

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Prof. Dr. Kristina Lorenz



**Untersuchung der Genotoxizität von Pyrrolizidinalkaloiden *in vitro*
am Beispiel von Riddelliin und Lasiocarpin**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Vanessa Magali Ramge

aus Ansbach

Würzburg, Dezember 2022



Referentin: Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Koreferentin: PD Dr. rer. nat. Malgorzata Burek

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag des Promotionskolloquiums: 25.05.2023

Die Promovendin ist Ärztin

Meiner Familie

1. Einleitung	1
1.1 Pyrrolizidinalkaloide	1
1.1.1 Allgemeines	1
1.1.2 Strukturformeln	1
1.1.3 Auswirkungen	4
1.1.3.1 Toxizität	4
1.1.3.1.1 Intoxikationen	5
1.1.3.1.2 Chronische, nicht-neoplastische Schäden	6
1.1.3.1.3 Embryotoxizität und Teratogenität	6
1.1.3.2 Karzinogenität	7
1.2 Metabolismus	8
1.3 Grenzwerte und gesetzliche Restriktionen	11
1.4 Fragestellung	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien, Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien	14
2.1.1 Puffer und Medium für die Zellkultur	15
2.2 Verwendete Zellart	20
2.2.1 Huh6 Zellen	20
2.2.2 Kultur der Zellen	20
2.2.2.1 Kultivieren der Huh6 Zellen	20
2.2.2.2 Einfrieren der Zellen	21
2.2.2.3 Auftauen der Zellen	21
2.2.2.4 Mykoplasmen-Test	22
2.2.2.5 Zellzählung	22
2.3 Verwendete Testsysteme	23
2.3.1 Cytokinesis-Block-Micronucleus-Assay (Mikrokerntest)	23
2.3.1.1 Durchführung und Auswertung der Mikrokerntests	25
2.3.2 Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)	26
2.3.2.1 Allgemeines zum Comet Assay	27
2.3.2.2 Anfertigung der Zellpräparate für den Comet Assay	28
2.3.2.3 FPG Comet Assay	29

2.3.2.4 Vitalitätstest	29
2.3.2.5 Auswertung des Comet Assays	30
2.3.3 γ -H2AX Assay	30
2.3.3.1 Durchführung der Antikörperbehandlung	31
2.3.3.2 Auswertung der Präparate	32
2.3.3.3 Genutzte Programme	32
2.4 Statistische Methoden	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Mikrokerntest	33
3.1.1. Optimierung der Positivkontrollen	33
3.1.1.1 Veränderung der Mikrokernrate nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid	33
3.1.1.2 Apoptosen nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid	34
3.1.1.3 Mitosen nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid	36
3.1.2 Veränderung der Mikrokernrate nach Behandlung mit Pyrrolizidinalkaloiden	37
3.1.2.1 Apoptosen nach Behandlung mit Riddelliin und Lasiocarpin	39
3.1.2.2 Mitosen nach Behandlung mit Riddelliin und Lasiocarpin	41
3.1.3 Kombinationstest	42
3.1.3.1 Veränderung der Mikrokernrate im Kombinationsversuch	42
3.1.3.2 Apoptosen im Kombinationsversuch	43
3.1.3.3 Mitosen im Kombinationsversuch	45
3.2 Comet-Assay	46
3.2.1 Vitalitätstest	46
3.2.2 Alkalischer Comet Assay	47
3.2.3 FPG Comet Assay	49
3.3 Veränderung der Immunfluoreszenz im γ -H2AX Assay	53
4. Diskussion	55
4.1 Diskussion der Ergebnisse	55
4.2 Ausblick	65
5. Zusammenfassung	68

5.1 Summary	69
6. Literaturverzeichnis	70
I. Abkürzungsverzeichnis	
II. Abbildungsverzeichnis	
III. Tabellenverzeichnis	
IV. Danksagung	
V. Lebenslauf	
VI. Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen	

1. Einleitung

1.1 Pyrrolizidinalkaloide

1.1.1 Allgemeines

In den letzten Jahrzehnten sorgen Pyrrolizidinalkaloide (PA) gehäuft für Diskussionen, vor allem wegen ihrer genotoxischen Eigenschaften. Diese sekundären Pflanzeninhaltsstoffe werden von verschiedenen Pflanzen unter anderem zum Schutz gegen ihre Prädatoren erzeugt (1, 2). Es wird davon ausgegangen, dass mehr als drei Prozent aller blühenden Pflanzen PA enthalten (3).

Das Vorkommen von PA wird vor allem in Asteraceae (Korbblütler), Boraginaceae (Raublattgewächse) und Fabaceae (Hülsenfrüchtler) beschrieben (2). Diese kommen meist als Beikräuter in Pflanzenkulturen oder Feldern vor, wodurch die kultivierten Pflanzen PA über den kontaminierten Boden aufnehmen können (4, 5). Kontaminiert sein können verschiedene Lebensmittel und Genussmittel wie zum Beispiel Tees, Gewürze, Kräuter, Mehl, Salat, Honig und Milch. Auch in Nahrungsergänzungsmitteln (NEM) und Heilkräutern der traditionellen chinesischen Medizin wurden vermehrt PA detektiert (6-15).

Es gibt über 600 verschiedene PA, welche sich durch die verschiedenen funktionellen Gruppen sehr in ihrer toxischen Wirksamkeit unterscheiden (16-18). Die Vielzahl an Molekülen mit unterschiedlicher Struktur kommen in über 6000 verschiedenen Pflanzenarten vor (18, 19). Getestet wurden in unserer Versuchsreihe die PA Lasiocarpin (Lasio) und Riddelliin (Ridd), welche schon in vorhergehenden Studien an Tieren als leberschädigend deklariert wurden (20). Nach der Metabolisierung, die vorwiegend in der Leber stattfindet, können PA Hepatotoxizität induzieren. Ihre genotoxischen Effekte sind beispielsweise Genmutationen, Chromosomenaberrationen und DNA-Adduktbildung (21-25).

1.1.2 Strukturformeln

Die chemische Grundstruktur der PA setzt sich aus 1-Hydroxymethylpyrrolizidin, welches die Necin-Base ist, und einer Necinsäure zusammen (**Abb. 1**). Base und Säure können miteinander verbunden werden, indem die Base mit der Carboxylgruppe der

aliphatischen Necinsäure verestert (26). Ihre Grundstrukturen können Monoester, offenkettige und makrozyklische Diester oder Triester sein (2, 13).

Wichtige Gruppen der PA-Basen sind beispielsweise Heliotridin, Retronecin, Otonecin und Platynecin (**Abb. 2**) (13). Sie können entweder als freie Basen oder als PA-N-Oxide vorkommen. Die PA-N-Oxide stellen eine leicht wasserlösliche Form dar. Es lässt sich somit mutmaßen, dass sie die Transportform der PA innerhalb der PA-bildenden Pflanzen und auch zwischen verschiedenen Pflanzen sein könnten (27).

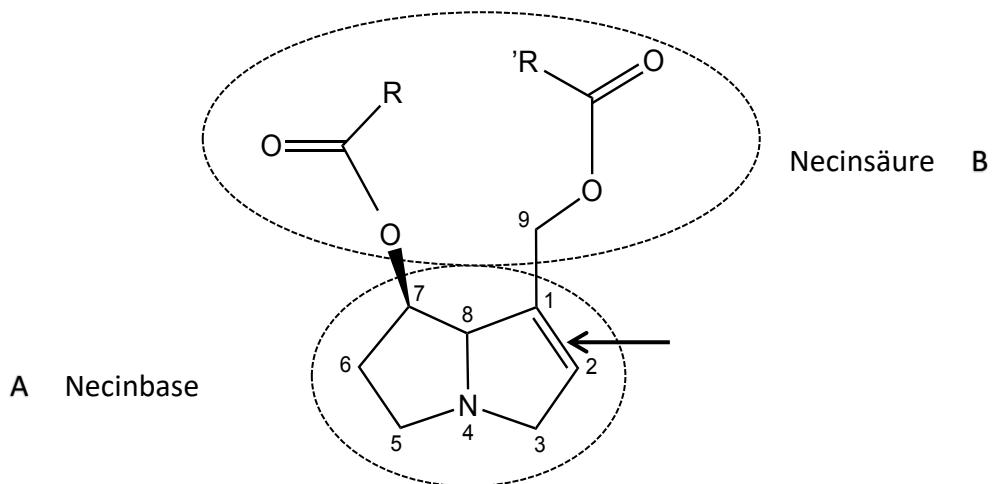


Abbildung 1: Grundstruktur der Pyrrolizidinalkaloide; Bicyclische Necinbase (A) mit ungesättigter Doppelbindung an 1,2-Position (siehe Pfeil), über Carboxylgruppen mit der Necinbase veresterte Necinsäure (B); die Strukturformel wurde nach Moreira et al. (26) skizziert.

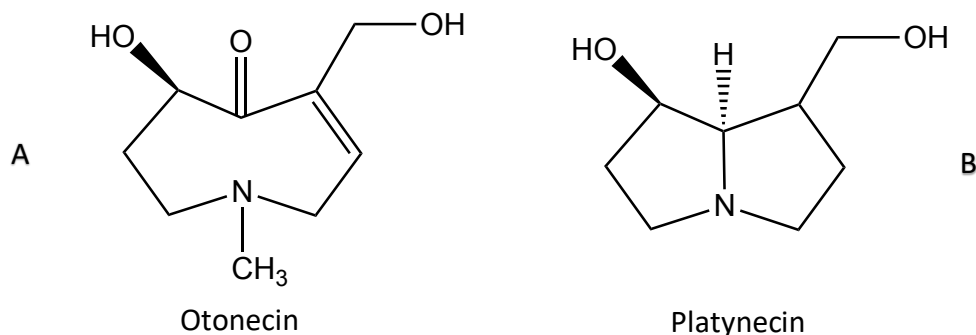


Abbildung 2: Chemische Strukturformel von Otonecin (A) und Platynecin (B) nach Vorlage aus Moreira et al. (26) .

Eine getestete Substanz ist Lasiocarpin (**Abb. 3**). Sie gehört zur Gruppe der Heliotridine und ist somit vom strukturellen Typ ein offenkettiger Diester. Lasiocarpin kommt beispielsweise in Heliotropium-Arten (Sonnenwenden) vor (28).

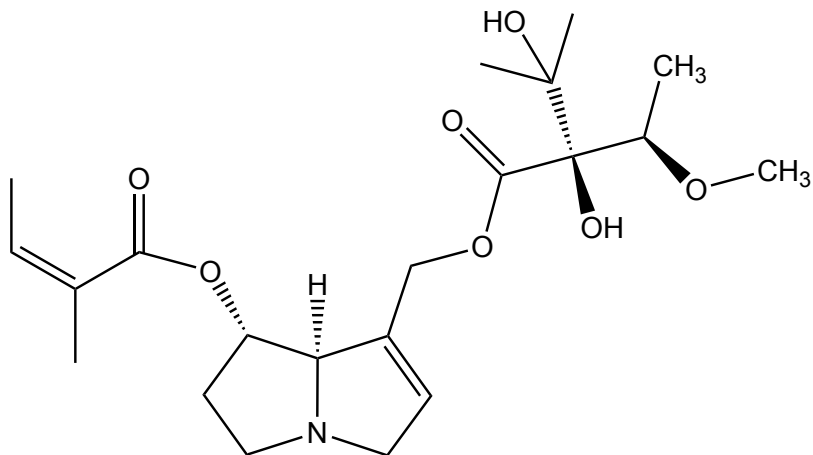


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von Lasiocarpin nach Vorlage aus Schrenk et al. (17).

Riddelliin (**Abb. 4**) gehört zu der Gruppe der Retronecin-Typen. Sie sind makrozyklische Diester mit Retronecin als ungesättigtem Alkohol und Riddelliinsäure als veresterte Necinsäure (**Abb. 5**) (29). Senecio-Arten (Kreuzkraut, Familie der Korbblütler) und Amsinckia-Arten (Amsinckien, Familie der Raublattgewächse) sind Beispiele für Pflanzengattungen, in denen Riddelliin vorkommt (30, 31). Räumlich gesehen zeigt die Hydroxygruppe am siebten Kohlenstoffatom nach vorne, was der einzige Unterschied dieser Grundstruktur zur Heliotridin- Grundstruktur (**Abb. 5**) ist. Das bedeutet, dass die Strukturen der Basen Diastereomere sind (26, 32).

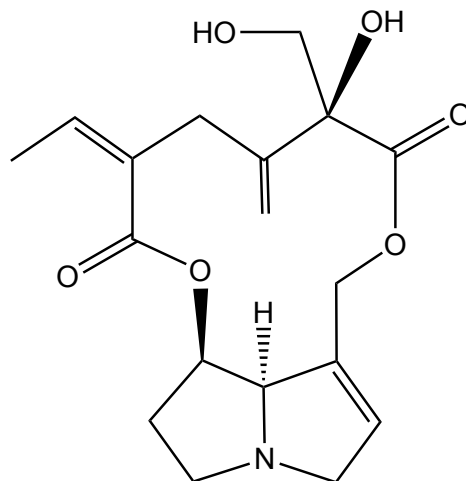


Abbildung 4: Chemische Strukturformel von Riddelliin nach Vorlage aus Ning et al. (29).

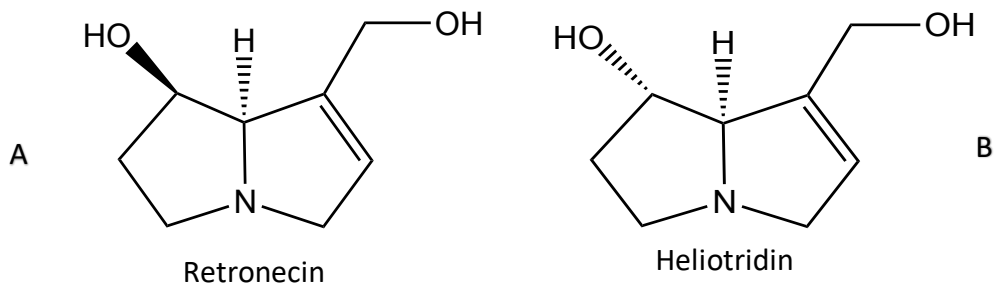


Abbildung 5: Chemische Strukturformeln eines Retronecin-Typs (A) und eines Heliotridin-Typs (B) nach Vorlage aus Moreira et al. (26).

PA-N-Oxide haben im Gegensatz zu den freien Basen eine potenziell niedrigere Reaktivität. Für diese PA-N-Oxide haben PA-produzierende Pflanzen eigene Transporter, welche ihnen helfen, die Stoffe kontrolliert innerhalb des Organismus zu bewegen. Am Beispiel von Senecio-Arten wurde festgestellt, dass die meisten PA in den Wurzeln von Pflanzen produziert werden, und zwar in Form von PA-N-Oxiden (33).

1.1.3 Auswirkungen

1.1.3.1 Toxizität

Für die Toxizität verantwortlich ist unter anderem die 1,2-Verbindung, welche eine erhöhte Toxizität aufweist, wenn sie ungesättigt ist. Aufgrund der Doppelbindung ist eine Hydrolyse wahrscheinlicher. Wenn die PA metabolisch aktiviert und zu den reaktiven Pyrrolestern transformiert wurden, können sie leicht DNA-Addukte bilden (22, 34). Ebenso wichtig für die Toxizität ist die Esterverbindung zwischen Necinbase und Necinsäure an C7- oder C9-Position. Je nachdem, ob eine oder beide Hydroxylgruppen verestert sind, kommen die PA dementsprechend als Mono- oder Diester vor. Den Diestern wird eine stärkere Toxizität beigemessen (22, 31). Relevanz für die Toxizität der PA haben außerdem die Verzweigungen der Alkylseitenketten der veresterten Säuren. Beispiele für eben jene PA-Grundstrukturtypen mit ungesättigten Doppelbindungen sind Heliotridin, Retronecin und Otonecin. PA, deren chemische Grundstruktur keine reaktiven, ungesättigten Doppelbindungen besitzen gelten als weniger toxisch, da sie wegen der geringeren Reaktivität durch die Doppelbindung seltener in toxische Metaboliten umgewandelt werden. Ein Beispiel hierfür ist Platynecin (13). Manche PA-Metaboliten sind nicht nur in der Leber, sondern unter anderem auch in Lunge, Niere, Knochenmark, Gastrointestinal-Trakt, Gehirn und Blut zu finden (6, 31, 35, 36).

1.1.3.1.1 Intoxikationen

Die Datenlage über PA-Intoxikationen des Menschen ist gering. Unterschieden wird generell zwischen akuten und chronischen Intoxikationen. Die im Abschnitt 1.1.1 genannten Lebens- und Genussmittel, in denen hohe Dosen an PA festgestellt werden können, sind trotz allem keine häufigen Induktoren von akuten toxischen Schäden. Wahrscheinlich sind hierfür die Dosen selbst bei kontinuierlicher Zufuhr zu gering (6). Eine Ausnahme stellen NEM dar. Ihnen wird zugeschrieben, dass sie durch eine kurz- oder langfristige Einnahme potenziell akute Gesundheitsschädigungen nach sich ziehen können. In Analysen des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) konnten in bis zu 60 % der geprüften Produkte PA nachgewiesen werden. NEM werden in unserer Gesellschaft als Teil einer gesundheitsbewussten Lebensweise angesehen. Bei der Substitution wird nicht immer hinterfragt, ob gesundheitliche Risiken durch die Aufnahme entstehen können. Bei Kindern sind vor allem Kräuterteemischungen wie Rooibosteas und Eisteegetränke auf Schwarzteebasis eine potenzielle Aufnahmequelle (11).

Die toxischen Wirkungen auf die Leber können sich als venös-okklusive Erkrankungen (VOD), Lebernekrosen, Zirrhosen oder Tumore äußern (6, 31, 37). VOD ist die Folge eines Verschlusses der kleinen Lebervenen (38, 39). Eine der histopathologischen pathognomonischen Veränderungen ist der Verschluss der zentralen sublobulären Lebervene (11, 40). Die auch als Stuart-Bras-Syndrom bekannte Krankheit kann in eine Leberzirrhose übergehen (41).

Meist äußern sich PA-Intoxikationen zunächst unspezifisch, wie zum Beispiel durch Oberbauchschmerz. Die Schwierigkeit der Identifizierung der Fälle liegt in der Verzögerung der Intoxikationszeichen, die normalerweise erst einige Tage nach der Exposition auftreten. Die Ursache der Symptome ist meist nicht mehr zu erinnern oder zu identifizieren, da die PA-Exposition von den Betroffenen oft nicht mit der Intoxikation assoziiert wird. Eher später auftretende Symptome können Aszites, Ödeme und Oligurie sein, eventuell begleitet von Übelkeit, Erbrechen, Ikterus und Fieber (11, 42, 43).

Sichere Nachweise einer direkten toxischen Wirkung der PA fand man nur in wenigen Fällen. Ein Fall, der vom BfR beschrieben wird, ist der eines sechs Monate alten

weiblichen Säuglings, dem über zwei Wochen eine Dosis zwischen 0,8-1,7 mg PA/kg pro Tag in Form von Kräutertee verabreicht wurde. Zwei Wochen post expositionem entwickelte er einen Aszites und einen Pleuraerguss, mehrere Monate später litt er an Leberzirrhose. Ein weiterer beschriebener Fall ist der eines zwei Monate alten männlichen Säuglings, der über vier Tage einer Dosis von 3 mg PA/kg pro Tag in Form von Kräutertee ausgesetzt war und an den Folgen verstarb. Hier waren vor allem Riddelliin und Retrorsin-N-Oxid der Haupt-PA-Bestandteil, welcher nach der Aufnahme zur Intoxikation führte (13).

1.1.3.1.2 Chronische, nicht-neoplastische Schäden

Auch bei Tieren konnte das Auftreten von degenerativen Lebererkrankungen immer wieder auf PA zurückgeführt werden. Die Problematik hierbei ist, dass PA-haltige Pflanzen natürlicherweise auf Flächen vorkommen, die zur Futtermittelgewinnung genutzt werden (44). Bei längerer PA-Aufnahme können im Tierversuch chronische Schäden wie eine pulmonal-arterielle Hypertension entstehen. Dies kann beispielsweise zu Herzinsuffizienz und Hypertrophie des rechten Ventrikels führen. Es ist außerdem bekannt, dass aus chronischer PA-Belastung bei Tieren periportale Fibrosen und Nekrosen, portale Hypertension, Aszites, mesenterische Ödeme und Diarrhöen resultieren können (6, 45-47). PA-assoziierte hepatische Enzephalopathien konnten bei Pferden beobachtet werden (48). Je nach Tierart waren die pathologischen Funde unterschiedlich ausgeprägt.

1.1.3.1.3 Embryotoxizität und Teratogenität

Speziell die ungesättigten Formen der PA sind aufgrund ihrer Plazentagängigkeit potenziell embryotoxisch. Im Tierversuch konnte man nach der Gabe hoher Dosen PA Teratogenität und Fetotoxizität feststellen. Die induzierte embryotoxische Schädigung kann sich in Form von verzögertem Wachstum, veränderten Skelettentwicklungen und kongenitalen Anomalien darstellen (6, 28, 31, 49).

1.1.3.2 Karzinogenität

Die Datenlage zur Karzinogenität von PA auf den Menschen ist nicht suffizient erforscht, in Bezug auf Tierversuche ist die Lage eine andere. Lasiocarpin wurde schon in den Siebzigerjahren in Tierversuchen auf Karzinogenität getestet und als möglicherweise kanzerogen für den Menschen deklariert (28, 50). In einer Versuchsreihe des US-amerikanischen National Cancer Institute wurden verschiedene Gruppen aus Ratten gebildet, darunter eine Kontrollgruppe. Die Tiere der anderen Gruppen erhielten eine niedrige, mittlere oder hohe Dosis an Lasiocarpin. Hier konnte herausgefunden werden, dass Ratten, die über mehrere Monate mit Lasiocarpin behandelt wurden, eine erhöhte Rate an Tumoren entwickelten. Die Zahl der Ratten mit Angiosarkomen der Leber in der behandelten Gruppe war signifikant erhöht, während in der Kontrollgruppe keine Ratte ein Angiosarkom entwickelte. Teilweise metastasierten die Tumore in die Lunge. Adenome und noduläre Hyperplasien der Leber wurden ausschließlich in den Gruppen der behandelten Ratten gefunden. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Lasiocarpin einen proliferativen Effekt auf die Hepatozyten der Ratten hatte. Außerdem erhöhte sich die Anzahl an Ratten, die an Leukämien oder Lymphomen erkrankten, signifikant. Hepatozelluläre Karzinome entstanden nur in den Rattengruppen, die mit einer hohen Lasiocarpin-Dosis behandelt wurden. Ferner stieg die Mortalitätsrate in den Gruppen der behandelten Ratten (51).

Riddelliin wurde wie Lasiocarpin im Tierversuch getestet. Auch hier wurde durch die PA-Gabe Tumorwachstum der Leber induziert. Die Tumore metastasierten teilweise in Lunge, Lymphknoten oder Pankreas. Außerdem wurde eine erhöhte Rate an Leukämien in der Gruppe der behandelten Ratten festgestellt (52). Ob die Daten der Tierversuche auf den Menschen übertragbar sind, lässt sich schwer abschätzen. Es wird jedoch angenommen, dass dies in Bezug auf die leberschädigenden und kanzerogenen Wirkungen nach jetzigem Wissensstand der Fall ist (37).

