in (C) präsentierten Spektrums ist in Schema 7 zu finden.

Retentionszeit im Chromatogramm und das Fragmentspektrum zu bestimmen. Durch charakteristische Verluste (gezeigt in Abbildung 5 als NL⁸) und Fragmente ist es oft möglich einer detektierten, unbekanntem Substanz eine Teilstruktur zuzuordnen. So weist beispielsweise ein NL von 129 u auf eine Mercaptursäure⁹ hin [42]. Um die Datenmenge möglichst klein aber dennoch informativ zu halten, war es nötig störende Massen von der Messung ganz oder teilweise auszuschließen und Signal-Rausch-Schwellen zu setzen unterhalb derer das Gerät nichts aufzeichnet. Der Informationsgehalt der Fragmentationsspektren wurde durch die Kombination von drei Einzelspektren bei verschiedenen Fragmentierungsenergien deutlich erhöht.

Es war so möglich für jede der 40 Urinproben ein Chromatogramm mit ca. 500 Datenpunkten aufzuzeichnen. Jeder Datenpunkt enthielt einen Full-Scan¹⁰ im Bereich von 100-500 u mit einer Auflösung von 0.06 u und einen Fragmentation-Scan¹¹ über den gleichen Massenbereich.

8 Ein Neutral Loss ist die Entstehung eines Fragmentes unter Verlust eines nicht detektierbaren Neutralteilchens

9 N-Acetyl-L-cystein-Konjugat eines Elektrophils das aus seinem Konjugat mit Glutathion (7) freigesetzt wurde. Die Konjugation mit Glutathion (7) ist der wichtigste Entgiftungsmechanismus für Elektrophile.

10 Aufzeichnung der Massenverteilung der Molekülionen mit einer vorgegebenen Auflösung über einen vorgegebenen Bereich zu einem bestimmten Zeitpunkt im Chromatogramm.

11 Aufzeichnung der Massenverteilung aller Fragmente eines Molekülions nach Fragmentierung der Molekülmasse durch Kollision mit einem Gas.

2.4 Datenextraktion aus den Full-Scan-Daten

Für die Aufarbeitung der im Full-Scan produzierten 130×10^6 Dateneinheiten¹² wurde eine Extraktionssoftware (Markerview™) verwendet, welche die Informationseinheiten unter Berücksichtigung des Auflösungsvermögens des Massenspektrometers, der Retentionszeit-schwankungen zwischen den Urinproben und der Qualität der Daten (Signal-Rausch-Verhältnis) zu Masse/Retentionszeit-Paaren zusammenfasst. Da nach den in der Literatur vorhandenen Daten [12] zu erwarten war, dass ein geeigneter Biomarker von jedem der fünf dosierten Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Exposition ausgeschieden wird, wurde bei der Extraktion die Bedingung gesetzt, dass ein Masse/Retentionszeit-Paar in mindestens vier der 40 Urinproben detektiert und von der Software erkannt werden muss. Die 130×10^6 Dateneinheiten wurden auf diese Weise in eine Datenmatrix extrahiert, welche aus 40 Observationen mal 449 Variablen (Masse-/Retentionszeit-Paaren) bestand. Die Datenmenge wurde so um ca. Faktor 7000 verkleinert und für die statistische Analyse vorbereitet.

2.5 Hauptkomponentenanalyse der extrahierten Datenmatrix

Abhängig von der Fragestellung wurden Teile aus der erzeugten Datenmatrix für die Hauptkomponentenanalyse ausgewählt. Für die Identifikation von Biomarkern waren die Dosis- und die Kontrollgruppe im 0-24 Stunden Sammelintervall von größter Bedeutung. Alle weiteren Untersuchungen dienten dem Ausschluss von Effekten durch die Ölgabe oder der Frage nach individuellen Besonderheiten einzelner Ratten und sind hier nicht dargestellt. Das Ziel der Hauptkomponentenanalyse war es jene Variablen in der Datenmatrix zu finden, welche durch die Behandlung mit Furan ihren Wert mit positivem Vorzeichen änderten. Um die Variablen mit einem einheitlichen Maßstab betrachten zu können, wurde von jeder Variablen der eigene Mittelwert in den verwendeten Proben in Abzug gebracht und die Streuung um diesen Mittelwert gleich eins gesetzt. Dieses Verfahren wird „zentrieren und skalieren der Daten auf Einheitsstreuung“ genannt und ordnet jeder Variablen, ungeachtet ihrer tatsächlichen Intensität, in der Hauptkomponentenanalyse die gleiche Bedeutung zu. Diejenigen Variablen, welche Substanzen kodieren, die in hoher Konzentration vorliegen, werden auf diese Weise in ihrem Gewicht reduziert, solche die nur in sehr geringer Konzentration vorliegen werden aufgewertet. Die direkt im Anschluss durchgeführte Hauptkomponentenanalyse trägt die einzelnen Observationen der n Variablen in einem n -dimensionalen Raum auf und versucht dann in diesem

12 $40 \text{ Urinproben} \times 500 \text{ Datenpunkte} \times (400 \text{ u Scanbereich} \div 0.06 \text{ u Auflösung}) \approx 130 \times 10^6$

Raum einen n -dimensionalen Vektor zu finden welcher die größte Varianz der Variablen im Raum erklären kann. Dieser durch Iterationen konstruierte Vektor ist dann die erste Hauptkomponente $t[1]$. Die zweite Hauptkomponente $t[2]$ wird durch einen Vektor in Richtung der zweitgrößten Varianz erhalten. Projiziert man die einzelnen Observationen auf diese beiden Hauptkomponenten, so erhält man eine zweidimensionale Darstellung, welche auch als „Scores Plot“ bezeichnet wird. Abbildung 6A zeigt einen solchen Plot für die zehn Urinproben des 0-24 Stunden Sammelintervalls. Auf der linken Seite sind die mit #6 - #10 bezeichneten Tiere der Dosisgruppe, auf der rechten Seite die mit #1 - #5 bezeichneten Tiere der Kontrollgruppe zu finden. Es war also möglich die Tiere entlang der ersten Hauptkomponente in zwei Gruppen zu trennen, welche dem Expositionsszenario entsprachen. Die zweite Hauptkomponente ist für diese Trennung nicht relevant und spiegelt lediglich die durch Exposition vergrößerte Varianz innerhalb der Dosisgruppe wieder. In Abbildung 6B, auch als „Loadings Plot“ bezeichnet, sind die Variablen nach ihrem Beitrag zur jeweiligen Hauptkomponente aufgetragen. Solche mit

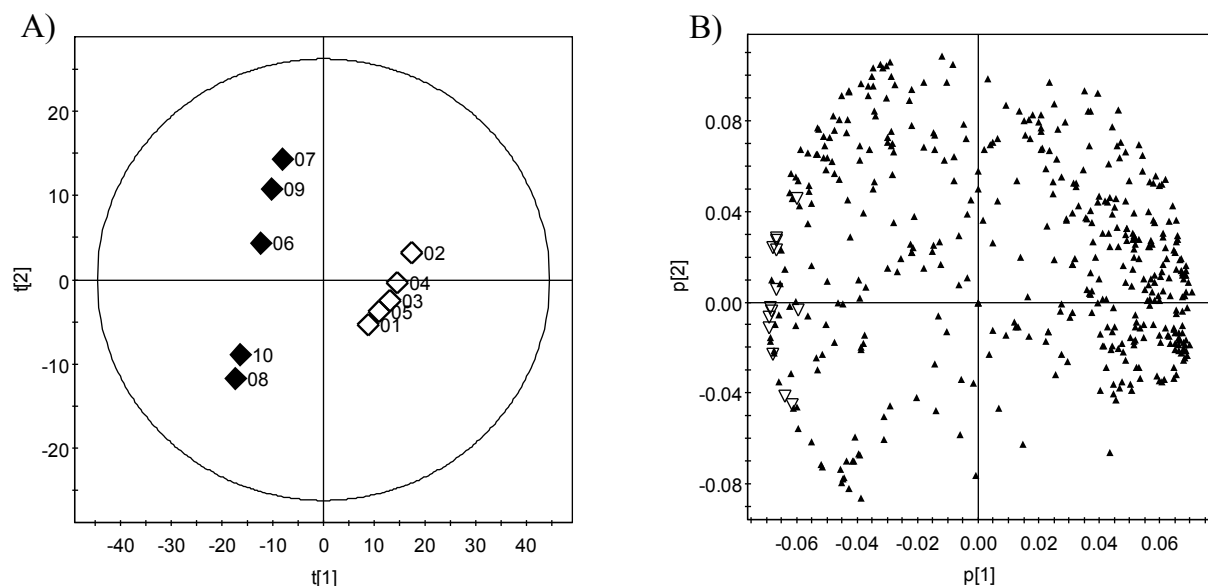


Abbildung 6: Visualisiertes Ergebnis der Hauptkomponentenanalyse mit den Daten der ersten Sammelperiode nach Exposition. Durch Projektion der einzelnen Observationen aus dem n -dimensionalen Raum auf die erste und zweite Hauptkomponente ($t[1]$, $t[2]$) erhält man den „Scores-Plot“ (A) der behandelten (schwarz) und unbehandelten Tiere (weiß). Er ermöglicht die visuelle Analyse der Trennung von Dosis- und Kontrolltieren durch das verwendete Modell. Eine vollständige Trennung ist bereits mit der ersten Hauptkomponente möglich. In Loadings-Plots (B) sind die Variablen nach ihrem Beitrag zur jeweiligen Hauptkomponente aufgetragen. Variablen auf der linken Seite sind entsprechend dem Scores-Plot für die Abtrennung der Dosisgruppe verantwortlich und damit für die Biomarkersuche von großer Bedeutung. Die 13 Variablen mit offenem Symbol repräsentieren Substanzen die nach Prüfung in den Originaldaten für die weitere Analyse ausgewählt wurden.

einem positiven Loadings-Koeffizienten $p[1]$ tragen zur Verschiebung der Kontrolltiere #1 - #5 im „Scores Plot“ in positive Richtung von $t[1]$ bei und sind deshalb für die Suche nach Expositionsbiomarkern nicht von Bedeutung. Solche mit einem stark negativen Loadings-Koeffizienten $p[1]$ haben den größten Beitrag zur Verschiebung der Dosisgruppe in die negative Richtung von $t[1]$ und sind daher für die weitere Suche relevant.

Die weitere Biomarkersuche wurde auf die 50 Variablen mit den negativsten Koeffizienten beschränkt. Jede einzelne dieser 50 Variablen wurde in den Originaldaten auf Verwendbarkeit untersucht. Variablen zu denen kein Fragmentationsspektrum aufgezeichnet wurde und solche bei denen es sich um ein Isotop einer anderen Variable handelte, wurden von der weiteren Untersuchung ausgeschlossen. Gleiches galt für Variablen mit nicht verwertbarer Chromatographie. Durch diesen Schritt wurden die 50 Variablen weiter auf 13 reduziert. Diese potentiellen Biomarker sind in Abbildung 6B als offene Dreiecke dargestellt.

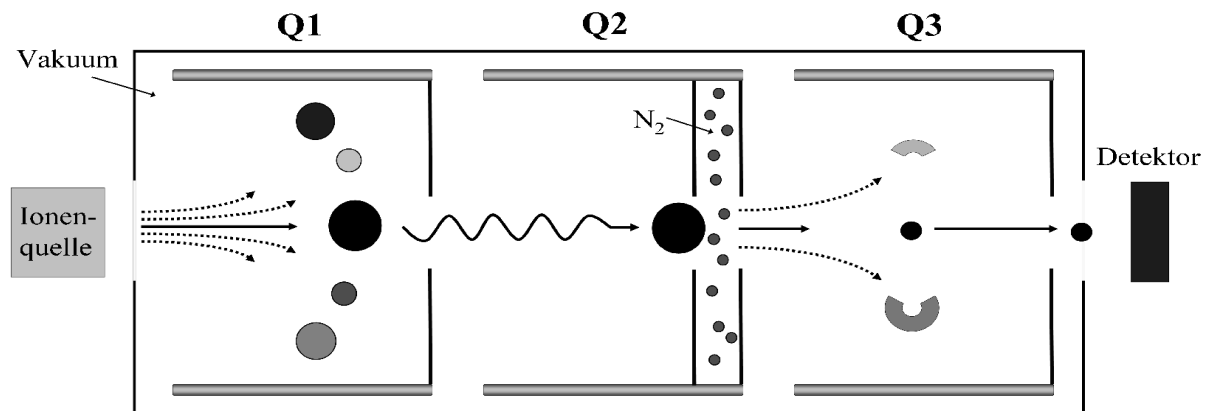


Abbildung 7: Schematische Darstellung eines Tandemmassenspektrometers mit Q2 als linearer Ionenfalle im Multi-Reaction-Monitoring-Modus. Im ersten Quadrupol (Q1) wird ein Molekülion mit definiertem m/z -Verhältnis selektiert. Im zweiten Quadrupol (Q2) werden diese Ionen gesammelt und anschließend durch Kollision mit Stickstoffatomen fragmentiert. Aus den gebildeten Fragmenten wird genau eines dieser Fragmente anhand seines m/z -Verhältnisses im dritten Quadrupol (Q3) ausgewählt und detektiert. Durch die Auswahl eines Q1/Q3-Massenpaares wird eine hoch selektive doppelte Massenfilterung erreicht. Während eines Scans können mehrere dieser Paare aufgezeichnet werden.

2.6 Verfeinerte Analyse potentieller Biomarker

Um die Aussagekraft der Variablen weiter zu untersuchen, wurden die 13 potentiellen Biomarker mit einer verfeinerten massenspektrometrischen Methode (Multi Reaction Monitoring, MRM) bei gleicher Chromatographie erneut in den Urinproben gemessen. Die Methode erlangt eine hohe Sensitivität bei gleichzeitig hoher Selektivität durch die Massenfilterung auf zwei Ebenen. Wie in Abbildung 7 gezeigt, wird aus den ionisierten Molekülen genau eines im ersten Quadrupol (Q1) des Massenspektrometer selektiert und in einer dem zweiten Quadrupol (Q2) nachgeschalteten Kollisionszelle fragmentiert. In einem dritten Quadrupol (Q3) wird dann genau eines der entstandenen Fragmente für den Nachweis ausgewählt.

Tabelle 3: Im Urin von Ratten gefundene Furan-Biomarker und deren strukturelle Information. Sie wurden mittels Hauptkomponentenanalyse identifiziert und durch eine zweite LC-MS/MS-Messung im Multi-Reaction-Monitoring (MRM) Modus auf ihre Konzentration hin untersucht. Der Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Gruppe im 0-24 Stunden Intervall war für die MRM-Daten der gezeigten Variablen im Wilcoxon Rangsummentest hoch signifikant mit $p < 0.005$. Neben der Masse und der Retentionszeit konnten den Biomarkern anhand von charakteristischen Fragmenten in den Fragmentationenspektren Strukturklassen und später auch Strukturen zugeordnet werden.

Variable		Charakteristische Fragmente (EPI) <i>m/z</i> (Verlust)	Strukturelle Information		Masse in Q3 für MRM-Analyse $M-H^+ \rightarrow$
<i>m/z</i>	<i>t_R</i> [min]		Strukturklasse	Struktur	
354	15.0	unspezifisch		8	141
253	14.1	82 (NL 171)	<i>N</i> -Acetyl-L-lysin-Addukt	5	211
398	20.1	269 (NL 129) 227 (NL 171)	Merkaptursäure ^a <i>N</i> -Acetyl-L-lysin-Addukt	6	269
414	14.4	285 (NL 129) 243 (NL 171)	Merkaptursäure ^a <i>N</i> -Acetyl-L-lysin-Addukt	12	285
242	23.3	unspezifisch		11	97
335	14.6	206 (NL 129)	Merkaptursäure ^a		206
371	13.7	242 (NL 129)	Merkaptursäure ^a		242

^a Ein NL von 129 ist charakteristisch für eine Merkaptursäure oder deren Sulfoxid

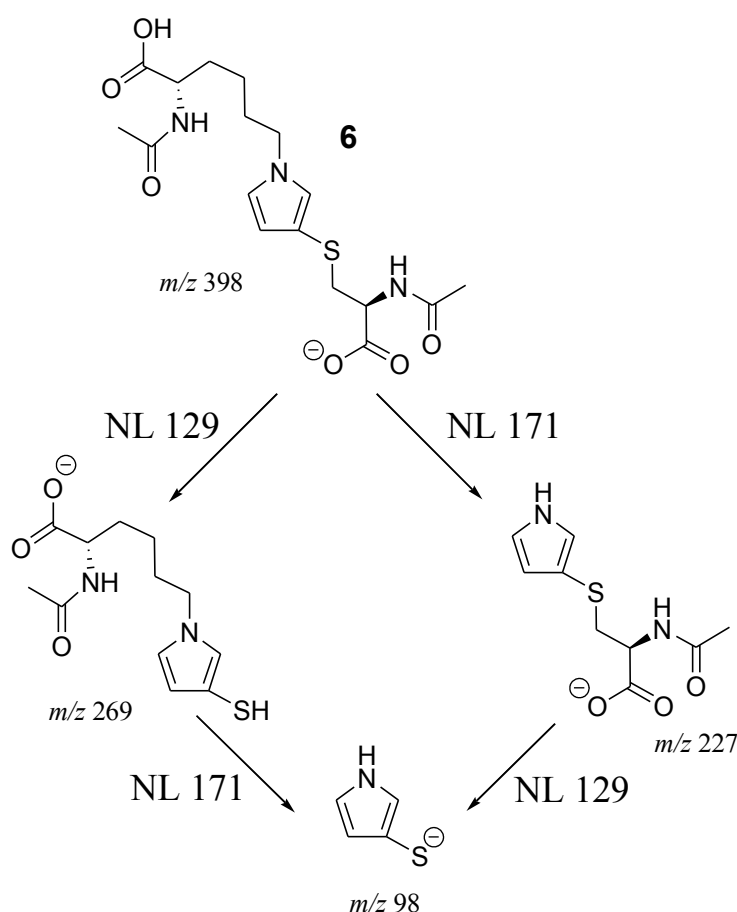
Um für die potentiellen Biomarker solche Massenpaare ("MRM-Übergänge") zu identifizieren wurden die aufgezeichneten Fragmentationenspektren auf geeignete Fragmente durchsucht. Als geeignet wurden solche angesehen, welche entweder eine hohe Intensität besaßen oder charakteristisch für eine Substanzklasse (siehe Abbildung 5; dort NL von 129) waren. In Tabelle 3 ist das für die jeweilige Variable verwendete Massenpaar und die zugeordnete Substanzklasse präsentiert. Nach Auswertung der aufgezeichneten Daten wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests im R 2.3.1 Programm (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>) untersucht, ob die Variablen in den 24 Stunden nach Exposition für die Kontroll- und Dosisgruppe signifikant unterschiedlich sind. Sieben der 13 untersuchten Variablen wurden dadurch als hoch signifikant mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.005$ identifiziert und sind in Tabelle 3 gelistet.

Für insgesamt vier dieser Variablen konnte ein „Neutral Loss“ von 129 u beobachtet werden. Diese konnten dadurch als Mercaptursäure bzw. deren Sulfoxid identifiziert werden. Bei drei der Variablen konnte ein „Neutral Loss“ von 171 beobachtet werden. Dieser bisher nicht bekannte Verlust eines Neutralteilchens konnte durch die im folgenden Kapitel präsentierte Strukturaufklärung als charakteristisch für *N*-Acetyl-L-lysin-Konjugate identifiziert werden.

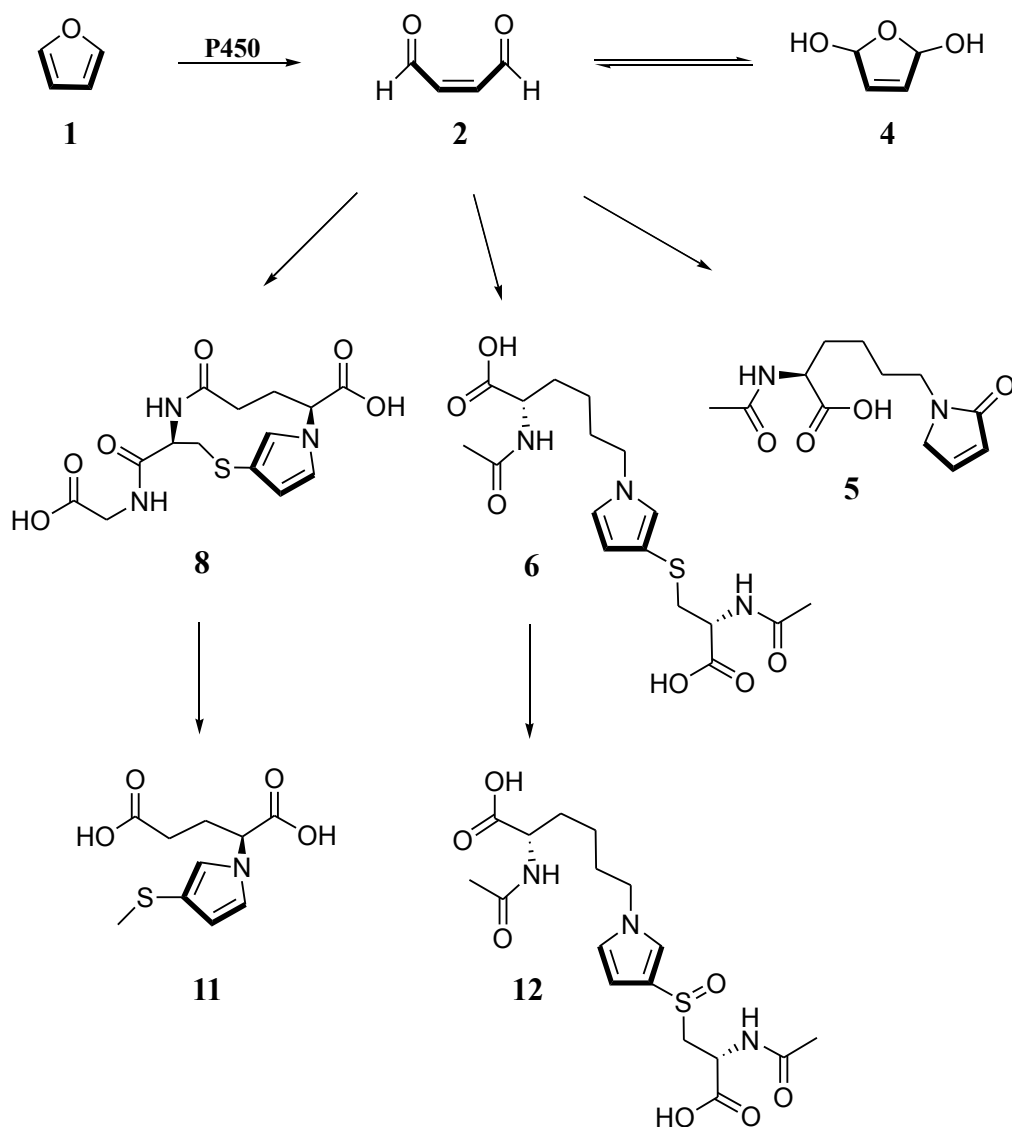
2.7 Strukturaufklärung potentieller Biomarker

Die zusammen mit dem Full-Scan aufgezeichneten Fragmentationen-Scans lieferten, wie in Abbildung 5 gezeigt, zum Teil Informationen über die Substanz-Klasse der Biomarker. Für eine weitere strukturelle Aufklärung dieser Substanzen war die in der Literatur beschriebene Bildung eines thio-substituierten Pyrrolrings entscheidend [15, 19]. Dieser war *in vitro* charakteristisch für die Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit einem Stickstoff- und einem Schwefelnukleophil. Die hier vorgestellten Untersuchungen zeigen nun, dass dieses Reaktionsprinzip auch *in vivo* relevant ist. In Schema 7 ist am Beispiel der Variablen mit m/z 398 gezeigt, wie bei der Interpretation der Fragmentationenspektren (siehe Abbildung 5C) vorgegangen wurde. Das Fragment m/z 269 entstand durch einen „Neutral Loss“ von 171 u und wies damit auf ein *N*-Acetyl-L-lysin-Konjugat hin. Das Fragment m/z 227 entstand durch den für Mercaptursäuren charakteristischen Verlust von 129 u. Finden beide Verluste hintereinander statt, so bildet sich ein Fragment mit m/z 98. Dies stimmt mit der Masse eines thio-substituierten Pyrrols überein. Letztendlich konnte durch diese Schritte der Variablen m/z 398 die bereits im Rahmen von *in vitro* Experimenten [15] charakterisierte Struktur **6** zugeordnet werden. In eigenen *in vitro* Experimenten wurde die Synthese von **6** durch Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-

dial (**2**) mit *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein reproduziert und mit der für die Analyse der Rattenurine entwickelten LC-MS/MS-Methode gemessen. Tabelle 4 zeigt die dabei beobachtete Übereinstimmung von *in vivo* und *in vitro* Experiment anhand der Retentionszeit und der Intensität der Fragmente. Die Zuordnung einer Struktur konnte auf diese Weise für fünf der sieben Variablen erfolgen (siehe Schema 8). Das ebenfalls literaturbekannte Lysinaddukt **5** entsteht durch Konjugation von *N*-Acetyl-L-lysin mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) unter physiologischen Bedingungen als Hauptprodukt. Das bisher nicht charakterisierte Konjugat **12** entsteht vermutlich durch Sulfoxidierung von Konjugat **6** und wurde sowohl *in vivo* als auch in den Inkubationen zur Herstellung von **6** durch Autoxidation gebildet. Ein Versuch die Verbindung durch Oxidation von isolierter Verbindung **6** in Reinform zu erhalten misslang. Durch die partielle Oxidation von **11** zur entsprechenden Sulfonsäure wurde im



Schema 7: Fragmentierung des als Verbindung 6 identifizierten Moleküls mit m/z 398. Es konnten zwei Fragmentierungen unter Verlust eines Neutralteilchens (NL) beobachtet werden. Zum einen der Verlust von 129 u der auf eine Merkaptursäure hinweist und zum anderen der Verlust von 171 u der für ein Addukt mit *N*-Acetyl-L-lysin charakteristisch ist. Beide NL hintereinander setzen ein Fragment mit m/z 98 frei.