1.2 Metabolismus

Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Strukturmerkmale der PA-Typen findet man für diese auch verschiedene Stoffwechselwege. Sie entfalten ihre toxische Wirkung erst nach metabolischer Aktivierung durch Leberenzyme. In der im Abschnitt 1.1.3.2 erwähnten Studie konnte gezeigt werden, dass das Hauptschädigungsziel von Lasiocarpin die Leber ist (51). Säugetiere nehmen PA oral auf, die Resorption erfolgt über die Darmschleimhaut, was bereits 1982 im Tierexperiment festgestellt wurde (53). Die Art der Darmpassage erfolgt auf unterschiedliche Weise abhängig vom jeweiligen Strukturtyp (54). Falls die PA in Form von Stickstoffoxiden vorkommen, werden diese im Tierversuch vor der Resorption zu tertiären Basen reduziert (55). Ein Teil der Esterverbindungen der PA wird im Blut durch unspezifische Esterasen zu Necin-Base und Necinsäure gespalten. Diese Entgiftungsreaktion stellt nur einen Teil der Möglichkeiten der Verstoffwechslung dar. Die wasserlöslichen Necin-Basen, welche als nicht toxisch gelten, werden teilweise als Konjugate renal ausgeschieden. Toxikologisch keine Bedeutung zu haben scheinen die auf diesem Weg frei werdenden Necinsäuren (31, 56). Der andere Teil der PA wird in die Leber transportiert. Am Beispiel von Riddelliin werden im Folgenden verschiedene Metabolisierungswege aufgezeigt (**Abb. 6**). Durch N-Oxidation mittels Cytochrom P-450 (CYP) werden PA in nicht-toxische PA-N-Oxide umgewandelt. PA-N-Oxide sind die Form, in welcher PA natürlicherweise in Pflanzen vorkommt (33). Aufgrund ihrer erhöhten Wasserlöslichkeit können sie leichter aus dem Körper ausgeschieden werden (57). Aus dieser Form können jedoch auch toxische Metaboliten entstehen (22, 45). Aus dem Körper ausgeschieden werden die PA vorwiegend über den Urin und weniger über den Stuhl (31, 45, 53).

In vorhergehenden Studien wurde herausgefunden, dass der enzymatische Aktivierungsvorgang hauptsächlich vom hepatischen CYP-System katalysiert wird (22, 58). CYP-Enzyme haben also einen großen Einfluss auf die Metabolisierung der PA. Sie können, wie oben beschrieben, beispielsweise das Necin-Basengerüst an C8-Position hydroxylieren. Dabei entsteht zuerst ein reaktives, labiles Zwischenprodukt, das die Hydroxygruppe leicht abspalten kann. Diese können zu hochreaktiven 6,7-Dihydro-7-

hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin (DHP) weiter reagieren. DHP sind die metabolisch aktive und hoch reaktive Form der PA mit kurzer Halbwertszeit, unter anderem durch ihr elektrophiles Zentrum im Necinbasengerüst (59, 60). Dieses Zentrum wird durch Kationen an C7- oder C9-Position gebildet. Die Kationen entstehen häufiger aus den reaktiven Estergruppen als aus PA mit Hydroxygruppen (57). Reagieren können sie beispielsweise mit nukleophilen Gruppen anderer Proteine wie Thiol- und Hydroxygruppen oder γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycin (Glutathion, GSH). Eine weitere Möglichkeit der Verstoffwechslung ist eine Giftungsreaktion durch Oxidation zu toxischen, reaktiven Pyrrolestern (31, 57).

Aus der Quervernetzung der DNA können strukturelle Veränderungen resultieren. Diese werden auch Crosslinks genannt und können unter anderem entstehen, wenn DHP die Alkylierung von DNA-Basen oder Proteinen induzieren (23). DNA-/Protein-Crosslinks wurden in mehreren Studien *in vivo* und *in vitro* nachgewiesen. Auch DNA-Addukte können toxisch wirken und gelten als potenzielle Biomarker für mögliche PA-induzierte Leberzelltumore (22, 25, 61-65). Sie können auch *in vivo* aus den als weniger toxisch geltenden PA-N-Oxiden entstehen und karzinogene Wirkungen nach sich ziehen (66). Es ist wahrscheinlich, dass DNA-Replikationsstörungen durch DNA-DNA-Crosslinks entstehen können (61). Die Crosslinks werden, genauso wie die Addukte, mit der Entstehung von VOD und Tumoren assoziiert (22, 25, 57, 66). Die Auswirkungen der GSH-Konjugation auf DHP werden differenziert bewertet. 1990 diskutierten Huxtable et al. in einer Veröffentlichung über GSH-Konjugate als potenzielle indirekte Auslöser von (Pneumo)-Toxizität (67). Xia et al. nannten GSH-Konjugate als mögliche Ursache von DNA-Addukt-Bildung, welche potenziell hepatotoxische Metaboliten darstellen (68). Heutzutage werden GSH-Konjugaten in mehreren Veröffentlichungen auch detoxifizierende Wirkungen zugesprochen (57). Freie Necin-Basen sind, ob gesättigt oder ungesättigt, keine toxischen Metaboliten. Die Hydroxygruppe kann hier nicht anionisch abgespalten werden, weshalb sie keine Gefahr für den Menschen darstellt.

EINLEITUNG

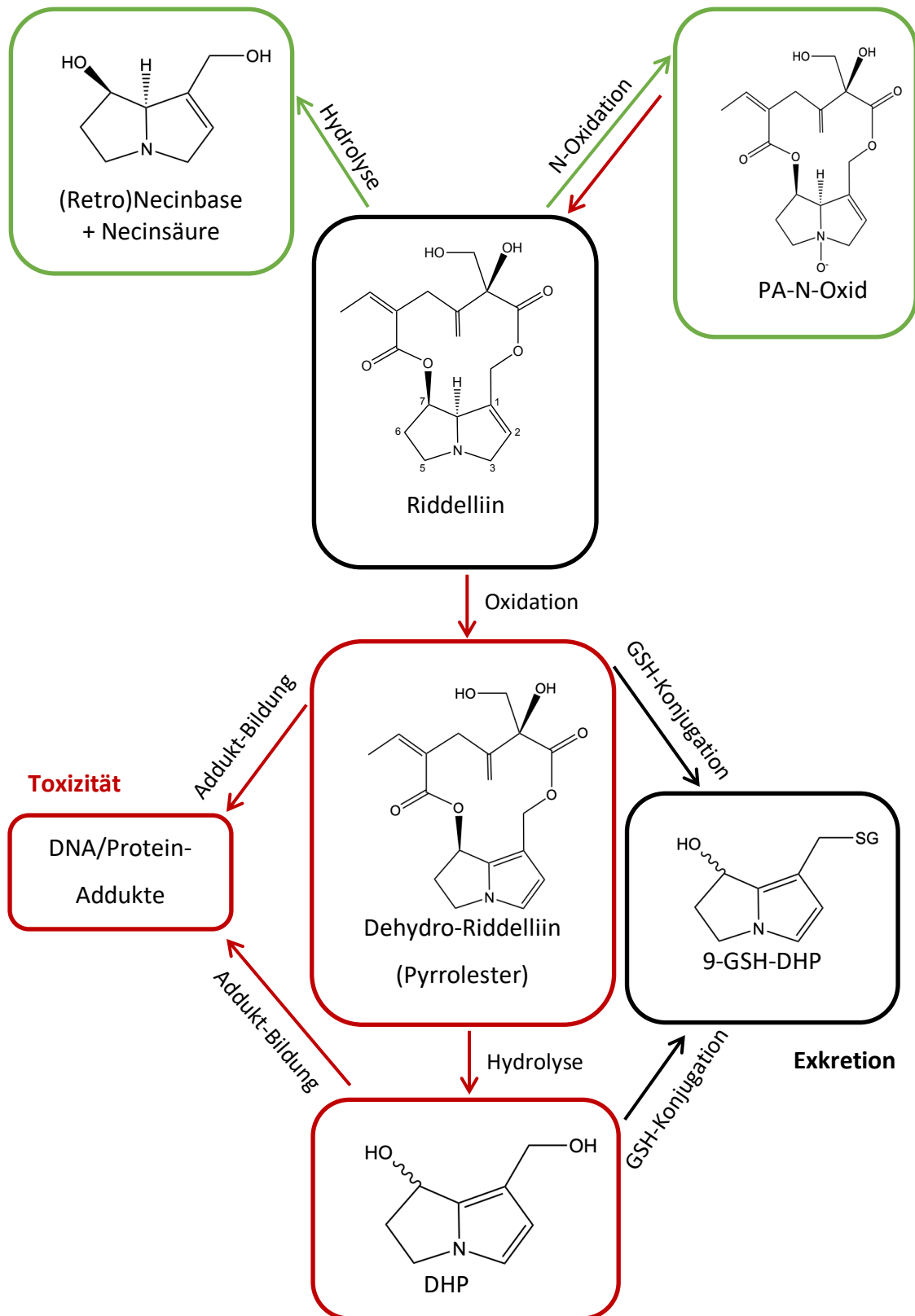


Abbildung 6: Metabolisierungswege von Pyrrolizidinalkaloiden am Beispiel von Riddelliin; Rot markierte Stoffwechselwege kennzeichnen Giftungsmechanismen, grün markierte Entgiftungsmechanismen; modifizierte, schematische Darstellung nach Moreira et al. (26) und Ning et al. (29); DHP: 6,7-Dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin, GSH: Glutathion, PA-N-Oxid: Pyrrolizidinalkaloid-N-Oxid.

1.3 Grenzwerte und gesetzliche Restriktionen

Laut einer Stellungnahme des BfR lässt sich die von PA ausgehende potenzielle Gefahr für den Menschen durch Verzicht auf Konsum und Kontrolle von mit PA kontaminierten Lebensmitteln minimieren (69). Kommt es zur Aufnahme, gibt es Grenzwerte, an denen sich Verbraucher orientieren können. Generell gilt das „as low as reasonably achievable“-Prinzip (ALARA, so gering wie vernünftigerweise möglich), welches in Sachen PA von dem BfR empfohlen wird. Demnach soll der Verzehr von Pflanzen, die mit PA kontaminiert sind, auf das Nötigste beschränkt bzw. vermieden werden. Das BfR empfiehlt die Aufnahme einer Menge „von 0,007 µg ungesättigten PA/kg“ pro Tag nicht zu überschreiten (13). Bisher nutzt das BfR den „Margin of Exposure“ (MOE, Sicherheitsmarge) zur Berechnung eines Richtwertes, der von der European Food safety authority (EFSA; Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit) empfohlen wird. Es ist zu betonen, dass der MOE genauso wie der „Benchmark Dose Lower Confidence Limit 10 %“-Wert (BMDL₁₀-Wert) keine auf der Gesundheit der KonsumentInnen basierender Wert ist, sondern zur „Priorisierung von Maßnahmen für das Risikomanagement“, wie beispielsweise amtliche Lebensmittelkontrollen eingesetzt wird (69). Von RisikobewerterInnen wird dieses Instrument genutzt, um eine mögliche Gefahr von Substanzen abzuschätzen, die in Lebensmitteln vorkommen und Genotoxizität oder Kanzerogenität auslösen können. Ein MOE-Wert von ≥ 10.000 gilt hier als gering bedenklich in Bezug auf die Gesundheit (69).

Er wird folgendermaßen berechnet:

$$\frac{\textit{niedrigste schädliche Dosis}}{\textit{geschätzte höchste Exposition der Allgemeinbevölkerung}} \geq 10.000 \rightarrow \textit{wenig bedenklich}$$

Die kleinste schädliche Dosis wurde aus Daten berechnet, die auf Tierstudien basieren. Aus diesen Tierversuchen leitet sich der BMDL₁₀-Wert ab, der zur Berechnung des MOE genutzt wird. Er ist ein geschätzter Wert der niedrigsten Dosis, die mit 95 prozentiger Sicherheit eine Krebsinzidenz von höchstens zehn Prozent nach sich zieht. Aktuell kalkuliert die EFSA mit einem BMDL₁₀-Wert von 237 µg/kg pro Tag (34).

Die in 1.1.3.1.1 beschriebenen Fälle menschlicher Intoxikationen führten dazu, dass die EFSA eine Niedrigstdosis von 1-3 mg PA/kg pro Tag kalkulierte, welche zu akuter Toxizität führen kann (34). Das BfR hat einen Wert ermittelt, ab welchem im Tierversuch nicht-neoplastische, chronische Schäden entstehen können. Dieser sogenannte Health Based Guidance Value (HBGV, gesundheitsbasierter Richtwert) hat den Wert von 0,1 µg/kg und Tag (11). Einen Schwellenwert zu berechnen, der einer unbedenklichen Aufnahmemenge entsprechen würde, ist bei genotoxischen und kanzerogenen Stoffen jedoch nicht möglich (69).

Schon seit 1992 gibt es Richtlinien zu PA-Gehalten in Arzneimitteln. Laut dem damals vom Bundesgesundheitsamt erstellten Stufenplan dürfen in pharmazeutisch hergestellten Arzneimitteln für die kutane Anwendung höchstens 100 µg PA pro Tagesdosis enthalten sein und maximal sechs Wochen pro Jahr bzw. 10 µg PA pro Tagesdosis ohne zeitliche Limitierung angewendet werden. Für die orale Applikation sollen besagte Arzneimittel höchstens 1 µg PA pro Tagesdosis enthalten und maximal sechs Wochen pro Jahr eingenommen werden bzw. 0,1 µg PA pro Tagesdosis ohne zeitliche Limitierung (70). Der Ausschuss für pflanzliche Arzneimittel hat 2014 als europäisches Fachgremium die Beurteilung ausgesprochen, dass ein akzeptabler Wert für eine kurzfristige orale Anwendung von PA-haltigen Phytopharmaka eine Dosis von 0,35 µg pro Tag für maximal vierzehn Tage sei (71).

2019 wurde außerdem vom Arbeitskreis Nahrungsergänzungsmittel des Bunds für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e. V. ein „Code of Practice“ herausgegeben, welcher einen Leitfaden für ProduzentInnen von pflanzlichen NEM darstellt (72). Die genannten Einschränkungen bezüglich der Herstellung von NEM betreffen nicht nur die Pflanzen, die PA produzieren, sondern auch diejenigen, die potenziell mit PA kontaminiert sein könnten.

1.4 Fragestellung

Vor dem einleitend beschriebenen Problemhintergrund hat die vorliegende Arbeit als primäres Ziel die Gewinnung eines besseren Verständnisses über die Genotoxizität der PA Lasiocarpin und Riddelliin *in vitro*, insbesondere auf die vielversprechend hinsichtlich der metabolischen Aktivierung bewerteten humanen Leberzelllinie Huh6. Welche Auswirkungen Lasiocarpin und Riddelliin auf die ausgewählte Zelllinie haben ist bisher noch nicht untersucht worden.

Im Fokus steht die Ermittlung von DNA-Schäden mittels Mikrokerntest und Comet Assay, welche zu den Standardmethoden der Toxikologie für Untersuchungen der Genotoxizität zählen und die Quantifizierung unterschiedlichen DNA-Schadens ermöglichen. Zur Detektion von oxidativem Stress wird das Testspektrum um den FPG Comet Assay erweitert. Außerdem wird der γ -H2AX Assay durchgeführt, welcher Informationen über die Relevanz von Doppelstrangbrüchen bei den Genomschäden geben kann. Durch die Auswahl mehrerer, unterschiedlicher Untersuchungsmethoden wird sich erhofft, differenzierte Aussagen über die Art des durch Lasiocarpin und Riddelliin induzierten DNA-Schadens treffen zu können.

Der Endpunkt der abschließenden Kombinationsverfahren ist die Detektion einer gegebenenfalls vorliegenden Potenzänderung bei der Behandlung der Huh6 Zellen mittels niedriger und hoher Dosen von sich strukturell unterscheidenden PA. Hier sind vor allem eventuell auftretende, synergistische Effekte von Interesse.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Arbeitsgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die PA Lasiocarpin und Riddelliin wurden freundlicherweise von der Firma Phytolab GmbH & Co. KG (Vestenbergsgreuth, Deutschland [D]) und Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH bzw. der Bayer AG (Darmstadt, D) zur Verfügung gestellt. Die Huh6 Zellen wurden von der Universität Wien, Österreich (AG Prof. Siegfried Knasmüller) bezogen. Die Chemikalie Cyclophosphamid (CPA) stammte von der Firma Alfa Aesar GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D), die Chemikalie Benzo(a)pyren (BaP) von der Firma Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D). 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), Ethanol, Cytochalasin-B (Cyto-B) und Trypsin/Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung wurden ebenfalls von der Firma Sigma-Aldrich GmbH bezogen. Ethanol, Methanol und die Objektträger Superfrost wurden bei der Firma Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D) bezogen. Die Pufferlösungen wurden in unserem Labor autoklaviert oder steril gefiltert. Formamidopyrimidin-Glykosylase (FPG) wurde freundlicherweise von der Universität Mainz (Prof. Dr. Bernd Epe) zur Verfügung gestellt.

Die 6- und 24-Well-Platten, Reagenzgläser und Zellkulturflaschen wurden von der Firma Sarstedt AG & Co. KG (Nümbrecht, D) bezogen. Deckgläser wurden von der Firma Paul Marienfeld GmbH & Co. KG (Lauda-Königshofen, D) erworben. Objektträger wurden von der Firma Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG (Sondheim, D) bezogen. Die Eppendorf-Reagenzgläser wurden von der Eppendorff SE (Hamburg, D) gekauft.

In alphabetischer Reihenfolge aufgelistet findet sich eine Übersicht weiterer genutzter Arbeitsmittel: Accu-Jet Pro, Autoklav, PowerPac (Biorad), Brutschrank, Cytospin, Eismaschine, Feinwaage, Heizplatte, Inkubator, Magnetrührer, Neubauer Zählkammer, pH-Meter, Pipetten, Rüttler, Spritzen, Spritzenvorsatzfilter, sterile Werkbank, Transferpetten, Vortexer, Wasserbad, Zellzähler, Zentrifuge, Zentrifugen-Röhrchen.

Aufgeführt werden im Folgenden die genutzten Mikroskope und Kameras (**Tab. 1**):

Tabelle 1: Mikroskope und Kameras; D: Deutschland.

Mikroskope/Kameras	Firma	Testmethode
Fluoreszenzmikroskop Eclipse 55i	Nikon GmbH (Düsseldorf, D)	Mikrokerntest
Intas Eclipse 55i Kamera	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, D	
Fluoreszenzmikroskop Labophot-2	Nikon GmbH (Düsseldorf, D)	Comet Assay
Luca S Kamera	Andor Technology Ltd (Belfast, Vereinigtes Königreich)	
Lichtmikroskop Diavert	Leitz (Wetzlar, D)	Vitalitätstest
Fluoreszenzmikroskop Nikon TE2000-E	Nikon GmbH (Düsseldorf, D)	γ -H2AX Assay

2.1.1 Puffer und Medium für die Zellkultur

Aufgeführt werden die benötigten Puffer und Medien für die Zellkultur der Huh6 Zellen (**Tab. 2**). Die benutzten Lösungen und deren Zusätze mit Konzentrations- und Mengenangaben sind im folgenden Abschnitt (**Tab. 3**) zusammengefasst.

Tabelle 2: Puffer, Medium und dessen Zusätze für die Zellkultur; D: Deutschland; FBS: fetal bovine serum bzw. Fetales Kälberserum; NaOH: Natriumhydroxid; PBS: Phosphat buffered saline bzw. Phosphatpuffersalzlösung.

Medium und Zusätze	Firma	Konzentrationen bzw. Menge
FBS	Biochrom GmbH (Berlin, D)	10 % bzw. 50 ml
L-Glutamin	Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D)	1 %, 200 nM
Natriumhydrogencarbonat (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)	2,0 g/L
Penicillin (100 μ g/ml)-Streptomycin (1 mM)	Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D)	1 % bzw. 5 ml
RPMI-1640	Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D)	500 ml
Trypsin/EDTA-Lösung mit PBS verdünnt (1:10)	Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D)	3 μ l/ml

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 3: Zusammenstellung der benutzten Puffer/Lösungen; Abcam PLC (Cambridge, Vereinigtes Königreich); Biochrom GmbH (Berlin, D); Biotrend Chemikalien GmbH (Köln, D); Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D); Merck KGaA (Darmstadt, D); Sigma-Aldrich GmbH (München bzw. Steinheim, D); BSA: bovine serum albumine; DABCO: 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan; D: Deutschland; DMSO: Dimethylsulfoxid; EDTA: Ethylendiamintetraessigsäure; FDA: Fluoresceindiacetat; HMP-Agarose: high melting point agarose; LMP-Agarose: low melting point agarose; NaCl: Natriumchlorid; NaOH: Natriumhydroxid; PBS: Phosphat buffered saline bzw. Phosphatpuffersalzlösung; PFA: Paraformaldehyd; TRIS: Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Lösungen	Zusätze	Mengen bzw. Konzentrationen	Hersteller
Lyse-Puffer, <i>pH 10</i> mit NaOH einstellen	NaCl (2,5 M)	146,1 g/l	Carl Roth
	EDTA (100 mM)	37,22 g/l	Carl Roth
	TRIS (10 mM)	1,21 g/l	Carl Roth
Lyse-Lösung	DMSO	7,5 ml	Carl Roth
	Triton X-100	0,75 ml	Sigma-Aldrich
	Lysepuffer	66,75 ml	
Elektrophorese-Puffer	EDTA-Lösung (0,2 M)	10 ml	
	destilliertes H ₂ O	1 l	
	NaOH (5 M)	120 ml	Carl Roth
GelGreen (Gebrauchslösung)	destilliertes H ₂ O	990 µl	
	GelGreen-Stocklösung	10 µl	Biotrend
GelRed (Gebrauchslösung)	destilliertes H ₂ O	990 µl	
	GelRed Stocklösung	10 µl	Biotrend

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen	Zusätze	Mengen bzw. Konzentrationen	Hersteller
DABCO (Gebrauchslösung)	Glycerin	90 ml	Carl Roth
	PBS (1x)	10 ml	
	DABCO	250 mg	Sigma-Aldrich
PBS-Lösung (10x)	Dinatriumhydrogenphosphat	2 g	Sigma-Aldrich
	Kaliumchlorid	5,75 g	
	Natriumchlorid	80 g	
	Kaliumdihydrogenphosphat	2 g	
	destilliertes H ₂ O	1 l	
PBS-Puffer (1x)	destilliertes H ₂ O	1 l	
	PBS-Lösung (10x)	100 ml	
EDTA (0,2 M)	destilliertes H ₂ O	200 ml	
	EDTA	74,45 g	
NaOH-Lösung (5 M)	destilliertes H ₂ O	1 l	
	Natriumhydroxid	200 g	Carl Roth
TRIS-Puffer (0,4 M, pH 7,5, eingestellt mit Salzsäure)	destilliertes H ₂ O	1 l	
	TRIS	14,89 g	

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen	Zusätze	Mengen bzw. Konzentrationen	Hersteller
Vitalitätsfärbelösung	GelRed-Lösung	2 µl	Sigma-Aldrich
	PBS	2 ml	
	FDA-Lösung	12 µl	
FDA-Lösung (5 mg/ml)	Aceton	1 ml	Carl Roth
	FDA	5 mg	Sigma-Aldrich
Bisbenzimid-Stammlösung	DMSO	1 ml	Carl Roth
	Hoechst 33258	1 mg	Sigma-Aldrich
Bisbenzimid-Lösung (5 µg/ml)	PBS	99,5 ml	
	Bisbenzimid-Stammlösung	0,5 ml	
HMP-Agarose-Lösung (1,5 %)	PBS (1x)	100 ml	Carl Roth
	HMP-Agarose	1,5 g	
LMP-Agarose-Lösung (0,5 %)	PBS (1x)	10 ml	Sigma-Aldrich
	LMP-Agarose	0,05 g	
FPG-Enzym	E. coli-Stamm: JM105 Plasmid pFPG230		

MATERIAL UND METHODEN

Lösungen	Zusätze	Mengen bzw. Konzentrationen	Hersteller
FPG-Puffer (pH 8,0)	2-(4-(2-Hydroxyethyl) - 1-piperazinyl) - ethansulfonsäure	40 mM	Sigma-Aldrich
	Kaliumchlorid	0,1 M	Carl Roth
	EDTA	0,5 mM	
	BSA	0,2 mg/ml	Sigma-Aldrich
Blocking Puffer	FBS 5%	5 ml	
	BSA	2 g	
	Triton-X 100	100 µl	
0,25 % Triton-X 100	PBS (1x)	100 ml PBS	
	Triton-X 100	250 µl	
0,1 % Triton-X 100	PBS (1x)	100 ml PBS	
	Triton-X 100	100 µl	
0,5 % Triton-X 100	PBS (1x)	100 ml PBS	
	Triton-X 100	500 µl	
4 % PFA	PFA-Stock (10 %)	6 ml	Merck
	PBS (1x)	9 ml	
Primärantikörper (γ-H2AX- Rabbit monoklonaler Antikörper)	Primärer Antikörper	10 µl	Abcam
	Blocking Puffer	10 ml	
Sekundärantikörper (γ-H2AX-Goat-Anti-Rabbit monoklonaler Antikörper)	Sekundärer Antikörper	5 µl	Abcam
	Blocking Puffer	10 ml	

2.2 Verwendete Zellart

2.2.1 Huh6 Zellen

Die Zelllinie, mit der geforscht wurde, heißt Huh6. Es handelt sich hierbei um eine humane Leberzelllinie eines japanischen Jungen mit Hepatoblastom (73). Die Kultivierung erfolgte mit dem in Tabelle 2 aufgeführten Medium. Die Zellen wiesen eine gute metabolische Aktivierung durch verschiedene CYP-Enzyme auf. Hierfür sind vor allem CYP3A4, CYP3A7, CYP4F2, CYP4F3 und CYP2B6 in dieser Linie verantwortlich (73-75). Außerdem wird die Zelllinie folgendermaßen charakterisiert (**Tab. 4**):

Tabelle 4: Spezifizierung der Huh6 Zelllinie; modifizierte Darstellung der Daten nach Waldherr et al. (73).

Zelllinie	Morphologie	Verdopplungszeit pro Stunde	Chromosomenzahl
Huh6	Epitheliale Desmosomen und Glykogengranulat im Zytoplasma	45-50	82-86

Die Huh6 Zellen wurden dort als undifferenziert bezeichnet. Zusätzlich wurde übereinstimmend mit anderen Studien herausgefunden, dass diese Zelllinie im Gegensatz zu anderen humanen Leberzelllinien viel Glykogengranulat enthält (76). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten auf, dass die Huh6 Zelllinie eine der vielversprechendsten in Bezug auf Routine-Laboruntersuchungen ist. Beim Arbeiten mit Huh6 Zellen können Promutagene detektiert werden, ohne dass zusätzlich vom Tier stammendes Leberhomogenat für die Metabolisierung der Substanzen benötigt wird. Bisher wurden Huh6 Zellen noch nicht standardmäßig in Genotoxizitätstests genutzt.

2.2.2 Kultur der Zellen

2.2.2.1 Kultivieren der Huh6 Zellen

Zur Vorbereitung der Kultivierung wurden die Phosphatpuffersalzlösung (PBS, Phosphat buffered saline) und das Medium in ein auf 37 °C vortemperiertes Wasserbad gegeben. Zuerst musste das Medium entfernt werden. Um die adhärennten Zellen nach dem Waschen mit 5 ml PBS von der Kulturflasche zu lösen, wurden sie bei 37 °C für fünf

Minuten (min) mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Durch die Zugabe von 5 ml frischem Medium wurde der Effekt des Trypsins gestoppt. Die Zellen wurden mit einer 10 ml Glaspipette vorsichtig resuspendiert und in ein Plastikzentrifugenröhrchen gegeben. Ausgezählt wurden die Zellen in einer Neubaukammer. Hierfür wurde 10 µl der Resuspension auf die Kammer pipettiert, während die restliche Flüssigkeit-Zell-Suspension bei 1000 Umdrehungen pro Minute (rpm, revolutions per minute) für fünf Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert wurde. Das exakte Vorgehen der Zellzahlbestimmung wurde in Abschnitt 2.2.2.5 aufgeführt. Das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem, 37 °C warmem Medium erneut resuspendiert. Durch einfachen Dreisatz wurde berechnet, wie viel von der Suspension für die Subkultivierung von ca. 2 Millionen Zellen in eine 75 Kubikzentimeter (cm³) große Kulturflasche nötig war. Die Zelllinie Huh6 wurde im Inkubator bei einer Atmosphäre von 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und dampfgesättigter Luft kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte zweimal wöchentlich.

2.2.2.2 Einfrieren der Zellen

Beim Einfrieren der Zellen wurde, wie auch beim Umsetzen, zuerst die Zellzahl bestimmt. Währenddessen erfolgte die Zentrifugierung der Zellen, der Überstand wurde verworfen. Es wurde eine Suspension mit einer Zelldichte von 2×10^6 pro Cryoröhrchen pro Milliliter hergestellt, indem Dimethylsulfoxid (DMSO) mit dem Zellpellet resuspendiert wurde. Dann erfolgte die Befüllung mit ca. 1 ml Zellsuspension pro Cryoröhrchen. Die Röhrchen wurden sodann zum Kühlen in eine Box mit 70 % Isopropanol platziert und für 24 Stunden (h) in einem -80 °C kalten Kühlschrank gelagert. Nach dem Vorkühlen konnten die Röhrchen bis zum erneuten Gebrauch in einem mit flüssigem Stickstoff gefüllten Tank gelagert werden.

2.2.2.3 Auftauen der Zellen

Aufgetaut wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37 °C. Die flüssige Zellsuspension wurde mit dem ebenfalls im Wasserbad vorgewärmtem Medium in einem Reagenzglas resuspendiert, zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min bei RT) und der Überstand verworfen. Das

Gleiche wurde wiederholt, um die Zellen vom DMSO zu reinigen. Anschließend wurde eine 75 cm³ Zellkulturflasche mit 20 ml Medium befüllt und dazu ca. 2 Millionen Zellen aus der Zellsuspension dazugegeben. Die Zellkulturflasche wurde bei 37 °C im Brutschrank gelagert, eine weitere Subkultivierung erfolgte nach 48 h.

2.2.2.4 Mykoplasmen-Test

Der Mykoplasmen-Test sollte zum Ausschluss einer Kontaminierung in regelmäßigen Abständen durchgeführt werden. Eine Zellsuspension mit einer Zellzahl von 300.000 Zellen wurde hergestellt. Mittels Cytospin wurden die Zellen auf einem Objektträger platziert, für mindestens 2 h in -20 °C kaltem Methanol in einer Küvette fixiert und danach getrocknet. Die Zellen wurden anschließend drei Minuten mit 20 µl der Bisbenzimid-Lösung behandelt. Es erfolgte eine Spülung mit PBS und die Fixation mit 1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan (DABCO). Unter UV-Licht ließ sich die DNA durch die Bisbenzimid-Färbung in blauer Farbe darstellen und erlaubte so die Beurteilung der Zellkerne. Während der Versuche war kein Mykoplasmenbefall erkennbar.

2.2.2.5 Zellzählung

Zur Auszählung der Zellen wurde eine Neubaukammer unter ein Durchlichtmikroskop gelegt. Vitale Zellen waren leicht an der typischen Morphologie zu erkennen. Innerhalb der Quadranten konnte ein Volumen von 0,1 µl gefasst werden. Daraus leitete sich folgende Formel ab, um die Anzahl von vitalen Zellen auszurechnen, nachdem der Überstand abpipettiert und 1 ml frisches Medium resuspendiert wurde:

$$\text{Zellzahl pro ml} = \frac{\text{Summe der Zellen in vier Quadranten}}{4} \times 10.000 \times 7$$

Zur Subkultivierung wurde von der hergestellten Suspension die gewünschte Zellzahl in eine neue Kulturflasche umgesetzt.

2.3 Verwendete Testsysteme

2.3.1 Cytokinesis-Block-Micronucleus-Assay (Mikrokerntest)

Der Mikrokerntest (MK-Test) ist ein etabliertes Testverfahren zur Charakterisierung der Genotoxizität bestimmter Substanzen *in vitro* und *in vivo*. Durch den *in vitro*-Test konnten unter anderem DNA-Schäden und Zytotoxizität ermittelt werden (77). Außerdem können mitotische Störungen erkannt werden (78). Apoptotische und mitotische Zellen (**Abb. 7**) sind durch die charakteristische Morphologie im MK-Test leicht zu erkennen und somit zu quantifizieren.

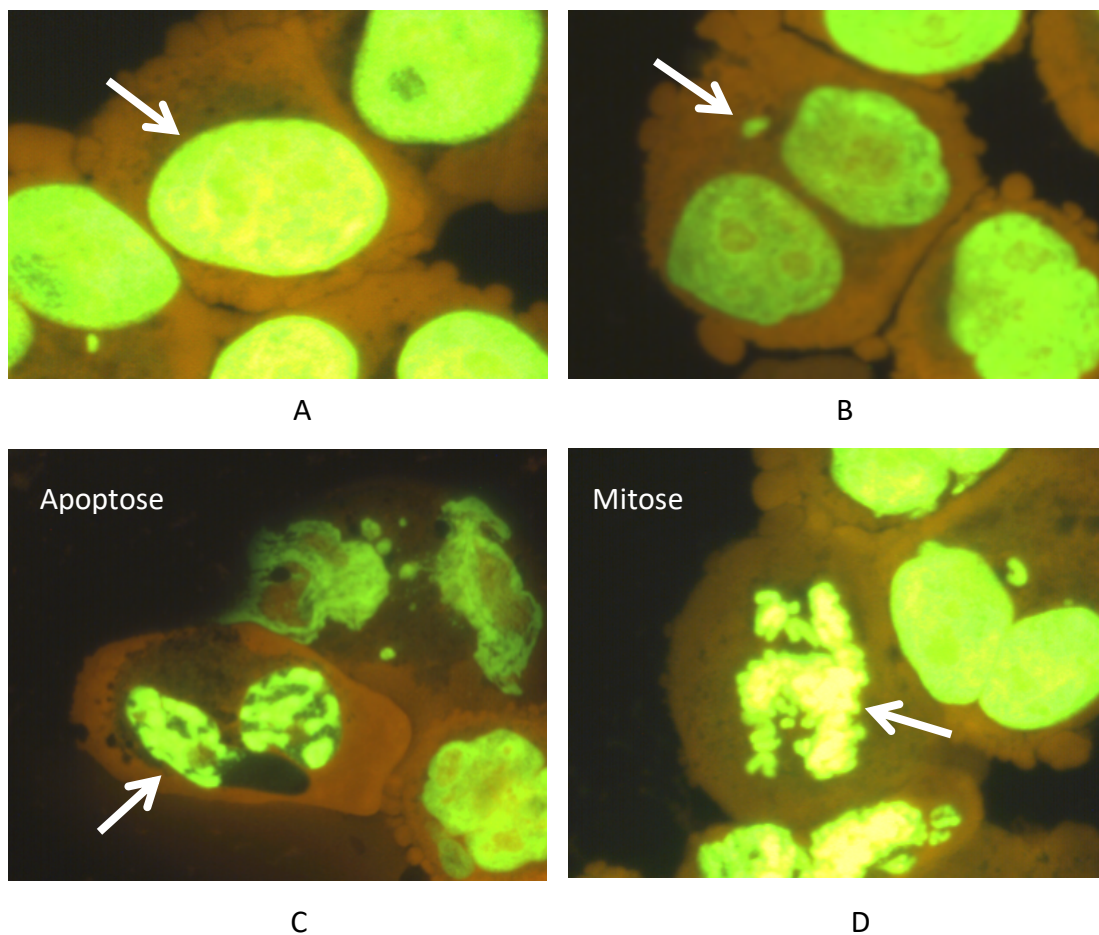


Abbildung 7: Gefärbtes Mikrokernpräparat unter dem Mikroskop im Mikrokerntest, Zellkerne sind umgeben von orange gefärbtem Zytosol; A: Einkernige Zelle mit grün gefärbtem Zellkern (Pfeil); B: Doppelkernige Zelle mit Mikrokern (Pfeil); C: Apoptotische Zelle (Pfeil) mit charakteristischer pyknotischer Morphologie; D: Zelle in der Mitose (Pfeil) mit charakteristischer Morphologie.

Die Mikrokerne (MK, **Abb. 8**) werden im Zytosol von Zellen lokalisiert. Es können ganze Chromosomen/Chromatiden in MK enthalten sein. Sie sind kleiner als der Hauptbestandteil des Zellkerns und weisen keine Verbindung zu diesem auf (79-82). Die Endpunkte des MK-Tests und ihre Quantifizierung sind in **Tab. 5** beschrieben.

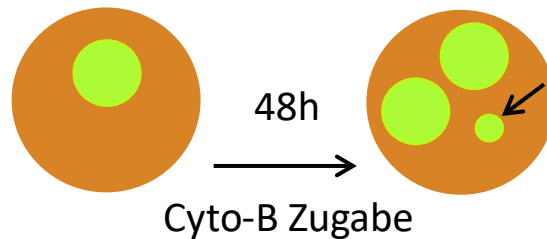


Abbildung 8: Links ist eine Zelle mit Zellkern vor der Gabe des Zytokinese-Inhibitors Cytochalasin-B (Cyto-B) skizziert; rechts eine behandelte Zelle mit Zellkern nach 48 h Inkubation mit Cytochalasin-B; zu erkennen ist nach erfolgter Kernteilung die Entstehung eines Mikrokerne (kleiner Pfeil).

Tabelle 5: Wichtige Endpunkte des Mikrokerntests, tabellarisch aufgeführt; CBPI: Cytokinesis block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex; DKZ: Doppelkernige Zellen.

Endpunkte	Parameter	Zellzahl pro Experiment
DNA-Schaden	Mikrokerne	2x 1.000 DKZ
Proliferation	CBPI	2x 1.000 Zellen
Apoptosen	Apoptotische Zellen	2x 1.000 Zellen
Mitosen	Mitotische Zellen	2x 1.000 Zellen

Zum Nachweis der Sensitivität von Huh6 Zellen im MK-Test gegenüber genotoxischen Substanzen wurden die Huh6 Zellen zuerst im Vorversuch mit den Substanzen Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid behandelt. Das Prokarzinogen BaP muss enzymatisch aktiviert werden, bevor es seine toxischen Eigenschaften entfaltet. BaP wurde in der EU-Chemikalienverordnung als potenziell karzinogen und keimzellmutagen eingestuft (83). CPA ist ein oft eingesetztes Zytostatikum und Alkylans, das die Zellteilung unterdrückt, indem es mit der DNA interagiert. Unter anderem wird das

Prodrug durch CYP-Enzyme der Leber aktiviert und entfaltet danach seine toxische Wirkung (84, 85).

2.3.1.1 Durchführung und Auswertung der Mikrokerntests

Für den Mikrokerntest wurden 6- bzw. 24-Well-Platten genutzt, in welche ca. 350.000 bzw. 200.000 Zellen/ml Medium pro Well gesät wurden. Nach der Behandlung der Zellen mit den PA wurde nach 24 h Inkubation im Brutschrank die Substanz Cyto-B (3 µg/ml, Stammlösung 500 µg/ml) hinzugegeben. Cyto-B verhindert die Zellteilung, während die Teilung des Zellkerns nicht beeinflusst wird. Somit sah man bei der Auswertung unter dem Mikroskop oft doppel- und mehrkernige Zellen sowie MK. Der MK-Test wurde in unserer Versuchsreihe ausschließlich unter Cyto-B Gabe durchgeführt. Nach 48 h Cyto-B Inkubation wurden die Zellen geerntet. Zuerst wurde das Medium aus den Wells entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Ablösen der Zellen vom Boden wurde Trypsin genutzt. In jedes Well wurde 2 ml Trypsin pipettiert und für fünf Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden pro Well 5 ml Medium hinzugegeben. Nach dem Resuspendieren wurde die Zell-Medium-Suspension in ein Reagenzglas gegeben und zentrifugiert (1.000 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde abgekippt. Um die Zellen zu waschen, wurde erneut 7 ml Medium hinzugegeben und der Zentrifugiervorgang ein zweites Mal durchgeführt. Danach wurde der Überstand erneut verworfen und 1 ml Medium zu dem Zellpellet gegeben. Die Reagenzgläser wurden auf Eis gelegt und nacheinander per Zellzentrifuge auf Objektträgern fixiert. Durch einen Trichter wurden ca. 100 µl der Zellsuspension aus Röhrchen, die auf Eis gelegten waren, pipettiert, sodass sich im optimalen Fall ca. 40.000 Zellen auf einem Objektträger befanden. Für fünf Minuten wurden die Zellen bei 600 rpm zentrifugiert. Die Kontrolle der Zelldichte erfolgte unter einem Mikroskop. Die Zellzahl konnte dann durch Verdünnung oder Erhöhung des pipettierten Volumens angepasst und die Auswertungsbedingungen optimiert werden. Für die Testungen wurden mindestens vier Objektträger pro Substanz angefertigt. Die beschrifteten Objektträger wurden mindestens 24 h bei -20 °C in Methanol fixiert. Nach der Fixierung wurden die Objektträger codiert und gefärbt. Dazu wurde 10 µl GelGreen (1:100 mit PBS verdünnt) auf die Zellen pipettiert und ca. acht Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde

der Überstand der Farblösung mit PBS-Puffer abgewaschen. Zum Schutz und für längere Haltbarkeit des Präparates wurden 10 µl DABCO und ein kleines Deckglas auf dem Objektträger platziert. Ausgewertet wurden die Objektträger mit dem Mikroskop Nikon Eclipse 55i bei 400-facher Vergrößerung. Bei Nutzung des Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Filters leuchteten die Zellkerne neongrün, das Zytoplasma war orange gefärbt. Pro Substanz wurden zwei Replikate vorbereitet und pro Objektträger 1000 Zellen ausgezählt. Es wurde zwischen einkernigen (EKZ), doppelkernigen (DKZ), doppelkernigen mit MK, mehrkernigen Zellen (mehr als drei Kerne), Mitosen und Apoptosen unterschieden. Im Anschluss konnte daraus der Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) berechnet werden, welcher Auskunft über die Anzahl an Zellzyklen während der Behandlung und über die Zytotoxizität gab. Der CBPI berechnete sich wie folgt:

$$\frac{\text{Anzahl EKZ} + (2x \text{ Anzahl DKZ}) + (3x \text{ Anzahl mehrkernige Zellen})}{\text{gesamte Zellzahl}}$$

Im Fall einer hohen Zytotoxizität waren im Vergleich zu den mehrkernigen Zellen übermäßig viele einzellige Zellen bei der Auswertung zu sehen. Die vollständige Inhibierung der Zellproliferation würde einem CBPI von eins entsprechen. Das würde bedeuten, dass nur EKZ im Präparat vorhanden sind (86). Damit die Werte vergleichbar waren, wurden an dieser Stelle pro Objektträger 1000 DKZ gezählt.

2.3.2 Comet Assay (Einzelzell-Gelelektrophorese)

Der Comet Assay ist eine Einzelzell-Gelelektrophorese. Es ist bekannt, dass dieser Assay verschiedene Arten von DNA-Schäden, wie zum Beispiel Einzel- und Doppelstrang-DNA-Brüche, in verschiedenen Zellarten nach Behandlung mit genotoxischen Substanzen empfindlich nachweist (87, 88). Das Ziel des Assays war es, DNA-Bruchstücke zu detektieren und zu quantifizieren. Außerdem war es möglich, Alkali-labile Stellen zu detektieren. Der Assay wurde nach Singh et al. mit Modifizierungen durchgeführt (89). Genutzt wurden 24-Well-Platten, in welche ca. 300.000 Zellen/ml Medium pro Well gesetzt wurden. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurden sie mit den PA behandelt.

2.3.2.1 Allgemeines zum Comet Assay

Wichtige Schritte beim Alkalischen Comet Assay waren die Zell-Lyse und die Alkalisierung des Elektrophoresemilieus. Die Lyse induzierte Zellmembranschädigung, damit die DNA im elektrischen Feld zum Pluspol wandern und sich gut anfärben lassen konnte. Die Technik des Comet Assays wurde 1988 von Sing et al. durch die Einführung alkalischer Bedingungen spezifiziert und erhöhte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse (89). Ein Alkalischer Comet Assay detektiert Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche, Alkali-labile Stellen und (in modifizierter Protokollform) Crosslinks (87, 90-92). Die DNA entwindet sich im alkalischen Milieu besser (93). Die Nuklei haben einen sogenannten Kometenschweif, der je nach Schädigungsgrad unterschiedlich stark ausgeprägt ist, da kleine DNA-Bruchstücke schneller zum Pluspol gelangen (**Abb. 9**). In weiteren Studien wurde herausgefunden, dass der Comet Assay ein sensibler Test ist, um den Effekt genotoxischer Substanzen in anderen humanen Leberzellen nachzuweisen (94).

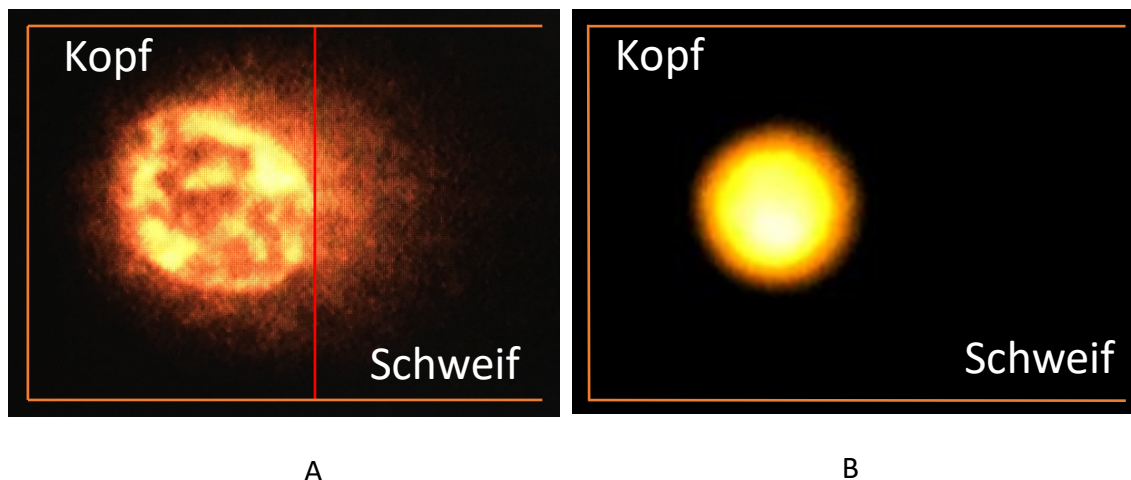


Abbildung 9: Repräsentatives Beispiel von Zellkernen der Zelllinie Huh6 und deren DNA-Schweif nach Einzelzellelektrophorese und Färbung; A: Positivkontrolle mit viel DNA im Schweif nach Behandlung mit Cyclophosphamid; B: Negativkontrolle mit wenig bzw. keiner DNA im Schweif; Fluoreszenzmikroskopische Auswertung unter 200-facher Vergrößerung.