Schema 8: Phase-I- und Phase-II-Metabolismus von Furan (1). Nach der Oxidation zu cis-2-Buten-1,4-dial (2) bzw. dessen zyklisches Hydrat 4 bestehen drei Reaktionsmöglichkeiten. Der linke Pfad zeigt die nach Konjugation mit einem Äquivalent Glutathion (7) ausgeschiedenen Substanzen. Verbindung 8 ist das zyklische Konjugat von cis-2-Buten-1,4-dial mit dem freien Thiol und dem freien Amin von Glutathion (7). Verbindung 11 entsteht durch den Abbau von 8 (siehe Schema 9). Der mittlere und rechte Pfad kann durch die Reaktion von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit Protein erklärt werden. Für die Bildung des Metaboliten 5 ist eine Reaktion von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit der Seitenkette von Lysin nötig. Die Metaboliten 6 und 12 entstehen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eine zweistufige Reaktion von cis-2-Buten-1,4-dial (2) mit einer Cystein- und einer Lysinseitenkette. Der Metabolit 12 ist dabei das Sulfoxid von 6.

Massenspektrometer sowohl ein Signal bei m/z 414, als auch m/z 430 beobachtet. Das aus dem Gemisch der Diastereomeren des Sulfoxids und der Sulfonsäure erhaltene $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum konnte nicht ausgewertet werden.

Das Glutathionkonjugat **8** wurde bereits im Urin von Ratten identifiziert [19]. In vitro konnte es durch die Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Glutathion (**7**) hergestellt werden. Es entsteht dabei als Hauptprodukt neben weiteren Konjugaten [15]. Das besondere dieser Konjugationsreaktion mit Glutathion (**7**) ist die Entstehung eines 11-gliedrigen Ringes unter Einbeziehung des Glutaminsäurestickstoffs.

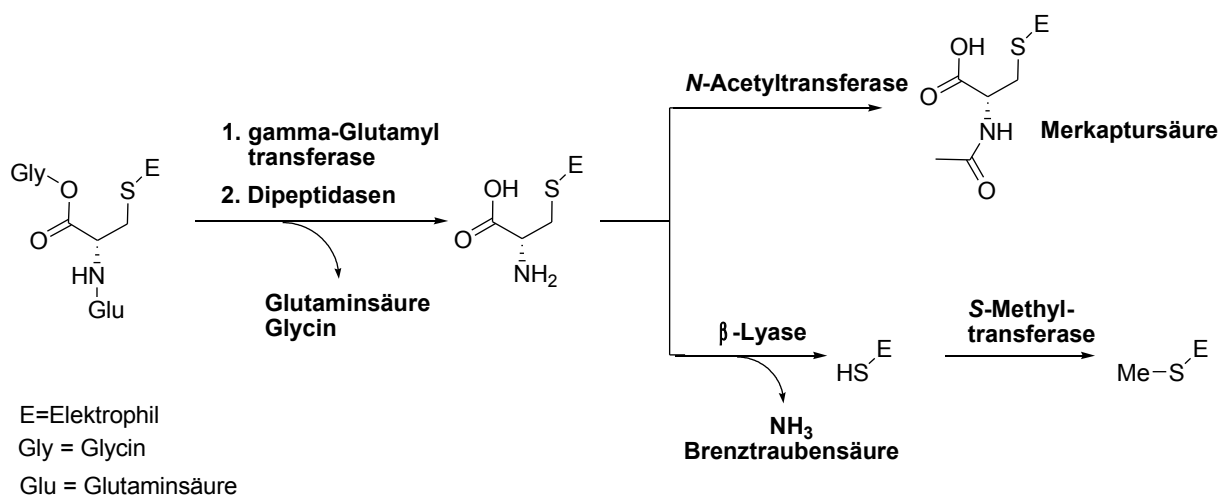
Normalerweise werden Glutathionkonjugate durch enzymatische Reaktionen zu Cystein-konjugaten abgebaut und dann nach Acetylierung als Mercaptursäuren ausgeschieden (siehe oberer Pfad in Schema 9). Dieser Weg wäre auch für das Glutathionkonjugat **8** denkbar. Die normalerweise abgespaltene Glutaminsäure würde dann noch am Rest der Mercaptursäure

Tabelle 4: LC-MS/MS-Daten der identifizierten Biomarker in vitro und in vivo. Zur strukturellen Absicherung der aus den in vivo Daten vorgeschlagenen Strukturen wurde *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) in vitro mit *N*-Acetyl-*L*-lysin, *N*-Acetyl-*L*-cystein, Glutaminsäure, Methylsulfid und Glutathion (**7**) einzeln oder in den relevanten Kombinationen inkubiert und mit der für die in vivo Daten entwickelten LC-MS/MS Methode untersucht. Die nahezu 100%ige Übereinstimmung der Retentionszeiten (t_R) und der Fragmente sowie deren Intensitäten verifizieren die vorgeschlagenen Strukturen.

Variablen		Struktur	Retentionszeit und Fragmente t_R ; m/z (relative Intensität in %)	
m/z	t_R [min]		Rattenurin	In vitro
354	15.0	8	15.0 min; 354 (100); 336 (14); 185 (10); 141 (25); 124 (17); 98 (13)	15.4 min; 354 (100); 336 (8); 185 (9); 141 (24); 124 (13); 98 (12)
253	14.1	5	14.1 min; 253 (100); 211 (92); 167 (9); 82 (19)	14.4 min; 253 (100); 211 (87); 167 (9); 82 (21)
398	20.1	6	20.1 min; 398 (100); 269 (78); 227 (78); 98 (40)	20.5 min; 398 (100); 269 (72); 227 (65); 98 (29)
414	14.4	12	14.4 min; 414 (45); 285 (100); 243 (41); 114 (11)	14.8 min; 414 (44); 285 (100); 243 (44); 114 (9)
242	23.3	11	23.3 min; 242 (40); 198 (15); 112 (34); 97 (100)	22.5 min; 242 (27); 198 (11); 112 (32); 97 (100)

hängen. In den LC-MS/MS-Daten konnte jedoch kein Hinweis auf ein solches Konjugat gefunden werden.

Ein weiterer, weniger bekannter Abbauweg für Glutathionkonjugate, ist eine β -Lyase abhängige Abspaltung eines Thiols vom Cysteinkonjugat unter Bildung von Brenztraubensäure und Ammoniak [43]. Eine anschließende Methylierung des freien Schwefels resultiert in der Bildung des entsprechenden Methylsulfids (siehe unterer Pfad Schema 9). Die Variable mit m/z 242 (Struktur **11**) wurde als solches Methylsulfid identifiziert und ist vermutlich auf diesem Weg entstanden. Die Bestätigung von Verbindung **11** erfolgte durch die Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Glutaminsäure und Methylsulfid. **11** konnte aus den Inkubaten isoliert und mit Hilfe der ^1HMR -Spektroskopie charakterisiert werden. Die drei Protonen der Methylsulfidgruppe zeigten ein Singulett bei 2.29 ppm. Die Verschiebungen (6.13, 6.72 und 6.75 ppm) und Kopplungskonstanten ($J_{4,5} = 2.91$ Hz, $J_{5,2} = 2.22$ Hz $J_{2,4} = 1.74$ Hz) der aromatischen Protonen waren vergleichbar mit denen anderer 3-Thio-pyrrole [15]. Die beiden diastereotopen β -methylen Protonen von Glutaminsäure zeigten zwei getrennte Multipletts bei 2.05-2.25 ppm und 2.30-2.45 ppm. Beide Multipletts wiesen im ^1H - ^1H -COSY eine Kopplung zum α -methin Proton (4.65-4.75 ppm) auf und integrierten 3:1 auf Grund der bei 2.05-2.25 ppm überlagernden γ -methylen Protonen.



Schema 9: Abbau des Glutathionkonjugates eines Elektrophils E. Nach der Abspaltung des Glutaminsäure- und Glycinrestes wird das verbleibende Cysteinkonjugat in den meisten Fällen nach Acetylierung des freien Stickstoffs als Merkaptursäure ausgeschieden (oberer Weg). Für bestimmte Reste R ist aber auch ein weiterer Abbau zum Sulfid durch eine β -Lyase und die anschließende Methylierung durch eine S-Methyltransferase bekannt.

2.8 Kinetik der Biomarker nach Exposition

Wie bereits dargelegt, war zu erwarten, dass die größte Menge an aufgenommenem Furan (**1**) innerhalb der ersten 24 Stunden nach Exposition wieder ausgeschieden wird. Ein Vergleich des Intervalls von 0 bis 24 Stunden mit dem Intervall von 24 bis 48 Stunden sollte zeigen, ob die gefundenen Marker auch zu einem späteren Zeitpunkt noch ausgeschieden werden. Es wurde beobachtet, dass die von der Glutathionkonjugation abgeleiteten Biomarker **8** und **11** im zweiten Intervall nicht mehr nachweisbar waren. Gleiches galt für den Marker mit m/z 335. Die anderen Biomarker **5**, **6**, **12** und m/z 371 hingegen zeigten im Wilcoxon Rangsummentest keine signifikante Verringerung in der Konzentration. Dies ist in Übereinstimmung mit der Vorstellung, dass die Strukturen **5**, **6**, **12** durch Reaktion mit Protein, dessen Abbau und anschließender Acetylierung entstehen.

3. Dosisabhängigkeit und Kinetik der Furanbiomarker im Urin von Ratte und Maus

3.1 Einführung

Nach der Identifizierung von Furanmetaboliten im Urin von Ratten nach einer hohen Dosis Furan (1) (siehe Ergebnisse Teil 2: Schema 8) sollte nun überprüft werden, ob diese

- (a) auch bei kleineren Aufnahmemengen
- (b) mit einer Dosis-Wirkungs-Beziehung
- (c) im Urin von Ratte und Maus
- (d) über einen Zeitraum von >48 Stunden zu identifizieren sind.

In Teil 2 wurde eine hohe Furandosis von 40 mg/kg Körpergewicht gewählt, um den Nachweis von unbekanntem Metaboliten zu vereinfachen. Die Eignung der dabei identifizierten Ausscheidungsprodukte für ein Expositionsbiomonitoring hängt jedoch auch davon ab, wie sich die Ausscheidungsmenge mit der aufgenommenen Dosis ändert und bei welcher Konzentration die Nachweisgrenzen liegen. Ein Vergleich von Ratte und Maus ist auf Grund der Unterschiede hinsichtlich der Ausbildung von Gallengangskarzinomen von großer Bedeutung. Möglicherweise findet sich auch ein Unterschied im Metabolitenmuster der beiden Tierarten, welcher Rückschlüsse auf die unterschiedliche Suszeptibilität zulässt. Nach der Identifikation von Metaboliten aus Proteinaddukten (5, 6, 12 in Schema 8), war es in dieser zweiten Tierstudie von großem Interesse den Zeitraum nach 48 Stunden zu untersuchen, um Rückschlüsse auf die Lebensdauer der Proteine machen zu können.

3.2 Tierversuch und Datenanalyse

Der Dosisbereich erstreckte sich für beide Tierarten von 0.125 bis 8 mg Furan (1) pro kg Körpergewicht in Abstufungen von Faktor zwei. Es ergaben sich somit für jede Tierart sieben Dosisgruppen und eine Kontrollgruppe. Die Kontrollgruppe erhielt die entsprechende Menge des Trägermediums Öl. Eine Gruppe bestand aus jeweils fünf Tieren. Gesammelt wurde der Urin an insgesamt vier Tagen; ein Tag vor und drei Tage nach Exposition. Schon während des Tierversuches konnte die Beobachtung gemacht werden, dass sich, anders als im ersten Tierversuch, das mittlere Urinvolumen der Kontrolltiere von dem der Behandelten nicht

unterscheidet. Im Mittel vergleichbar war auch die relative Dichte der Urinproben. Der niedrigste gemessene Wert lag bei 1.039. Alle Urinproben wurden deshalb mit Wasser auf eine Dichte von 1.03 verdünnt und mit 8 N Salzsäure auf pH 3 eingestellt.

Die Analyse der Urinproben erfolgte mit einer zum Ergebnis Teil 2 leicht veränderten LC-MS/MS Analytik im MRM-Modus. Die Parameter für die Messung der MRM-Massenpaare in Q1 und Q3 wurden, wenn möglich, mit Hilfe der Inkubationslösungen in Hinblick auf eine höhere Empfindlichkeit optimiert.

Bei 80 Tieren (Ratte und Maus) und vier Sammelzeitpunkten ergeben sich 320 zu messende Urinproben. Neben einem enormen zeitlichen Aufwand (320 Proben zu je 45 min) ergeben sich bei der Messung vieler Proben Probleme durch Schwankungen des Massenspektrometers und dem schlechter werdenden Zustand der verwendeten Säulen. Diese können ohne internen Standard nicht ausgeglichen werden. Darüber hinaus war nicht bekannt, ob eventuelle Nachweisgrenzen die Analyse der Urinproben einschränkt. Um die Zahl der Messungen zu reduzieren und gleichzeitig aber einen Teil Information aus allen Proben zu nutzen wurden die Urinproben gruppen- und tageweise vereint. Die dadurch um 4/5 auf 64 reduzierte Probenmenge konnte innerhalb von drei Tagen gemessen werden.

Da auf Grund der chaotisch eluierenden Urinmatrix für die LC-MS/MS-Analyse nur aufwendig zu synthetisierende, isotopenmarkierte interne Standards der jeweiligen Verbindung in Frage kommen, musste eine andere Möglichkeit der Kompensation von Messschwankungen gefunden werden. Eine Mischung von Rattenurinproben wurde analog den anderen zu messenden Proben aufgearbeitet und nach jeder achten Probe (d.h. nach der Messung von zwei Dosisgruppen) als Qualitätskontrolle gemessen. Nach der manuellen Integration der Biomarker in allen gemessenen Proben, wurde die jeweilige Peakfläche einer Substanz in den acht Proben zwischen zwei Qualitätskontrollen durch das arithmetische Mittel der Peakflächen der Qualitätskontrollen korrigiert.

Da es ohne Eichgeraden nicht möglich ist von den Integralen auf die reale Konzentration der Substanz im Urin zu schließen, sind die zu beobachtenden Unterschiede in den Integralen zweier Substanzen nicht für eine Diskussion bezüglich der quantitativen Unterschiede geeignet. Deshalb wurden alle in Maus und Rattenurin gemessenen Werte eines Biomarkers in Relation zu dem Wert der 0-24 Stunden Sammelperiode in der Rattengruppe mit einer Dosis von 8 mg Furan (1) pro kg Körpergewicht gesetzt.

3.3 Ausscheidungskinetik in der höchsten Dosisgruppe

Für die Untersuchung der Kinetik der Ausscheidung wurde zuerst die Dosisgruppe von 8 mg/kg Körpergewicht herangezogen, da sie die meisten Datenpunkte lieferte. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse dieser Auswertung. Im linken Teil der Abbildung sind die protein-assoziierten Lysinaddukte **5**, **6**, **12** und *m/z* 371 abgebildet. Diese Verbindungen werden über mehr als 24 Stunden ausgeschieden. Der rechte Teil zeigt die durch Reaktion mit Glutathion (**7**) gebildeten Addukte **8**, **11** und *m/z* 335. Sie haben ein Ausscheidungsintervall von ungefähr 24 Stunden. Auf Grund der Normierung der Peakflächen der einzelnen Metaboliten auf die Peakfläche des betreffenden Metaboliten aus der 0-24 Stunden Sammelperiode der 8 mg/kg Rattengruppe ist der Wert des 0-24 Stunden Intervalls für jeden Metaboliten gleich eins.

Betrachtet man die Kurven in Abbildung 8A, so fällt auf, dass bei der Ratte alle dort abgebildeten Metaboliten zwar über mindestens 72 Stunden ausgeschieden wurden, aber im

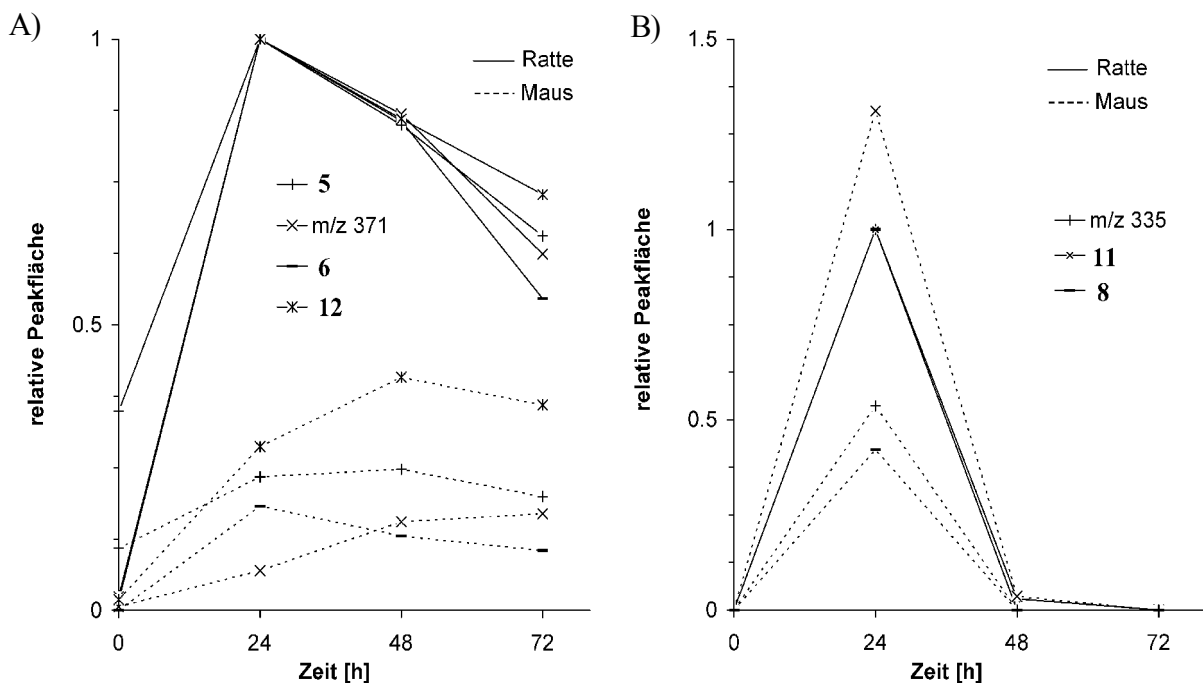


Abbildung 8: Zeitverlauf der Ausscheidung von Furanmetaboliten im Urin von Ratten (ausgezogene Linien) und Mäusen (gestrichelte Linien), vor und nach der oralen Gabe von 8 mg Furan (1) pro kg Körpergewicht. Der eingezeichnete Zeitpunkt stellt das Ende einer jeweils 24-stündigen Sammelperiode des Urins dar. Die Werte auf der y-Achse sind die gemessenen Peakflächen relativ zur Peakfläche des jeweiligen Ausscheidungsproduktes im 0-24 Stunden Urin der Ratte. Das linke Diagramm zeigt die lysin- bzw. protein-assoziierten (**5**, **6**, **12** und *m/z* 371), das rechte die glutathion-assoziierten (**8**, **11** und *m/z* 335) Biomarker.

0-24 Stunden Intervall ihren größten Wert hatten. Bei der Maus gilt dies nur für Verbindung **6** mit m/z 398. Alle anderen erreichten ihr Ausscheidungsmaximum zu einem späteren Zeitpunkt.

Die Kurven in Abbildung 8B zeigen, dass alle glutathion-assoziierten Biomarker nahezu ausschließlich innerhalb der ersten 24 Stunden ausgeschieden wurden. Ausnahme bildete Verbindung **11** mit einem im 24-48 Stunden Intervall gerade noch messbaren Level im Rattenurin. Zu beachten ist, dass die Darstellung des y-Achsenabschnitts auf 1.5 relative Einheiten vergrößert werden musste, da Verbindung **11** an Tag zwei in der Maus eine größere Peakfläche aufwies als in der Ratte (=Referenz).

Die neuen Untersuchungen können somit die im Teil 2 beschriebenen Ergebnisse zur Ausscheidungskinetik bestätigen und erweitern. Es kann zwischen protein-assoziierten und glutathion-assoziierten Biomarkern unterschieden werden. Während erstere eine lange Halbwertszeit im Urin aufweisen, sind letztere nur sehr kurzzeitig nachweisbar. Im Hinblick auf ein Expositionsbiomonitoring sind beide von großer Bedeutung. Eine kurze Halbwertszeit ermöglicht kurz nach der Exposition eine Abschätzung der Expositionshöhe. Eine gewollte und ungewollte Aufnahme der gleichen Substanz vor diesem Zeitpunkt beeinflusst das Ergebnis nur gering. Eine lange Halbwertszeit durch langlebige Proteine hingegen ermöglicht die Untersuchung der kumulativen Exposition. Da die kumulative Exposition bei Nahrungsmitteltoxinen wie Furan (**1**) der Realität entspricht, sind über diese Art von Biomarker möglicherweise wichtige Informationen zu erschließen. Entscheidend für die Verwendbarkeit ist die im folgenden Abschnitt untersuchte Dosisabhängigkeit.

3.4 Dosisabhängigkeit der Biomarker in Ratte und Maus

Abbildung 9 zeigt die Dosis-Ausscheidungs-Kurven für das erste Sammelintervall nach Furangabe. Bei der Ratte war der Nachweis aller Metaboliten selbst bei der kleinsten Dosis von 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht möglich. In der Maus galt dies nur für die Verbindung **11**. Verbindung **8** und der Biomarker mit m/z 335 konnten in den Urinproben der Dosisgruppen unter 1000 bzw. 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht nicht quantifiziert werden.

Die obere Reihe der Abbildung 9 zeigt die Dosis-Ausscheidungs-Diagramme für die Biomarker **5**, **6**, **12** und m/z 371. Mit Ausnahme der Verbindung **5** in der Maus zeigten alle einen deutlichen Anstieg mit Erhöhung der Dosis in beiden Tierarten. Bei den Ratten konnte ein leichtes Abflachen der Kurven zu höheren Dosen hin beobachtet werden. Möglicherweise zeigten der Proteinabbau oder die Ausscheidung in diesem Bereich bereits Sättigungseffekte.