2.3.2.2 Anfertigung der Zellpräparate für den Comet Assay

Die Objektträger (Menzel, Superfrost) wurden vor dem Versuch mit 1,5 % Agaroselösung beschichtet und getrocknet. Nach den oben genannten Vorgaben wurden die behandelten Zellen geerntet und die Zellzahl bestimmt. Eine Zellsuspension mit einer Zelldichte von ca. 1 Million Zellen pro ml wurde hergestellt. Danach wurden die Zellen in 10 ml Röhrchen auf Eis gelegt, welche in einer Styroporbox aufbewahrt wurden. Auf einer Heizplatte wurde 0,5 % Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt auf 37 °C temperiert. In vorgewärmten Mikroreagenzgefäßen wurden jeweils 180 µL Agarose pipettiert. Aus dem auf Eis gelegtem 10 ml Röhrchen wurden 20 µL der Zellsuspension in eines der erwärmten Mikroreagenzgefäße pipettiert. Nach dem Resuspendieren erfolgte die Verteilung von jeweils 45 µl auf zwei der mit Agarose beschichteten Objektträger. Um die Zellen auf den Objektträgern zu schützen, wurde ein Deckglas darauf platziert und nach dem Trocknen wieder entfernt. Dieses Verfahren wurde mit allen weiteren Testsubstanzen wiederholt. Die Objektträger wurden in vorgekühlten Küvetten in Lyselösung gelagert und für eine Stunde bei 4 °C kühlgestellt. Währenddessen wurde der Vitalitätstest wie in 2.3.2.4 beschrieben durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer auf 4 °C in Eis vortemperiert. Die Kammern wurden mit dem vorgekühlten Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die Objektträger wurden mit destilliertem Wasser abgespült, in der Kammer platziert und die Kammer mit dem Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Die DNA-Entwindung erfolgte für 40 Minuten. Für die Elektrophorese wurde für 20 Minuten eine Spannung von 25 Volt angelegt. Danach wurden die Objektträger fünf Minuten in eine Küvette mit Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)-Puffer platziert, der Puffer wurde anschließend verworfen. Anschließend wurde die Küvette zur fünfminütigen DNA-Fixierung mit eiskaltem Methanol befüllt. Nach Verwerfen des Methanols wurden die Objektträger unter einen Abzug gelegt, bis das Methanol verdampfte. Für längere Persistenz der Färbung wurde neben der GelRed-Gebrauchslösung DABCO im Verhältnis 1:3 (1GelRed: 3DABCO) verwendet. 20 µl dieses Gemischs wurden pro Objektträger genutzt und zum Schutz des Präparates mit einem Deckglas bedeckt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt und trocken in Aufbewahrungskästen.

2.3.2.3 FPG Comet Assay

Durch den FPG Comet Assay sollten Lasiocarpin und Riddelliin auf die Induktion von durch oxidativen Stress ausgelöste DNA-Strangbrüche getestet werden (95). Die in Agarose eingebetteten Nuclei der Huh6 Zellen wurden hierfür mit dem Protein FPG inkubiert. Es agiert als Endonuklease und kann mit hoher Sensitivität DNA-Bruchstücke, die durch oxidative Schäden entstehen, detektieren. Ein Beispiel für eine solche modifizierte Base ist 8-OH-Guanin (96, 97). Der entscheidende molekulare Vorgang ist die Basen-Exzisionsreparatur. Dieser Mechanismus dient der DNA-Reparatur, indem er beschädigte Basen erkennt und die geschädigten Purine aus der DNA entfernt. Bei diesem Vorgang verursacht das Enzym Strangbrüche der DNA, die wiederum im FPG Comet Assay detektiert werden können (98).

Der zusätzliche Schritt war die dreimalige Inkubation der Objektträger mit Enzympuffer für jeweils fünf Minuten. Die Hälfte der Objektträger wurde auf Eis platziert und 100 µl FPG (8 µl/ml, Stammlösung ca. 2,1 mg/ml) auf jeden Objektträger pipettiert. Zu den übrigen Objektträgern wurde 100 µl Puffer gegeben und mit einem großen Deckglas abgedeckt. Alle Objektträger wurden danach für eine Stunde in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.3.2.4 Vitalitätstest

Dieser Test ist ein Verfahren zur Eliminierung zytotoxischer Effekte, womit vor der Durchführung des Comet Assays die zelluläre enzymatische Aktivität und die Membranintegrität nach Testsubstanz-Exposition geprüft wurde. Die Ergebnisse des Comet Assays sind nur aussagekräftig, wenn die Mehrheit der substanzbehandelten Zellen vital ist. GelRed wurde genutzt, um die Membranintegrität zu überprüfen, da es nur in Zellen eindringt, deren Plasmamembran nicht intakt ist. Dort erscheint es nach DNA-Bindung in fluoreszierender roter Farbe. Fluoresceindiacetat (FDA), welches intrazellulär durch aktive Esterasen im Zytosol hydrolysiert wird, akkumuliert in der Zelle und lässt dadurch vitale Zellen grün erscheinen (99). Den Anteil an vitalen Zellen berechnete man wie folgt:

$$\text{Vitalität (\%)} = \frac{\text{Anzahl der vitalen Zellen}}{\text{gesamte Zellzahl}} \times 100 \%$$

35 μl der Zellsuspension wurden mit 15 μl Vitalitätsfärbelösung in einem Mikroreagenzgefäß resuspendiert. Pro Ansatz wurden zwei Objektträger untersucht, jeweils mit 15 μl des Zell-Farb-Gemisches. Unter dem Mikroskop wurden pro Objektträger und Konzentration 200 Zellen ausgezählt, die grün gefärbten Zellen entsprachen den vitalen und die rot gefärbten Zellen den avitalen Zellen.

2.3.2.5 Auswertung des Comet Assays

Es wurden pro Substanz zwei Objektträger à 50 Kometen ausgewertet. Hierfür wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit 200-facher Vergrößerung genutzt. Außerdem wurden sogenannte Geisterzellen („ghost-cells“) gezählt (**Abb. 10**), bei welchen sich per definitionem über 80 % der DNA im Kometen-Schweif befindet (100).

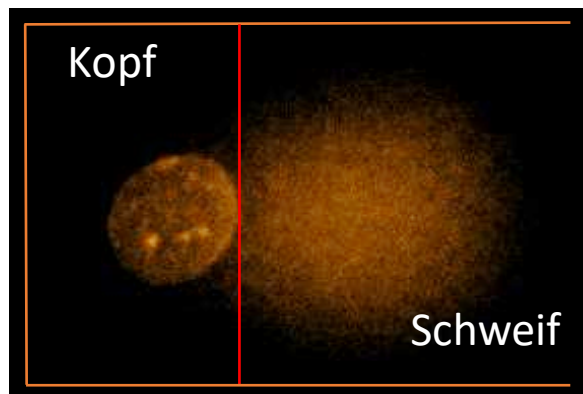


Abbildung 10: Repräsentatives Beispiel einer Geisterzelle der Zelllinie Huh6 und deren DNA-Schweif nach Einzelzellelektrophorese und Färbung; Fluoreszenzmikroskopische Auswertung unter 200-facher Vergrößerung.

2.3.3 γ -H2AX Assay

Durch diesen Genotoxizitätstest sollte herausgefunden werden, welche Relevanz Doppelstrangbrüche bei den Genomschäden haben, die durch die ausgewählten PA in Hepatozyten entstehen (17). Nach der Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen durch zelluläre Reparaturmechanismen wird das Histon H2AX phosphoryliert (γ -H2AX). Der Phosphorylierungsvorgang ist somit Teil der DNA-Reparatur (101). Bei der

Antikörperbehandlung ist die Zielstruktur des Primärantikörpers das C-terminale Ende des phosphorylierten Serin-139 des H2AX.

2.3.3.1 Durchführung der Antikörperbehandlung

Am ersten Versuchstag wurden die Zellen in 6-Well-Platten (ca. 400.000 Zellen pro Well) auf den Deckgläsern (25 mm, rund) ausgesät. Am zweiten Tag erfolgte die Behandlung der Zellen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die adhärenen Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Triton hatte den Effekt, dass die Zellmembran permeabel für die Antikörper wurde, damit diese an die DNA-Doppelstrangbrüche binden konnten. In jedes Well wurde 1 ml 0,5 % Triton X-100 Lösung gegeben. Für maximal fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Flüssigkeit in der 6-Well-Platte auf einem Schüttler vermischt. Nach dem erneuten Waschen der Zellen mit PBS (1X, 2 ml/Well) wurden die Zellen mit der 4 % Paraformaldehyd (PFA)-Lösung für 10-15 min bei RT fixiert. Es erfolgte eine erneuter Waschschrift. Als nächstes wurde 1 ml von der 0,25 % Triton X-100 Lösung in jedes Well gegeben und für zehn Minuten inkubiert. Danach wiederholte sich der PBS-Waschschrift ein drittes Mal. Anschließend wurde bei RT für 30 Minuten jeweils 1 ml Blocking Puffer zu den Zellen gegeben. Nach der halben Stunde wurde der Primärantikörper (1:1000 in Puffer verdünnt, 1 ml/Well) hinzugefügt und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit 0,1 % Triton X-100 Lösung gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper (1:2000 in Puffer verdünnt, 1 ml/Well) hinzugegeben und für eine Stunde bei RT inkubiert. Zum Schutz vor Licht wurde die Box mit Aluminiumfolie umhüllt. Nach der Antikörperinkubation wurden die Zellen noch einmal mit 2 ml 0,1 % Triton X-100 und einmal mit PBS gewaschen. Als Schutz wurden die Zellen mit VectaShield Antifade Mounting Medium (mit DAPI) bedeckt. Am nächsten Tag erfolgte die Fixierung der Zellen auf Objektträgern mittels durchsichtigen Lackes.

2.3.3.2 Auswertung der Präparate

Pro Objektträger wurden mindestens zwei Bilder mit UV- und FITC-Filter mit Hilfe eines 40x Objektivs aufgenommen. Mit Hilfe des UV-Filters wurde die DAPI-Färbung sichtbar, durch den FITC-Filter die phosphorylierten H2AX-Seiten.

2.3.3.3 Genutzte Programme

Das Literaturverzeichnis wurde mit Hilfe des Programms EndNote in der Version X9 erstellt. Die Auswertung des Comet Assays wurde mithilfe des Programms Komet 6 (BFI Optilas, ANDOR™ Technology) durchgeführt. Die quantitative Bildanalyse des γ -H2AX Assay wurde von der Software ImageJ unterstützt. Zum Zeichnen der Strukturformeln wurde ChemDraw in der Version 18.0 genutzt.

2.4 Statistische Methoden

Für die durchgeführten Tests wurden Mittelwerte und der Standardfehler (3. Wurzel der Standardabweichung) aus jeweils drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten in Microsoft Excel ermittelt. Um die Signifikanz zu analysieren, wurde die Software SPSS in der Version 27 genutzt. Zuerst wurde ermittelt, ob die Daten innerhalb einer Testart normal verteilt waren, wobei bei positiven Ergebnissen der T-Test zum Berechnen der Signifikanzen genutzt wurde. Anderenfalls wurden die Daten mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Als signifikant wurden Ergebnisse mit p-Werten $\leq 0,05$ bewertet. Ein Sternchen (*) markierte die Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle (NK). Ansonsten wurden alternative Symbole, wie zum Beispiel ein Dreieck (\blacktriangle), genutzt. Die Standardfehler wurden in allen Diagrammen dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Mikrokerntest

Alle Versuche wurden wie in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben in unserem Labor durchgeführt. Für den MK-Test wurden bei jedem Versuch als Negativkontrolle Zellen mit dem Lösungsmittel der Testsubstanzen behandelt. Die weiteren Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an Testsubstanzen behandelt.

3.1.1. Optimierung der Positivkontrollen

3.1.1.1 Veränderung der Mikrokernrate nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid

Nach der Behandlung der Zellen mit BaP (**Abb. 11**) stieg die Anzahl der doppelkernigen MK-haltigen Zellen dosisabhängig, jedoch war die Erhöhung nicht signifikant. Der CBPI bewegte sich bei der Behandlung mit BaP zwischen 1,64 (0,5 μ M) und 1,43 (2 μ M).

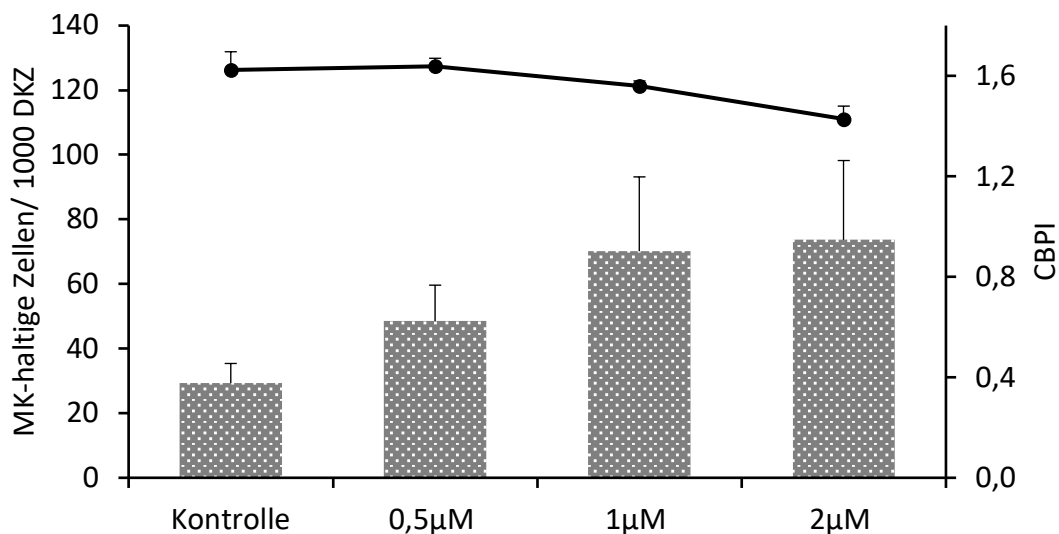


Abbildung 11: Mikrokerninduktion durch Benzo(a)pyren in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokinesis block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

Eine Erhöhung der MK-haltigen Zellen bei Erhöhung der Behandlungskonzentration wurde bei der Behandlung mit CPA (**Abb. 12**) beobachtet. Hier stieg die Anzahl

dosisabhängig bei jeder Konzentrationserhöhung. Eine signifikante Zunahme der MK-haltigen Zellen sahen wir bei den Konzentrationen 75 μM und 100 μM . Der CBPI fiel dosisabhängig von 1,72 (Kontrolle) auf 1,54 (100 μM).

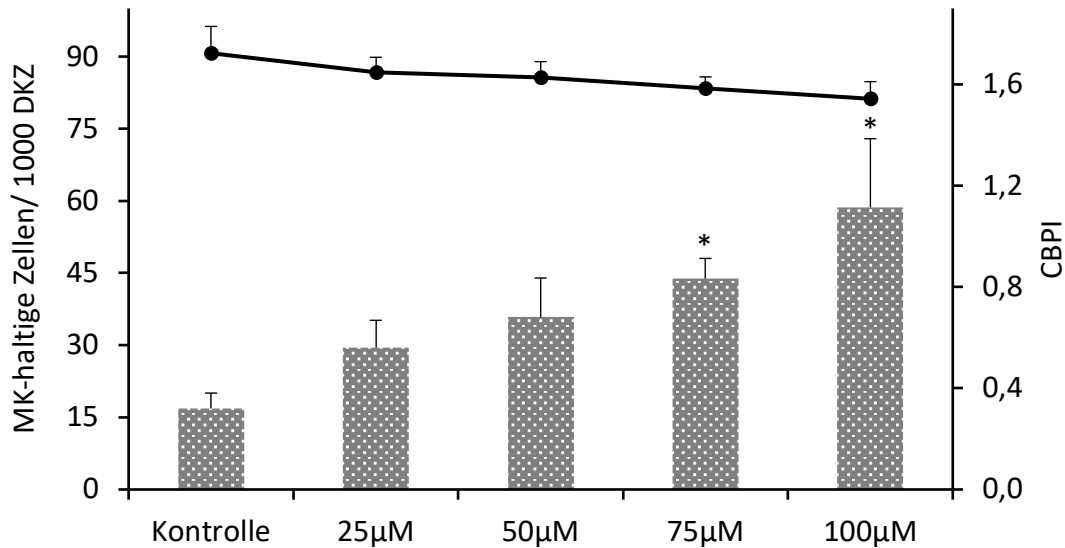


Abbildung 12: Mikrokerninduktion durch Cyclophosphamid in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, * = $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im T-Test.

3.1.1.2 Apoptosen nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid

Im Folgenden wurde die Anzahl der Apoptosen verglichen. Diese stieg in den Experimenten mit BaP (**Abb. 13**) und CPA (**Abb. 14**) dosisabhängig mit der Konzentrationserhöhung, jedoch nicht signifikant. Eine Ausnahme hiervon war die höchste Konzentration in beiden Versuchsreihen.

ERGEBNISSE

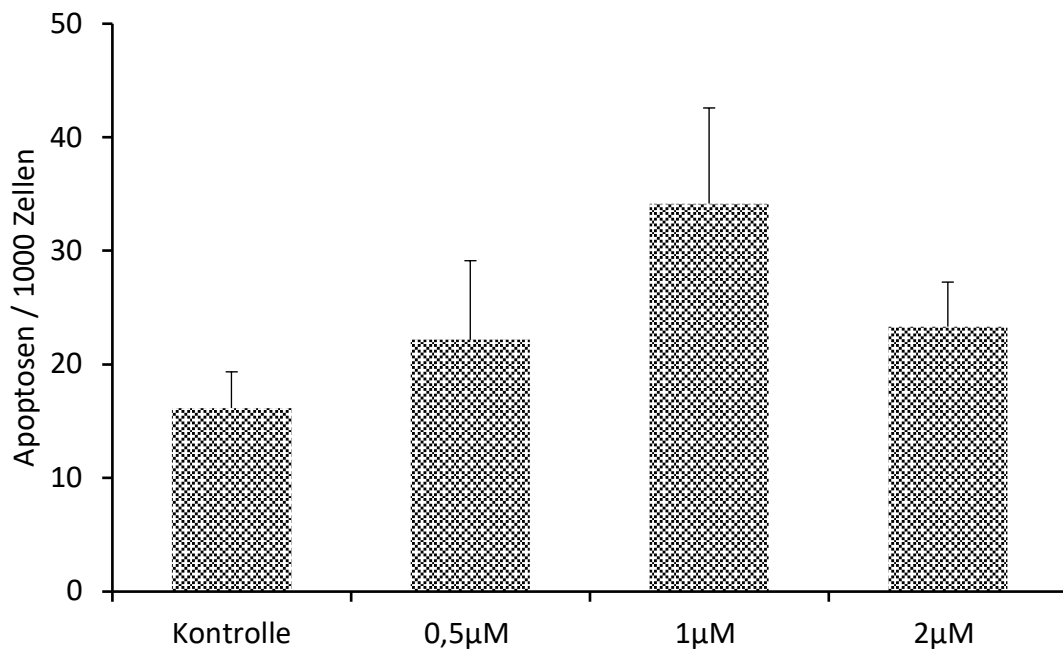


Abbildung 13: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch Benzo(a)pyren in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

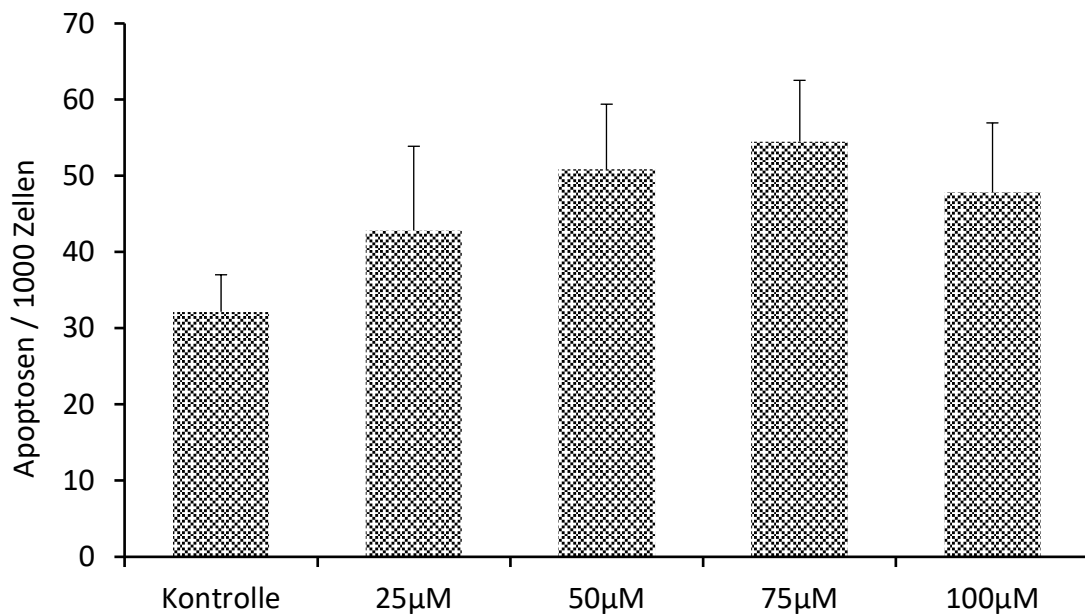


Abbildung 14: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch Cyclophosphamid in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

3.1.1.3 Mitosen nach Behandlung mit Benzo(a)pyren und Cyclophosphamid

Die Zahl der Mitosen nahm im MK-Test mit Erhöhung des zytotoxischen Effektes der Substanzbehandlung tendenziell ab. Im MK-Test mit BaP (**Abb. 15**) wurde bei jeder Konzentrationserhöhung eine Abnahme der Mitoserate im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich.

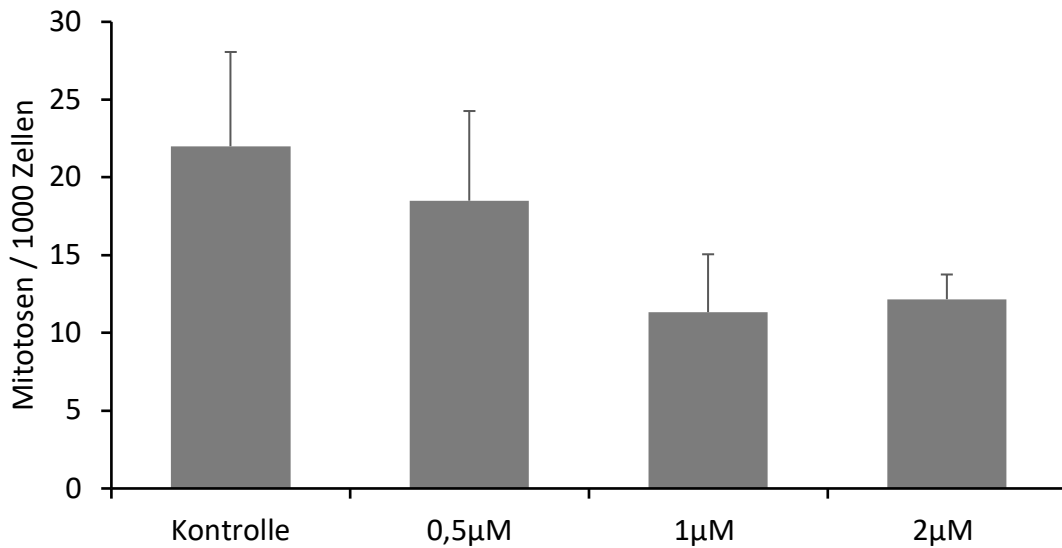


Abbildung 15: Induktion von Mitose im Mikrokerntest durch Benzo(a)pyren in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

Bei der Behandlung mit CPA (**Abb. 16**) waren alle Mitoseraten wie beim Versuch mit BaP geringer als die der Negativkontrolle, die Abnahme war nicht dosisabhängig und nicht signifikant.

ERGEBNISSE

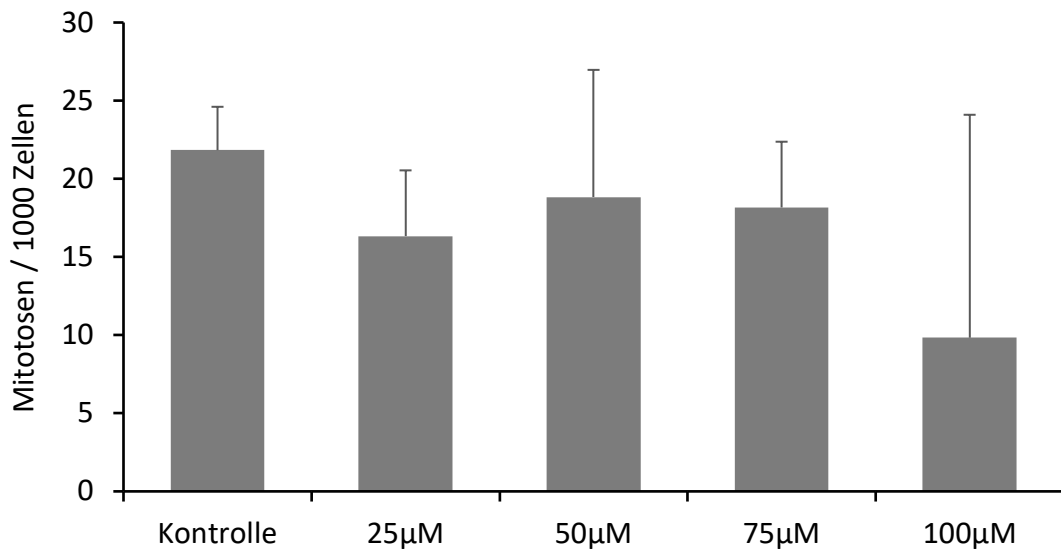


Abbildung 16: Induktion von Mitose im Mikrokernstest durch Cyclophosphamid in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

3.1.2 Veränderung der Mikrokernrate nach Behandlung mit Pyrrolizidinalkaloiden

Nach der Behandlung der Huh6 Zellen mit Riddelliin (**Abb. 17**) stieg die Zahl der MK-haltigen, doppelkernigen Zellen dosisabhängig mit Konzentrationserhöhung der Substanz. Die Konzentrationsspanne, die dafür ausgesucht wurde, bewegte sich zwischen 1 μ M und 320 μ M. Die Anzahl an MK-haltigen Zellen verdoppelte sich im Vergleich zur Kontrolle bei der Konzentration 320 μ M. Der CBPI bewegte sich zwischen 1,57 (Kontrolle) und 1,43 (320 μ M). Die Erhöhungen der Anzahl an MK-haltigen Zellen der Konzentrationen 10 μ M, 100 μ M und 320 μ M waren signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

ERGEBNISSE

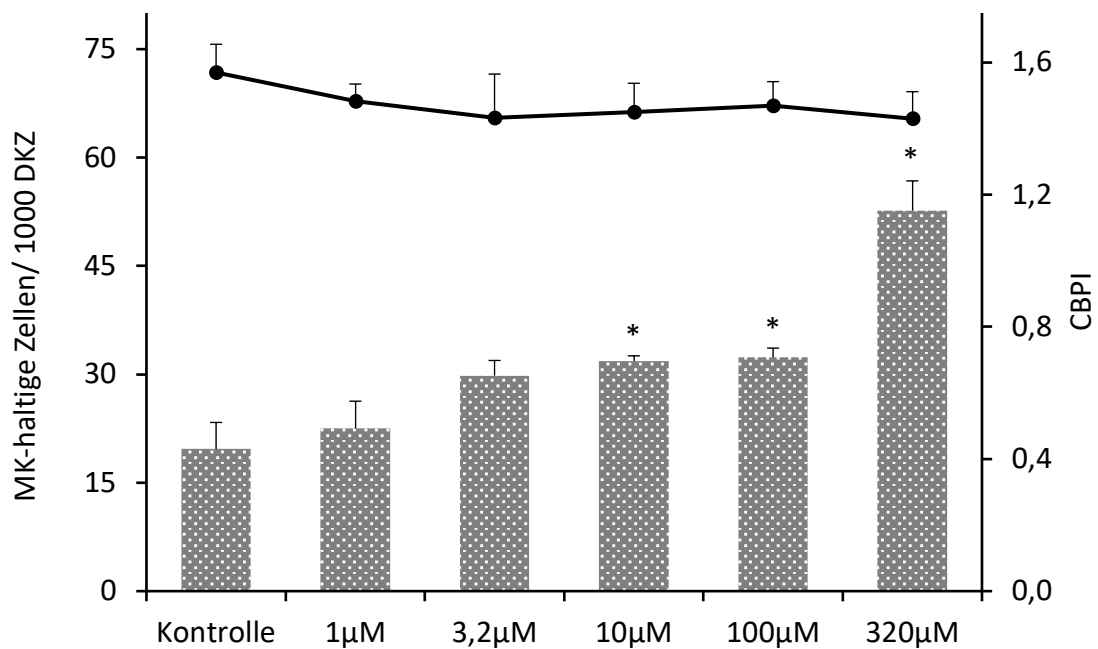


Abbildung 17: Mikrokerninduktion durch Riddelliin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokinesis block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, * = $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im T-Test.

Behandelt wurden die Zellen im nächsten Versuch in aufsteigender Konzentration mit Lasiocarpin (**Abb. 18**). Die Konzentrationsspanne lag zwischen 0,32 µM und 32 µM. Die Behandlungen mit allen Konzentrationen induzierten einen signifikanten Anstieg an MK-haltigen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Anstieg war nicht dosisabhängig. Die Anzahl an MK-haltigen Zellen verdoppelte sich im Vergleich zur Kontrolle bei der Konzentration 32 µM. Der CBPI bewegte sich zwischen 1,49 (32 µM) und 1,55 (10 µM).

ERGEBNISSE

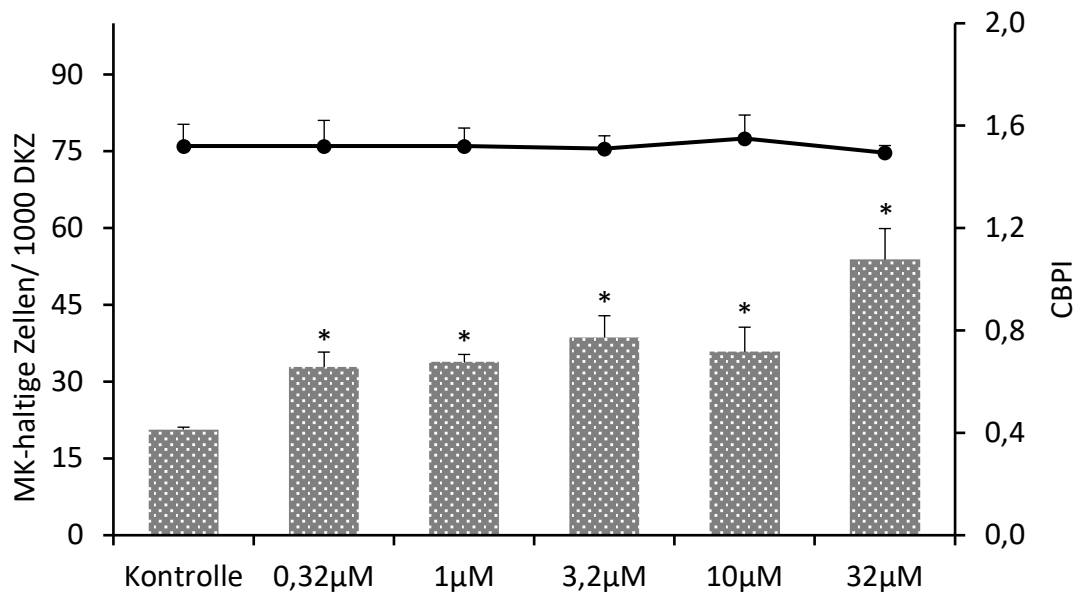


Abbildung 18: Mikrokerninduktion durch Lasiocarpin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokinesis block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, * = $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im T-Test.

Im Vergleich zu Lasiocarpin war die zehnfache Riddelliinkonzentration nötig, um eine Verdopplung der MK-haltigen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle pro 1000 Zellen zu erreichen. Somit kann rückgeschlossen werden, dass Lasiocarpin in diesem Versuch das potentere PA darstellte.

3.1.2.1 Apoptosen nach Behandlung mit Riddelliin und Lasiocarpin

Bei der Behandlung mit Riddelliin (**Abb. 19**) war keine signifikante Steigerung der Apoptosefrequenz mit Erhöhung der Konzentration ersichtlich. Nach der Behandlung der Huh6 Zellen mit Lasiocarpin (**Abb. 20**) war von den Konzentrationen 0,32 μ M bis 32 μ M ein Anstieg der Apoptosen mit der Erhöhung der Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle erkennbar, mit Ausnahme der Konzentration 1 μ M. Die Anzahl der Apoptosen stieg bei der Konzentration 10 μ M signifikant im Vergleich zur Kontrolle an.

ERGEBNISSE

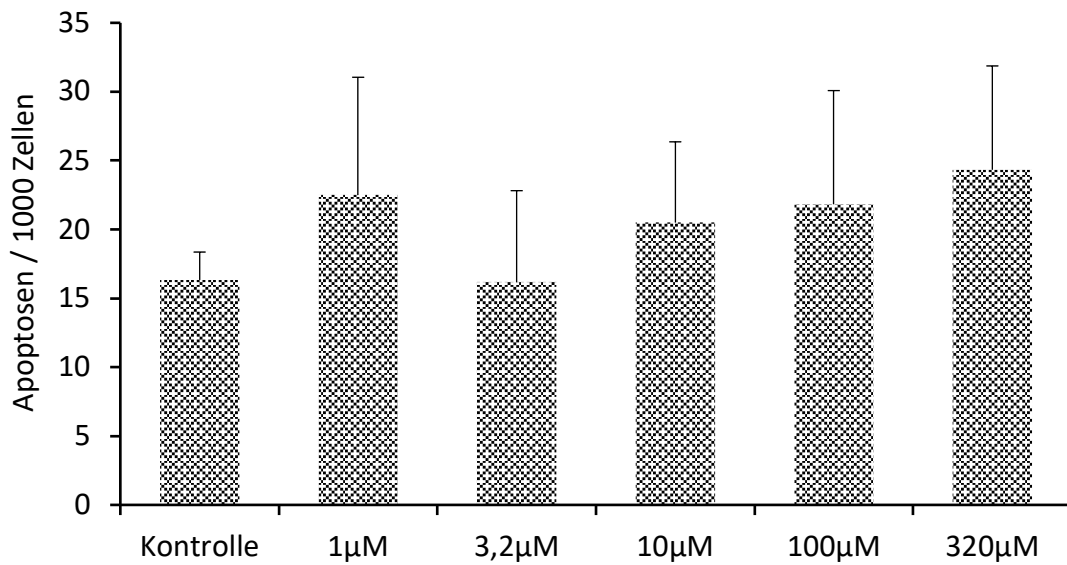


Abbildung 19: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch Riddelliin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

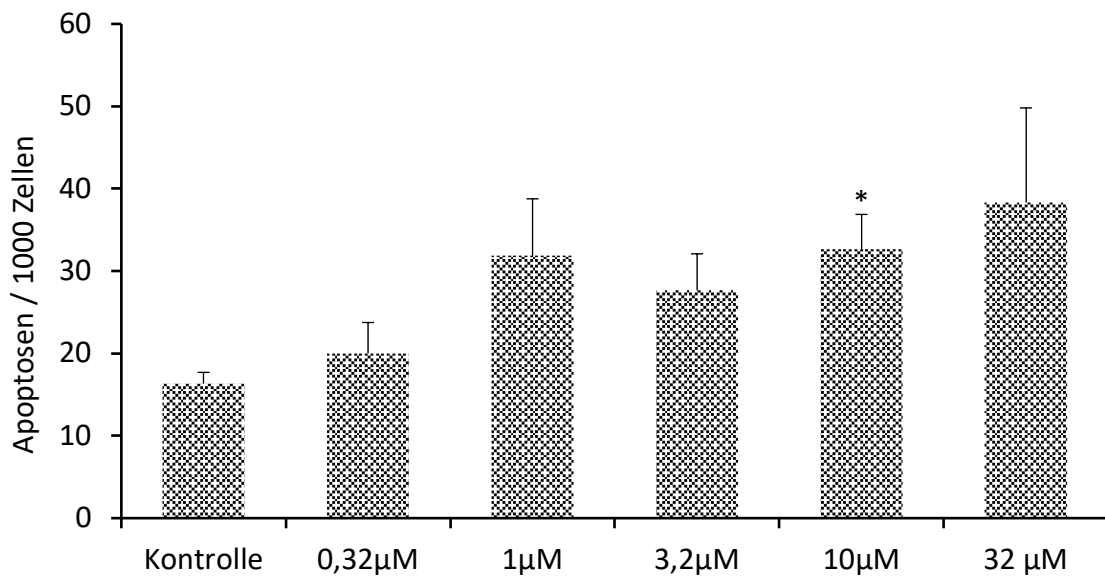


Abbildung 20: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch Lasiocarpin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, * = $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im T-Test.

3.1.2.2 Mitosen nach Behandlung mit Riddelliin und Lasiocarpin

Die Mitoserate sank nach der Behandlung der Huh6 Zellen mit Riddelliin (**Abb. 21**) im Vergleich zur Negativkontrolle bei jeder der getesteten Konzentrationen, jedoch nicht dosisabhängig. Das gleiche wurde bei den Mitoseraten nach der Behandlung mit Lasiocarpin (**Abb. 22**) beobachtet.

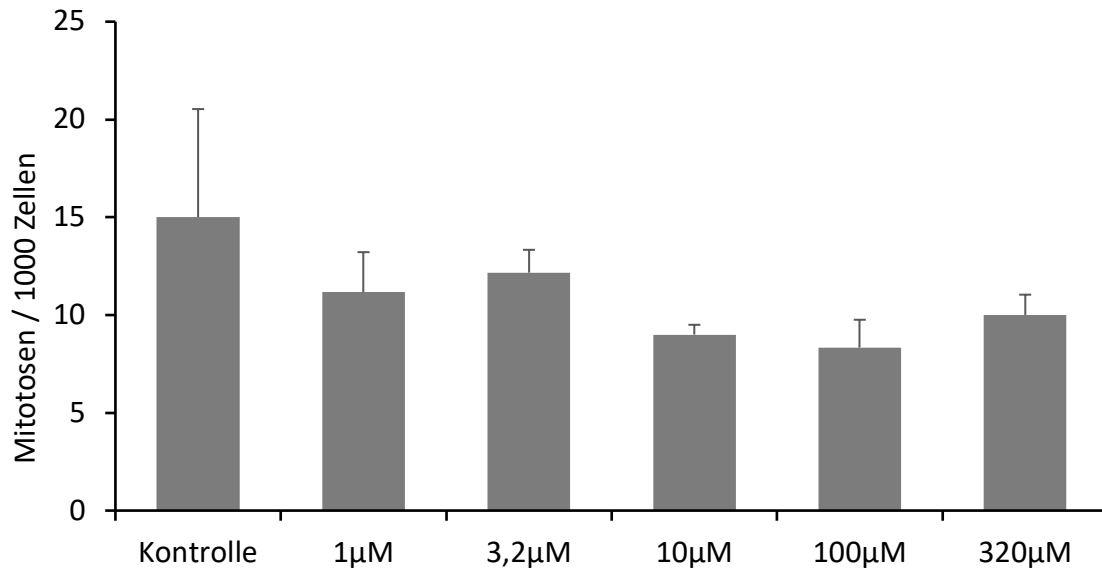


Abbildung 21: Induktion von Mitose im Mikrokerntest durch Riddelliin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

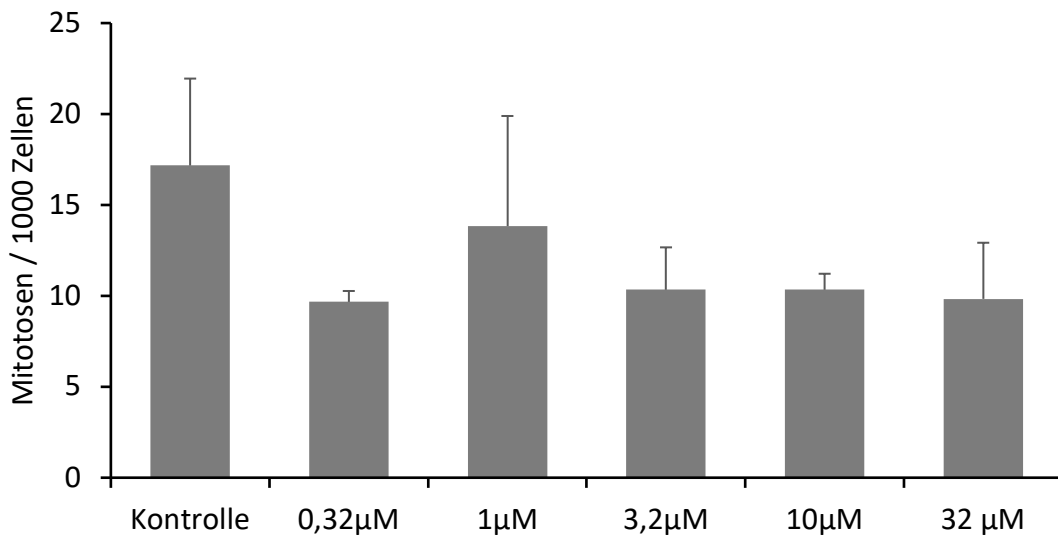


Abbildung 22: Induktion von Mitose im Mikrokerntest durch Lasiocarpin in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde, in aufsteigender Reihenfolge; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

3.1.3 Kombinationstest

Neben den Einzelsubstanztests sollten die Effekte einer Kombination der Substanzen Riddelliin und Lasiocarpin untersucht werden. Hierfür wurden verschiedene Konzentrationen der PA kombiniert und die genotoxischen Auswirkungen durch MK-Test, Comet Assay und γ -H2AX Assay überprüft.

3.1.3.1 Veränderung der Mikrokernrate im Kombinationsversuch

Für die erste Kombination wurden zwei niedrige PA-Dosen gemeinsam appliziert (**Abb. 23**). Hierfür wurde sich im MK-Test für die Konzentrationen 0,32 μ M Lasiocarpin und 10 μ M Riddelliin entschieden. Die Anzahl der MK-haltigen Zellen stieg bei dieser Kombination im Vergleich zur Einzelsubstanztestung nicht an. Der CBPI lag zwischen 1,7 (0,32 μ M) und 1,63 (Kombination aus 0,32 μ M Lasiocarpin und 10 μ M Riddelliin).

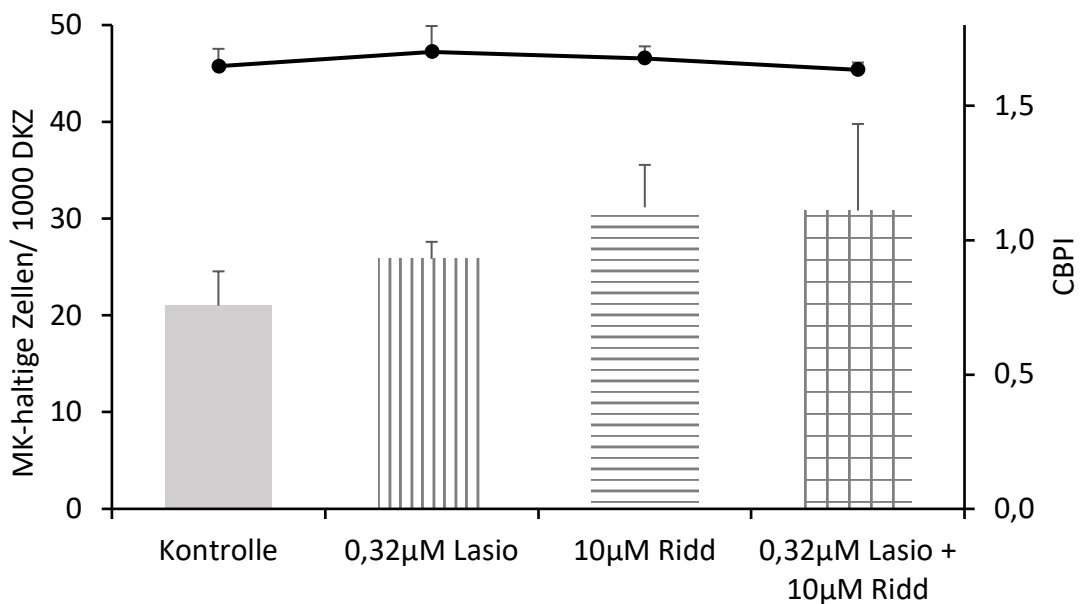


Abbildung 23: Mikrokerninduktion durch 0,32 μ M Lasiocarpin (Lasio) und 10 μ M Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

Die zweite Kombination bestand aus zwei hohen PA-Dosen (**Abb. 24**). Für diesen Versuch wurde die Konzentrationen 32 μ M Lasiocarpin und 320 μ M Riddelliin gewählt.

ERGEBNISSE

Die Behandlung mit diesen Konzentrationen zog nur in den parallel durchgeführten Einzelsubstanztests einen signifikanten Anstieg an MK-haltigen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle nach sich. Im Gegensatz dazu sank die Zahl der MK-haltigen Zellen im Ansatz mit den hohen PA-Konzentrationen im Vergleich zu den Einzelsubstanztests signifikant. Der Proliferationsindex verminderte sich nicht signifikant und bewegte sich zwischen 1,71 (320 μ M Riddelliin) und 1,61 (Kombination aus 32 μ M Lasiocarpin und 320 μ M Riddelliin).