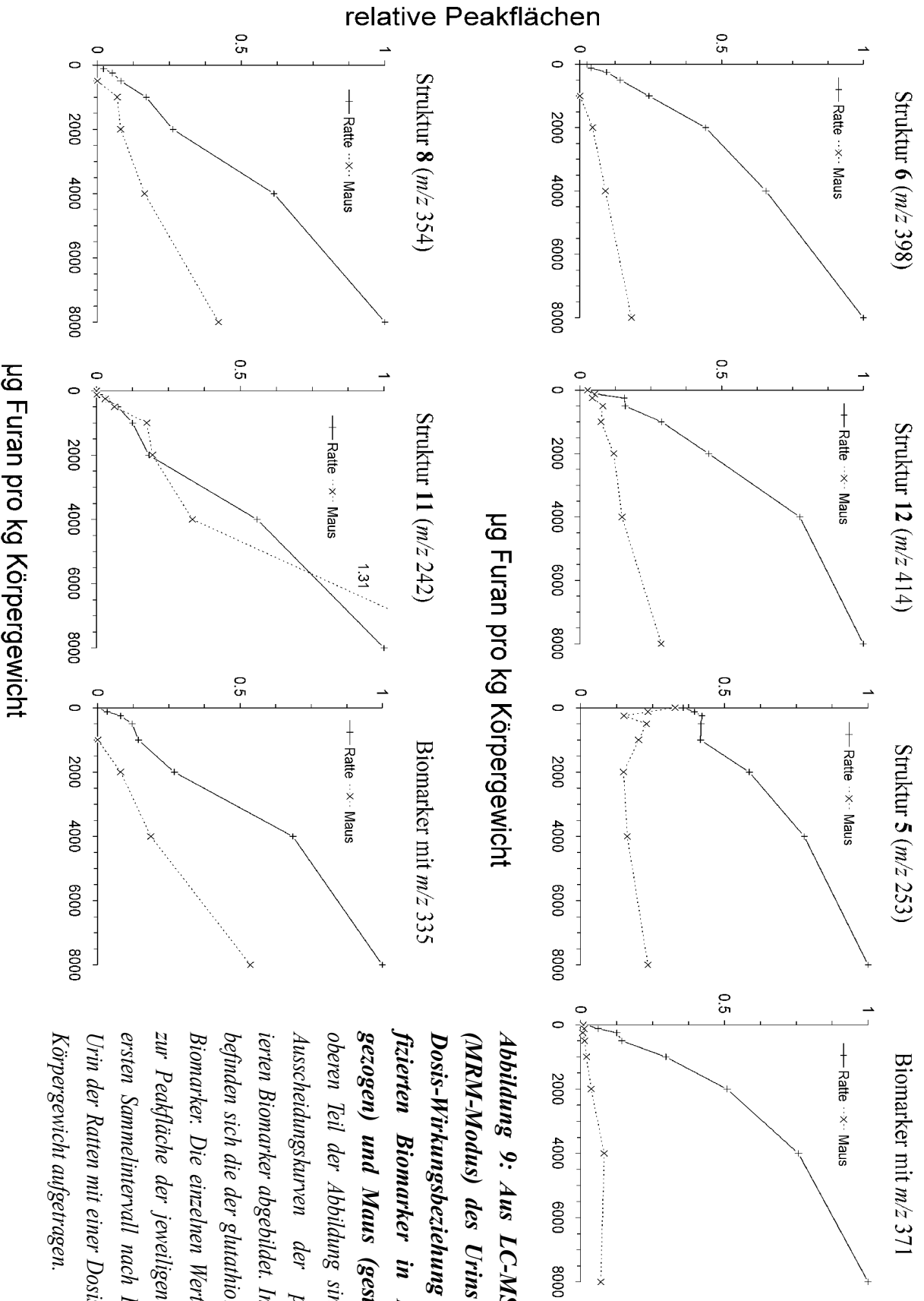


Abbildung 9: Aus LC-MS/MS-Daten (MRM-Modus) des Urins abgeleitete Dosis-Wirkungsbeziehung der identifizierten Biomarker in Ratte (ausgezogen) und Maus (gestrichelt). Im oberen Teil der Abbildung sind die Dosis-Ausscheidungskurven der protein-assoziierten Biomarker abgebildet. Im unteren Teil befinden sich die der glutathion-assoziierten Biomarker. Die einzelnen Werte sind relativ zur Peakfläche der jeweiligen Substanz im ersten Sammelintervall nach Exposition im Urin der Ratten mit einer Dosis von 8 mg/kg Körpergewicht aufgetragen.

Auffällig war weiterhin, dass bei allen Verbindungen die Kurve für die Ratten deutlich steiler verlief als für die Mäuse. Bei angenommener Linearität ergab sich in den Rattenurinen eine annähernde Verdoppelung der relativen Peakflächen bei einer Verdoppelung der Dosis. In den Mausurinen war die Steigung um mindestens die Hälfte kleiner. Ob diese Beobachtung durch die zu späteren Sammelintervallen verschobene Ausscheidung der Biomarker oder durch die Beteiligung einer weiteren unbekannt Substanz am Furanmetabolismus verursacht wurde, kann ohne quantitative Daten nicht geklärt werden. Verbindung **5** hatte neben einem bereits sehr hohen Level in der Kontrollprobe die flachste Kurve in der Ratte. In den Mausurinen war keine klare Dosisabhängigkeit erkennbar. Verbindung **5** scheint damit in der Ratte nur eine geringe und in der Maus gar keine Bedeutung für die Elimination von Furan (**1**) zu besitzen. Es ist deshalb auch unwahrscheinlich, dass der hohe Hintergrundlevel im Kontrollurin durch oral aufgenommenes Furan (**1**) verursacht wird. Vielmehr deutet diese Tatsache auf eine Beteiligung endogener Bildungsmechanismen hin.

Bei den Glutathion-Addukten **8**, **11** und m/z 335, mit einer Ausscheidungsdauer von bis zu 24 Stunden, ist ebenfalls ein deutlicher Anstieg mit der Dosis zu beobachten. Sowohl in der Ratte als auch in der Maus stiegen alle drei Marker linear dosisabhängig an. Unterschiedliche Steigungen für die beiden Tierarten sind nur bei den Verbindungen **8** und m/z 335 zu finden. Die Unterschiede sind jedoch wesentlich kleiner als bei den Proteinaddukten. Der kleinere Achsenabschnitt für die Kurven der Maus könnten auf eine höhere Ionensuppression bei der Messung des Urins bei der LC-MS/MS-Analyse hinweisen, die zu einer geringeren Empfindlichkeit führen. Diese Hypothese stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Verbindung **11** mit einer langen Retentionszeit in beiden Tierarten einen vergleichbaren y -Achsenabschnitt besitzt. Ionensuppression tritt am stärksten am Anfang der Elutionsphase auf, wenn sehr viele Substanzen und Salze in die Ionenquelle gelangen und so den Ionisationsvorgang der Analyten hemmen.

4. Untersuchung des mutagenen Potentials von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit dem Ames-Test

4.1 Einführung

Der Ames-Test ist eine anerkannte *in vitro* Methode zur Untersuchung des mutagenen Potentials von Stoffen [44, 45]. Gerade deshalb ist es wichtig die durch den positiven Test von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) [30] aufgeworfenen Fragen zu klären (siehe Kenntnisstand Teil 7). Durch eine Reproduktion der Ergebnisse könnten die im Kenntnisstand erläuterten Zweifel entkräftet werden. Beim Ames-Test werden Stämme von *Salmonella typhimurium* mit einem defekten Gen für die Histidinsynthese mit einem potentiell mutagenen Stoff inkubiert. Wird durch den Stoff eine Rückmutation (Reversion) am betreffenden Histidin-Gen induziert, ist das Bakterium wieder in der Lage auf „histidinfreiem“¹³ Nährboden zu wachsen. Über das Auszählen von revertierten Bakterien auf histidinfreien Agarplatten ist somit eine Aussage über die

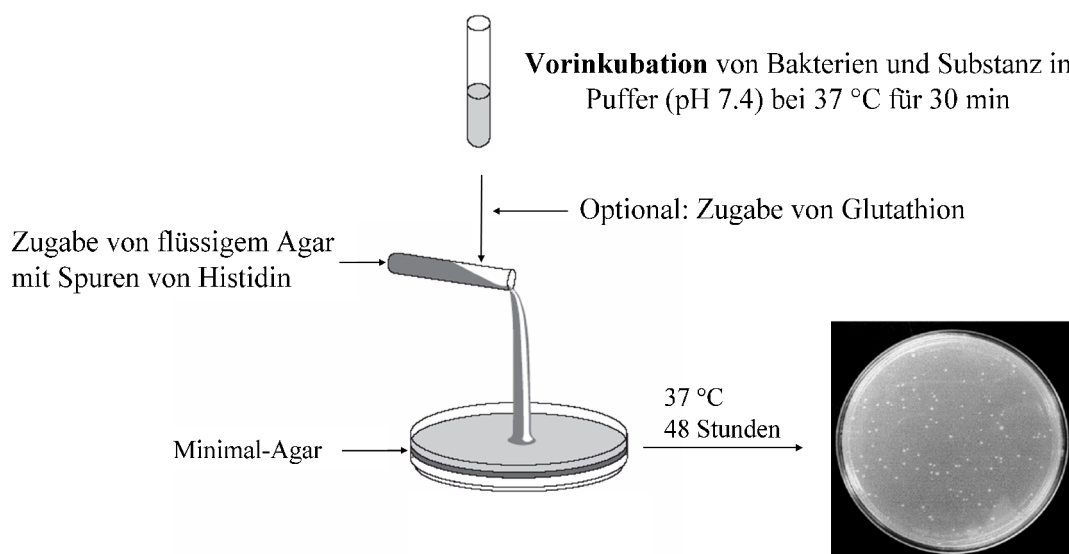


Abbildung 10: Ablauf eines Ames-Tests nach der Vorinkubationsmethode. Zuerst werden die Bakterien über eine kurze Zeitspanne in einem kleinen Volumen mit der Substanz vorinkubiert und dann auf histidinfreiem Minimal-Agar ausplattiert. In einer Variante des Ames-Tests für zytotoxische Stoffe wird nach Ende der Vorinkubationszeit Glutathion (7) zum Inkubat gegeben, um die noch vorhandene Substanz chemisch zu inaktivieren. Nach 48 Stunden bei 37 °C können dann die gewachsenen Kolonien auf der Agarplatte ausgezählt werden.

¹³ Der Nährboden ist nicht komplett histidinfrei, sondern enthält eine Menge an Histidin welche für 2-3 Zellzyklen der Bakterien ausreicht.

Mutagenität möglich. Für ein positives Testergebnis ist mindestens eine Verdoppelung der über eine Kontrollprobe bestimmten Spontanrevertanzahl nötig. Das Besondere am Ames-Test ist, dass für das Wachstum der Zellen ohne Histidin eine Rückmutation des inaktiven Gens für die Histidinsynthese erfolgen muss. Es muss dafür eine gezielte Genmutation stattfinden. Eine Mutation an anderer Stelle reicht dafür nicht aus. Abhängig von der Basenkodierung und dem Ort (Bakterienchromosomen, Plasmid, Multicopyplasmid) des Histidin-Gens gibt es unterschiedliche Amesstämme, die sich weiter durch das Vorhandensein unterschiedlicher Membranstrukturen und DNS-Reparaturwege aufgliedern. Die selbst nur zu geringem Metabolismus befähigten Bakterien können zusammen mit metabolisierenden Enzymmischungen (S9-Mix) inkubiert werden.

Bei den hier vorgestellten Arbeiten wurde mit dem Stamm TA104 gearbeitet. Dieser kann durch eine Mutation an einem Stopp-Codon mit der Basensequenz Thymidin-Adenin-Adenin revertiert werden. Auf die Zugabe von metabolisierenden Enzymen konnte verzichtet werden, da der reaktive Metabolit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) direkt eingesetzt wurde. Die Synthese von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) erfolgte nicht wie bei dem publizierten positiven Ames-Test [30] durch die Oxidation von Furan (**1**) mit Dimethyldioxiran, sondern wie in Schema 6 gezeigt durch die Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**). Ein Vorteil dieser Methode bestand neben dem Verzicht auf peroxidbildende Reagenzien darin, dass die Einwaage von **13** eine aufwendige Konzentrationsbestimmung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) ersetzte.

Die verwendete „Vorinkubations-Variante“ des Ames-Tests (siehe Abbildung 10) teilte sich in zwei Abschnitte. Nach einer kurzen Vorinkubationszeit der Bakterien mit der zu testenden Substanz in einem kleinen Volumen Pufferlösung wird die Bakteriensuspension auf histidinfreiem Agar ausplattiert und für weitere 48 Stunden inkubiert. Da die zu testende Substanz nur für kurze Zeit in hoher Konzentration auf die Bakterien einwirkt wird die Wahrscheinlichkeit für eine Mutation erhöht ohne dabei das anschließende Wachstum auf der Agarplatte durch zytotoxische Effekte zu verhindern [46]. Um zytotoxische Effekte durch α,β -ungesättigte Aldehyde wie *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) zusätzlich zu unterdrücken besteht die Möglichkeit der Zugabe einer Glutathion-Lösung nach der Vorinkubationsphase [31]. Noch im Inkubationsmedium vorhandene Elektrophile können dadurch mit dem Thiol zu unreaktiven oder in ihrer Reaktivität verminderten Substanzen reagieren.

4.2 Ames-Test mit Glutathionzugabe nach der Vorinkubationsphase

Die erste Experimenterserie wurde weitestgehend analog zu dem Protokoll, das den einzigen publizierten positiven Test [30] lieferte durchgeführt. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich deshalb von 1.4 bis 4.3 $\mu\text{mol/Platte}$ und nach der Vorinkubationsphase wurde durch den Zusatz von Glutathion (7) versucht die Zytotoxizität zu verringern. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten unter Verwendung von verschiedenen Ansätzen einer Bakteriensuspension des Stammes TA104. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden aus drei parallel durchgeführten Einzelerperimenten gebildet, welche jeweils auf den gleichen Bakterienansatz zurückgriffen. Es konnte bei keiner Konzentration eine relevante Erhöhung der Spontanrevertanden beobachtet werden.

Tabelle 5: Ergebnisse der Untersuchung von cis-2-Buten-1,4-dial (2) im Ames-Test mit der Zugabe von Glutathion (7) nach der Vorinkubationsphase. Es handelte sich um zwei unabhängige Experimente. Gezählt wurden jeweils die absoluten Zahlen an Revertanden auf der Agarplatte. Der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung (SD) von jeder Konzentration und Substanz wurde aus drei Einzelwerten aus drei unabhängigen Inkubationen mit derselben Bakterienkultur errechnet. Als Positivkontrolle wurde sowohl Glutaraldehyd als auch Methylglyoxal verwendet.

Behandlung	Konzentration [$\mu\text{mol/Platte}$]	Experiment 1	Experiment 2
		Mittelwert \pm SD	Mittelwert \pm SD
Kontrolle + H ₂ O	-	285 \pm 61	245 \pm 26
Methylglyoxal	1	2417 \pm 63	1831 \pm 37
Glutaraldehyd	0.25	-	736 \pm 111
cis-2-Buten-1,4-dial	1.4	229 \pm 23	269 \pm 11
	1.7	345 \pm 41	262 \pm 10
	2.1	348 \pm 48	303 \pm 24
	2.9	339 \pm 27	298 \pm 22
	3.5	331 \pm 17	448 \pm 9
	4.3	166 \pm 22	126 \pm 10

Zweifel am richtigen Konzentrationsbereich bestanden nicht, da bei der höchsten Konzentration von 4.3 $\mu\text{mol/Platte}$ bereits hohe Zytotoxizität zu beobachten war. Eine leichte Zunahme der Kolonienzahl bei niedrigeren Konzentrationen kann durch eine bereits einsetzende Zytotoxizität verursacht sein. Überleben nur wenige Bakterien die Inkubation mit der

zytotoxischen Substanz, ist es möglich, dass die im Minimalagar für zwei bis drei Zellzyklen vorhandene Histidinmenge bei der geringeren Zelldichte auch nicht revertierten Bakterien das Bilden von Kolonien ermöglicht. Da sowohl Methylglyoxal als auch Glutaraldehyd zu einem positiven Ergebnis führten, konnte die Funktionalität des Salmonellenstammes im jeweiligen Experiment sichergestellt werden. Die Aldehyde Methylglyoxal und auch Glutaraldehyd wurden im Stamm TA104 als mutagen identifiziert [31].

4.3 Ames-Test ohne Glutathionzugabe nach der Vorinkubationsphase

In einem weiteren Experiment (Tabelle 6) wurde untersucht, ob die Mutagenität durch den Zusatz von Glutathion (7) möglicherweise unterdrückt wird. Allerdings zeigte sich auch hier keine Mutagenität im Stamm TA104. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich bis 4 $\mu\text{mol/Platte}$. Die Zytotoxizität wurde bei dieser um 0.3 μmol geringeren Konzentration als in

Tabelle 6: Ergebnisse der Untersuchung von cis-2-Buten-1,4-dial (2) im Ames-Test ohne die Zugabe von Glutathion (7) nach der Vorinkubationsphase. Es handelte sich um zwei unabhängige Experimente. Gezählt wurden jeweils die absoluten Zahlen an Revertanden auf der Agarplatte. Der Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung (SD) von jeder Konzentration und Substanz wurde aus drei Einzelwerten aus drei unabhängigen Inkubationen mit derselben Bakterienkultur errechnet. Als Positivkontrolle wurde Methylglyoxal verwendet.

Behandlung	Konzentration [$\mu\text{mol/Platte}$]	Experiment 1 Mittelwert \pm SD	Experiment 2 Mittelwert \pm SD
Kontrolle + H ₂ O	-	352 \pm 11	303 \pm 20
Methylglyoxal	1	1996 \pm 290	2069 \pm 71
cis-2-Buten-1,4-dial	0.0625	375 \pm 28	354 \pm 3
	0.125	343 \pm 38	380 \pm 8
	0.25	385 \pm 6	326 \pm 18
	0.5	414 \pm 16	370 \pm 22
	1	407 \pm 38	379 \pm 27
	2	407 \pm 28	415 \pm 20
	3	n.a.	425 \pm 32
	4	n.a.	338 \pm 25
cis-2-Buten-1,4-dial und GSH	4	n.a.	455 \pm 33

den vorherigen Experimenten nicht so deutlich sichtbar. Die Schwelle für Zytotoxizität scheint in einem sehr kleinen Bereich zu liegen und nur in geringem Ausmaß von Glutathion (7) unterdrückt zu werden. Eine mitgeführte Inkubation mit Glutathionzugabe zeigte bei der Konzentration von 4 $\mu\text{mol/Platte}$ nur eine leicht höhere Anzahl von Revertanden.

5. Parallele Bestimmung gentoxischer Endpunkte in Mauslymphomzellen: Kometen-Test, Mikrokern-Test, Thymidinkinase-Mutationstest

5.1 Einführung

Nach den zu Literaturdaten widersprüchlichen Ergebnissen im Ames-Test sollte die Gentoxizität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) in einem eukaryontischen Zellsystem (L5178Y Mauslymphomzellen) genauer untersucht werden. Ziel war es zu klären, inwieweit *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) DNS-Strangbrüche, chromosomale Schäden oder Mutationen induziert. Dazu wurden drei gentoxikologische Standardtests verwendet. Der Kometen-Test diente zur Bestimmung von DNS-Strangbrüchen, der Mikrokern-Test zur Bestimmung von chromosomalen Schäden und der Thymidinkinase-Mutationstest (TK⁺-Test) zur Identifikation von kleinen Deletionen und Genmutationen. Zusätzlich zu den gentoxischen Endpunkten wurde die Zytotoxizität bestimmt. Alle Tests wurden parallel (siehe Abbildung 11) in Kulturen von L5178Y Mauslymphomzellen durchgeführt, um die Resultate direkt vergleichbar zu machen.

Das Prinzip des Kometen-Tests (auch: Einzelzellelektrophorese) beruht darauf, dass DNS-Strangbrüche zu kurzen DNS-Fragmenten führen, die während der Elektrophorese in einem Agarosegel vermehrt aus dem fixierten Zellkern in Richtung Anode wandern (siehe Abbildung 12). Die Strangbrüche können entweder durch den Einfluss eines gentoxischen Stoffes direkt induziert werden oder bilden sich indirekt während des Kometen-Tests an

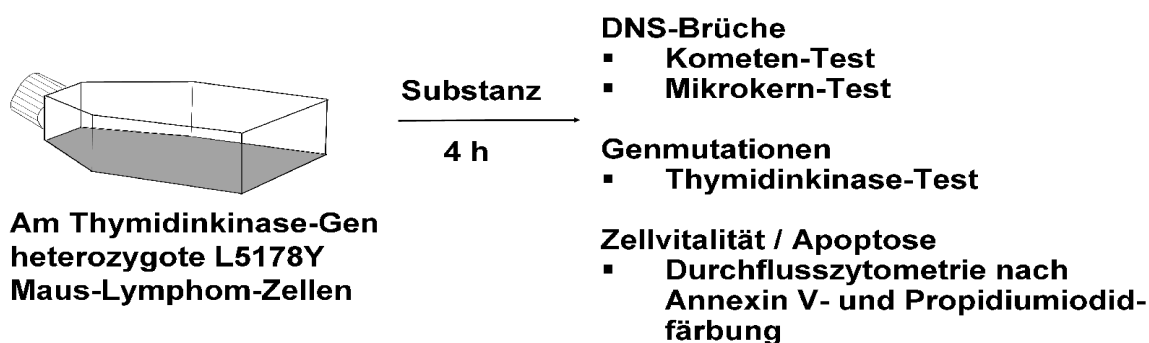


Abbildung 11: Umfang der Untersuchungen in den Mauslymphomzellen nach Furan (1) bzw. cis-2-Buten-1,4-dial Behandlung. Aus einem Zellansatz heraus wurden nach vierstündiger Inkubation parallel die Untersuchungen zu Gentoxizität, Mutagenität und Zytotoxizität durchgeführt.

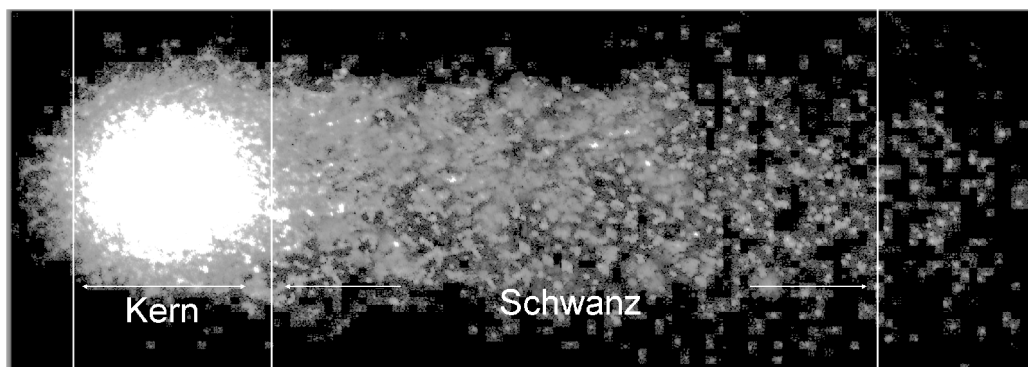


Abbildung 12: Ein „DNS-Komet“, wie er mit dem Fluoreszenz-Mikroskop nach einer Einzellzellelektrophorese und Anfärbung mit Propidiumiodid beobachtet werden kann. Im Kern ist das Chromatin des Zellkerns und damit eine hohe Intensität. Der Schwanz besteht aus DNS-Bruchstücken, welche durch den Einfluss einer genotoxischen Substanz entstanden sind. Relevant für die quantitative Beurteilung eines Kometen-Tests, ist der Quotient aus der Intensität des Schwanzes und des Kopfes.

substanzinduzierten alkalilabilen Stellen. Der Anteil der wandernden DNS-Fragmente kann nach Anfärbung relativ zu der im Kern verbliebenen, genomischen DNS bestimmt werden und dient als Maß für die DNS-Fragmentierung (%Tail DNS).

Beim Mikrokern-Test (MN-Test) zählt man Mikrokerne, welche von Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen stammen, die während der Kernteilung nicht auf die beiden Tochterkerne verteilt wurden. Chromosomale Fragmente können z.B. durch Doppelstrangbrüche an der DNS entstehen. Beim Mikrokern-Test wurde die sogenannte Zytokineseblock-Variante mit Cytochalasin B verwendet. Cytochalasin B bewirkt, dass bei der Zellteilung nur die Kernteilung erfolgt und die Zytokinese unter Bildung zweier Zellen unterbleibt. Es entstehen dadurch doppelkernige Zellen. Beschränkt man die Auswertung auf die doppelkernigen Zellen (siehe Abbildung 13), ist sichergestellt, dass die beobachteten Mikrokerne sich in Zellen befinden, die genau einen Kernteilungszyklus eingeleitet haben.

Mit dem Thymidinkinase-Mutationstest (TK^{+/-}-Test) werden Mutationen nachgewiesen, die zu einem Funktionsausfall im autosomalen Thymidinkinase-Gen (TK-Gen) führen. Die Zelllinie L5178Y ist heterozygot für das Thymidinkinase-Gen. Eine weitere Mutation am funktionellen Allel führt somit zur gänzlichen Inaktivierung der Thymidinkinase. Im Gegensatz zum Ames-Test können im TK^{+/-}-Test neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen erfasst werden. Die behandelten Zellen werden in einem selektiven Medium inkubiert, welchem das toxische Thymidin-Analogon Trifluorthymidin zugesetzt wurde. Zellen, in denen die

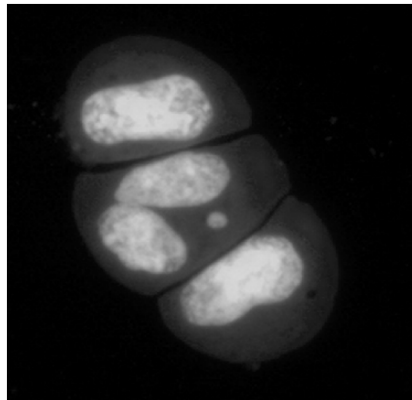


Abbildung 13: Ein Mikrokern in einer zweikernigen Zelle. Die Auszählung von Mikrokernen in zweikernigen Zellen nach Zytokineseblock durch Cytochalasin B stellt sicher, dass sich alle ausgewerteten Zellen im ersten Zellteilungszyklus nach Behandlung befinden.

Thymidinkinase inaktiviert ist ($TK^{-/-}$) können Trifluorthymidin nicht in die DNS einbauen, überleben und bilden Kolonien. Nicht mutierte Zellen ($TK^{+/+}$) setzen Trifluorthymidin zu Trifluorthymidintriphosphat um, bauen dies in die DNS ein und sterben ab. Die behandelten Zellen werden in 96-well Platten ausgesät und nach dem Prinzip eines Fluktuationstests¹⁴ kann anhand der Anzahl der gebildeten Kolonien auf die Mutantenhäufigkeit (MH) am TK-Gen geschlossen werden.

Parallel zu den gentoxischen Endpunkten wurde die Zytotoxizität durchflusszytometrisch mittels Annexin-V- und Propidiumiodid-Färbung bestimmt. Die Annexin-V-Färbung ist geeignet zur Identifikation von apoptotischen Zellen. Bei gleichzeitiger Färbung mit Propidiumiodid können lebende Zellen (negativ für Annexin-V und Propidiumiodid) von apoptotischen (positiv für Annexin-V) und nekrotischen (positiv für Propidiumiodid) Zellen abgegrenzt und quantifiziert werden.

Die Untersuchung auf DNS-vernetzende Eigenschaften erfolgte in einem getrennten Experiment mit einem modifizierten Kometen-Test (siehe Abbildung 14). Während im Standard Kometen-Test Strangbrüche über eine Vergrößerung der Kometen identifiziert werden können, kann bei dieser Variante das vernetzende Potential eines Stoffes durch eine Verringerung der Kometenlänge erschlossen werden. Nach der Inkubation mit einem vernetzenden Agens werden in der Behandlungs- und Kontrollgruppe Strangbrüche induziert. Die Verringerung der Kometen

¹⁴ Bakterien-Mutationstest nach Max Delbrück und Salvador Edward Luria um die Zufälligkeit (Fluktuation) von Mutationen zu beweisen.

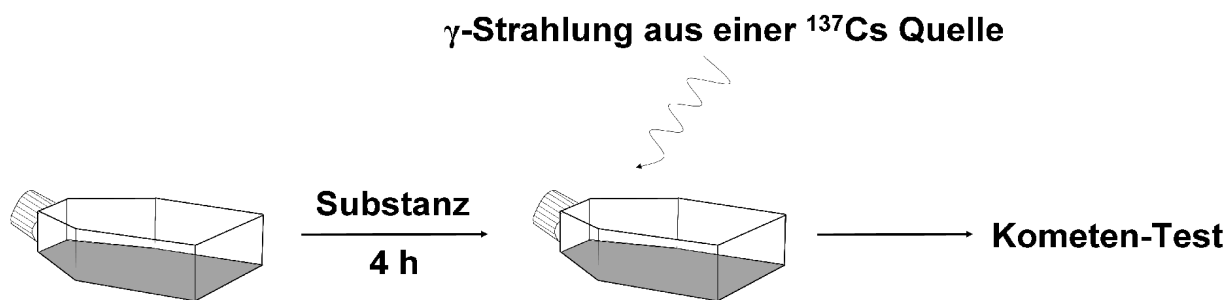


Abbildung 14: Modifizierter Kometen-Test zur Untersuchung auf vernetzende Eigenschaften. Nach einer vierstündigen Inkubationsphase mit dem potentiell vernetzenden Agens werden die Zellen zur Induktion von Strangbrüchen mit γ -Strahlung aus einer ^{137}Cs -Quelle bestrahlt. Wirkt eine Substanz vernetzend auf die DNS wird ein im Vergleich zur ausschließlich bestrahlten Kontrolle reduzierter Effekt im Kometen-Test erwartet.

durch die Substanz im Vergleich zur Kontrollgruppe ist ein Maß für das vernetzende Potential dieser Substanz [47, 48]. Die Induktion von Strangbrüchen kann entweder durch die Inkubation mit einem strangbruchinduzierenden Agens (z.B. Methylmethansulfonat oder Bleomycin) oder durch die Bestrahlung der Zellen mit γ -Strahlung erfolgen. Die Entscheidung fiel auf die γ -Strahlung, da sie bereits für die Untersuchung des Dialdehyden Glutaraldehyd erfolgreich eingesetzt wurde [49].

5.2 Test auf Gentoxizität und Mutagenität von *cis*-2-Buten-1,4-dial

Tabelle 8 zeigt die Effekte von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) bei den Konzentrationen 0, 6.25, 12.5, 25, 50 μM in Form von drei unabhängigen Replikaten. Für jedes Replikat wurde ein Kometen-Test, ein Mikrokern-Test, ein $\text{TK}^{+/-}$ -Mutationstest und die Zellvitalität ausgewertet. Als Positivkontrolle wurde das Methylierungsreagenz Methylmethansulfonat verwendet. Weiterhin gab es eine Kontrollprobe mit 100 μM Essigsäure, da bei der Hydrolyse von 2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**) zwei Äquivalente Essigsäure entstehen. In Abbildung 15 sind die drei Replikate der Tabelle anschaulich dargestellt. Da sich die einzelnen Replikate bereits sehr stark in ihren Kontrollwerten unterschieden, wurden alle Werte eines Replikates relativ zur Kontrolle berechnet und der Mittelwert der relativen Werte mit Standardabweichung aufgetragen. Für die Kontrollprobe gab es aus diesem Grund keinen echten Mittelwert.

Bei Betrachtung der Daten (Tabelle 8, Abbildung 15c) fällt auf, dass ab 25 μM die Zytotoxizität erhöht war. Ab einer Konzentration von 50 μM stieg die Zytotoxizität derart hoch an, dass der Prozentsatz lebensfähiger Zellen nach 24 Stunden auf unter 50% fiel. Gleichzeitig nahm die Zahl der apoptotischen Zellen zu. Die zusammen mit dem Thymidinkinase-Test (nach 14 Tagen) bestimmte Klonierungseffizienz (KE), zeigte damit übereinstimmend eine drastische Abnahme ab einer Konzentration von 50 μM .

Im Kometen-Test konnte eine leichte Zunahme der DNS-Wanderung mit steigender Dosis beobachtet werden. Bei 25 μM ergab sich für die drei Replikate im Mittel eine Zunahme um Faktor 1.6 relativ zur Kontrolle. Um Vergleiche mit anderen DNS-schädigenden Substanzen anstellen zu können, wurde die Steigung der dosisabhängigen Zunahme mit Hilfe eines „Linear-Mixed-Effect“-Modells bestimmt. Dieses berücksichtigt unter Einbeziehung eines Zufallsfehlers

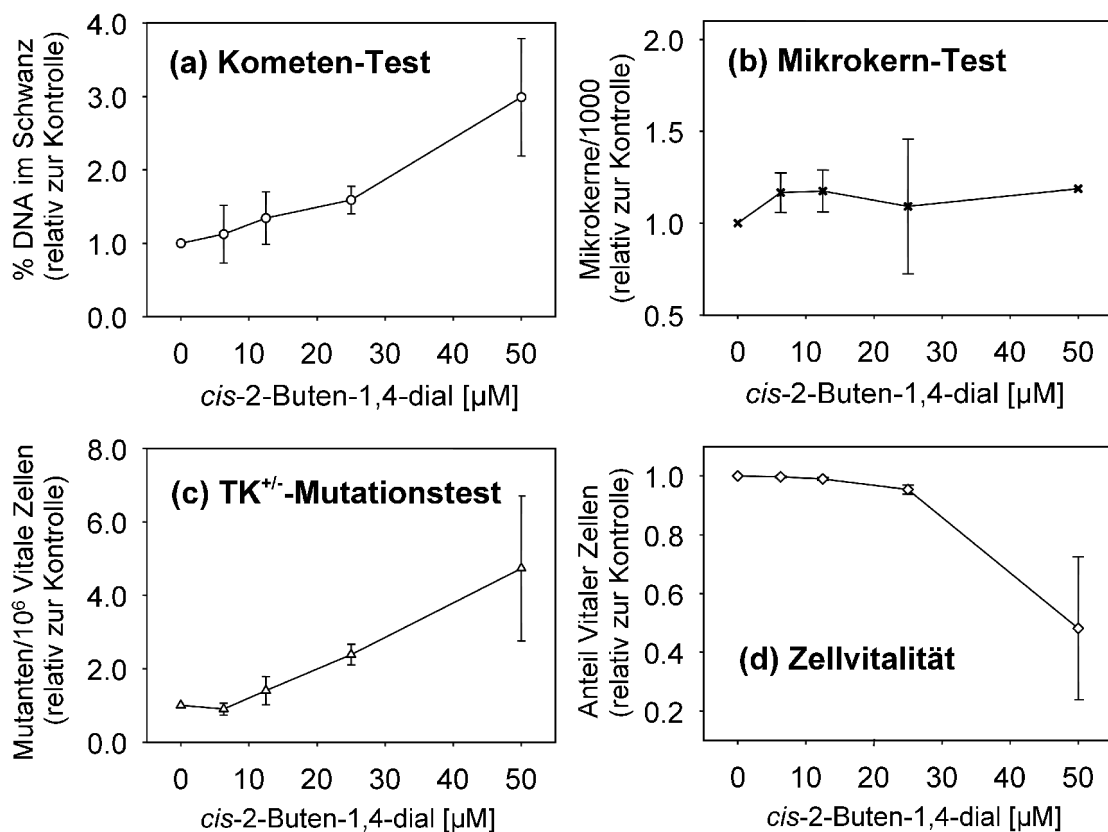


Abbildung 15: Dosis-Wirkungsbeziehung für verschiedene Endpunkte an L5178Y Mauslymphomzellen nach 4 Stunden Inkubation mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (2). Abgebildet sind der relative Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Relativierung auf die Kontrollprobe erfolgte vor der Berechnung des Mittelwerts, so dass für die Kontrolle keine Standardabweichung berechnet werden konnte.

die linearen Dosis-Wirkungs-Kurven der einzelnen, stark unterschiedlichen Replikate. Die Gleichung für die Kurve bis 25 μM wurde als „% DNS im Schwanz“ = $3.1 + 0.07 \times \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$ erhalten. Das Signifikanzlevel für eine von 0 verschiedene Steigung lag bei $p = 0.01$. Methylmethansulfonat hatte eine Steigung von 0.05. Auf Basis dessen scheint *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) geringfügig mehr potent für die Induktion von Strangbrüchen zu sein.

Im Mikrokerntest zeigte sich durch die Behandlung mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) kein dosisabhängiger Effekt. Eine mit dem „Linear-Mixed-Effect“-Modell errechnete lineare Kurve hatte einen p -Wert von 0.98. Dass trotz der gefundenen DNS-Strangbrüche im Kometen-Test keine Mikrokerne (Doppelstrangbrüche) gebildet wurden, lag möglicherweise an der Zeitfolge der Auswertung. Während der Kometen-Test direkt nach der Inkubation ausgewertet wurde, waren für die Mikrokerninduktion weitere 18 Stunden für die Zellteilung nötig. In dieser zusätzlichen Zeit könnte eine Reparatur der Einzelstrangbrüche erfolgt sein.

Die $\text{TK}^{+/-}$ -Mutantenhäufigkeit (MH) stieg mit der Konzentration von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) linear an. Die statistische Analyse der Proben bis 25 μM mit dem „Linear-Mixed-Effect“-Modell lieferte folgende Gleichung: $\text{MH} = 80 + 6.1 \times \text{Konzentration } [\mu\text{M}]$ mit $p < 0.001$. Extrapoliert auf 100 μM ergab sich somit eine 8.6-fache Erhöhung der Mutantenhäufigkeit. Methylmethansulfonat als Positivkontrolle erreichte hier nur einen Anstieg von 3.8-fach. *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) ist somit auch bezüglich der Mutantenhäufigkeit am TK-Gen potenter als Methylmethansulfonat. Die beobachtete Schwankung zwischen den Kontrollen (75-143 Mutationen pro 10^6 lebensfähiger Zellen) liegt im für den Test üblichen Bereich von 50 bis 170 [50].

5.3 Test auf das Potential von *cis*-2-Buten-1,4-dial DNS zu vernetzen

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung auf das DNS-vernetzende Potential von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**). Als Positivkontrolle wurde der bereits positiv getestete und vergleichbar zytotoxische Dialdehyd Glutaraldehyd mitgeführt [49]. Nach der Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) und Glutaraldehyd wurden in L5178Y Mauslymphomzellen mit γ -Strahlung DNS-Strangbrüche induziert und das Ausmaß der DNS-Fragmentierung mit dem Kometen-Test untersucht. Für ein vernetzendes Agens wird durch die gleichzeitige Vernetzung von DNS und/oder Protein eine Abnahme der strahlungsinduzierten DNS-Fragmentierung mit steigender Konzentration erwartet. Für Glutaraldehyd ist dies in Abbildung 17 gezeigt. Für *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) konnte dies nicht beobachtet werden. Im

Tabelle 7: Ergebnisse aus der Untersuchung von cis-2-Buten-1,4-dial (BDA) auf gentoxische, mutagene und zytotoxische Eigenschaften in L5178Y Mauslymphomzellen. Positivkontrolle war das mutagene und gentoxische Methylmethansulfonat (MMS). Es handelte sich um zwei unabhängige Experimente. Die angegebenen Konzentrationen sind die Soll-Konzentrationen die unter der Annahme vollständiger Löslichkeit und geringer Flüchtigkeit erreicht worden wären. Es wurden für jede Konzentration die gentoxischen und die zytotoxischen Endpunkte bestimmt.

	μM	Gentoxische Endpunkte ^a			Zytotoxische Endpunkte ^b		
		Kometen-Test	Mikrokern-Test	tk ^{+/-} -MH	KE	Vitale Zellen	Apoptotische Zellen
BDA	0	3.7	26	102	87	97	1.1
	6.3	5.8	28	77	68	97	1.4
	12.5	5.3	28	115	69	97	1.7
	25	6.6	31	216	65	94	3.8
	50	12	32	612	13	62	18
MMS	100	8.9	49	350	78	87	2.3
AcOH	200	7.7	27	82	58	94	2.7
BDA	0	2.4	10	139	82	93	4.1
	6.3	1.9	11	149	78	93	4.5
	12.5	2.3	13	171	76	92	5.2
	25	3.8	14	327	52	87	7.8
	50	8.9		800	1	19	34
MMS	100	9.9	25	346	60	88	5.3
AcOH	200	3.1	15	143	47	95	2.7
BDA	0	2.9	24	75	66	95	2.9
	6.3	3.0	31	66	61	95	1.3
	12.5	4.8	29	138	68	95	3.3
	25	4.0	17	201	60	92	6.5
	50	6.1	29	184	30	58	39
MMS	100	6.1	54	409	68	93	2.4
AcOH	200	2.8	42	121	34	94	4.1

^a Kometen-Test: [% DNS im Schwanz]; Mikrokern-Test: [Mikrokerne / 10³ Zweikernige Zellen]; tk^{+/-}-Mutantenhäufigkeit [Mutanten / 10⁶ vitale Zellen]

^b KE: Klonierungs-Effizienz, zusammen mit dem tk^{+/-}-Test nach 14 Tagen untersucht; Vitale Zellen = % Zellen, die nach 24 Stunden negativ für Propidiumiodid und Annexin V Färbung sind; Apoptotische Zellen = % Zellen, die nach 24 Stunden positiv für Annexin V Färbung sind

Gegenteil, mit steigenden Konzentrationen an *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) stieg die DNS-Fragmentierung sogar an. Die Zunahme der Fragmentierung bei hohen Konzentrationen in diesem Experiment darf allerdings nicht mit den Ergebnissen des Standard-Kometen-Tests verglichen werden, da ab 50 μM bereits der zytotoxische Bereich begann und möglicherweise einen Teil der DNS-Fragmentierung verursachte. Im Kometen-Test nach γ -Strahlen-Behandlung äußerte sich dies ab einer Konzentration von 100 μM durch die Beobachtung von sogenannten Geister-Zellen. Diese entstehen durch apoptotische oder nekrotische Zellen und haben im Kometen-Test einen Kopf mit stark kondensierter DNS und einen diffusen Schwanz [51, 52].

Die unterschiedliche Wirkung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) und Glutaraldehyd auf die DNS beruht möglicherweise auf Unterschieden in der Reaktivität gegenüber Protein. Der α,β -ungesättigte Aldehyd *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) besitzt im Gegensatz zu Glutaraldehyd eine hohe Reaktivität gegenüber Thiolen aus Protein. Nach einer Primärreaktion mit dem Thiol eines Proteins ist es wahrscheinlicher, dass eine weitere Reaktion mit dem Protein statt mit der DNS stattfindet. Die mit der vorgestellten Methode erfassbare DNS/DNS- bzw. DNS/Protein-Vernetzung könnte auf diese Weise unterdrückt werden. Indizien für eine hohe Reaktivität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) gegenüber Protein lieferten *in vitro* und *in vivo* Daten (siehe Ergebnisse Teil 2 und Teil 3).

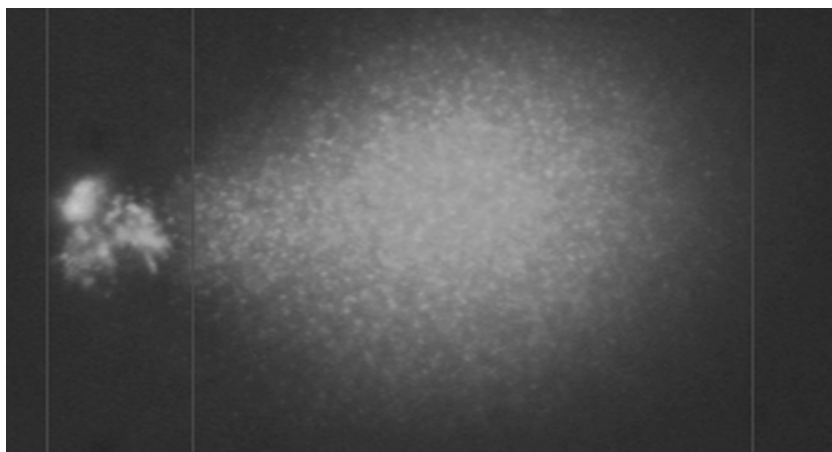


Abbildung 16: Eine sogenannte Geisterzelle im Kometen-Test nach der Behandlung von L5178Y Mauslymphomzellen mit *cis*-2-Buten-1,4-dial. Geisterzellen sind ein Hinweis auf eine hohe Zytotoxizität. Sie entstehen aus apoptotischen oder nekrotischen Zellen und sind im Kometen-Test durch einen Kopf mit stark kondensierter DNS und einen diffusen Schwanz zu erkennen.

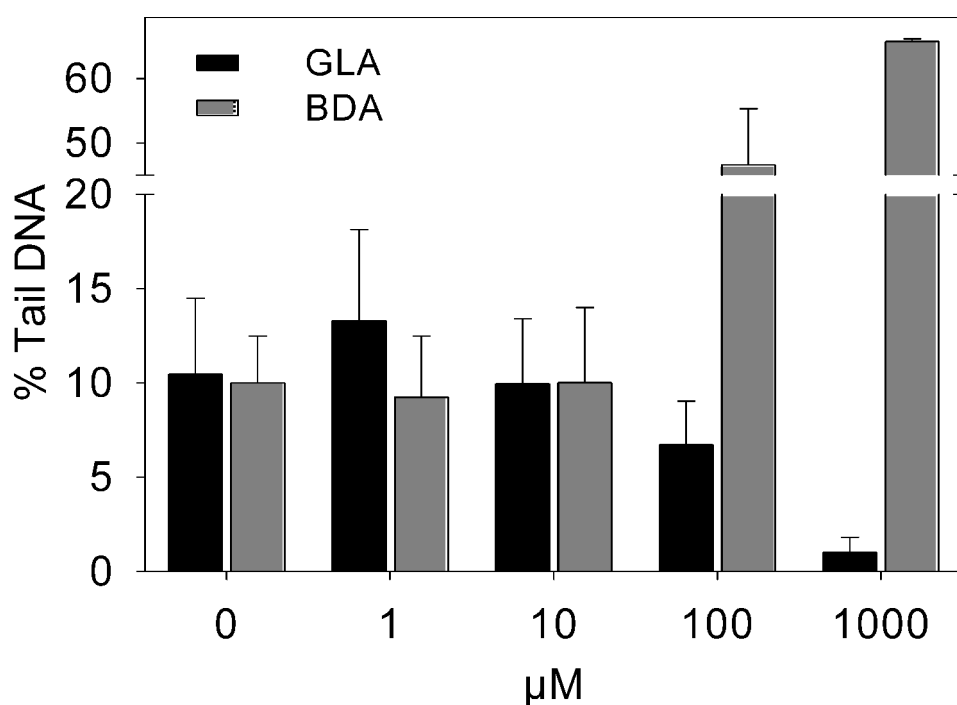


Abbildung 17: Untersuchung von Glutaraldehyd und *cis*-2-Buten-1,4-dial in L5178Y Mauslymphomzellen mit einem modifizierten Protokoll des Kometen-Tests zum Nachweis der DNS-Vernetzung. Gezeigt ist das Ausmaß der DNS-Fragmentierung nach Vorbehandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an *cis*-2-Buten-1,4-dial und Glutaraldehyd und anschließender Bestrahlung mit γ -Strahlung (siehe Abbildung 14).

5.4 Test auf Gentoxizität und Mutagenität von Furan

Analog den Untersuchungen von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) wurde auch Furan (**1**) im Kometen-Test, im Mikrokern-Test und im TK[±]-Test untersucht. Wie für eine Zelllinie mit geringer metabolischer Aktivität [53] zu erwarten war, konnte keine dosisabhängige Veränderung beobachtet werden. Tabelle 8 zeigt die Daten von zwei unabhängigen Experimenten. Selbst bei einer nominalen Konzentration von 60 mM (4 g/L) zeigten weder die gentoxischen noch die zytotoxischen Endpunkte eine signifikante Veränderung. Die mit Methylmethansulfonat produzierten Werte liegen im Bereich von Tabelle 8 und bestätigen als Positivkontrolle die Funktionalität des Tests. Die verwendeten Konzentrationen waren an denen der Literaturdaten orientiert um die Ergebnisse vergleichbar zu machen. In der Literatur wurden jedoch trotz ähnlicher Durchführung gentoxische und auch zytotoxische Effekte berichtet [26].