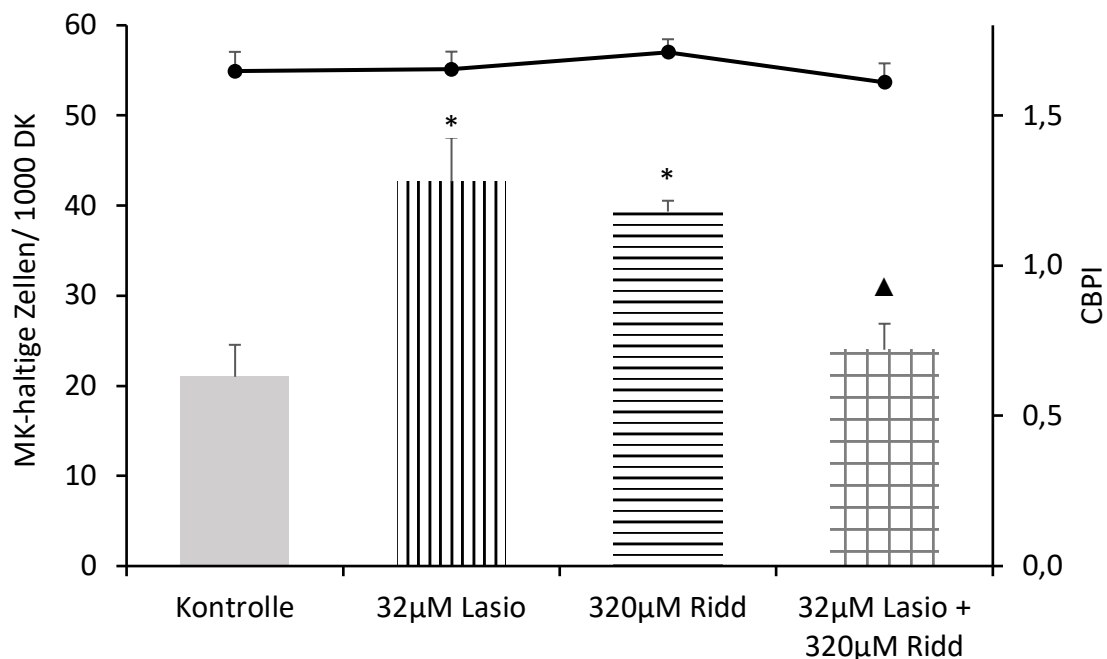


Abbildung 24: Mikrokerninduktion durch 32 μ M Lasiocarpin (Lasio) und 320 μ M Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Totale Anzahl der MK-haltigen Zellen pro 1000 doppelkernigen Zellen (DKZ); Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, * = $p \leq 0,05$ vs. Kontrolle im t-Test; ▲ = $p \leq 0,05$ vs. 32 μ M Lasiocarpin und 320 μ M Riddelliin im T-Test.

3.1.3.2 Apoptosen im Kombinationsversuch

Die Zahl der Apoptosen erhöhte sich während des Kombinationsversuches bei den einzelnen niedrigen Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle (**Abb. 25**). In Kombination der beiden Konzentrationen sank die Apoptosezahl im Vergleich zu den Einzelkonzentrationstests wieder. Beim Kombinieren der hohen Konzentrationen Lasiocarpin und Riddelliin (**Abb. 26**) erhöhte sich die Zahl der Apoptosen des

ERGEBNISSE

Kombinationsansatzes im Vergleich zu den Einzelsubstanztests und zur Negativkontrolle. Diese Veränderungen waren jedoch nicht signifikant.

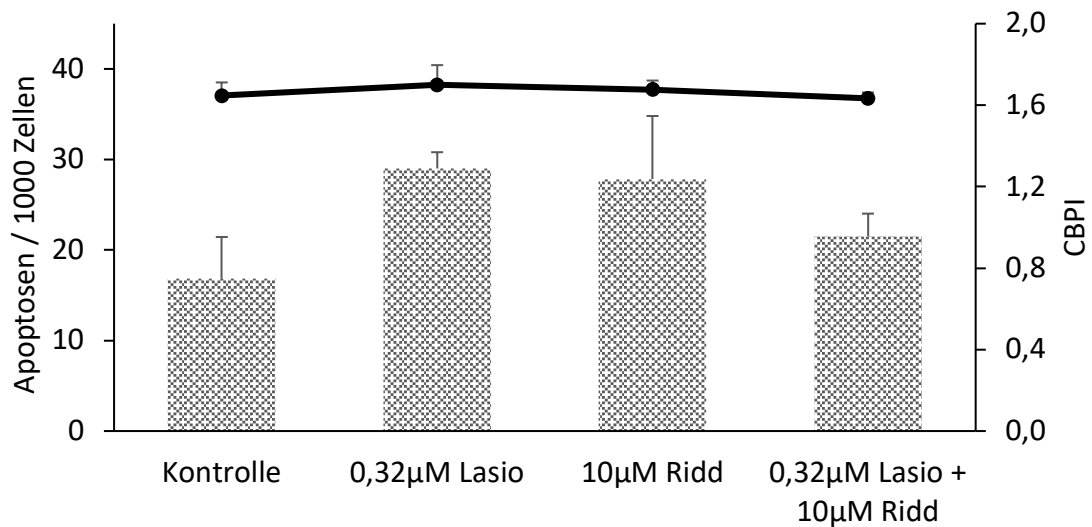


Abbildung 25: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio) und 10 µM Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

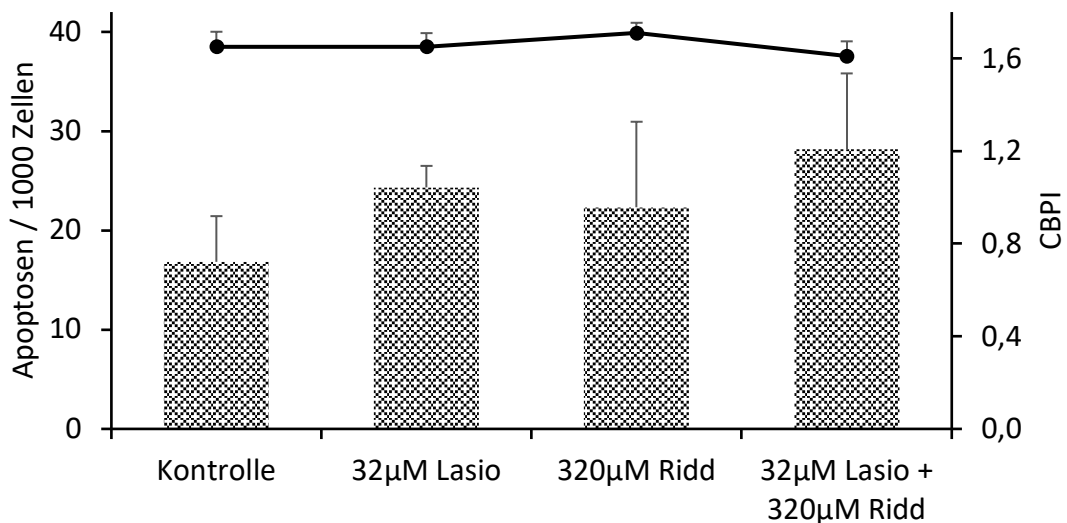


Abbildung 26: Induktion von Apoptose im Mikrokerntest durch 32 µM Lasiocarpin (Lasio) und 320 µM Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Apoptosen pro 1000 Zellen; Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

3.1.3.3 Mitosen im Kombinationsversuch

Die Anzahl der Mitosen erhöhte sich während des Kombinationsversuches bei den einzelnen niedrigen Konzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle im MK-Test jedoch nicht signifikant (**Abb. 27**). In Kombination der beiden Konzentrationen sank die Mitosezahl verglichen mit den Einzelkonzentrationstests wieder.

Im Vergleich zu der Negativkontrolle sank im Kombinationsversuch die Mitosezahl der beiden hoch konzentrierten PA in der Einzelsubstanztestung nicht (**Abb. 28**). Diese Veränderungen erwiesen sich als nicht signifikant.

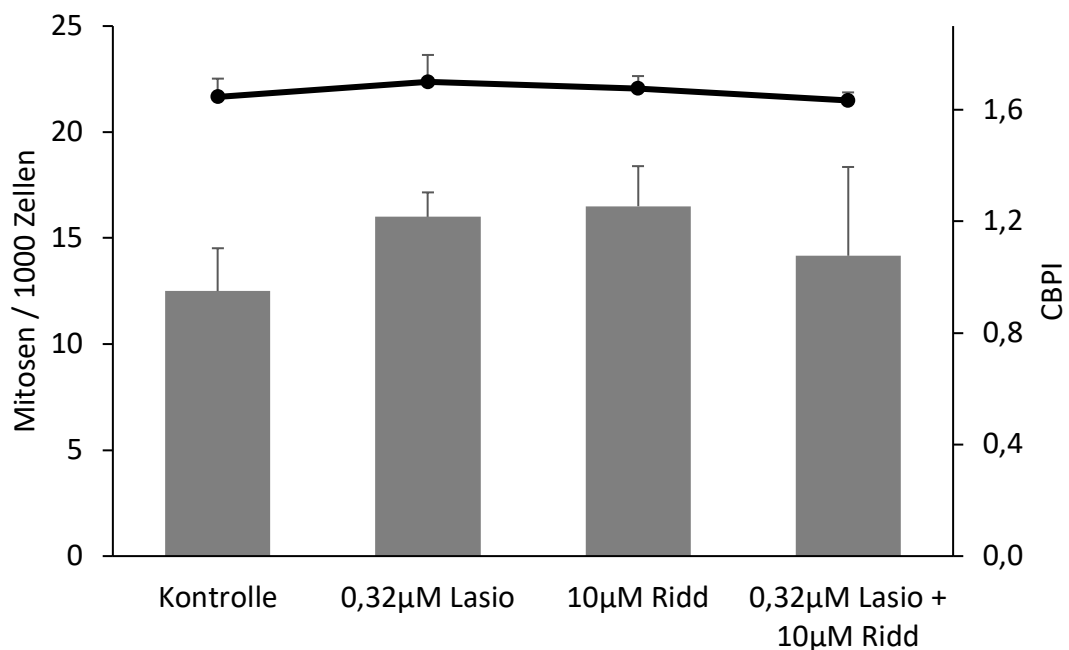


Abbildung 27: Induktion von Mitose im Mikrokerntest durch 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio) und 10 µM Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; Cytokines block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

ERGEBNISSE

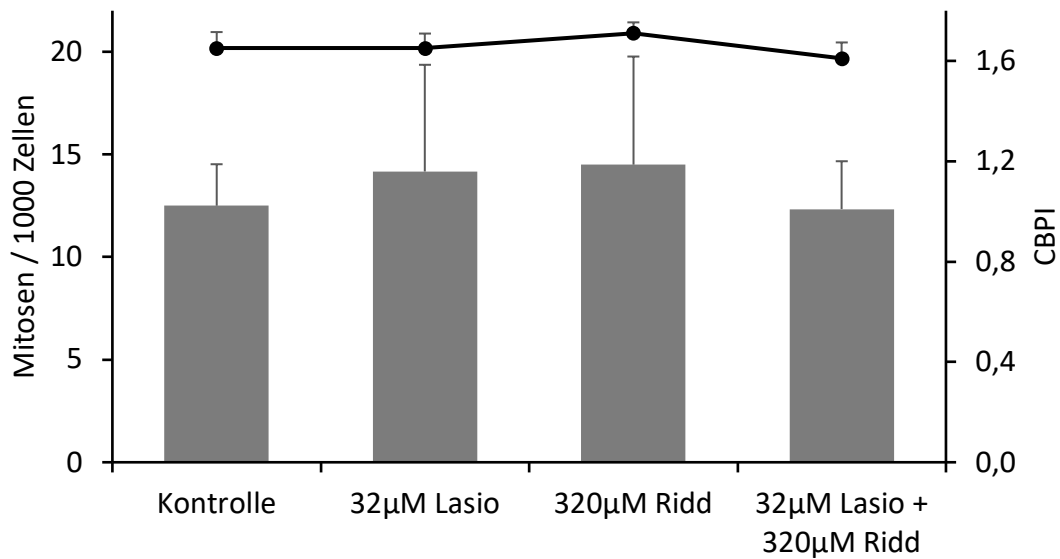


Abbildung 28: Induktion von Mitose im Mikrokerntest durch 32 µM Lasiocarpin (Lasio) und 320 µM Riddelliin (Ridd) in Huh6 Leberzellen; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Mitosen pro 1000 Zellen; Cytokinesis block proliferation index bzw. Zytokinese-Block-Proliferationsindex (CBPI) durch schwarzen Graphen dargestellt; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert.

3.2 Comet-Assay

3.2.1 Vitalitätstest

Im folgenden Abschnitt (**Tab. 6**) werden die Ergebnisse des Vitalitätstests des Comet Assays und des FPG Comet Assays aufgelistet:

Tabelle 6: Mittelwerte der Prozentwerte vitaler Zellen im Vitalitätstest (n=3) ± Standardfehler in Prozent; Ridd: Riddelliin, Lasio: Lasiocarpin, CPA: Cyclophosphamid.

Substanzen	Mittelwert vitaler Zellen (%)	Standardfehler
Kontrolle	84,5	± 3,82
Lasio 0,32 µM	89,0	± 3,59
Lasio 32 µM	92,7	± 1,62
Ridd 100 µM	88,7	± 3,19
Ridd 320 µM	89,9	± 1,99
Lasio 0,32 µM + Ridd 100 µM	93,1	± 1,96
Lasio 32 µM + Ridd 320 µM	89,4	± 0,46
CPA 100 µM	96,2	± 0,30

Im Vitalitätstests zeigte sich kein signifikanter Abfall an lebendigen Zellen mit Erhöhung der Konzentrationen der PA. Die durchschnittliche Anzahl der lebendigen Zellen war stets über 79%. Sie bewegte sich im Durchschnitt zwischen 84,5 (Negativkontrolle) und 96,2 (100 μM CPA).

3.2.2 Alkalischer Comet Assay

Beim Comet Assay wurde sich für 100 μM CPA als Positivkontrolle entschieden. Im Durchschnitt wurde ein dosisabhängiger Anstieg des Anteils an DNA im Kometenschweif mit Erhöhung der Substanzdosis entdeckt. Für den Kombinationsversuch wurde für die erste Kombination die Konzentrationen 0,32 μM Lasiocarpin und 100 μM Riddelliin (**Abb. 29**) genutzt. Für die zweite Kombination wurden die Konzentrationen 32 μM Lasiocarpin und 320 μM Riddelliin (**Abb. 30**) genutzt.

Beim Kombinieren der beiden niedrigen Konzentrationen der PA stieg der Anteil an DNA im Schweif tendenziell, was für eine Erhöhung des DNA-Schadens spricht. Den größten Anteil an DNA im Schweif erreichte die Kombination der beiden niedrigen PA-Dosen. Bei der Testung von 100 μM Riddelliin wurde ein ähnlicher prozentualer Anteil an DNA im Schweif wie bei der Positivkontrolle erreicht. Die Einzelsubstanz Lasiocarpin 0,32 μM konnte im Vergleich zur Negativkontrolle keine Steigerung des DNA-Anteils im Schweif bewirken.

Im zweiten Kombinationsansatz mit den höher konzentrierten PA erhöhte sich der prozentuale Anteil an DNA im Schweif nur gering im Vergleich zu den Einzelsubstanztests. Alle getesteten Substanzen inklusive der Positivkontrolle und der Kombination hatten einen höheren Anteil an DNA im Schweif als die Negativkontrolle. Ein deutlicher Abfall des detektierten Schadens beim Kombinieren der PA, wie er im MK-Kombinationstest zu sehen war, blieb hier aus. Die Varianzen waren hoch, die Ergebnisse waren nicht signifikant.

ERGEBNISSE

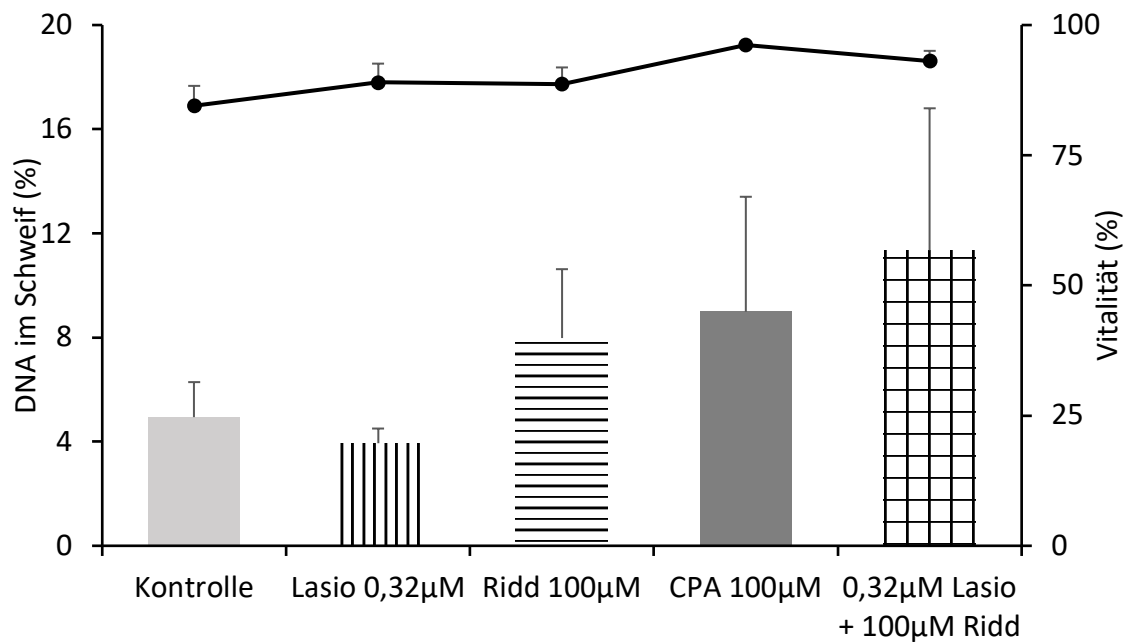


Abbildung 29: Darstellung der prozentualen Menge an DNA im Schweif nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio), 100 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Prozentualer Anteil an DNA im Schweif; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop; Vitalität durch schwarzen Graphen dargestellt.

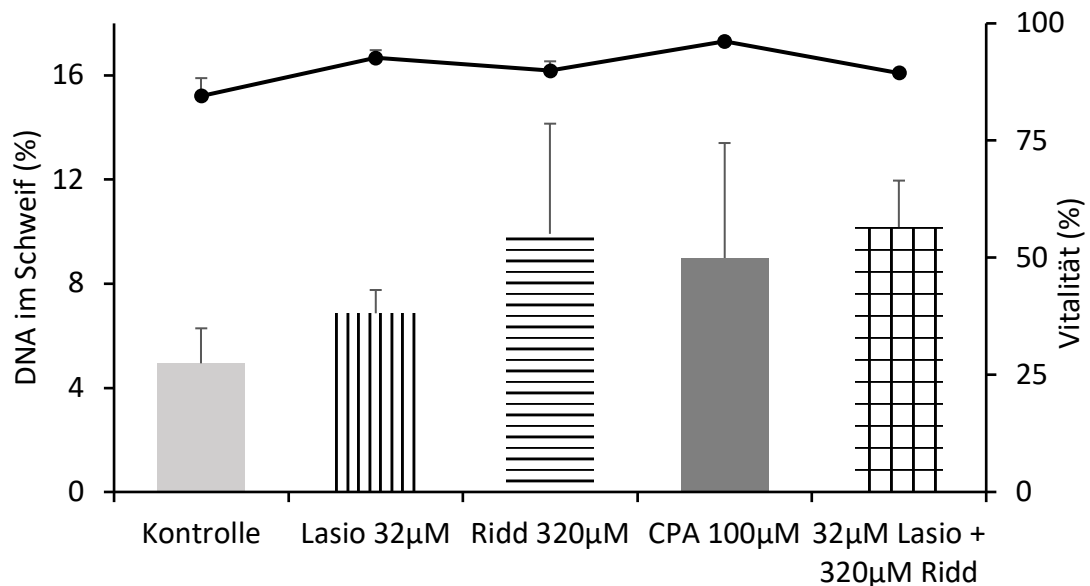


Abbildung 30: Darstellung der prozentualen Menge an DNA im Schweif nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 32 µM Lasiocarpin (Lasio), 320 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Prozentualer Anteil an DNA im Schweif; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop; Vitalität durch schwarzen Graphen dargestellt.

ERGEBNISSE

Im Comet Assay wurden während der Auswertung sogenannte Geisterzellen gezählt, bei denen der Großteil der DNA im Schweif verteilt ist. Die Veränderung der Geisterzellenanzahl ist nicht konzentrationsabhängig gestiegen. Die Zahl der Geisterzellen wurde durch die Behandlung nicht signifikant beeinflusst (**Abb. 31 und 32**).

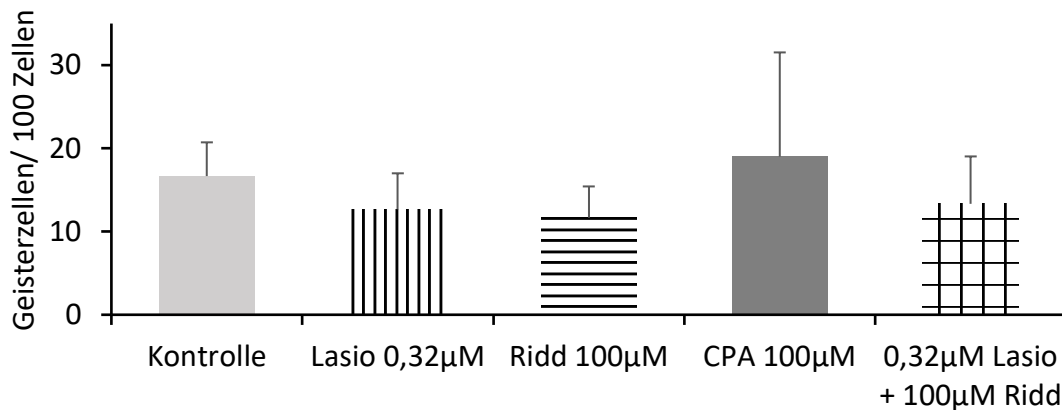


Abbildung 31: Induktion von Geisterzellen im Comet Assay nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio), 100 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM CPA (Cyclophosphamid, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Anzahl an Geisterzellen pro 100 Zellen; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

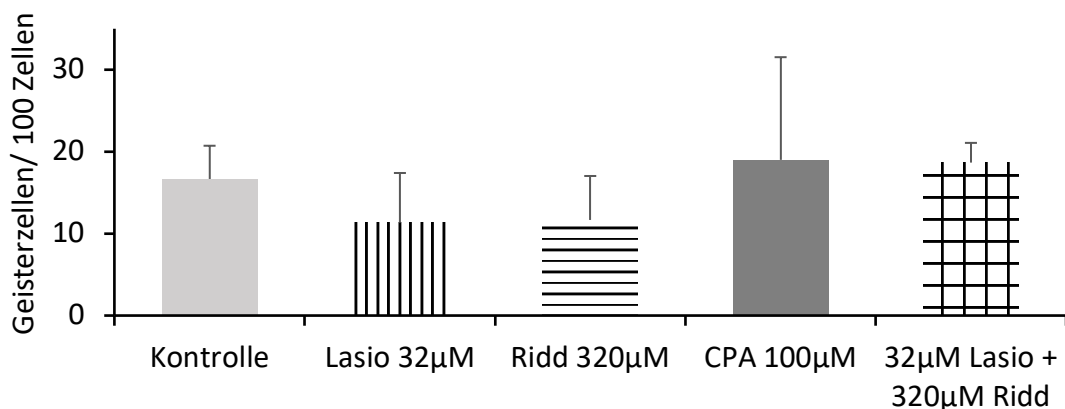


Abbildung 32: Induktion von Geisterzellen im Comet Assay nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 32 µM Lasiocarpin (Lasio), 320 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM CPA (Cyclophosphamid, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Anzahl an Geisterzellen pro 100 Zellen; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.3 FPG Comet Assay

Das Ziel dieses Versuches war es zu detektieren, wie sich der prozentuale Anteil an durch oxidativen Stress induzierten DNA-Schaden nach FPG Behandlung im Vergleich zur

ERGEBNISSE

Pufferbehandlung verändert, indem Zellen parallel mit Puffer und FPG behandelt wurden. Nach der Einzelzelelektrophorese entdeckten wir in der Auswertung (**Abb. 33**), dass der Anteil an DNA im Kometen-Schweif auch bei der Kontrolle der Pufferbehandlung hoch war. Das Gleiche galt für die FPG-Behandlung innerhalb der Testreihe mit den niedrigen Konzentrationen. Bei der Analyse der Unterschiede der Werte war die Differenz der mit CPA behandelten Zellen am größten. Außer bei der Kombination von 0,32 μM Lasiocarpin und 100 μM Riddelliin (Säule mit Muster markiert) überstiegen alle Proben der mit Enzym behandelten Zellen den Wert des DNA-Schadens der mit Puffer behandelten Zellen (**Abb. 34**).