Tabelle 8: Ergebnisse aus der Untersuchung von Furan (1) auf gentoxische, mutagene und zytotoxische Eigenschaften in L5178Y Mauslymphomzellen. Positivkontrolle war das mutagene und gentoxische Methylmethansulfonat (MMS). Es handelte sich um zwei unabhängige Experimente. Die angegebenen Konzentrationen sind die Soll-Konzentrationen, welche unter der Annahme vollständiger Löslichkeit und geringer Flüchtigkeit erreicht worden wären. Es wurden für jede Konzentration die gentoxischen und die zytotoxischen Endpunkte bestimmt.

	mM	Gentoxische Endpunkte ^a			Zytotoxische Endpunkte ^b		
		Kometen-Test	Mikrokern-Test	tk ^{+/-} -MH	KE	Vitale Zellen	Apoptotische Zellen
Furan	0	1.1	22	161	69	95	2.4
	3.7	1.5	24	144	70	96	2.2
	7.4	2.8	20	97	69	96	2.4
	15 ^c	1.3	41	67	78	96	2.2
	30	2.2	30	77	75	96	2.0
	60 ^d	2.3	28	110	77	96	2.1
MMS	0.1	7.3	49	439	60	92	4.5
Furan	0	1.8	24	107	62	98	1.5
	3.7	3.0	24	106	69	98	1.2
	7.4	3.3	22	95	71	98	1.3
	15	3.5	17	77	75	97	1.6
	30	2.4	22	77	72	97	1.9
	60	2.0	21	110	72	98	1.5
MMS	0.1	6.3	51	308	55	90	2.8

^a Kometen-Test: [% DNS im Schwanz]; Mikrokern-Test: [Mikrokerne / 10³ zweikernige Zellen]; tk^{+/-}-Mutantenhäufigkeit [Mutanten / 10⁶ vitale Zellen]

^b KE: Klonierungs-Effizienz, zusammen mit dem tk^{+/-}-Test nach 14 Tagen untersucht; Vitale Zellen = % Zellen, die nach 24 Stunden negativ für Propidiumiodid und Annexin V Färbung sind; Apoptotische Zellen = % Zellen, die nach 24 Stunden positiv für Annexin V Färbung sind

^c effektive berechnete Dosis 0.88 mM

^d effektive berechnete Dosis 3.14 mM

Auf Grund der Diskrepanz zu den Literaturdaten wurde untersucht, in welcher Konzentration Furan (1) den Zellen zur Verfügung stand. Zwei Effekte dürften dabei sowohl die eigenen als auch die Literaturdaten beeinflusst haben. Zum einen besitzt Furan (1) einen niedrigen Siedepunkt von 30-32 °C und zum anderen eine mäßige Löslichkeit in Wasser. In Wasser sind bei 25 °C maximal 10 g/L (148 mM) löslich [11, 54]. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass sich die Soll-Konzentration und die effektive Konzentration über die

komplette Inkubationsdauer deutlich unterschieden. Um die Effekte abschätzen zu können wurde Furan (**1**) bei 37 °C zu reinem Wasser in Zellkulturflaschen gegeben und dann die Konzentration mit einem UV-Spektrometer bestimmt. Das zeitliche und handwerkliche Vorgehen war an dem der Gentoxizitätstests orientiert. Auf die Zugabe der Zellkulturlösungen und Zellen wurde wegen der hohen Absorption verzichtet. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass die Anwesenheit von Zellen und anderen Bestandteilen die Konzentration von Furan (**1**) im Medium erhöht bzw. den Verlust über die Zeit verringert. Um einen Referenzwert und eine Eichgerade zu erhalten wurde eine bei 25 °C gesättigte Lösung hergestellt und die Absorption bei 211 nm ($\lambda_{\text{max}}=209$ in Acetonitril [55]) in verschiedenen Verdünnungen bei 25 °C bestimmt. Ausgehend von der Annahme, dass die

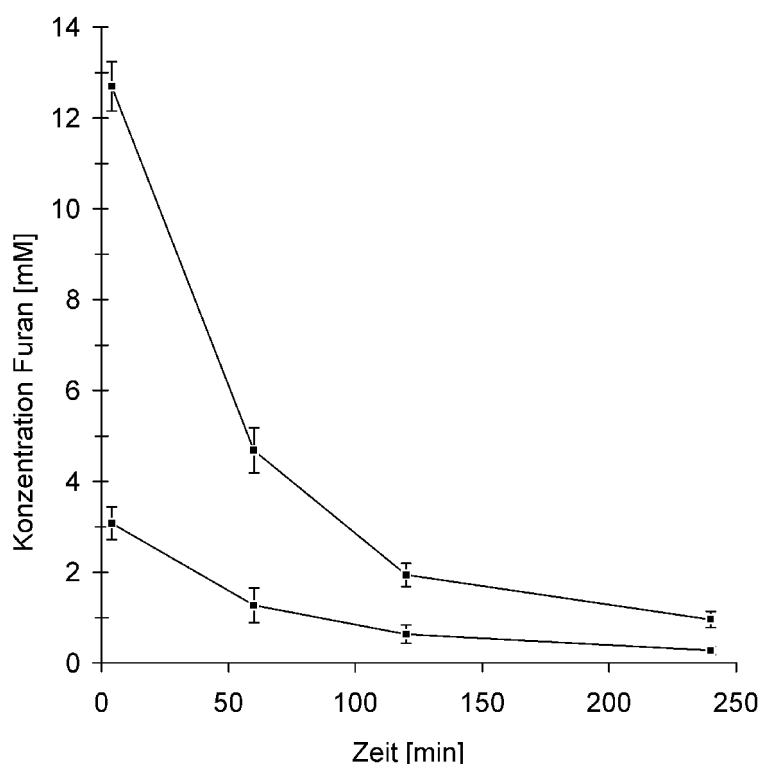


Abbildung 18: Zeitabhängigkeit der Konzentration von Furan (1) in Wasser in einer Zellkulturflasche, wie sie für die Gentoxizitätstests mit L5178Y Mauslymphomzellen verwendet wurde. Die beiden Kurven zeigen die reale Konzentration von zwei Furan-Lösungen mit den Soll-Konzentrationen von 60 bzw. 15 mM in Wasser über eine Zeit von vier Stunden. Der reale initiale Wert betrug im Falle der oberen Kurve 21% im Falle der unteren Kurve 25% des Sollwertes. Die geringere Konzentration und der anschließende rasche Verlust sind auf die schlechte Löslichkeit und hohe Flüchtigkeit von Furan (**1**) zurückzuführen. Beide Kurven ließen sich durch eine Exponentialfunktion annähern. Nach Integration konnte so die Fläche unter den Kurven als das jeweilige Dosis-Zeitintegral bestimmt werden. Mit Hilfe des Verhältnisses der Flächen von Real und Idealfall kann die effektive Dosis relativ zum Idealfall bestimmt werden.

gesättigte Lösung einer 148 mM Furan-Lösung entspricht, wurde über den linearen Bereich der Verdünnungsreihe die Gleichung der Eichgeraden als $\text{Absorption} = 4486 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{Konzentration [M]} - 3.132\text{e-}02$ bestimmt. Die Steigung ist hierbei gleichzeitig der molare Extinktionskoeffizient ϵ . Für die Messung der Furankonzentration in den Zellkulturflaschen wurde eine Aliquot entnommen und auf eine Konzentration im linearen Bereich des Photometers verdünnt und gemessen. Es wurden drei verschiedene Soll-Konzentrationen untersucht. Für die höchste Konzentration von 4 g/L (60 mM) bestand die Zugabe aus reinem Furan (**1**). Die zweithöchste Konzentration mit 1 g/L (15 mM) wurde durch die Zugabe einer 1:4-Verdünnung von Furan (**1**) mit Dimethylsulfoxid hergestellt. Abbildung 18 zeigt das Ergebnis der Messungen. Die erreichten Initialkonzentrationen nach Zugabe von 4 g/L bzw. 1 g/L Furan (**1**) waren 12.7 mM bzw. 3.1 mM. Um eine Aussage über die effektive Konzentration in der Lösung machen zu können, musste das Konzentrations-Zeit-Integral der einzelnen Inkubationen berechnet und mit dem Idealfall, einer über die komplette Inkubationszeit konstanten Konzentration, verglichen werden. Durch Annäherung der Kurve der Soll-Konzentration 60 mM mit einer Exponentialfunktion der Form „Konzentration = $13.5 \times 0.983^{\text{Zeit}}$ “ konnte das Konzentrations-Zeit-Integral von 4 bis 240 Minuten zu $740 \text{ mM} \times \text{min}$ bestimmt werden. Wäre eine über die Zeit konstante Konzentration von 60 mM zu messen gewesen, hätte dies ein Integral von $14140 \text{ mM} \times \text{min}$ ergeben. Das tatsächliche Konzentrations-Zeit-Integral betrug somit 5.2% der Nominalbelastung der Zellen. Entsprechend berechnete sich eine effektive Konzentration von 3.14 mM als 5.2% des Sollwertes von 60 mM. Für die Kurve der Soll-Konzentration 15 mM konnte eine Exponentialfunktion der Form $\text{Konzentration} = 3.22 \times 0.985^{\text{Zeit}}$ gefunden werden. Analoge Berechnungen ergaben eine effektive Konzentration von 0.88 mM.

Für das Ergebnis der Gentoxizitätsprüfung in Tabelle 8 bedeutete dies, dass die maximale effektive Konzentration von Furan (**1**) $\geq 3.14 \text{ mM}$ war. Die in der Literatur publizierte niedrigste Konzentration mit gentoxischem Effekt war 30 mM [26] und wurde somit nicht erreicht. Es ist jedoch davon auszugehen, dass auch dort die effektive Konzentration deutlich niedriger lag. In Anbetracht der Tatsache, dass der Furanmetabolit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) bereits bei einer wesentlich geringeren Konzentration (~ 125 -fach) mutagene Eigenschaften zeigte, dürfte ein positives Ergebnis bei derart hohen Konzentrationen von untergeordneter Rolle für die Bewertung von Furan (**1**) sein.

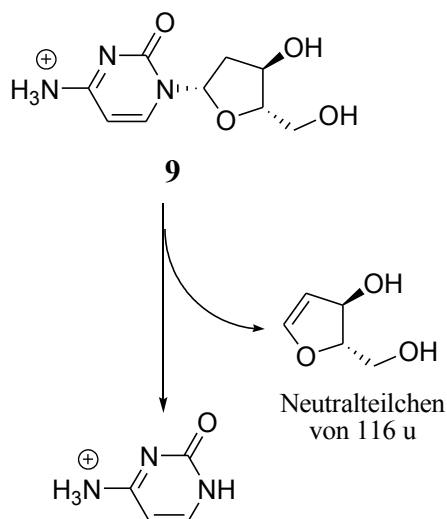
6. Reaktion von Desoxycytidin mit *cis*-2-Buten-1,4-dial in Anwesenheit von Aminosäuren

6.1 Einführung

Die in Ergebnisteil 4 vorgestellten positiven Tests auf Genotoxizität bzw. Mutagenität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) sowie das literaturbekannte Reaktionsvermögen des ungesättigten Aldehyden mit den Desoxyribonukleosiden [20, 23, 29] sprechen für einen genotoxischen Beitrag zur Kanzerogenese von Furan (**1**). Die Beobachtung von hoher Zytotoxizität (siehe Ergebnisse Teil 3 und 4) und die Bildung von Proteinaddukten (siehe Ergebnisse Teil 1 und 2) werfen weiterhin die Frage auf, ob die Interaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit DNS *in vivo* die hohe Kanzerogenität von Furan (**1**) in der Ratte erklären kann. Die beobachtete Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Aminosäurestrukturen stellt einerseits einen gewissen Schutz der DNS dar, andererseits kann durch die zytotoxische Wirkung von Proteinaddukten über nicht direkt genotoxische Mechanismen eine Schädigung der DNS stattfinden. Während letzteres nur schwierig nachzuweisen ist, können grundlegende Informationen über die Schutzfunktion der Peptide relativ einfach durch die gleichzeitige Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Aminosäureäquivalenten und DNS-Äquivalenten gewonnen werden. Für die hier vorgestellten Untersuchungen wurde Desoxycytidin (dCyd) als DNS-Äquivalent ausgewählt, da es in den literaturbekannten Experimenten die höchste Reaktivität gegenüber *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) bei pH 7.4 aufwies und das daraus resultierende Addukt 7-Hydroxy-8-acetaldehyde-3,*N*⁴-ethano-2'-desoxycytidin (**10**) (siehe , Kenntnisstand Teil 4) die größte Stabilität besaß [20]. Als Aminosäureäquivalent wurde das Tripeptid Glutathion (**7**) verwendet, da es *in vivo* in großen Konzentrationen vorliegt und per se für den Schutz von Zellen vor Elektrophilen zuständig ist. Darüber hinaus ist aus den Ergebnissen in Teil 2 und 3 die Bildung eines Glutathionaddukts mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) *in vivo* bekannt.

Analytisch sind DNS-Addukte mit Hilfe von Säulen mit Umkehrphase und Pufferlösungen als Fließmittel gut zu chromatographieren. Der massenspektrometrische Nachweis der Nukleoside bzw. deren Addukte mit einem Tandemmassenspektrometer erfolgt im Multi-Reaction-Monitoring-Mode (siehe Abbildung 7, Ergebnisse Teil 2) durch die Aufzeichnung des Verlusts eines Neutralteilchens von 116 u. Dies entspricht genau dem Verlust der Desoxyribose. In Schema 10 ist das Fragmentierungsverhalten eines Nukleosids anhand des positiv geladenen

Desoxycytidins (**9**) gezeigt. Sofern das Addukt eine charakteristische Masse besitzt, die es von den natürlichen Nucleosiden und Addukten unterscheidet, kann es auf diese Weise selektiv nachgewiesen werden. Für das hier untersuchte Addukt von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Desoxycytidin (**9**) ist ein Massenübergang Q1 → Q3 von 312 → 196 u charakteristisch.



Schema 10: Fragmentierung eines Nucleosids unter Abspaltung eines Neutralteilchens von 116 u am Beispiel des Desoxycytidins (**9**). Der Neutralteilchenverlust von 116 u bei der Fragmentierung von Desoxycytidin entspricht der Abspaltung von Desoxyribose und ist somit charakteristisch für alle Nucleoside bzw. deren Addukte.

6.2 Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin in Gegenwart von Glutathion, N-Acetyl-L-cystein und L-Glutamin

Lösungen von Desoxycytidin (**9**) (1mM) und verschiedenen Konzentrationen an Glutathion (**7**) (0 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1 mM, 3 mM und 10 mM) wurden mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) (1 mM) für 24 Stunden bei 37 °C und pH 7.4 inkubiert. Anschließend wurden über die Intensitäten im Massenspektrometer die relativen Konzentrationen des Desoxycytidinaddukts **10** gegenüber der Probe ohne Glutathion (**7**) bestimmt (siehe Abbildung 19A). Es konnte beobachtet werden, dass die Konzentration des Addukts bis zu einer Glutathionkonzentration von 300 μ M um ca. Faktor 13 relativ zur Kontrollprobe ohne Glutathion (**7**) zunimmt. Ab 300 μ M nimmt die Adduktmenge zwar wieder leicht ab, bleibt aber selbst bei einer Konzentration von 10 mM noch um Faktor 4.5 über dem der Kontrollprobe. Dieser Sachverhalt war auf Grund der bekannten Reaktivität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**)

gegenüber Glutathion (7) nicht zu erwarten. Obwohl Glutathion (7) bei der höchsten Konzentration in 10-fach höherer Konzentration als Desoxycytidin (9) vorliegt, wird mehr Addukt gebildet als in der Kontrollgruppe. Um klären zu können, ob das freie Amin der Glutaminsäure oder die Thiolgruppe des Cysteins im Glutathion (7) für diese Effekt verantwortlich waren, wurde die Inkubation unter gleichen Bedingungen jeweils mit L-Glutamin und *N*-Acetyl-L-cystein anstelle von Glutathion (7) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 19B. Während die Aminosäure L-Glutamin keinen Einfluss auf die Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) mit Desoxycytidin hatte, zeigte das Aminosäurederivat *N*-Acetyl-L-cystein den gleichen Effekt wie Glutathion (7). Bis zu einer Konzentration von 300 μ M findet eine Zunahme um Faktor 14 statt und bei 10 mM *N*-Acetyl-L-cystein ist der Adduktlevel noch Faktor 5.5 über dem Kontrollwert. Eine Hypothese ist, dass der Thiol das in der Reaktivität gehemmte zyklische Hydrat 4 für eine Weiterreaktion aktiviert. Für eine Aufklärung des genauen Mechanismus sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Ob durch die Aminosäuren ein Schutz der DNS möglich ist, bleibt deshalb weiter fraglich.

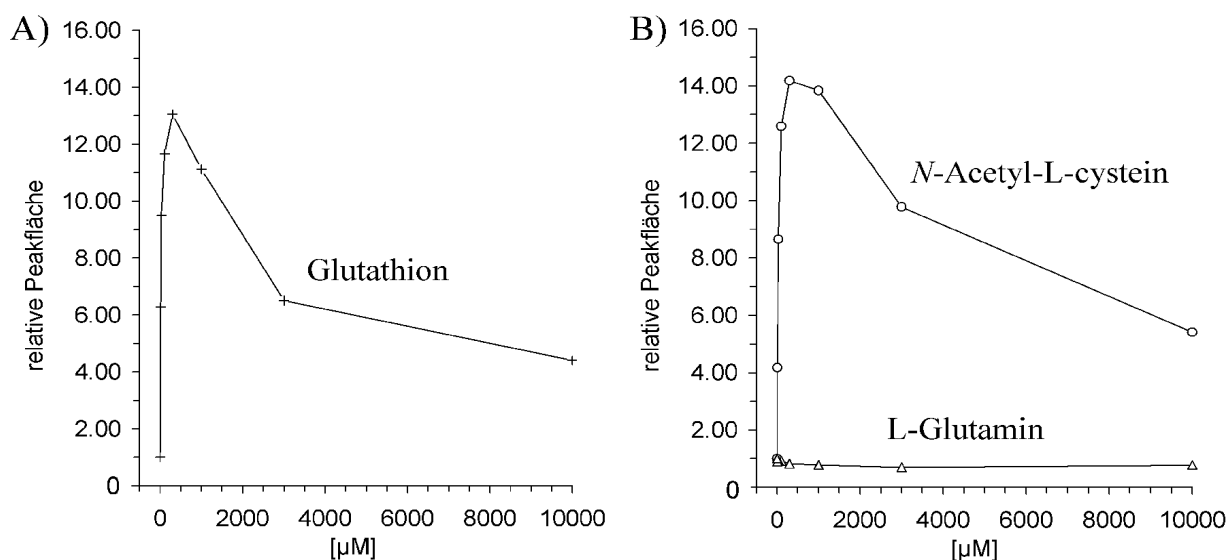


Abbildung 19: Relative Konzentrationen (Peakflächen) des aus Desoxycytidin (9) und *cis*-2-Buten-1,4-dial gebildeten Addukts 10 in Gegenwart von (A) Glutathion (7), (B) *N*-Acetyl-L-cystein und L-Glutamin nach 24 Stunden. Die Konzentrationen von *cis*-2-Buten-1,4-dial und Desoxycytidin waren jeweils 1 mM, die des anderen Nukleophils 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 und 10000 μ M. Inkubiert wurde für 24 Stunden bei pH 7.4.

DISKUSSION

Die zentrale Frage, ob die Kanzerogenität von Furan (**1**) in der Ratte auf einen gentoxischen Mechanismus zurückzuführen ist, konnte in dieser Arbeit nicht vollständig geklärt werden. Durch die vorgestellten Ergebnisse konnte jedoch eine große Anzahl von Fragen beantwortet und der Grundstein für weitere Untersuchungen gelegt werden.

Die Untersuchungen zur Gentoxizität in L5178Y Mauslymphomzellen zeigten, dass die Aktivierung von Furan (**1**) zu *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) eine Voraussetzung für die Beobachtung von gentoxischen oder mutagenen Effekten ist. Im Gegensatz zu den vorhandenen Literaturdaten [26] konnte keine Mutagenität und Gentoxizität für Furan (**1**) beobachtet werden. Auf Grund der geringen metabolischen Aktivität der L5178Y Mauslymphomzellen [53] war dies nicht überraschend. Die hohe Flüchtigkeit und die geringe Wasserlöslichkeit schränkten jedoch die Interpretation der Ergebnisse zunächst stark ein. Mit Hilfe eines Photometers konnte jedoch der Konzentrationsverlauf von Furan (**1**) in Wasser bei 37 °C in Zellkulturflaschen untersucht werden. Über das Konzentrations-Zeit-Integral wurde eine effektive Konzentration für die Soll-Konzentrationen 60 und 15 mM berechnet. Die maximale effektive Konzentration lag zwar mit 3.1 mM deutlich unter der maximalen Soll-Konzentration von 60 mM, war aber für eine Bewertung von Furan (**1**) völlig ausreichend. Vergleicht man die Daten zu Furan (**1**) mit den Daten zu *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) sieht man, dass die maximale effektive Furan-Konzentration um ca. Faktor 125 größer war als die niedrigste Konzentration, bei der *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) gentoxische und mutagene Effekte zeigte (25 µM). Auf Grund des sehr schnellen Metabolismus von Furan (**1**) zu *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) [13] ist es sehr unwahrscheinlich, dass Furan (**1**) einen relevanten Beitrag zur Mutagenität *in vivo* leisten kann. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Diskrepanz zu den Literaturdaten ist die starke Neigung von Furan (**1**) zur Autoxidation. Während in den hier vorgestellten Ergebnissen mit Butylhydroxytoluol stabilisiertes Furan (**1**) verwendet wurde, war dies für die Literaturdaten nicht nachvollziehbar. Es ist denkbar, dass durch Oxidation gebildete Produkte zu einem positiven Ergebnis führten.

Vor dem Hintergrund der mutagenen Eigenschaften von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) in L5178Y Mauslymphomzellen, war der in der Literatur beschriebene [30] positive Ames-Test im Stamm TA104 nicht verwunderlich. Überraschenderweise konnten die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit nicht reproduziert werden. Die Verwendung des Stammes TA104 erfolgte wegen seiner hohen Empfindlichkeit für die Identifikation von mutagenen Enalen und Dicarbonylen [31]. Gleichzeitig ist der Stamm jedoch auch sehr empfindlich gegenüber oxidativen Einflüssen

[32, 56]. Es ist deshalb denkbar, dass die Ergebnisse aus der Literatur durch die Verwendung von Dimethyldioxiran für die Synthese von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) beeinflusst wurden. Doch auch bei den eigenen Untersuchungen können Problempunkte angeführt werden. Es war schwierig eine funktionierende Kultur des Stammes zu erhalten, da er sich nicht in der von der OECD verabschiedeten Richtlinie 471 zur Durchführung von Bakterien-Reversionstests befindet [45] und deshalb nicht für die Standarduntersuchung auf Mutagenität verwendet wird. Auch wenn alle durchgeführten Voruntersuchungen und Positivkontrollen die Identität des Stammes bestätigten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass unbemerkte Mutationen über Jahre hinweg die eng beieinander liegenden Schwellen für die Mutagenität und die Zytotoxizität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) geringfügig verändert haben und deshalb die Mutagenität durch die Zytotoxizität überlagert wurde.

Daten aus dem Thymidinkinase-Mutationstest in Mauslymphomzellen sind mit Daten aus dem Ames-Test (Reversionstest) nur schwierig zu vergleichen. Eine Reversion benötigt eine Punktmutation, welche die Funktionsfähigkeit des betreffenden Gens wiederherstellt. Eine Mutation die zur Ausschaltung des Gens führt kann jedoch entweder durch eine Deletion oder eine Punktmutation erfolgen. Unabhängig von der Aussage der Ames-Daten muss festgehalten werden, dass *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) in Mauslymphom- und damit Säugerzellen mutagen und gentoxisch war, und dass es einer Gruppe von Wissenschaftlern gelang die Bildung von DNS-Addukten an der Bakterien-DNS nachzuweisen [23]. Eine gentoxische Wirkung von Furan *in vivo* kann deshalb nicht ausgeschlossen werden.

Ebenfalls einen Widerspruch zu bereits vorhandenen Daten stellten die Ergebnisse einer Untersuchung auf das DNS-vernetzende Potential von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit einer Modifikation des Kometen-Tests dar. Die DNS-Vernetzung in Eierstockzellen des Chinesischen Hamsters [33] konnte in Mauslymphomzellen nicht nachvollzogen werden. Des weiteren unterschieden sich die Daten zu *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) deutlich von denen zu Glutaraldehyd, einer für die DNS-Vernetzung bekannten Substanz [49]. Während durch Glutaraldehyd eine Reduktion der strahlungsinduzierten Kometen beobachtet werden konnte, stieg die DNS-Fragmentierung durch *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) sogar an. Für den Anstieg waren vermutlich die hohe Zytotoxizität verantwortlich. Möglicherweise wurde die Vernetzung der DNS durch die Vernetzung von Protein verhindert.

Die Bildung von Protein- und Aminosäureaddukten wurde durch die im Urin von Ratten gefundenen sieben Reaktionsprodukte von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) mit Glutathion (**7**), *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein bestätigt. Von fünf der sieben Verbindungen ist die Struktur

bekannt. Die Identifizierung dieser Metaboliten erfolgte im Rattenurin nach der Gabe von 40 mg Furan (1) pro kg Körpergewicht mit Hilfe einer Hauptkomponentenanalyse an dafür vorbereiteten LC-MS/MS-Daten. Neben der Verwendung als Expositionsbiomarker für Furan (1), ermöglichen die Metaboliten einen Zugang zu Informationen über die Reaktivität von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) in der Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass das aus Furan (1) freigesetzte *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) entweder durch Reaktion mit Glutathion (7) und/oder mit Protein abreagieren kann. Während die alleinige Reaktion mit Glutathion (7) normalerweise zu einer echten Detoxifizierung führt, bedeutet die Reaktion mit Protein im Normalfall das Auftreten von Zytotoxizität. Die Konzentration der einzelnen Metaboliten im Rattenurin konnte nur relativ bestimmt werden, da eine absolute Quantifizierung erst der Synthese von markierten Standards bedurft hätte. Um dennoch ihre Bedeutung im Metabolismus zu bestätigen wurde in einem zweiten Tierexperiment die Dosisabhängigkeit in Ratte und Maus untersucht. Es konnte eine klare Dosisabhängigkeit für sechs der sieben postulierten Marker gefunden werden. Für das aus Lysin und *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) gebildete Addukt konnte eine Dosisabhängigkeit nur in der Ratte beobachtet werden. Auf Grund der fehlenden Möglichkeit zur Quantifizierung der sieben Biomarker war es nicht möglich abzuschätzen, welcher Anteil des aufgenommenen Furans (1) über die gefundenen Biomarker mit dem Urin ausgeschieden wurde. Auch die Bedeutung der Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) mit Glutathion (7) im Hinblick auf den Schutz von Protein oder DNS konnte ohne Quantifizierung nicht diskutiert werden.

Die Ausarbeitung einer analytischen Methode auf der Basis von synthetischen Standards für eine Auswahl der Biomarker wäre auch der nächste Schritt in Richtung eines Humanbiomonitorings. Der gefundene Unterschied zwischen glutathion-abgeleiteten und protein-abgeleiteten Biomarkern könnte dann im Rahmen eines Biomonitorings zur Unterscheidung zwischen akuter und kumulativer Exposition dienen. Großer Diskussionsbedarf besteht für die beobachteten Hintergrundlevel der protein-abgeleiteten Biomarker in den Urinproben der Kontrollgruppe. Möglich ist entweder eine endogene Bildung oder die Aufnahme über das Futter. Für eine endogene Bildung spricht die Tatsache, dass es durch den oxidativen Abbau von Desoxyribose zur Freisetzung des ähnlich reaktiven Isomers *trans*-2-Buten-1,4-dial (2) kommen kann [21, 22]. Der hohe Hintergrundlevel des Lysinaddukts 5 kann diese Aussage möglicherweise stützen, da die mit dem Desoxyribose-/Phosphatgerüst wechselwirkenden Histone zu einem hohen Anteil aus Lysin bestehen [57, 58]. Eine sofortige Reaktion von freigesetztem *trans*-2-Buten-1,4-dial (2) mit Lysinseitenketten in Histonen wäre sehr wahrscheinlich. Ein weiteres Indiz für die endogene Bildung ist die Tatsache, dass das Lysinaddukt 5 in der Ratte zwar die

schwächste Dosisabhängigkeit zeigte, aber dazu relativ betrachtet den höchsten Hintergrundlevel besaß. In der Maus findet sich sogar nur ein Hintergrundlevel und keine Dosisabhängigkeit. Hat der Hintergrund eine endogene Herkunft, muss der Effekt jeder zusätzlichen Belastung als Inkrement zum unvermeidbaren Hintergrund betrachtet werden.

Um einen Einblick zu erhalten in welchem Umfang Glutathion (7) die Bildung von DNS-Addukten mit *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) verhindern kann, wurden erste Inkubationsexperimente von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) mit Glutathion (7) und Desoxycytidin (9) durchgeführt. Überraschenderweise nahm die Entstehung des Desoxycytidinaddukts mit der Zugabe kleiner Mengen Glutathion (7) zu. Erst bei höheren Konzentrationen nahm die Adduktbildung wieder ab. Bei der Zugabe von *N*-Acetyl-L-cystein zeigte sich der gleiche Effekt. Möglicherweise ist dies ein Hinweis auf die Aktivierung des cyclischen Hydrates von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) durch die Thiolgruppe. Auch wenn es sich bei diesen Beobachtungen um Vorversuche handelte, so zeigen sie dennoch die Komplexität der Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) mit endogenen Nucleophilen. Eine noch ungeklärte Frage auf diesem Gebiet ist die nach der Bildung von reversiblen Addukten, die eine Speicher- bzw. Transportform für *cis*-2-Buten-1,4-dial (2) darstellen. Ein Transport von großen Molekülen mit Säuregruppen wie z.B. Glutathion (7), in die Galle ist ein bekannter Mechanismus. Vielleicht könnte so die im Vergleich zu den Leberzellkarzinomen hohe Inzidenz der Gallengangskarzinome erklärt werden.

EXPERIMENTELLES

1. Darstellung von *cis*-2-Buten-1,4-dial

1.1 Chemikalien und Geräte

Chemikalien

Die Chemikalien Blei(IV)tetraacetat, Furan (**1**), Essigsäureanhydrid und die Essigsäure waren Handelsprodukte der Firma *Sigma-Aldrich GmbH*.

GC-MS-Kopplung

Gaschromatograph: HP 6890 der Firma *Hewlett Packard* Chromatographiebedingungen A: DB-WAX-Kapillarsäule (Firma *J&W Scientific*); Länge ca. 30 m, ID 0.32 mm, Filmdicke 0.10 μm ; Front-Inlet: Total Flow 16.9 mL/min; Split ratio 10:1; Inlettemperatur: 240 °C; Trägergas Helium 1.3 mL/min; Interfacetemperatur: 250 °C; Injektionsvolumen 1 μL ; Temperaturprogramm: 40 °C – 10 °C/min – 240 °C. Detektor: HP 5973 MSD der Firma *Hewlett Packard* (Elektronenstoßionisation) Verwendete Messverfahren: Aufzeichnung aller Massen von 40 bis 300 u (SCAN).

NMR-Spektroskopie

Die Messungen erfolgten bei 300 °K an einem AV 400 der Firma *Bruker*. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Software Mestrec C 4.9.9.6 der Firma *Mestrelab Research*. Als Lockmittel wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet. Externer Standard war Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$ ppm).

1.2 Synthese von *cis*-/*trans*-2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran

Eine Suspension von Pb-(IV)-tetraacetat (5.0 g; 11.3 mmol) in Eisessig (25 mL) und Essigsäureanhydrid (1 mL) wurde bei einer Temperatur von 60 °C gerührt. Durch ein Septum wurde dann Furan (**1**) (0.85 mL; 11.4 mmol) zugegeben und für eine weitere Stunde bei 60 °C gerührt. Die Suspension ging dabei in Lösung. Anschließend wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum entfernt. Das übrig gebliebene Öl wurde dann in Diethylether (20 mL) suspendiert und ein weißer Feststoff abfiltriert. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum wurde erneut mit wenig Diethylether (ca. 2 mL)

aufgenommen und die Lösung durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Es konnten 1.68 g (8.98 mmol, 80% Ausbeute) eines leicht gelben Öls isoliert werden. Die Stereoisomeren *trans*-1,5-Diacetoxy-1,5-dihydrofuran (*trans*-**13**) und *cis*-1,5-Diacetoxy-1,5-dihydrofuran (*cis*-**13**) entstanden im Verhältnis 2:1.

cis-1,5-Diacetoxy-1,5-dihydrofuran (*cis*-**13**):

¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃): δ = 2.00 (s, 6H, CH₃), 6.20 (s, 2H, CHCH), 7.00 (s, 2H, CHOCH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 21.0 (2C, CH₃), 101.5 (2C, CHOCH), 131.3 (2C, CHCH), 169.9 [OC(O)CH₃].

trans-1,5-Diacetoxy-1,5-dihydrofuran (*trans*-**13**):

¹H-NMR (400.1 MHz, CDCl₃): δ = 2.10 (s, 6H, CH₃), 6.25 (s, 2H, CHCH), 6.75 (s, 2H, CHOCH).

¹³C-NMR (100.6 MHz, CDCl₃): δ = 21.1 (2C, CH₃), 100.1 (s, 2H, CHOCH), 131.0 (s, 2H, CHCH), 169.8 [2C, OC(O)CH₃].

GC/EI-MS: *t_R* = 7.19 min und 7.43 min; *m/z* (%): 157 (1) [M⁺ – 2 CH₃], 143 (1) [M⁺ – CH₃CO], 127 (13) [M⁺ – OAc], 84 (10) [M⁺ – CH₃CO, – OAc], 68 (2) [M⁺ – 2 OAc], 43 (100) [CH₃CO⁺].

1.3 Herstellung einer 100 mM *cis*-2-Buten-1,4-dial Lösung

2,5-Diacetoxy-2,5-dihydrofuran (**13**) (9.3 mg; 50 μmol) wurde in destilliertem Wasser (500 μL) gelöst, gut vermischt und für 24 h bei Raumtemperatur aufbewahrt. Weitere Verdünnungen für Inkubationen wurden mit Wasser hergestellt. Nach 24 h war die Hydrolyse zu den Hydraten *cis/trans*-2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran zu > 97% abgeschlossen. Gleichzeitig konnte die Bildung von zwei Äquivalenten Essigsäure beobachtet werden. Die *cis/trans*-Isomere lagen in einem Verhältnis von 2:1 vor. Für die ¹H-NMR Messung wurde der Ansatz um Faktor drei verdünnt.

cis-2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran (*cis*-**4**):

¹H-NMR (400.1 MHz, D₂O): δ = 6.12 (1 H), 6.13 (1 H)

trans-2,5-Dihydroxy-2,5-dihydrofuran (*trans*-**4**):

¹H-NMR (400.1 MHz, D₂O): δ = 5.83 (1 H), 6.11 (1 H).

2. Tierversuch zur Identifizierung von Furanmetaboliten im Urin von Ratten

2.1 Chemikalien, Geräte und Arbeitsweise

Chemikalien

N-Acetyl-L-lysin, *N*-Acetyl-L-cystein, Glutathion (7) und Natriummethanthiolat waren Handelsprodukte der Firma *Sigma-Aldrich GmbH*.

¹H-NMR-Spektroskopie

Die ¹H-NMR-Messungen erfolgten bei 300 °K an einem AV 400 der Firma *Bruker*. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Software *Mestrec C 4.9.9.6* der Firma *Mestrelab Research*. Als Lockmittel wurde das jeweilige Lösungsmittel verwendet. Externer Standard war Tetramethylsilan ($\delta = 0.00$ ppm).

Arbeitsweise

Zur Herstellung und Aufarbeitung von Inkubationslösungen wurden nach der Guten Laborpraxis überprüfte und geeichte Eppendorfpipetten und Messkolben verwendet. Wenn möglich wurden die Lösungen so hergestellt, dass Volumen kleiner als 10 μ L nicht pipettiert werden mussten. Die zu messenden Lösungen wurden zwischen den einzelnen Messtagen bei 7 °C aufbewahrt. Stammlösungen und Verdünnungsreihen die längerfristig zu verwenden waren, wurden bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt. Die HPLC erfolgte, sofern nicht abweichend angegeben, bei einer Temperatur von 18 °C.

2.2 Tierversuch

Der Tierversuch wurde von der Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die männlichen Fischer 344 Ratten wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) im Alter von 8 Wochen und mit einem Gewicht zwischen 200 und 235 g bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem pathogenfreien Tierhaus unter Einhaltung eines 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C mit Wasser und Futter ad libitum. Eine Gruppe von fünf Ratten erhielt eine Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht Furan (1) in Maiskeimöl per Schlundsondierung. Eine Kontrollgruppe von ebenfalls fünf Tieren erhielt die selbe Menge an Öl (2.5 mL pro kg Körpergewicht). Für die Urinsammlung wurden die Tiere 48

Stunden vor Exposition einzeln in Metabolismuskäfige gesetzt. Wasser und Futter stand ihnen auch während dieser Phase ad libitum zur Verfügung. Der Urin wurde in je zwei Sammelperioden vor und nach der Furgabe in einem Wasser/Eis-Bad gesammelt, in 500 μL Portionen aliquotiert und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Analyse aufbewahrt. Mit einem DRC-200 Handrefraktometer (Fuzhou Link Optical Instrument Co. Ltd, Fujian, China) wurde die relative Dichte der Urinproben bestimmt. Weitere Urinparameter, d.h. der Kreatiningehalt, Harnstoffgehalt, die Konzentration an Kalium, Natrium und Chlorid, sowie die Osmolarität wurden vom Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg analysiert.

2.3 Probenvorbereitung

Aliquote der 40 Urinproben wurden nach Bedarf aufgetaut und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ und $14000\times g$ für 20 Minuten zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile aus dem Urin zu entfernen. Um die unterschiedliche Konzentration des Urins auszugleichen, wurde jede Urinprobe mit Wasser auf eine relative Dichte von 1.010 g/mL verdünnt. Ein Ausgleich der leicht unterschiedlichen pH-Werte auf analytisch sinnvolle Werte erfolgte durch die Zugabe von $5\text{ }\mu\text{L}$ einer 4 M Salzsäurelösung zu $450\text{ }\mu\text{L}$ der Probe.

2.4 Automatisierte Probenaufarbeitung und Analytik mit einer Säulenschaltung

Die in Abbildung 4 schematisch gezeigte Säulenschaltung bestand aus einem Autosampler mit $900\text{ }\mu\text{L}$ Probenschleife, zwei HPLC-Pumpen (Agilent Series 1100, Waldbronn, Deutschland) und einem elektronisch gesteuerten Schaltventil. $350\text{ }\mu\text{L}$ einer Probe wurden durch Pumpe 2 und den Autosampler mit $1000\text{ }\mu\text{L/min}$ auf die mit Ameisensäure (0.1%) equilibrierte Trap-Säule (ReproSil-Pur C18-AQ, $5\text{ }\mu\text{m}$, $33\times 3\text{ mm}$, Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland) transferiert. In einem Spülzyklus von 1.1 min wurden nicht adsorbierte Stoffe in den Abfall gespült und so die Probe gereinigt. Pumpe 1 equilibrierte zu diesem Zeitpunkt die analytische Säule (ReproSil-Pur C18-AQ, $3\text{ }\mu\text{m}$, $150\times 2\text{ mm}$, Dr. Maisch) isokratisch mit Ameisensäure (0.1%) und Acetonitril ($95/5\text{ Vol-\%}$). Nach Abschluss der Probenaufarbeitung wurde die Säulenverknüpfung mittels eines elektronisch gesteuerten Schaltventils so verändert, dass nun Pumpe 1 die noch auf Trap-Säule befindlichen Analyten über die analytische Säule ins Massenspektrometer eluierte. 0.9 min nach Beginn der Elutionsphase fuhr Pumpe 1 innerhalb von 23 min einen Gradienten auf 50 Vol-\% Acetonitril. Ein weiterer Gradient auf 90 Vol-\%

Acetonitril wurde innerhalb weiterer 2 min durchlaufen und für 2 min gehalten. Nach 8.9 min in der Elutionsphase waren alle Analyten von der Trap-Säule auf die analytische Säule gespült und das Steuerventil schaltete zurück auf den Spülmodus um die Trap-Säule durch einen Gradienten bis 90 Vol-% Acetonitril für die nächste Analyse vorzubereiten. Nach Abschluss des analytischen Gradienten wurde innerhalb von 2 min auf das ursprüngliche Lösungsmittelgemisch (95/5 Vol-%) zurückgestellt und dann für 9 min equilibriert. Insgesamt ergab sich eine Zeit von 40 min pro Probe.

2.5 Nicht zielgerichtete Tandemmassenspektrometrie-Methode

Das Massenspektrometer (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Kanada) wurde im negativen Elektrospray-Ionisations-Modus betrieben. Die Ionisierungsspannung betrug -4200 V bei einer Quelltemperatur von $400\text{ }^{\circ}\text{C}$. Das „Declustering Potential“ war -30 V und das „Entrance Potential“ -10 V . Stickstoff wurde als Ionen-Spray- (45 psi), Trocknungs- (50 psi) und „Curtain Gas“ (30 psi) verwendet. Stickstoff wurde ebenfalls in der Kollisionszelle als Fragmentierungsgas verwendet. Das Massenspektrometer zeichnete währendes des HPLC-Laufes von Minute 5 bis 30 die Daten im „EMS-IDA-EPI“-Modus auf. EMS stand dabei für „Enhanced Mass Spectrometry, IDA für „Information Dependent Acquisition“ und EPI für „Enhanced Product Ion Scan“. Mit Hilfe der EMS-Technik wurde ein Full-Scan im Bereich von m/z 100 bis 500 mit einer Scan-Rate von 1000 u/s aufgezeichnet. Aus diesem Bereich wurden die Ionen m/z 134 und 178 herausgenommen, da sie vom Lösungsmittel gebildet wurden und für einen konstanten Hintergrund verantwortlich waren. Der Aufzeichnungsschwellenwert wurde auf 100 counts/s gesetzt. Die zur Ionenanreicherung verwendete lineare Ionenfalle hatte eine Füllzeit von 50 ms . Eine weitere Anreicherung der Ionen wurde durch die Sammlung von Ionen in einem vorgeschalteten Quadrupol (Q0) erreicht. Für einen Datenpunkt im Chromatogramm wurden jeweils zwei Scans aufsummiert. Wurde mit diesen zwei Scans eine Intensität von 2500 counts/s überschritten, wurde ein Fragmentationenspektrum (EPI) von der intensivsten Masse mit ebenfalls zwei Scans aufgenommen. Die Kollisionsenergie betrug für jeweils ein Drittel der Scan-Zeit -15 V , -30 V und -45 V . Die für das Fragmentationenspektrum ausgewählte Masse wurde für die nächsten 15 s ausgeschlossen. Weiterhin wurden für die komplette Analysedauer die Ionen mit m/z 159, 201, 202, 203, 212 ausgeschlossen, da sie die Aufzeichnung störten. Die mittlere Scan-Zeit für einen „EMS-IDA-EPI“-Scan betrug 3.6 s .

2.6 Datenextraktion und Hauptkomponentenanalyse

Für die Biomarkersuche mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse wurden ausschließlich die EMS (Full-Scan) Daten verwendet. Alle 40 aufgezeichneten Full-Scan-Chromatogramme wurden als Einheit mit der MarkerView Software 1.2 (Applied Biosystems/MDS Sciex) extrahiert. Die dazu verwendeten Extraktionsparameter waren ein Schwellenwert von 10 counts/s, eine minimale spektrale Peakbreite von 0.1 u und eine maximale zeitliche Peakbreite von 20 Scans. Für die Zuordnung eines Signals zu einer Variable wurden Retentionszeitverschiebungen von 30 s und Massenverschiebungen von 0.1 u in und zwischen den einzelnen Läufen akzeptiert. Weiterhin war für die Akzeptanz eines Peaks der Nachweis in mindestens 4 der 40 Proben nötig. Die Extraktion der Daten wurde durch einen von der Software angebotenen Reintegrationsalgorithmus verbessert. Unter Verwendung dieser Parameter ergab sich eine Datenmatrix mit 449 Variablen (Masse-/Retentionszeit-Paare) bei 40 Observationen. Die Datenmatrix wurde für die Hauptkomponentenanalyse in SIMCA-P 11.5 (Umetrics, Umeå, Schweden) importiert, zentriert und auf Einheitsvarianz skaliert. Die Berechnung der Hauptkomponenten erfolgte für alle 10 Tiere innerhalb der ersten 24 Stunden nach Exposition. Die Anzahl der signifikanten Hauptkomponenten wurde automatisch über eine im Programm integrierte siebenfache Cross-Validierung (Q^2) überprüft. Die Visualisierung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte durch "Scores Plots" und "Loadings Plots". Die erste Hauptkomponente konnte bereits die Dosis- von den Kontrolltieren trennen. Die für die Abtrennung der Dosisgruppe 50 wichtigsten Variablen wurden in den Originalchromatogrammen auf Isotopen sowie auf chromatographische und massenspektrometrische Eigenschaften untersucht. 13 davon kamen in die nähere Auswahl als Biomarker. m/z (t_R): 414 (14.4); 335 (14.6); 371 (13.7); 398 (20.1); 357 (13.5); 354 (15.0); 217 (19.1); 387 (23.6); 382 (13.2); 167 (5.5); 242 (23.3); 403 (20.7); 253 (14.1).

2.7 Tandemmassenspektrometrie-Methode für die quantitative Untersuchung von potentiellen Biomarkern

Die 13 mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse ausgewählten 13 potentiellen Biomarker wurden unter Verwendung der oben beschriebenen chromatographischen Methode zusätzlich mit Hilfe des Multi-Reaction-Monitoring Modus des Massenspektrometers in allen Urinproben nach Exposition untersucht. Die dafür verwendeten Massenpaare des ersten (Q1) und dritten Quadrupols (Q3) wurden aus den Fragmentationenspektren herausgelesen. Wenn möglich, wurde das empfindlichste Ion des Spektrums für Q3 verwendet. Die Aufzeichnungszeit für einen

Übergang betrug 25 ms. Die Kollisionsenergie wurde für alle Paare auf -30 V gesetzt. Das Massenspektrometer QTRAP 2000 (Applied Biosystems/MDS Sciex) wurde im negativen Elektrospray-Modus betrieben. Die Ionisierungsspannung betrug -4200 V bei einer Quelltemperatur von 400 °C. Das „Declustering Potential“ war -30 V und das “Entrance Potential” -10 V. Stickstoff wurde als Ionen-Spray- (45 psi), Trocknungs- (50 psi) und “Curtain Gas” (30 psi) verwendet. Stickstoff wurde ebenfalls in der Kollisionszelle als Fragmentierungsgas verwendet. Die Integration der Peakflächen erfolgte manuell mit dem Programm Analyst 1.4.1 (Applied Biosystems/MDS Sciex). Die analytische Reproduzierbarkeit wurde durch die Messung von vermischten Urinproben als Qualitätskontrolle nach jeder zehnten Probe überwacht. Übergänge mit mehr als 1×10^5 counts wurden zur Berechnung von Variations-

Tabelle 9: Parameter für die Analyse der Rattenurine im Multi-Reaction-Monitoring Modus auf potentielle Furanmetaboliten und Auswertung der erhaltenen Peakflächen mit dem Wilcoxon-Test. Für die Auswertung wurde jeweils der Übergang von der Masse im ersten Quadrupol (Q1) auf die Masse im dritten Quadrupol (Q3) verwendet. Statistisch wurde sowohl der Unterschied zwischen der Dosis- und der Kontrollgruppe im 0-24 Stunden Sammelintervall nach Exposition, als auch der Unterschied zwischen dem 0-24 und 24-48 Stunden Sammelintervall untersucht.

Parameter			Wilcoxon Rangsummentest	
Masse Q1	Masse Q3	Retentionszeit	Dosis- vs. Kontrollgruppe im 0-24 h Sammelintervall	Dosisgruppe im 0-24 h gegen Dosisgruppe im 24-48 h Sammelintervall
414	285	14.4	***	n.s.
335	206	14.6	***	*
371	242	13.7	***	n.s.
398	269	20.1	***	n.s.
357	137	13.5	*	n.s.
354	141	15.0	***	*
217	157	19.1	**	n.s.
387	387	23.6	***	n.s.
382	206	13.2	n.s.	n.s.
167	124	5.5	n.a.	n.s.
242	97	23.3	***	*
403	403	20.7	n.a.	n.s.
253	211	14.1	***	n.s.

*** Signifikant mit $p < 0.005$; ** Signifikant mit $p < 0.01$; * Signifikant mit $p < 0.05$; n.s., nicht Signifikant; n.a., nicht auswertbar.

koeffizienten herangezogen. Es ergab sich ein Variationskoeffizient von 4% für das Signal von 387→387 bei t_R 23.6 min 19% für das von 357→137 bei t_R 13.5 min und 7% für das von 217→157 bei t_R 19.1 min. Die Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Gruppe bzw. zwischen 24 und 48 Stunden nach Behandlung wurden statistisch mit dem einseitigen bzw. zweiseitigen Wilcoxon Rangsummentest im R 2.3.1 Programm (R Foundation for Statistical Computing) analysiert.

2.8 Inkubation von *cis*-2-Butene-1,4-dial mit *N*-Acetyl-L-lysin

Zu 1.9 mL Kaliumphosphatpuffer (250 mM, pH 7.4) wurden 50 μ L einer Lösung von *N*-Acetyl-L-lysin (10 mM) und 50 μ L einer Lösung von *cis*-2-Butene-1,4-dial (**2**) (1 mM) gegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Hauptprodukt dieser Inkubation wurde in der Literatur als R-2-(Acetylamino)-6-(2,5-dihydro-2-oxo-1*H*-pyrrol-1-yl)-1-hexansäure (**5**) charakterisiert [15]. Die Analyse der Lösung erfolgte mit der für die *in vivo* Daten vorgestellten "EMS-IDA-EPI"-Methode. Es wurde die Struktur von **5** bestätigt. LC-MS/MS-Daten von **5**: t_R =14.1 min; m/z 253 [$M^- - H$; 100%], 211 [$M^- - C(O)CH_3$; 87%], 167 [$M^- - C(O)CH_3$ und $-COOH$; 9%], 82 [$N(CH_2CH=CHC=O)^-$; 21%].