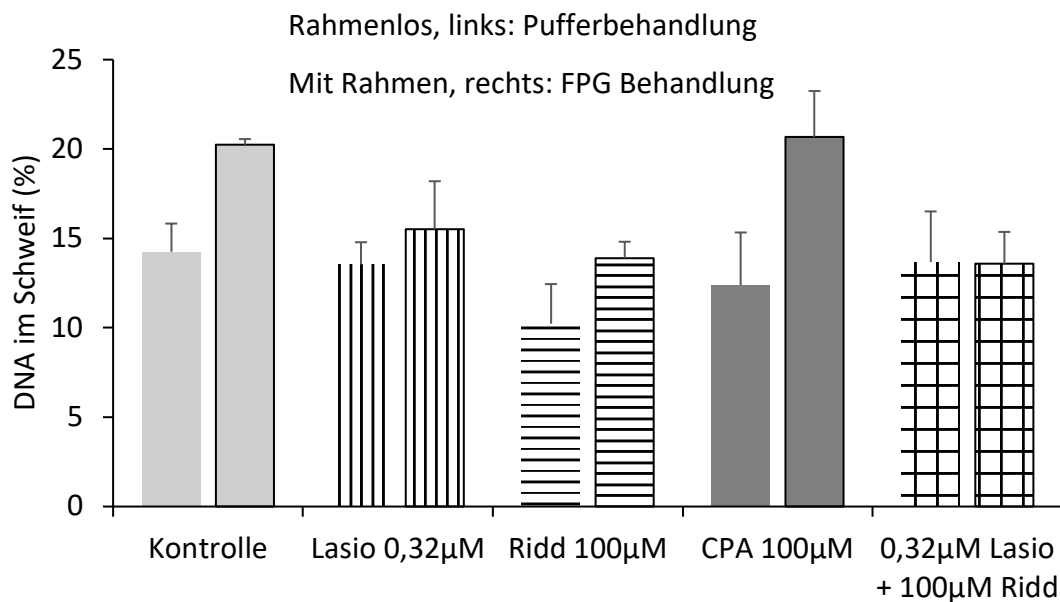


Abbildung 33: Darstellung der prozentualen Menge an DNA im Schweif nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 0,32 μM Lasiocarpin (Lasio), 100 μM Riddelliin (Ridd) und 100 μM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle) im Vergleich zwischen Puffer- (rahmenlos, jeweils links) und FPG-Behandlung (mit Rahmen, jeweils rechts); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Prozentualer Anteil an DNA im Schweif; n=3, Mittelwert \pm Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

ERGEBNISSE

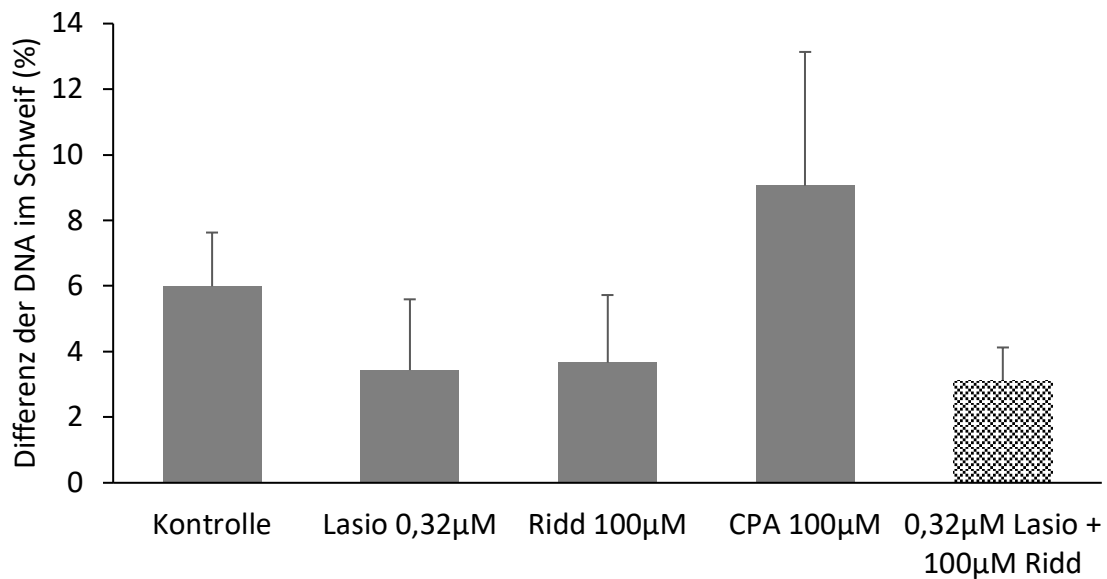


Abbildung 34: Darstellung der Differenz der DNA im Schweif nach Behandlung mit 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio), 100 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle) im Vergleich zwischen Puffer- und FPG-Behandlung; einfarbige Balken: DNA-Schaden-Differenz zugunsten der mit FPG-behandelten Zellen; gemusterter Balken: DNA-Schaden-Differenz zugunsten der Pufferbehandlung; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Differenz der DNA im Schweif in Prozent; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert; Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

Bei der Untersuchung der höher konzentrierten PA überschritt der prozentuale DNA-Anteil im Schweif zwar bei allen PA-Puffertests den Wert der Negativkontrolle, aber nur minimal und nicht signifikant. (**Abb. 35**). Im Vergleich zur FPG- Negativkontrolle stieg der Anteil an DNA im Schweif nur bei der Kombination aus 32 µM Lasiocarpin und 320 µM Riddelliin. Der Anteil an DNA im Schweif überstieg, außer beim Einzelsubstanztest mit 32 µM Lasiocarpin (Säule mit Muster markiert), beim FPG-Ansatz die des Puffer-Ansatzes (**Abb. 36**). Der größte Differenzwert zugunsten der mit Enzym behandelten Zellen konnte bei der Positivkontrolle mit CPA detektiert werden. Es wurde in diesem Versuch eine Tendenz entdeckt, dass die Enzymbehandlung potenziell zu höheren Basalwerten führt als der Puffer. Die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant. Durch die zum Teil hohen Standardfehler wurden keine signifikanten Differenzen zwischen den Versuchsansätzen sichtbar.

ERGEBNISSE

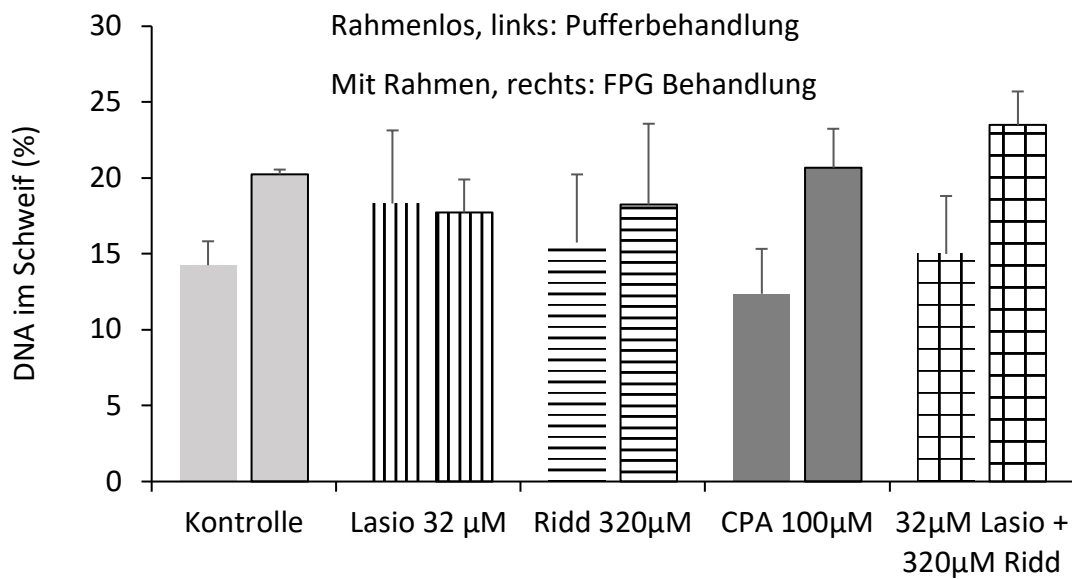


Abbildung 35: Darstellung der prozentualen Menge an DNA im Schweiß nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 32 µM Lasiocarpin (Lasio), 320 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle) im Vergleich zwischen Puffer- (rahmenlos, jeweils links) und FPG-Behandlung (mit Rahmen, jeweils rechts); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Prozentualer Anteil an DNA im Schweiß; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

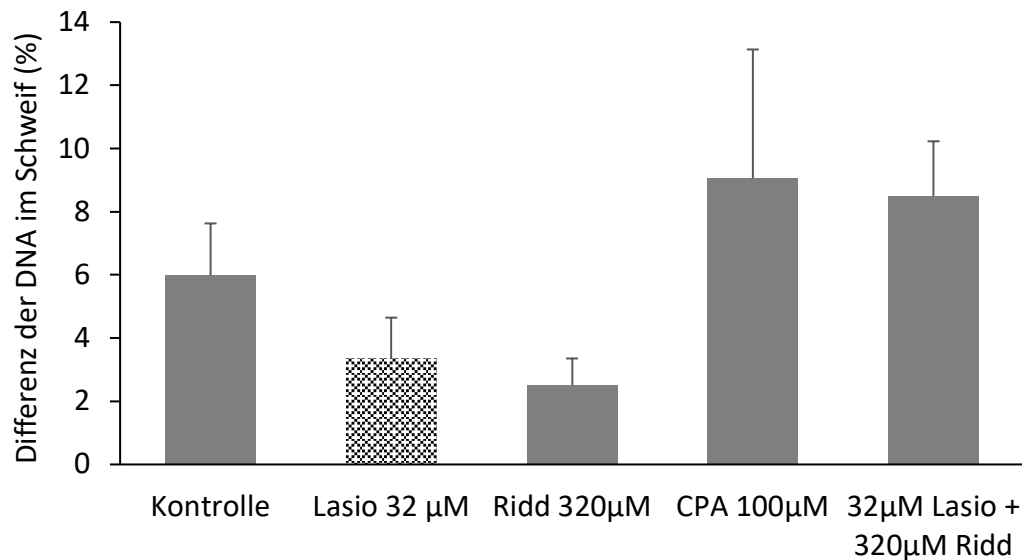


Abbildung 36: Darstellung der Differenz der DNA im Schweiß nach Behandlung mit 32 µM Lasiocarpin (Lasio), 320 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle) im Vergleich zwischen Puffer- und FPG-Behandlung; einfarbige Balken: DNA-Schaden-Differenz zugunsten der mit FPG-behandelten Zellen; gemusterte Balken: DNA-Schaden-Differenz zugunsten der Pufferbehandlung; x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: Differenz der DNA im Schweiß in Prozent; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. Auswertung der Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop.

3.3 Veränderung der Immunfluoreszenz im γ -H2AX Assay

Der Grad an Fluoreszenz veränderte sich nach der Behandlung der Zellen mit 32 μ M Lasiocarpin (34,2) im Gegensatz zur Negativkontrolle mit 2 % DMSO (23,5) nicht signifikant (**Abb. 37**).

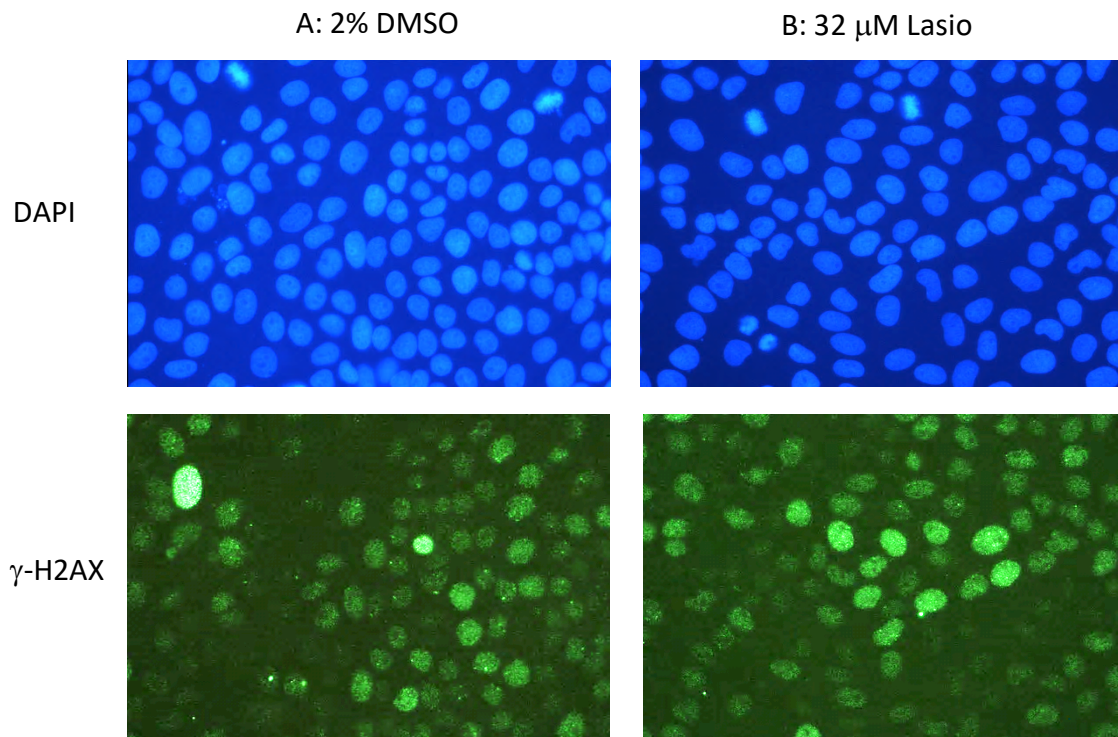


Abbildung 37: Immunfluoreszenzfärbung des phosphorylierten Histons H2AX zur Detektion von PA-induzierten Doppelstrangbrüchen der DNA in Huh6 Zellen; Repräsentative Bilder der γ -H2AX-Färbung nach Inkubation der Zellen mit der Negativkontrolle 2% Dimethylsulfoxid (DMSO, A) und der Positivkontrolle 32 μ M Lasiocarpin (Lasio, B).

Beim Einzelsubstanztest mit 10 μ M Riddelliin wurde das Niveau der Positivkontrolle erreicht. Die Fluoreszenzwerte der Testreihe der niedrigen PA-Konzentrationen überstiegen den Wert der durchschnittlichen Fluoreszenz der Negativkontrolle (**Abb. 38**). In dem zweiten Kombinationsversuch wurden hohe Konzentrationen Lasiocarpin und Riddelliin appliziert (**Abb. 39**). Auch hier stieg die Fluoreszenz in den Einzelsubstanztests gegenüber der Negativkontrolle (2% DMSO) an, jedoch nicht signifikant. Im Kombinationstest der beiden hoch konzentrierten Substanzen sank der Fluoreszenzwert im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Tendenz, dass sich die DNA-Schädigung im Kombinationsversuch mit den niedrigen Substanzkonzentrationen

ERGEBNISSE

potenziert, wurde hier nicht bestätigt. Bei den Huh6 Zellen konnte keine signifikante Erhöhung der durchschnittlichen Fluoreszenz nach Behandlung mit Lasiocarpin und Riddelliin beobachtet werden.

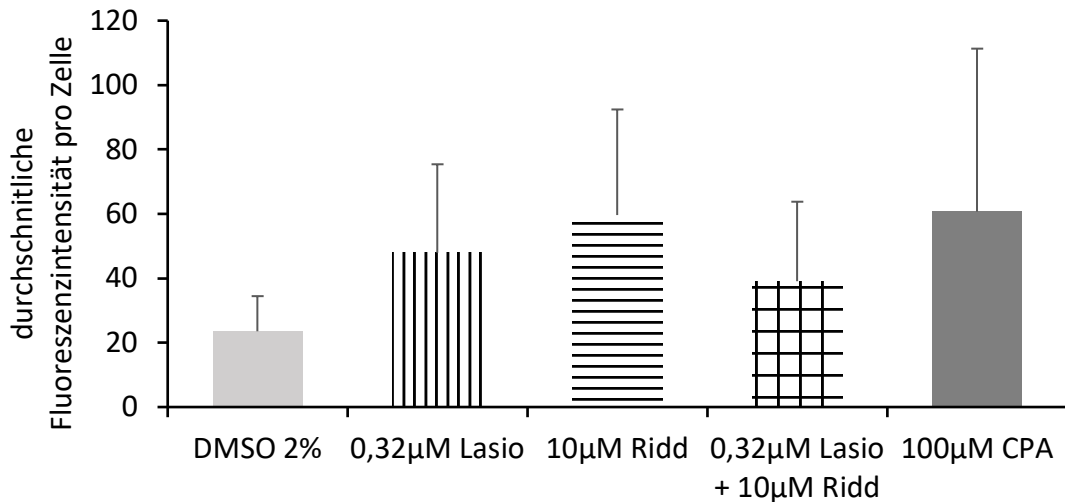


Abbildung 38: Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 0,32 µM Lasiocarpin (Lasio), 10 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Zelle; Anzahl der Fotos pro Objektträger: 2-7; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. DMSO: Dimethylsulfoxid (Negativkontrolle).

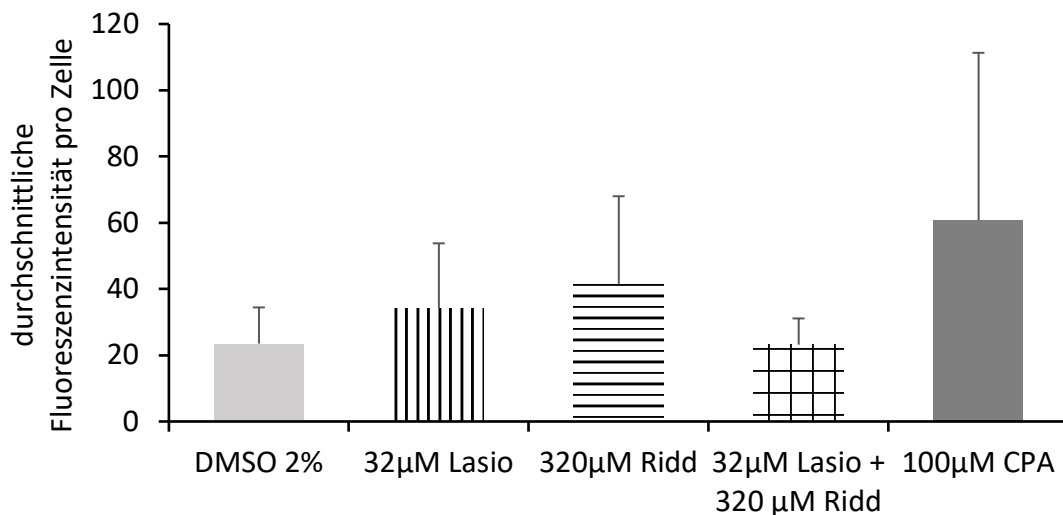


Abbildung 39: Darstellung der durchschnittlichen Fluoreszenzintensität nach Behandlung der Huh6 Zellen mit 32 µM Lasiocarpin (Lasio), 320 µM Riddelliin (Ridd) und 100 µM Cyclophosphamid (CPA, Positivkontrolle); x-Achse: Konzentrationen der Substanz, mit der behandelt wurde; y-Achse: durchschnittliche Fluoreszenzintensität pro Zelle; Anzahl der Fotos pro Objektträger: 2-7; n=3, Mittelwert ± Standardfehler, es wurde keine statistische Signifikanz detektiert. DMSO: Dimethylsulfoxid (Negativkontrolle).

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Das Ziel der Studie war es herauszufinden, welche genotoxischen Wirkungen Lasiocarpin und Riddelliin *in vitro* auf Huh6 Zellen haben. Des Weiteren wurde ein Fokus auf Kombinationstests der unterschiedlichen Grundstrukturtypen gesetzt, welche in verschieden hohen Konzentrationen miteinander kombiniert wurden, um neue Forschungsergebnisse bezüglich der Potenz von PA zu generieren.

Ein generelles Problem von Genotoxizitätsstudien sind die zur Verfügung stehenden Zelllinien, da deren Enzyme die Metabolisierung der zu testenden Substanzen oft nicht der Realität entsprechend darstellen können. Für die vorliegende Studie wurde sich dagegen entschieden, standardmäßig in Genotoxizitätstests eingesetzte Zelllinien wie HepaRG oder HepG2 zu nutzen.

HepaRG ist eine für *in vitro* Versuche häufig genutzte humane Hepatom-Zelllinie (102). Sie wurde in Publikationen, unter anderem wegen der Expression von Phase I- und II-Enzymen, als überdurchschnittlich metabolisch aktiv beschrieben (103, 104). Jedoch können die eingeschränkte Verfügbarkeit und die hohen Kosten limitierende Faktoren für die Nutzung sein. HepG2 ist ebenfalls eine humane Leberkarzinomzelllinie, welche ohne das externe Zufügen von Enzymen Prokarzinogene detektieren kann. Knasmüller et al. (105) berichten über starke Sensitivitätsschwankungen bei der vergleichenden Auswertung von Untersuchungsergebnissen verschiedener Labore. Eventuell kann der Grund dafür eine Inkonstanz der Enzym-Transkription sein (106). Für *in vitro* Untersuchungen sind primäre humane Hepatozyten das dem humanen Leberstoffwechsel ähnlichste Model, jedoch sind die Variabilität der Spender, die eingeschränkte Verfügbarkeit und die begrenzte Lebensdauer Nachteile des Arbeitens mit diesen Zellen (103).

Aus diesen Gründen, und um das bereits vorhandene Wissen über die Wirkungen von PA zu erweitern, wurde sich in dieser Studie für die humane Leberkarzinomzelllinie Huh6 entschieden. Die Zelllinie stammt von einem japanischen Jungen mit Hepatoblastom

(107). Sie erwies sich schon in mehreren Studien als geeignet für Genotoxizitätstestungen. Laut Waldherr et al. (73) ist die Huh6 Linie eine im Vergleich sehr vielversprechende. Sie wird als genauso oder teilweise noch sensibler als die gängigen Zelllinien in Bezug auf Genotoxizitätstests befunden. HepaRG Zellen konnten beispielsweise ROS-induzierte DNA-Schäden weniger effizient detektieren.