2.9 Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit *N*-Acetyl-L-lysin und *N*-Acetyl-L-cystein

Zu 1.85 mL Kaliumphosphatpuffer (250 mM, pH 7.4) wurden 50 μ L einer Lösung von *N*-Acetyl-L-cysteine (10 mM), 50 μ L einer Lösung von *N*-Acetyl-L-lysin (10 mM) und 50 μ L einer Lösung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) (1 mM) gegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Hauptprodukt dieser Inkubation wurde in der Literatur als *N*-Acetyl-S-[1-[5-(acetylamino)-5-carboxypentyl]-1*H*-pyrrol-3-yl]-L-cystein (**6**) charakterisiert [15]. Die Analyse der Lösung erfolgte mit der für die *in vivo* Daten vorgestellten "EMS-IDA-EPI"-Methode. Es wurde die Struktur von **6** bestätigt. LC-MS/MS-Daten: t_R =20.1 min; m/z 398 [$M^- - H$; 100%], 269 [$M^- - CH_2CH(NHCOCH_3)COOH$; 72%], 227 [$M^- - C_4H_8CH(NHC=OCH_3)COOH$; 65%]; 98 [pyrrol-3-thiolat; 29%]. Ein weitere Substanz in der Inkubationslösung wurde als das Sulfoxid von **6** identifiziert. Es konnte bereits in den *in vivo* Daten als Verbindung **12** nachgewiesen werden. LC-MS/MS-Daten von **12**: t_R =14.4 min; m/z 414 [$M^- - H$; 44%], 285 [$M^- - CH_2CH(NHC(O)CH_3)COOH$; 100%], 243 [$M^- - C_4H_8CH(NHCOCH_3)COOH$; 44%]; 114 [9%]. Die Oxidation von mit HPLC isolierter Verbindung **6** mit

H₂O₂ führte ebenfalls zu **12**. LC-MS/MS-Daten: (*t_R*=14.2 min): *m/z* 414 [39%], 285 [100%], 243 [48%]; 114 [10%].

2.10 Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Glutathion

Zu 1.9 mL Kaliumphosphatpuffer (250 mM, pH 7.4) wurden 50 µL einer Lösung von reduziertem Glutathion (**7**) (10 mM) und 50 µL einer Lösung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) (1 mM) gegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Hauptprodukt dieser Inkubation wurde in der Literatur als Cyclo-*N*-[4-carboxy-4-(3-mercapto-1*H*-pyrrol-1-yl)-1-oxobutyl]-L-cysteinylglycinsulfid (**8**) beschrieben [15]. Die Analyse der Lösung erfolgte mit der für die *in vivo* Daten vorgestellten "EMS-IDA-EPI"-Methode. Es wurde die Struktur von **8** bestätigt. LC-MS/MS **8**: *t_R*=15.0 min; *m/z* 354 [*M*⁻ - H; 100%], 336 [*M*⁻ - H₂O; 8%]; 185 [9%]; 141 [24%]; 124 [13%]; 98 [pyrrol-3-thiolat; 12%].

2.11 Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Methanthiol und Glutaminsäure

Zu 1.85 mL Kaliumphosphatpuffer (250 mM, pH 7.4) wurden 50 µL eine Lösung von Natriumglutamat (10 mM), 50 µL einer Lösung von Natriummethanthiolat and 50 µL einer Lösung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) (1 mM) gegeben. Die Lösung wurde für 16 h bei 37 °C inkubiert. Das Hauptprodukt dieser Inkubation wurde mit den massenspektrometrischen Daten und ¹H-NMR-Spektroskopie als *S*-[1-[5-(Acetylamino)-5-carboxypentyl]-1*H*-pyrrol-3-yl]-methanthiol (**11**) charakterisiert. LC-MS/MS-Daten **11**: *t_R*=15.0 min; *m/z* 242 [*M*⁻ - H; 100%], 112 [*M*⁻ - H₂O; 8%]; 97 [pyrrole-3-thiolate; 12%]. ¹H-NMR (400.13 MHz, Acetonitril-*d*₃): δ = 2.05-2.25 (m; 3H; β-*CH*₂ und γ-*CH*₂), 2.29 (s; 3H; *SCH*₃), 2.30-2.45 (m; 1H; β-*CH*₂), 4.65-4.75 (m; 1H; α-*CH*₂), 6.13 (dd; *J*_{4,5} = 2.91 Hz; *J*_{4,2} = 1.74 Hz; 1H; C4-*H*), 6.72 (dd; *J*_{5,4} = 2.91 Hz; *J*_{5,2} = 2.22 Hz; 1H; C5-*H*), 6.75 (dd; *J*_{2,5} = 2.22 Hz; *J*_{2,4} = 1.74 Hz; 1H; C2-*H*).

3. Tierversuch zur Untersuchung der Zeit- und Dosisabhängigkeit der Furanmetaboliten im Urin von Ratte und Maus

3.1 *Tierversuch*

Der Tierversuch wurde von der Tierschutzbehörde der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die männlichen Fischer 344 Ratten und B6C3F1 Mäuse wurden von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen und hatten bei Versuchsbeginn jeweils ein Alter von 10 Wochen. Das Gewicht der Ratten lag zwischen 200 und 250 g, das der Mäuse zwischen 28 und 30 g. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem pathogenfreien Tierhaus unter Einhaltung eines 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus bei einer Temperatur von 22 ± 2 °C mit Wasser und Futter ad libitum. Das Furan (**1**) wurde mit Stempelpipetten und Verdünnungsreihen in Öl so verdünnt, dass jede Ratte mit 2.5 mL Öl pro kg Körpergewicht und jede Maus mit 2.5 mL Öl pro kg Körpergewicht dosiert werden konnte. Die Verabreichung einer Dosisstufe erfolgte immer parallel für fünf Mäuse und fünf Ratten. Begonnen wurde mit der Kontrollgruppe. Für die Urin-Sammlung wurden die Tiere im Zeitraum von 24 Stunden vor bis 72 Stunden nach Exposition einzeln in Metabolismuskäfige gesetzt. Wasser und Futter stand ihnen auch während dieser Phase ad libitum zur Verfügung. Der Urin wurde für jeweils 24 Stunden in einem Wasser/Eis-Bad gesammelt, aliquotiert und bei -20 °C bis zur Analyse aufbewahrt. Mit einem DRC-200 Handrefraktometer (Fuzhou Link Optical Instrument Co. Ltd, Fujian, China) wurde die relative Dichte der Urinproben bestimmt.

3.2 *Probenvorbereitung*

Aliquote der gesammelten Urinproben wurden nach Bedarf und bei 4 °C und $14000 \times g$ für 20 Minuten zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile aus dem Urin zu entfernen. Um die unterschiedliche Konzentration des Urins auszugleichen, wurde jede Urinprobe mit Wasser auf eine relative Dichte von 1.030 verdünnt. Ein Ausgleich der leicht unterschiedlichen pH-Werte auf analytisch sinnvolle Werte erfolgte durch die Zugabe von 10 µL einer 8 M Salzsäurelösung zu 500 µL der Probe.

3.3 Automatisierte Probenaufbereitung und Analytik mit einer Säulenschaltung

Die in Abbildung 4 (Ergebnisse Teil 2) schematisch gezeigte Säulenschaltung bestand aus einem Autosampler mit 900 μL Probenschleife, zwei HPLC-Pumpen (Agilent Series 1100, Waldbronn, Deutschland) und einem elektrischen Schaltventil. 250 μL einer Probe wurden durch Pumpe 2 und den Autosampler mit 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf die mit Ameisensäure (0.1%) equilibrierte Säule B (ReproSil-Pur C18-AQ, 5 μm , 33 \times 3 mm, Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland) gespült. In einem Spülzyklus von 1.1 min wurden nicht zurückgehaltene Stoffe in den Abfall gespült und so die Probe gereinigt. Pumpe 1 equilibrierte zu diesem Zeitpunkt die analytische Säule A (ReproSil-Pur C18-AQ, 3 μm , 150 \times 2 mm, Dr. Maisch) isokratisch mit Ameisensäure (0.1%) und Acetonitril (95/5 Vol-%). Nach Abschluss der Probenaufarbeitungsphase wurde die Säulenverknüpfung mittels eines elektronisch gesteuerten Schaltventils so verändert, dass nun Pumpe 1 die noch auf Säule B befindlichen Analyten über die Säule A ins Massenspektrometer (MS) eluierte. 0.9 min nach Beginn der Elutionsphase fuhr Pumpe 1 innerhalb von 23 min einen Gradienten auf 50 Vol-% Acetonitril. Ein weiterer Gradient auf 90 Vol-% Acetonitril wurde innerhalb weiterer 5 min durchlaufen und für 3 min gehalten. Nach 14.9 min in der Elutionsphase waren alle Analyten von Säule B auf Säule A gespült und das Steuerventil schaltete zurück auf den Spülmodus um Säule B durch einen Gradienten bis 90 Vol-% Acetonitril für die nächste Analyse vorzubereiten. Nach Abschluss des analytischen Gradienten auf Säule A wurde innerhalb von 2 min auf das ursprüngliche Lösungsmittelgemisch (95/5 Vol-%) zurückgestellt und dann für 9 min equilibriert. Insgesamt ergab sich eine Zeit von 45 min pro Probe.

3.4 Massenspektrometrie

Das Massenspektrometer (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Kanada) wurde im negativen Elektrospray-Modus betrieben. Die Ionisierungsspannung betrug –4200 V bei einer Quelltemperatur von 400 °C. Das „Declustering Potential“ war –30 V und das „Entrance Potential“ –10 V. Stickstoff wurde als Ionen-Spray- (45 psi), Trocknungs- (50 psi) und „Curtain Gas“ (30 psi) verwendet. Stickstoff wurde ebenfalls in der Kollisionszelle als Fragmentierungsgas verwendet. Die Parameter für das Massenspektrometer im Multi-Reaction-Monitoring-Modus wurden für jeden Analyten optimiert. Dazu wurden Verdünnungen der Inkubationslösungen (siehe Experimenteller Teil 2) in einer Konzentration von 10-1000 $\mu\text{mol}/\text{L}$ in einer Methanol-Wasser-Lösung (1:1) gelöst und bei einem Fluss von

5 $\mu\text{L}/\text{min}$ in die Ionenquelle eingeleitet. Mit Softwareunterstützung (Analyst 1.4) wurde die Kollisionsenergie für die Fragmentierung des jeweiligen Molekülions optimiert. Ein zusätzliches Q1/Q3 Paar wurde für jede Verbindung als Identifikationshilfe verwendet. Die Messzeit für ein Massenpaar in Q1 und Q3 betrug für einen Messzyklus 100 ms.

Tabelle 10: Kollisionsenergie für die zum Nachweis verwendeten Massenpaare (Q1/Q3).

Quadrupol 1 (Q1)	Quadrupol 3 (Q3)	Kollisionsenergie [V]
414.2	285.1	-22
414.2	114.0	-48
398.2	269.1	-22
398.2	98.0	-60
253.2	211.1	-34
253.2	82.0	-24
242.1	97.0	-44
242.1	112.0	-24
354.2	141.0	-34
354.2	98.0	-40
371.2	242.1	-25
371.2	113.1	-45
335.2	206.1	-25
335.2	98.0	-45

4. Untersuchung von *cis*-2-Buten-1,4-dial im Ames-Test (Stamm TA104)

4.1 Chemikalien und allgemeine Arbeitsweise

Chemikalien

Die für die Nährmedien und Pufferlösungen verwendeten Chemikalien waren Handelsprodukte der Firmen Sigma/Fluka (Taufkirchen, Deutschland). Der für die Herstellung der Nährmedien verwendete Bacto-Agar bzw. Nutrient Broth Nr. 2 waren Handelsprodukte der Firmen Difco Lab. GmbH (Augsburg, Deutschland) bzw. Oxoid Unipath (Basingstoke, England). Der verwendete Ames-Stamm TA 104 war eine Schenkung von Prof. Dr. Hans-Rudolf Glatt (Deutsches Institut für Ernährungsforschung, Potsdam).

Allgemeine Arbeitsweise

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden stets mit autoklavierten oder mit abgeflamten Materialien und Reagenzien durchgeführt. Die Überprüfung der Aktivität und Funktionalität des verwendeten Ames-Stammes TA104 sowie die Durchführung des Tests erfolgte, wenn nicht anders angegeben, nach Standardprotokoll [46]. Jede Konzentration bzw. Kontrolle wurde parallel in dreifacher Ausführung mit Bakterien inkubiert. Die Auszählung der Platten erfolgte elektronisch mit einem Kolonienzähler von Biorad (München, Deutschland). Anschließend wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt.

4.2 Herstellung einer Bakteriensuspension

Mit einer Impföse wurde ein Abstrich einer Agarkultur des Stammes TA104 in 10 mL Oxoid-Lösung verteilt. Die Bakteriensuspension wurde dann im Wasserbad bei 37 °C für 10 h inkubiert und anschließend bis zum Versuchsbeginn auf Eis gelagert.

4.3 Herstellung von Lösungen und Agarplatten

Die für den Ames-Test verwendeten Stammlösungen und Agarplatten wurden aus den in der folgenden Tabelle ersichtlichen Einwaagen hergestellt.

Tabelle 11: Einwaagen für die Stammlösungen für den Ames-Test

Medium	Zusammensetzung
Top-Agar	500 mL H ₂ O, 3 Bacto-Agar, 2.5 g NaCl, 25 mL Biotin-Lösung (0.5 M), 25 mL Histidin-Lösung (0.5 M)
Oxoid-Lösung	6.25 g Nutrient-Broth Nr. 2, 250 mL H ₂ O
Ampicillin-Lösung	80 mg Ampicillin, 10 mL NaOH (0.02 M)
Vogel-Bonner-Lösung	335 mL H ₂ O, 5 g MgSO ₄ ×7H ₂ O, 50 g Zitronensäure×1H ₂ O, 327.5 g K ₂ HPO ₄ ×3H ₂ O, 87.5 g NaNH ₄ HPO ₄ ×4H ₂ O
Minimalagarplatten	1500 mL H ₂ O, 30 g D-(+)-Glucose-Monohydrat, 22.5 g Bactoagar, 30 mL Vogel-Bonner-Lösung
Methylglyoxal-Lösung	22.5 mg Methylglyoxal (40%ig), 2.5 mL H ₂ O
Glutaraldehyd-Lösung	5µL Glutaraldehyd, 1.12 mL Wasser
<i>cis</i> -2-Buten-1,4-dial (2)	100 mM (siehe Experimenteller Teil 1)

4.4 Ames-Test ohne die Zugabe von Glutathion nach der Vorinkubationsphase

In für das Experiment vorbereiteten 5 mL Inkubationsröhrchen wurden 500 µL Kaliumphosphatpuffer (0.1 M, pH 7.4) vorgelegt. Anschließend wurden in einer zuvor festgelegten Reihenfolge im 45-Sekunden-Takt zu jedem Röhrchen 100 µL Bakteriensuspension und 20µL der zu testenden Substanzlösung pipettiert und nach dem Vermischen sofort in ein auf 37 °C vorgeheiztes Wasserbad gestellt. Ab diesem Zeitpunkt wurde jedes Röhrchen für 30 min inkubiert. Die inkubierten Lösungen wurden dann aus dem Wasserbad entnommen und der Inhalt

sofort mit 2 mL einer auf 45 °C vorgewärmten Top-Agar-Lösung vermischt. Der noch warme Inhalt wurde dann auf eine vorbereitete Minimal-Agar Platte gegeben und gleichmäßig verteilt. Auf jede zehnte Platte wurde ausschließlich Top-Agar gegossen, um dessen Keimfreiheit zu bestätigen. Zehn Minuten nach Abschluss aller Inkubationen eines Experimentes wurden die Platten auf den Kopf gedreht, solche mit gleichem Inhalt aufeinander gestapelt und für 48 h in einen auf 37 °C vorgeheizten Brutschrank gestellt.

4.5 Ames-Test mit Zugabe von Glutathion zur Reduktion von zytotoxischen Effekten

Diese Variante des Ames-Tests wurde für die Untersuchung von stark zytotoxischen Enalen und Dialdehyden entwickelt [31]. Das Vorgehen bei dieser Variante des Ames-Tests mit Vorinkubationsphase unterscheidet sich ausschließlich durch die Zugabe von 50 µL einer Glutathion-Lösung (0.1 M in Kaliumphosphatpuffer 0.2 M) zu den Inkubationsröhrchen vor der Vermischung mit dem Top-Agar.

5. Untersuchung der Gentoxizität und Mutagenität von *cis*-2-Buten-1,4-dial und Furan in Mauslymphomzellen

5.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren, wenn nicht anders vermerkt, Handelsprodukte der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Fluoresceinkonjugiertes Annexin V wurde von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) erworben. Furan war mit Butylhydroxytoluol stabilisiert.

5.2 Zellkultur und Vorbereitung der Zellen

In allen Untersuchungen wurde die L5178Y Mauslymphomzelllinie (Klone 3.7.2c) von W. J. Caspary, NIEHS, USA) verwendet. Die Permanentkultur der Zellen erfolgte in einem Klimaschrank bei 37°C mit einem Kohlenstoffdioxid-Gehalt von 5% (v/v) in RPMI 1640 Medium mit Penicillin, Streptomycin, L-Glutamin (2 mM, Zugabe kurz vor Verwendung), Natriumpyruvat (180 mM) und Pferdeserum (10 Vol-%). Sieben Tage vor jedem Experiment wurden Zellen zweimal für je 24 h mit einer Lösung aus Thymidin (12.4 µM), Hypoxanthin (36.8 µM), Methotrexat 0.22 µM und Glycin (100 µM) behandelt um bereits vorhandene tk^{-/-}-Zellen zu entfernen [59]. Am Tag des Experimentes wurde für jede zu testende Substanz und Konzentration ein Kulturbehälter von 2×10^5 Zellen/mL (20 mL) vorbereitet und dann mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Die wässrige Stammlösung von *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) (siehe Experimenteller Teil 1) wurde mit Wasser auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Die Stammlösung und die Verdünnungen von Furan (**1**) wurden in Dimethylsulfoxid hergestellt. Als Positivkontrolle wurde Methylmethansulfonat (100 mM) in Wasser mitgeführt. Vier Stunden nach Inkubationsbeginn wurden die Zellen mit Kulturmedium von überschüssiger Substanz gereinigt. Ein Aliquot von 1×10^6 Zellen wurde in 5 mL Kulturmedium für 20 Stunden inkubiert und diente der Bestimmung der Zellvitalität und Apoptoserate durch Annexin-V und Propidiumiodid-Färbung [52] mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Die restlichen Zellen wurden auf drei Gefäße verteilt und für den Kometen-Test, den Mikrokern-Test und den Thymidinkinase-Mutationstest vorbereitet.

5.3 Der Kometen-Test

Die alkalische Version des Kometen-Tests wurde nach literaturbekannten Standardprotokollen durchgeführt [60]. 20 μL der behandelten Zellsuspension ($\approx 10^6$ Zellen/mL) wurden mit 180 μL einer 37 °C warmen Lösung von niedrig schmelzender Agarose (0.5 Masse-%) vermischt und auf tief gefrorene, mit einer dünnen Schicht von normal schmelzender Agarose (1.5 Masse-%) beschichtete Objektträger gegeben. Die Objektträger wurden sofort in eine Küvette mit einem Lysepuffer gestellt. Dieser hatte die Bestandteile NaCl (2.5 M), EDTA (0.1 M), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (0.01 M) und Natrium-*N*-dodecanoyl-*N*-methylglycinat (34 mM) und wurde mit einer Natriumhydroxid-Lösung auf pH 10 eingestellt. Kurz vor Verwendung wurden noch zusätzlich Triton X-100 (1 Vol-% in der Gesamtlösung) und Dimethylsulfoxid (10 Vol-% in der Gesamtlösung) zugegeben. Von jeder Konzentration und Substanz wurden zwei Objektträger angefertigt. Nach 60 min wurden die Objektträger für 20 min in ein Elektrophoresebad (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13.0) gelegt und für 20 min eine Spannung von 25 V (1.1 V/cm, 300 \times mA) angelegt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger in einem Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Puffer (0.4 M, pH 7.5 eingestellt durch HCl) neutralisiert. Die Anfärbung der DNS erfolgte mit 15 μL Propidiumiodid-Lösung (3 mM). Mit einem Fluoreszenzmikroskop (Labophot 2, Nikon, Deutschland) wurden für jede Konzentration und Substanz 50 Zellen (25 pro Replikat) ausgewählt und mit einer Analysesoftware (Komet 5, BFI Optilas, Deutschland) das Ausmaß der DNS-Wanderung (% DNS im Schwanz) bestimmt.

5.4 Der Mikrokern-Test

Der *in vitro* Mikrokern-Test wurde nach Standardprotokollen durchgeführt [61]. Ein Aliquot von 1×10^6 behandelten Zellen wurden in dem für die Permanentkultur hergestellten Medium unter Zusatz von Cytochalasin B (10.5 mM) für 18 Stunden inkubiert, mit reinem Medium gewaschen und durch Zentrifugation (200 \times g, 5 min) als Pellet isoliert. Von den im Kulturmedium resuspendierten Zellen wurde ein Aliquot von 5×10^4 Zellen entnommen und mit einer Cytospin-Zentrifuge auf mit Alkohol (70 Vol-%) gereinigte Objektträger aufzentrifugiert. Zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern wurden diese für mindestens 30 min in Methanol aufbewahrt. Kurz vor der Analyse mit einem Fluoreszenzmikroskop wurden die Zellen in einem Sørensen-Puffer (Na_2HPO_4 15 mM und KH_2PO_4 15 mM, pH 6.8) für 5 min mit 3,6-Bis-(dimethylamino)-acridiniumchlorid (143 μM) angefärbt und zweimal mit reinem Sørensen-

Puffer gewaschen. Für jede Konzentration und Substanz wurden zwei Objektträger angefertigt. Jeweils 1000 zweikernige Zellen wurden auf Mikrokerne untersucht.

5.5 Der Thymidinkinase-Mutationstest

Der TK⁺-Mutationstest wurde in 96-well Platten nach literaturbekannten Protokollen durchgeführt [50, 62]. Ein Aliquot von 1×10^6 behandelten Zellen wurde in 5 mL des für die Permanentkultur hergestellten Mediums für insgesamt 48 Stunden kultiviert. Während dieser Zeit konnten die Zellen mit tk⁻-Allel den entsprechenden Phänotyp exprimieren. Nach 24 Stunden wurde die Zelldichte der Kulturen mit einem "Coulter counter" kontrolliert und wieder auf 2×10^5 Zellen/mL verdünnt. Nach Abschluss der 48 stündigen Expressionsphase wurde die Zellsuspension auf 1×10^4 Zellen/mL bei einem Totalvolumen von 50 mL eingestellt. 32 µL dieser Zellsuspension wurden dann auf 40 mL verdünnt (8 Zellen/mL) und für die Bestimmung der Anzahl teilungsfähiger Zellen in eine 96-well-Platte mit 0.2 mL pro well pipettiert. Pro well ergab sich eine Konzentration von 1.6 Zellen/mL. Für die Selektion der Mutanten wurde zum Rest der 50 mL Zellsuspension 2'-Desoxy-5-trifluoromethyl-uridine (Trifluorthymidin, 10 µM) zugegeben. Die Zellen wurden dann in eine 96-well-Platte mit 0.2 mL pro well pipettiert. Pro well ergab sich eine Konzentration von 2000 Zellen/mL. Beide Inkubationsansätze wurden für 12 Tage bei 37 °C unter optimalen Bedingungen kultiviert. Mit Hilfe einer Durchlichtapparatur konnten die wells ohne lebenden Zellklon mit dem Auge ausgezählt werden. Die Mutantenhäufigkeit (MH) wurde nach Standardprotokoll unter Annahme einer Poissonverteilung der Mutanten ausgewertet [62, 63] und in Mutanten pro 10^6 teilungsfähige Zellen angegeben.

5.6 Untersuchung des DNS-vernetzenden Potentials von *cis*-2-Buten-1,4-dial

Für die Untersuchung auf DNS vernetzende Eigenschaften wurde ein modifiziertes Protokoll des alkalischen Kometen-Tests verwendet [49]. Getestet wurden *cis*-2-Buten-1,4-dial (**2**) und Glutaraldehyd in wässrigen Lösungen. Für jede Konzentration und Substanz wurden 1.5×10^6 L5178Y Mauslymphomzellen in 5 mL des Mediums für die Permanentkultur gesät. Vier Stunden nach Expositionsbeginn wurden die Zellen mit einer Strahlendosis von 32 Gy aus einer ¹³⁷Cs-Quelle belastet. Die so behandelten Zellen wurden isoliert und nach dem oben beschriebenen Protokoll des Kometen-Tests ausgewertet.

5.7 Stabilität von Furan/Wasser-Lösungen in Zellkulturflaschen

Die Konzentration von Furan (**1**) wurde mit einem UV-Spektrometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) bei 21 °C und einer Wellenlänge von 211 nm bestimmt. Als Referenzlösung wurde eine bei 25 °C gesättigte Furan-Lösung mit einer Konzentration von 148 mM verwendet [11, 54]. Die Sättigung wurde durch das Überschichten von Wasser mit einer 1 cm dicken Furanschicht in einem Wasserbad bei 25 °C erreicht. Zur Erstellung der Eichgeraden wurden zunächst 16 µL der gesättigten Lösung mit Wasser auf 4 mL Gesamtvolumen verdünnt und die Absorption mit dem Photometer relativ zu Wasser bestimmt. Anschließend wurde 1 mL der Lösung aus der Quarzglasküvette entnommen und durch 1 mL Wasser ersetzt. Die Verdünnung wurde auf diese Art und Weise fortgesetzt bis keine Absorption mehr beobachtet werden konnte. Dies war bei 6 µM der Fall. Für die endgültige Berechnung der Eichgeraden mit Hilfe des R-Programms standen die Ergebnisse zweier Verdünnungsreihen zur Verfügung. Die Eichgerade hatte die Gleichung:

$$\text{Absorption} = 4486 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times \text{Konzentration [M]} - 3.132 \times 10^{-02}$$

Die Konstante $\varepsilon = 4486 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ist zugleich der molare Absorptionskoeffizient am Absorptionsmaximum von 211 nm bei 21 °C in Wasser.

Um den Konzentrationsverlauf von Furan (**1**) in Zellkulturflaschen zu untersuchen, wurden sechs Flaschen mit 20 mL Wasser befüllt und bei 37 °C in einen Brutschrank gestellt. Nach einer Phase des Temperatúrausgleichs wurden je zwei Flaschen mit einer bestimmten Menge Furan (**1**) versetzt, die den Soll-Konzentrationen von 60 mM und 15 mM entsprachen. Die Flaschen der Soll-Konzentration 60 mM wurden mit 84 µL reinem Furan (**1**) versetzt. Für die 15 mM wurden Lösungen von Furan (**1**) in Dimethylsulfoxid verwendet. Die Berechnung der Verdünnung erfolgte so, dass die Soll-Konzentration durch Zugabe von 84 µL zu 20 mL Wasser erreicht werden konnte. Nach Zugabe des Furan (**1**) wurden die Zellkulturflaschen verschlossen und kurz geschwenkt. Nach 4 min bei Raumtemperatur wurde ein Aliquot von 100 µL entnommen und auf 4 mL in einer Quarzglasküvette verdünnt. Die Messung der Absorption erfolgte wie oben beschrieben. Die Zellkulturflasche wurde sofort wieder verschlossen und in den Brutschrank gestellt. Für die Lösung mit Dimethylsulfoxid wurde als Referenz für das Spektrometer eine Dimethylsulfoxid-Lösung der entsprechenden Konzentration verwendet. Die Messung der Absorption erfolgte erneut nach einer, nach zwei und nach vier Stunden.

6. Reaktion von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin

6.1 **Chromatographische Methode für die Analyse des Addukts von Desoxycytidin mit *cis*-2-Buten-1,4-dial**

Die Ausgangsbedingungen auf der Säule (ReproSil-Pur C18-AQ, 5 μ m, 150 \times 2 mm, Dr. Maisch, Ammerbuch, Deutschland) waren 100% 10 mM Ammoniumformiat-Puffer (pH 6.7) bei einem Fluss von 250 μ L/min. Mit Hilfe der HPLC-Pumpe (Agilent Series 1100, Waldbronn, Deutschland) wurde 3 Minuten nach der Injektion von 50 μ L der Probelösung ein linearer Gradient auf 40% Methanol gefahren. Innerhalb jeweils einer weiteren Minute wurde der Methanol-Anteil auf 50% und dann auf 90% erhöht. Nach einer Minute bei diesen Bedingungen wurde innerhalb von zwei Minuten auf Ausgangsbedingungen umgestellt für 10 min equilibriert.

6.2 **Tandemmassenspektrometrie-Methode für den Nachweis des Addukts von Desoxycytidin mit *cis*-2-Buten-1,4-dial**

Das Massenspektrometer (QTRAP 2000, Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Kanada) wurde im positiven Elektronenspray-Modus betrieben. Die Ionisierungsspannung betrug +5000 V bei einer Quelltemperatur von 400 °C. Das „Declustering Potential“ war +30 V und das „Entrance Potential“ +5.5 V. Stickstoff wurde als Ionenspray- (45 psi), Trocknungs- (75 psi) und „Curtain Gas“ (35 psi) verwendet. Stickstoff wurde ebenfalls in der Kollisionszelle als Fragmentierungsgas verwendet. Die Parameter für das Massenspektrometer im Multi-Reaction-Monitoring-Modus wurden für das Desoxycytidinaddukt **10** optimiert. Dazu wurden Verdünnungen der Inkubationslösungen (siehe Experimenteller Teil 2) mit einer Konzentration von 10-1000 μ mol/L in einer Methanol-Wasser-Lösung (50/50 v/v) hergestellt und bei einem Fluss von 5 μ L/min in die Ionenquelle eingeleitet. Mit Softwareunterstützung (Analyst 1.4) wurde die Kollisionsenergie für die Fragmentierung optimiert. Ein zusätzliches Q1/Q3 Paar wurde für jede Verbindung als Identifikationshilfe eingeführt. Die Messzeit in einem Messzyklus betrug für ein Massenpaar 50 ms. Die Massenpaare und Kollisionsenergien waren wie folgt: 312 u \rightarrow 196 u (Kollisionsenergie 19 V), 312 u \rightarrow 112 u (Kollisionsenergie 47 V).

6.3 Inkubation von *cis*-2-Buten-1,4-dial mit Desoxycytidin in Gegenwart von Glutathion, *N*-Acetyl-L-cystein und L-Glutamin

In 22 1.5 mL Inkubationsgefäßen wurde zu einem Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer (700 µL, 28.6 mM, pH 7.4) eine Lösung von Desoxycytidin (**9**) (100 µL, 10 mM) gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe von sieben Lösungen von Glutathion (**7**), *N*-Acetyl-L-cystein oder L-Glutamin in unterschiedlicher Konzentration (100 µL, 100 mM, 30 mM, 10 mM, 3 mM, 1 mM, 300 µM, 100 µM). Zu einer der 22 Lösungen wurde Wasser (100 µL) zugegeben. Nach Zugabe einer *cis*-2-Buten-1,4-dial-Lösung (100 µL, 10 mM) zu jedem der 22 Inkubationsgefäße wurde gut vermischt und bei 37 °C für 24 h inkubiert. Die Lösungen wurden dann direkt mit LC-MS/MS auf die Konzentration des Desoxycytidinaddukts 7-Hydroxy-8-acetaldehyd-3,*N*⁴-ethano-2'-desoxycytidin (**10**) untersucht.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Friedman, M., Food browning and its prevention: An overview. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1996**, *44*, 631-53.
- [2] Mottram, D.S.; Wedzicha, B.L. & Dodson, A.T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature* **2002**, *419*, 448-9.
- [3] Stadler, R.H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P.A. et al., Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature* **2002**, *419*, 449-50.
- [4] European Food Safety Authority, Report of the scientific panel on contaminants in the food chain on furan in food. *The EFSA Journal* **2004**, *137*, http://www.efsa.europa.eu/EFSA/Scientific_Document/contam_furan_report7-11-051,0.pdf.
- [5] Heppner, C.W. & Schlatter, J.R., Data requirements for risk assessment of furan in food. *Food Additives and Contaminants* **2007**, *24 Suppl 1*, 114-21.
- [6] Maga, J.A., Furans in foods. *CRC Critical Reviews in Food Science & Nutrition* **1979**, *11*, 355-400.
- [7] National Toxicology Program, Toxicology and carcinogenesis studies of furan in F344 rats and B6C3F1 mice. *National Toxicology Program - Technical Report Series* **1993**, *402*, http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/LT_rpts/tr402.pdf.
- [8] International Agency for Research on Cancer, Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. *IARC Monographs* **1995**, *63*, 393-407.
- [9] Perez Locas, C. & Yaylayan, V.A., Origin and mechanistic pathways of formation of the parent furan--a food toxicant. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* **2004**, *52*, 6830-6.
- [10] Limacher, A.; Kerler, J.; Davidek, T.; Schmalzried, F. & Blank, I., Formation of furan and methylfuran by Maillard-type reactions in model systems and food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 3639-47.
- [11] Epshtein, N. & Nizhny, S., Prediction of solubility during screening of biologically-active compounds: 3. water solubility and vanderwaals volume of molecules. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **1979**, *13*, 57-62.
- [12] Burka, L.T.; Washburn, K.D. & Irwin, R.D., Disposition of [¹⁴C]furan in the male F344 rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health* **1991**, *34*, 245-57.
- [13] Kedderis, G.L.; Carfagna, M.A.; Held, S.D.; Batra, R.; Murphy, J.E. & Gargas, M.L., Kinetic analysis of furan biotransformation by F-344 rats in vivo and in vitro. *Toxicology & Applied Pharmacology* **1993**, *123*, 274-82.
- [14] Chen, L.J.; Hecht, S.S. & Peterson, L.A., Identification of cis-2-butene-1,4-dial as a microsomal metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **1995**, *8*, 903-6.
- [15] Chen, L.J.; Hecht, S.S. & Peterson, L.A., Characterization of amino acid and glutathione adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **1997**, *10*, 866-74.

- [16] Kedderis, G.L. & Held, S.D., Prediction of furan pharmacokinetics from hepatocyte studies: comparison of bioactivation and hepatic dosimetry in rats, mice, and humans. *Toxicology & Applied Pharmacology* **1996**, *140*, 124-30.
- [17] Wu, G.; Fang, Y.; Yang, S.; Lupton, J.R. & Turner, N.D., Glutathione metabolism and its implications for health. *Journal of Nutrition* **2004**, *134*, 489-92.
- [18] Peterson, L.A.; Cummings, M.E.; Vu, C.C. & Matter, B.A., Glutathione trapping to measure microsomal oxidation of furan to cis-2-butene-1,4-dial. *Drug Metabolism and Disposition* **2005**, *33*, 1453-8.
- [19] Peterson, L.A.; Cummings, M.E.; Chan, J.Y.; Vu, C.C. & Matter, B.A., Identification of a cis-2-butene-1,4-dial-derived glutathione conjugate in the urine of furan-treated rats. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 1138-41.
- [20] Byrns, M.C.; Predecki, D.P. & Peterson, L.A., Characterization of nucleoside adducts of cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **2002**, *15*, 373-9.
- [21] Bohnert, T.; Gingipalli, L. & Dedon, P.C., Reaction of 2'-deoxyribonucleosides with cis- and trans-1,4-dioxo-2-butene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**, *323*, 838-44.
- [22] Gingipalli, L. & Dedon, P.C., Reaction of cis- and trans-2-butene-1,4-dial with 2'-deoxycytidine to form stable oxadiazabicyclooctamine Adducts. *Journal of the American Chemical Society* **2001**, *123*, 2664-5.
- [23] Byrns, M.C.; Vu, C.C.; Neidigh, J.W.; Abad, J.L.; Jones, R.A. & Peterson, L.A., Detection of DNA adducts derived from the reactive metabolite of furan, cis-2-butene-1,4-dial. *Chemical Research in Toxicology* **2006**, *19*, 414-20.
- [24] Chen, B.; Bohnert, T.; Zhou, X. & Dedon, P.C., 5'-(2-Phosphoryl-1,4-dioxobutane) as a Product of 5'-Oxidation of Deoxyribose in DNA: Elimination as trans-1,4-Dioxo-2-butene and Approaches to Analysis. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17*, 1406-13.
- [25] Gold, L.S. & Zeiger, E., Handbook of carcinogenic potency and genotoxicity databases. (CRC Press New York, 1997).
- [26] McGregor, D.B.; Brown, A.; Cattanaach, P.; Edwards, I.; McBride, D.; Riach, C. et al., Responses of the L5178Y tk+/tk- mouse lymphoma cell forward mutation assay: III. 72 Coded chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **1988**, *12*, 85-154.
- [27] Lee, H.; Bian, S.S. & Chen, Y.L., Genotoxicity of 1,3-dithiane and 1,4-dithiane in the CHO/SCE assay and the Salmonella/microsomal test. *Mutation Research* **1994**, *321*, 213-8.
- [28] Durling, L.J.K.; Svensson, K. & Abramsson-Zetterberg, L., Furan is not genotoxic in the micronucleus assay in vivo or in vitro. *Toxicology Letters* **2007**, *169*, 43-50.
- [29] Byrns, M.C.; Vu, C.C. & Peterson, L.A., The formation of substituted 1,N6-etheno-2'-deoxyadenosine and 1,N2-etheno-2'-deoxyguanosine adducts by cis-2-butene-1,4-dial, a reactive metabolite of furan. *Chemical Research in Toxicology* **2004**, *17*, 1607-13.
- [30] Peterson, L.A.; Naruko, K.C. & Predecki, D.P., A reactive metabolite of furan, cis-2-Butene-1,4-dial, is mutagenic in the Ames assay. *Chemical Research in Toxicology* **2000**, *13*, 531-34.

- [31] Marnett, L.J.; Hurd, H.K.; Hollstein, M.C.; Levin, D.E.; Esterbauer, H. & Ames, B.N., Naturally occurring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA 104. *Mutation Research* **1985**, *148*, 25-34.
- [32] Levin, D.E.; Hollstein, M.; Christman, M.F.; Schwiers, E.A. & Ames, B.N., A new Salmonella tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1982**, *79*, 7445-9.
- [33] Marinari, U.M.; Ferro, M.; Sciaba, L.; Finollo, R.; Bassi, A.M. & Brambilla, G., DNA-damaging activity of biotic and xenobiotic aldehydes in Chinese hamster ovary cells. *Cell Biochemistry and Function* **1984**, *2*, 243-8.
- [34] Adger, B.M.; Barrett, C.; Brennan, J.; McKervey, M.A. & Murray, R.W., Oxidation of furans with dimethyldioxirane. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications* **1991**, , 1553-4.
- [35] Hufford, D.L.; Tarbell, D.S. & Koszalka, T.R., Maleic and fumaric dialdehydes, D4-tetrahydrophthalaldehyde and related compounds. *Journal of the American Chemical Society* **1952**, *74*, 3014-18.
- [36] Chen, Z. & Meltzer, P.C., Synthesis of 6- or 7- hydroxy and 6- or 7- methoxy tropanes. *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 1121-24.
- [37] Holzapfel, C.W. & Williams, D.B.G., A facile route to 3a,8a-dihydrofuro[2,3-b]benzofuran. *Tetrahedron* **1995**, *51*, 8555-64.
- [38] Wagner, S.; Scholz, K.; Donegan, M.; Burton, L.; Wingate, J. & Voelkel, W., Metabonomics and biomarker discovery: LC-MS metabolic profiling and constant neutral loss scanning combined with multivariate data analysis for mercapturic acid analysis. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 1296-1305.
- [39] Idborg, H.; Edlund, P.O. & Jacobsson, S.P., Multivariate approaches for efficient detection of potential metabolites from liquid chromatography/mass spectrometry data. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2004**, *18*, 944-54.
- [40] Chen, C.; Ma, X.; Malfatti, M.A.; Krausz, K.W.; Kimura, S.; Felton, J.S. et al., A comprehensive investigation of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) metabolism in the mouse using a multivariate data analysis approach. *Chemical Research in Toxicology* **2007**, *20*, 531-42.
- [41] Lutz, U.; Lutz, R.W. & Lutz, W.K., Metabolic profiling of glucuronides in human urine by LC-MS/MS and partial least-squares discriminant analysis for classification and prediction of gender. *Analytical Chemistry* **2006**, *78*, 4564-71.
- [42] Scholz, K.; Dekant, W.; Voelkel, W. & Paehler, A., Rapid detection and identification of N-acetyl-L-cysteine thioethers using constant neutral loss and theoretical multiple reaction monitoring combined with Enhanced Product-Ion Scans on a linear ion trap mass spectrometer. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1976-84.
- [43] Commandeur, J.N.; Stijntjes, G.J. & Vermeulen, N.P., Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics. *Pharmacological Reviews* **1995**, *47*, 271-330.

- [44] Kirkland, D.; Aardema, M.; Henderson, L. & Muller, L., Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research* **2005**, *584*, 1-256.
- [45] OECD, Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1997**, *1*, 1-11.
- [46] Mortelmans, K. & Zeiger, E., The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutation Research* **2000**, *455*, 29-60.
- [47] Olive, P.L. & Banath, J.P., Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research* **1995**, *221*, 19-26.
- [48] Merk, O. & Speit, G., Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **1999**, *33*, 167-72.
- [49] Speit, G.; Neuss, S.; Schutz, P.; Frohler-Keller, M. & Schmid, O., The genotoxic potential of glutaraldehyde in mammalian cells in vitro in comparison with formaldehyde. *Mutation Research* **2008**, , 146-54.
- [50] Moore, M.M.; Honma, M.; Clements, J.; Bolcsfoldi, G.; Cifone, M.; Delongchamp, R. et al., Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International Workshop on Genotoxicity Tests Workgroup report - Plymouth, UK 2002. *Mutation Research* **2003**, *540*, 127-40.
- [51] Hartmann, A. & Speit, G., The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicology Letters* **1997**, *90*, 183-8.
- [52] Brink, A.; Schulz, B.; Kobras, K.; Lutz, W.K. & Stopper, H., Time-dependent effects of sodium arsenite on DNA breakage and apoptosis observed in the comet assay. *Mutation Research* **2006**, *603*, 121-8.
- [53] McGregor, D.B.; Edwards, I.; Wolf, C.R.; Forrester, L.M. & Caspary, W.J., Endogenous xenobiotic enzyme levels in mammalian cells. *Mutation Research* **1991**, *261*, 29-39.
- [54] Valvani, S.C.; Yalkowsky, S.H. & Roseman, T.J., Solubility and partitioning IV: Aqueous solubility and octanol-water partition coefficients of liquid nonelectrolytes. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1981**, *70*, 502-7.
- [55] de Melo, J.; Elisei, F.; Gartner, C.; Aloisi, G. & Becker, R., Comprehensive investigation of the photophysical behavior of oligopolyfurans. *Journal of Physical chemistry A* **2000**, *104*, 6907-11.
- [56] Ames, B.N.; Lee, F.D. & Durston, W.E., An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1973**, *70*, 782-6.
- [57] Iwai, K.; Hayashi, H. & Ishikawa, K., Calf thymus lysine- and serine-rich histone. 3. Complete amino acid sequence and its implication for interactions of histones with DNA. *Journal of Biochemistry* **1972**, *72*, 357-67.

-
- [58] Bustin, M. & Cole, R.D., Species and organ specificity in very lysine-rich histones. *Journal of Biological Chemistry* **1968**, *243*, 4500-5.
- [59] Clive, D. & Spector, J.F., Laboratory procedure for assessing specific locus mutations at the TK locus in cultured L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutation Research* **1975**, *31*, 17-29.
- [60] Tice, R.R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H. et al., Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **2000**, *35*, 206-21.
- [61] Fenech, M., The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* **2000**, *455*, 81-95.
- [62] Clements, J., The mouse lymphoma assay. *Mutation Research* **2000**, *455*, 97-110.
- [63] Oberly, T.J.; Yount, D.L. & Garriott, M.L., A comparison of the soft agar and microtitre methodologies for the L5178Y tk +/- mouse lymphoma assay. *Mutation Research* **1997**, *388*, 59-66.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Gemünden, den 28.06.2008

Marco Kellert

Danksagung

HERRN PROF. DR. WERNER K. LUTZ danke ich dafür, dass er die Arbeiten zu dieser Dissertation ermöglicht und betreut hat. Besonders danken möchte ich Ihm dafür, dass er immer Zeit für Ideen, Fragen und konstruktive Diskussionen hatte.

HERRN PROF. DR. PETER SCHREIER möchte dafür danken, dass er sich als Angehöriger der Fakultät für Chemie und Pharmazie bereit erklärte diese externe Dissertation zu unterstützen und zu begutachten.

HERRN DR. JOSEF SCHLATTER danke ich für die sehr hilfreichen Beiträge zu dieser Arbeit und für das finanzielle Management.

FRAU URSULA LUTZ, HERRN DR. WOLFGANG VÖLKEL, HERRN DR. ANDREAS BRINK und FRAU SILVIA WAGNER möchte ich für die sehr gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und die unzähligen Beiträge zu meiner Dissertation ganz besonders danken.

HERRN PROF. DR. HANS-RUDOLF GLATT danke ich für die freundliche Zusendung eines funktionierenden Ames-Stammes TA 104.

FRAU MARION FRIDEWALD, FRAU INGRID RICHTER, FRAU ELISABETH RÜB-SPIEGEL, FRAU NATALY BITTNER und FRAU URSULA TATSCH bin ich zu ganz besonderem Dank verpflichtet, da sie mir beim schwierigsten und zugleich wichtigsten Teil, der Laborarbeit, mit Ihren Erfahrungen und Kenntnissen stets zur Seite standen.

Meinen Kolleginnen und Kollegen EVA KOPP, SILVIA WAGNER, KAROLINE SIMON, EVA TRÖSKEN, PAUL WANEK, ANDREAS BRINK und vor allem MAXIMILIAN SIEBER möchte ich für die gute Freundschaft danken.

ALLEN nicht genannten Personen, welche wesentlich zur guten Atmosphäre innerhalb der Toxikologie beigetragen haben, wird hiermit ebenfalls gedankt.

Meinem treuen Freund HERRN DR. GERALD SCHWAB bin ich zu großem Dank verpflichtet. Mit ihm habe ich auch die schwierigen und sinn-defizienten Phasen des Studiums mit zwei lachenden Augen überstanden.

Ein weiterer großer Dank gebührt PHILIPP und LINDA GRENZEBACH, die seit meiner Kindheit für mich da sind und so letztendlich auch zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Meinen ELTERN und GROSSELTERN bin ich zu außerordentlichem Dank verpflichtet. Ihr finanzieller, mehr aber noch Ihr zwischenmenschlicher Einsatz zum Gelingen des Studiums sind durch nichts zu entlohnen.

Meiner liebevollen Frau KIRSTEN danke ich von ganzem Herzen. Ich danke Ihr besonders für die lieben Kinder die sie mir geschenkt hat und die seitdem der Motor aller Motivation sind.

Publikationen

Artikel in Fachzeitschriften

Kellert, M., Richter, I., Brink, A., Schlatter J., Lutz, WK
„Tests for genotoxicity and mutagenicity of furan and its metabolite cis-2-butene-1,4-dial in L5178Y tk+/- mouse lymphoma cells“
akzeptiert für die Publikation in *Mutation Research*

Kellert, M., Wagner, S., Lutz, U., Lutz, W.K.
„Biomarkers of furan exposure by metabolic profiling of rat urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis“
Chemical Research in Toxicology, **2008**, *21*, 761

Strohmann, C., Daschlein, C., Kellert, M., Auer, D.
„A highly enantiomerically enriched lithiosilane by selective cleavage of a silicon-phenyl bond with lithium“
Angewandte Chemie Int. Ed., **2007**, *46*, 4780

Wagner, S., Scholz, K., Sieber, M., Kellert, M., Voelkel, W.
„Tools in metabonomics: an integrated validation approach for LC-MS metabolic profiling of mercapturic acids in human urine“
Analytical Chemistry, **2007**, *79*, 2918

Kellert, M., Scholz, K., Wagner, S., Dekant, W., Volkel, W.
„Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry“
Journal of Chromatography A, **2006**, *1131*, 58

Posterpräsentationen

Kellert, M., Wagner, S., Lutz, U., Lutz, W.K.
„Biomarkers of furan exposure by metabolic profiling of rat urine with liquid chromatography-tandem mass spectrometry and principal component analysis“
The Toxicologist CD — An official Journal of the Society of Toxicology, **2008**, *102*, 78

Brink, A., Richter, I., Kellert, M., Schlatter, J., Lutz, W.K.
„Genotoxicity and mutagenicity of the furan metabolite cis-2-butene-1,4-dial in L5178Y mouse lymphoma cells“
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **2008**, *377*, 82

Kellert, M., Wagner, S., Schlatter, J., Lutz, W.K.
„Search for biomarkers of furan exposure by metabolite profiling of rat urine with LC-MS/MS and principal component analysis“
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology, **2007**, *375*, 98

Wagner, S., Scholz, K., Sieber, M., Kellert, M., Voelkel, W.

„Metabolic profiling of mercapturic acids in human urine: A validation approach for LC/MS metabonomics“

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, **2007**, 375, 98

Kellert, M., Dekant, W., Bringmann, G., Voelkel, W.

„Quantitation of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in urine samples of not intentional exposed humans“

Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology, **2005**, 371, 130