Der MK-Test ist eine schon über 40 Jahre genutzte und etablierte Methode für Genotoxizitätstestungen (108). Die vorliegenden Ergebnisse des MK-Tests stimmen überwiegend mit denen vergleichbarer Studien überein. Eine alternative Untersuchungsmethode ist die Durchfluss-Zytometrie. Die Testmethode hat den Nachteil, dass kein Cyto-B genutzt wird. Das erschwert bei den Messungen die Unterscheidung von MK und avitalen Zellteilen. Deshalb muss diese Methode für jede Zelllinie gut optimiert werden, um die korrekte Mikrokernfrequenz ermitteln zu können. Ein Vorteil der Durchfluss-Zytometrie ist, dass in einer kurzen Zeitspanne viele Zellen und MK gezählt werden können (109). Der mikroskopische MK-Test hat wiederum den Vorteil, dass die Darstellung von Proliferations-, Apoptose- und Mitoseindex möglich ist. Unter Anschluss weiterer Analysen ermöglicht er außerdem die Erkennung der zellulären Mechanismen von Mutagenen (78). Misík et al. (76) validierten Huh6 Zellen im MK-Test als geeignete Alternative zu bisher verwendeten Zelllinien in Genotoxizitätstestungen. Berichtet wird über die Auswirkungen der Konzentration des Fetalen Kälberserums (FBS, fetal bovine serum) und der Cyto-B Konzentration auf das Zellwachstum. Als optimale Behandlungszeitspanne mit den zu testenden Substanzen wird eine Dauer von 24 h genannt. Außerdem würde es die Sensitivität erhöhen, wenn das genutzte Medium mit 10% anstatt 4% FBS angereichert ist. Als optimale Zeitspanne für die Cyto-B Behandlung wurden 48 h genannt. Die optimale Cyto-B Konzentration bei der genannten Behandlungszeit sei 1,5 µg/ml. Somit wurden in der vorliegenden Studie die als optimal deklarierten Angaben bis auf eine differierende Cyto-B Konzentration für Huh6 Zellen eingehalten. Trotz der optimalen Behandlungsbedingungen bestanden während den Untersuchungen Schwierigkeiten beim Arbeiten mit den Huh6 Zellen. Bei den polyploiden Zellen stellten sich das Zytoplasma sowie die Zellkerne nach der Färbung immer wieder ungleichmäßig

angefärbt dar. Für zukünftige *in vitro* Genotoxizitätstestungen an Huh6 Zellen könnten alternative Färbeprotokolle eine Lösung für dieses Problem sein.

In den MK-Tests konnte die vorliegende Arbeit Ergebnisse darlegen, deren Tendenzen eindeutig waren. Zuerst wurden CPA und BaP in den Vorversuchen auf MK-Induktion an Huh6 Zellen getestet. Hier zeigten sich beide Prodrugs als potente, hepatotoxische Substanzen. Im Verlauf wurde sich für CPA als Positivkontrolle für die Experimente mit PA entschieden, da es eine signifikante MK-Induktion erzeugte. CPA wird im klinischen Bereich als Therapeutikum bestimmter onkologischer Krankheiten und Autoimmunerkrankungen genutzt (110-115). Es wurde festgestellt, dass die menschliche Leber schon bei der einmaligen Gabe einer niedrigen Dosis Schaden nehmen kann (116).

Es bestand ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Erhöhung der Konzentration von Lasiocarpin und Riddelliin und der MK-Induktion. Um eine Verdopplung der Anzahl an MK-haltigen Zellen wie bei Lasiocarpin zu induzieren, musste die zehnfache Dosis Riddelliin genutzt werden. Somit war Lasiocarpin im MK-Test das potentere PA.

Die Anzahl der Apoptosen im MK-Test stieg tendenziell im Vergleich zur Negativkontrolle in den Substanztests an. Signifikant war der Anstieg der Apoptosen im Einzelsubstanztest mit Lasiocarpin (10 μ M). Generell stieg die Anzahl der apoptotischen Zellen prozentual bei der Behandlung mit Lasiocarpin verglichen mit der Negativkontrolle deutlicher an als in der Behandlung mit Riddelliin. Dies unterstreicht die generierten Ergebnisse, dass Lasiocarpin *in vitro* einen schädlicheren Einfluss auf die Huh6 Zellen hat als Riddelliin.

Eine Reduktion der Mitoserate kann im MK-Test Anzeichen einer Verlangsamung der Zellteilung und einer verringerten Zellvitalität sein. Bei den Einzelsubstanztests mit Riddelliin und Lasiocarpin pendelten sich die Mitoseraten zwischen der niedrigsten und der höchsten genutzten Dosis ungefähr auf einem Level ein. Sie sanken jedoch weder dosisabhängig noch signifikant ab. In unserer Studie waren die Abweichungen der

Mitosefrequenz generell schwach und stellen somit typische Schwankungen dar, aus denen sich keine validen Schlüsse ziehen lassen.

Beim Kombinieren von Lasiocarpin und Riddelliin in niedriger Dosierung stieg die Anzahl an MK-haltigen Zellen nicht signifikant an. Die Kombination aus den hohen Dosen Lasiocarpin und Riddelliin erzeugte einen signifikanten Abfall der MK-haltigen Zellen im Vergleich zu den Einzelsubstanztests. Diese Erkenntnis kann darauf hindeuten, dass Heliotridin-PA und Retronecin-PA trotz der unterschiedlichen Strukturmerkmale zum Teil die gleichen Metabolisierungswege nutzen könnten und durch die simultane Gabe hoher PA-Dosen bestimmte Enzyme gesättigt sind.

In den Kombinationstests sank die Anzahl an apoptotischen Zellen beim Kombinieren der niedrigen Konzentrationen von Lasiocarpin und Riddelliin im Vergleich zu den Einzelsubstanztestwerten. Dagegen erhöhte sich die Zahl der apoptotischen Zellen beim Kombinieren der hoch konzentrierten PA im Vergleich zu den Einzelsubstanztests leicht. Die Mitoseraten verringerten sich im Vergleich zu der Negativkontrolle kaum. Die Ergebnisse waren nicht signifikant.

Beim Comet Assay gibt es kein Protokoll speziell für Huh6 Zellen. Im alkalischen Comet Assay werden DNA-Schäden detektiert, die unter anderem durch Einzel- und Doppelstrang-DNA-Brüche entstehen. DNA-Strangbrüche gehen beispielsweise mit einem erhöhten kanzerogenen Risiko einher, da Doppelstrangbruch-Reparationsmechanismen eine Schlüsselrolle in der Entstehung vieler Krankheiten spielen (117). Außerdem können im alkalischen Comet Assay speziell Alkali-labile Stellen detektiert werden. Bevor man den alkalischen Comet Assay etablierte, wurden im ursprünglichen neutralen Comet Assay hauptsächlich Doppelstrangbrüche detektiert (88). Die Kombination von Riddelliin und Lasiocarpin induzierte in niedrigen und in hohen Konzentrationen eine Erhöhung der prozentualen DNA-Menge im Schweif im Vergleich zum Mittelwert der zwei Einzelsubstanzen und zur Negativkontrolle. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Es besteht somit in dieser Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Menge an DNA im Schweif der Kometen und der Behandlung der Huh6 Zellen mit Riddelliin und Lasiocarpin.

Im FPG Comet Assay wird der durch oxidativen Stress erzeugte DNA-Schaden gemessen. Generell wurde im alkalischen Comet Assay eher weniger DNA-Schaden detektiert als im FPG Comet Assay. Die prozentuale Menge an DNA im Schweif war bei den mit Puffer behandelten Zellen nicht entsprechend denen des durchgeführten alkalischen Comet Assays. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre laut Collins et al. (92) die Kondition der Zellen. Diese soll nach Empfehlung der genannten Publikation nicht nur durch den Vitalitätstest überprüft werden, sondern auch anhand der Menge an DNA im Schweif der Negativkontrolle. Dieser Wert soll zwischen 0 % und 10 % liegen. Den genannten Wert überschritt die Negativkontrolle in der vorliegenden Studie beim FPG Comet Assay. Im Vitalitätstest waren die Zellen jedoch stets unauffällig. In Studien zum Thema Überleben von Zellen nach DNA-Schäden im Comet Assay wird für *in vitro* Experimente empfohlen, bei mehr als 20 % DNA im Kometen-Schweif gleichzeitig Vitalitätsdaten anzugeben (118). Selbst bei der Positivkontrolle CPA 100 μ M wurde in der vorliegenden Studie eine hohe Vitalität vorgefunden. Die Vitalität der Negativkontrolle war am niedrigsten. Es ist möglich, dass die Qualität der Zellen während der Testungen durch Inhaltsstoffe des FPG-Puffers oder die DMSO-Behandlung negativ beeinflusst wurden oder avitale Zellen in der Gruppe der PA-behandelten Zellen bei den Auswertungen nicht mehr sichtbar waren.

Es fällt schwer eine Aussage über die Ergebnisse des FPG Assays zu treffen, da keine Signifikanzen gegeben und die Varianzen erhöht waren. Freie Radikale können Mutationen verursachen, wenn diese in bestimmten Genen auftauchen, und sind deshalb potenziell kanzerogen. Sie können durch oxidativen Stress entstehen (119). Die eindeutigen und signifikanten positiven Ergebnisse hinsichtlich genetischen Schadens im MK-Test sind laut der negativen Ergebnisse des FPG Comet Assays also in Bezug auf Huh6 Zellen vermutlich weniger auf oxidativen Stress zurückzuführen. Dies wird auch von weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, beispielsweise zu Glutathion, dessen Depletion und der Superoxidproduktion durch Lasiocarpin, unterstrichen (120). Es ist daher eher plausibel, dass chromosomale Aberrationen und chromosomaler Verlust, mitotische Störungen oder Crosslink-Effekte der Grund des dort detektierten DNA-Schadens sein könnten. Interstrang-Crosslinks verhindern durch kovalente Bindung die

DNA-Strang-Separation, was Folgen auf Transkription oder Replikation haben kann (121).

Für die Positivkontrolle im Comet Assay wurde eine Substanz gebraucht, welche metabolische Aktivierung benötigt. Hierfür standen nach den Vorversuchen CPA und BaP zur Auswahl. Die Entscheidung für CPA ist diskutabel, da die Substanz keinen signifikanten Anstieg der prozentualen DNA-Menge im Kometen-Schweif induzierte. Alkylantien wie CPA haben die Wirkung Vernetzungen der DNA zu erzeugen (32, 122). Die Substanz hat also wahrscheinlich auch auf die DNA der Huh6 Zellen eher vernetzende Wirkungen, weswegen CPA keine optimale Positivkontrolle für DNA-Strangbruch nachweisende Tests wie dem Comet Assay ist. Für den FPG Comet Assay wäre es besser gewesen, einen Induktor von reaktiven Sauerstoffspezies als Positivkontrolle zu nutzen, um oxidativen Schaden zu erzeugen. Diesem Ansatz entsprechend könnte eine bessere Positivkontrolle beispielsweise ein Doppelstrangbruch-Induktor wie Wasserstoffperoxid sein (123), was sich im Crosslink Comet Assay bestätigt hat (124). Seo et al. (125) beschreiben, dass die Behandlung mit CPA an HepG2-Zellen weder DNA-Schäden noch Zytotoxizität verursacht, da das Aktivitätslevel der CYP-Enzyme in diesen Zellen eher niedrig ist. In unserer Arbeitsgruppe konnte im Versuch mit Huh6 Zellen Enzymaktivität der CYP1A nachgewiesen werden (120). Zur Induktion von DNA-Schäden benötigt CPA aber vor allem Enzyme der Gruppe CYP2B für die metabolische Aktivierung (125, 126). Unsere Arbeitsgruppe hat im Versuch mit Huh6 Zellen durch die simultane Gabe von Lasiocarpin und Rifampicin als CYP-Aktivator eine Steigerung der MK-Induktion nachweisen können. Auf der anderen Seite löste eine simultane Behandlung der Huh6 Zellen mit Lasiocarpin und Ketoconazol, einem potenten CYP-Enzym-Inhibitor, eine Reduktion der MK-Induktion aus (124). Dies unterstreicht nochmals die Relevanz der metabolischen Aktivierung durch CYP-Enzyme.

Ziel des γ -H2AX Assay war es, herauszufinden, ob die Anzahl der Doppelstrangbrüche in Huh6 Zellen durch die Kombination verschiedener lebertoxischen PA potenziert wird. Dies konnten nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl an detektierten, phosphorylierten

H2AX-Bruchstellen hat sich in den kombinierten Versuchsansätzen nicht signifikant verändert. Bei dem Kombinieren beider Strukturtypen verringerte sich die Fluoreszenzrate bei den niedrig- sowie bei den hochkonzentrierten Kombinationen. Die Ergebnisse waren nicht signifikant. Ein Grund für die fehlende Signifikanz könnten die hohen Varianzen sein, welche wiederum der variablen Anzahl an ausgewerteten Bildern geschuldet sein könnten. Interessanterweise waren in der vorliegenden Studie die Unterschiede der Potenzen von Lasiocarpin zu Riddelliin bei weitem nicht so hoch wie im MK-Test. Das Toxizitätsniveau war eher das gleiche. Dies unterstrich die Studienergebnisse von Lousse et al. (127). In der besagten Studie wurde die Genotoxizität verschiedener PA im γ -H2AX-Assay an HepaRG Zellen getestet. Dass Riddelliin in unserer Studie in niedrigeren Konzentrationen tendenziell höhere Fluoreszenzraten induzierte als die korrespondierenden Lasiocarpin-Konzentrationen, könnte eventuell auf die Grundstruktur zurückgeführt werden. Riddelliin als makrozyklischer Ester wurde von Hincks et al. (128) als potenterer DNA-Crosslink-Induktor beschrieben als Heliosupin, welches zu der Gruppe der offenkettigen Diester gehört. Dies könnte durch die Hypothese erklärt werden, dass Crosslinks, wenn diese bis zur Replikation nicht repariert wurden, DNA-Doppelstrangbrüche induzieren können (129, 130). Doppelstrangbrüche können wiederum durch den γ -H2AX Assay detektiert werden. Außerdem wird durch Hincks et al. beschrieben, dass die DNA-Crosslink-Aktivität mit mitotischen Störungen korrelieren kann (128). Es ist auch bekannt, dass ein weiterer Endpunkt des MK-Tests mitotische Störungen sein können (78). Fraglich ist, ob mitotische Störungen auch in unserer Studie einen Einfluss auf die MK-Entstehung in Huh6 Zellen hatten.

Die erhaltenen Ergebnisse im MK-Test stimmen im weitesten Sinne mit den Berichten von Allemang et al. (24) überein. Dies gilt vor allem für die unterschiedlich starke Toxizität von Lasiocarpin und Riddelliin. Die Untersuchungen betreffen die Potenzen von Heliotridin-PA (Lasiocarpin) und Retronecin-PA (Riddelliin) im MK-Test. In besagter Studie wird belegt, dass Lasiocarpin im durchgeführten MK-Test um ein Mehrfaches potenter ist als Riddelliin. Untersucht wurden die Potenzen von 15 verschiedenen PA im MK-Test unter Nutzung von HepaRG-Zellen. Hier wurde festgestellt, dass schon eine

Dosis von $<1 \mu\text{M}$ Lasiocarpin eine signifikante Erhöhung der MK-Zahl im Vergleich zur Negativkontrolle verursachte. Für eine signifikante Erhöhung der MK-Anzahl war mindestens die fünffache Dosis Riddelliin nötig. Unterschieden wurde zusätzlich zwischen PA und PA-N-Oxiden. Von letzteren wurde mehr als die hundertfache Dosis benötigt, um einen signifikanten Anstieg der MK-Zahl zu induzieren. Die PA-N-Oxide zeigten eine deutlich niedrigere MK-Induktion im Vergleich zu den korrespondierenden PA. Die Ergebnisse der induzierten MK-Frequenz unterstreichen die von uns generierten Ergebnisse im MK-Test. Im Einzelsubstanztest stieg die Anzahl an MK schon bei einer Dosis von $0,32 \mu\text{M}$ Lasiocarpin im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an, die Anzahl an MK verdoppelte sich in der vorliegenden Studie bei einer Lasiocarpin-Dosis von $32 \mu\text{M}$. Um eine Verdopplung der mikrokernhaltigen Zellen zu induzieren, war ca. die 100-fache Riddelliin-Dosis vonnöten.

Die Zytotoxizität stellt im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test einen Confounder dar, da avitale Zellen durch strukturelle Veränderungen fälschlicherweise von den Antikörpern detektiert werden können (131). Dadurch besteht die Möglichkeit, dass Versuche, bei denen die Zytotoxizität durch zu hohe Behandlungskonzentrationen stark erhöht ist, positiv in Bezug auf eine erhöhte Anzahl an Doppelstrangbrüchen ausgewertet werden könnten, obwohl tatsächlich viele avitale Zellen ausgewertet wurden. Quesnot et al. (132) beschrieben, dass HepaRG-Zellen im $\gamma\text{-H2AX}$ -Test sensitiv auf die Substanzen reagieren, die auch im MK-Test und anderen etablierten Genotoxizitätstestverfahren positive Ergebnisse hervorbrachten. In einer Studie von Khoury et al. (133) wurde die Sensitivität des $\gamma\text{-H2AX}$ -Test bei HepG2-Zellen auf 75% klassifiziert, die Spezifität lag bei 90–100%. Hier wurde geschlussfolgert, dass für diese Zelllinie die Sensitivität und die Spezifität höher als beim MK-Test ist. Außerdem wurde eine Zytotoxizitätsgrenze von 50% für zufriedenstellende Ergebnisse hinsichtlich Sensitivität und Spezifität festgelegt.

Für Huh6 Zellen liegt nach heutigem Stand des Wissens keine solche Klassifikation vor, weswegen eine wissenschaftliche Einordnung unserer Ergebnisse nicht einfach ist. Die vorliegenden Daten von Louise et al. wurden mit Nutzung des gleichen Primärantikörpers und HepaRG-Zellen erhoben (127). Wie schon erwähnt waren auch

hier keine großen Unterschiede hinsichtlich der Potenzen von Lasiocarpin und Riddelliin zu erkennen. Unterschiedliche Zellen haben unterschiedliche (CYP-)Enzyme für die Metabolisierung. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse der γ -H2AX-Assays zwischen den Daten sein. Für eine weitere Klärung dieser Unterschiede müssten die (CYP-)Enzym-Aktivität der beiden Leberzelllinien bestimmt und miteinander verglichen werden.

CPA erwies sich nicht als optimale Positivkontrolle, da die Behandlung keinen signifikanten Anstieg an phosphorylierten H2AX-Stellen induzierte. Im γ -H2AX Assay werden Doppelstrangbrüche nachgewiesen, welche wie eben beschrieben durch CPA wahrscheinlich eher weniger induziert werden. Die gefundenen Veränderungen geben somit zu der Vermutung Anlass, dass Doppelstrangbrüche und oxidativer Stress keine große Rolle bei PA-induziertem DNA-Schaden in Huh6 Zellen spielen.

Die Kultivierung der Huh6 Zellen ging immer wieder mit Schwierigkeiten einher. Oft lösten sich die adhärennten Zellen beim Umsetzen schlecht von den Kulturflaschen ab. Beim γ -H2AX Assay kam es vor, dass sich die Zellen ungleichmäßig auf dem Glas verteilten. Diese Bedingungen erschwerten das Fotografieren unter dem Mikroskop und damit auch die Auswertung der Bilder. Das kann ein weiterer Grund dafür sein, dass es mit den Huh6 Zellen nicht möglich war, die Ergebnisse des γ -H2AX Assay von Louise et al. (127) zu reproduzieren. Der Zusammenhang zwischen der Genotoxizität von PA und DNA-Strangbrüchen als spezifischem Genotoxizitätsmechanismus konnte in dieser Studie nicht abschließend geklärt werden.

Diskutabel ist auch das genutzte Färbeprotokoll der Immunfluoreszenzfärbung. Aufgrund von durch die Behandlung mit PA oder CPA induzierter Zytotoxizität oder hohem DNA-Schaden können (früh-) apoptotische Zellen entstehen. Diese können ebenfalls ein erhöhtes H2AX-Signal generieren. Wenn bei höheren Konzentrationen beispielsweise H2AX-positive Zellen vorhanden sind, kann, wie bei der DAPI-Färbung, der gesamte Zellkern gefärbt sein. Dann ist davon auszugehen, dass es sich um apoptotische Zellen handelt und nicht ausschließlich um eine Genotoxizität induzierte

Signalerhöhung. Diese Tatsache lässt die Apoptose als Ursache für die Unterschiede der Farbqualität als möglich erscheinen. Um die Unterschiede der verschiedenen Behandlungen unter dem Mikroskop in Zukunft besser erkennbar zu machen, könnte das Färbeprotokoll für Huh6 Zellen evaluiert werden.

Ning et al. (134) berichten über die Aufnahme von Lasiocarpin und Riddelliin in Lebermikrosomen unterschiedlicher Spezies, um auftretende Unterschiede zu klären. Es sind unter anderem die Wirkung von Lasiocarpin und Riddelliin auf humane Zellen und Rattenzellen verglichen worden. Die Untersuchungen, die auf den BMDL₅-Werten basieren, zeigen, dass eine Differenz zwischen den genotoxischen Wirkungen auf Zellen verschiedener Spezies besteht. Die humanen Leberkarzinomzellen reagierten demnach sensitiver auf Lasiocarpin (2-fach) und Riddelliin (8-fach) als die Hepatozyten der Ratten.

In einer weiteren Studie, in welcher PA-Metaboliten qualitativ und quantitativ untersucht wurden, wird berichtet, dass Lasiocarpin in Rattenleberzellen die höchste Anzahl an Dehydropyrrolizidinalkaloiden induziert. In humanen Lebermikrosomen wurden Dehydropyrrolizidinalkaloide ausschließlich nach Behandlung von Diester-PA detektiert (135). Den Ansatz, diskrepante speziestypische Stoffwechselwege von PA in der Zukunft vertieft zu verfolgen, ist eine interessante Möglichkeit, die teilweise auseinandergehenden Erkenntnisse wissenschaftlicher Studien in diesem Themenbereich zu erklären.

In der Studie von Chen et al. (136) wird von Untersuchungen über die Toxizität von Riddelliin und Lasiocarpin *in vitro* und *in vivo* berichtet. In den Tests zeigte sich, dass sich bei oraler Gabe gleich hoher PA-Konzentration die Riddelliin-Konzentration im Blut von Ratten um ein Vielfaches höher darstellt als die Lasiocarpin-Konzentration, was auf Unterschiede bezüglich der Metabolisierung zurückgeführt wurde. Somit kamen die Autoren zu dem Entschluss, unterschiedliche BMDL₅-Werte bei Ratten für Lasiocarpin (23–34,4 mg/kg pro Tag) und für Riddelliin (4,9–8,4 mg/kg pro Tag) zu generieren.

In der vorliegenden Arbeit erzeugte Lasiocarpin in einer geringeren Dosis einen signifikanteren Anstieg der MK-haltigen Zellen als Riddelliin. Die Tatsache, dass

Lasiocarpin im MK-Test eine höhere Potenz als Riddelliin aufweist, bedeutet somit nicht direkt, dass nach oraler Aufnahme von Lasiocarpin automatisch auch von einer höheren Bioverfügbarkeit auszugehen ist. Die in dieser Studie genutzten *in vitro* Testmethoden untersuchen relative Potenzen und damit die Toxikodynamik. Es wäre jedoch vonnöten auch die Toxikokinetik (Liberation, Absorption, Distribution, Metabolismus und Exkretion) zu berücksichtigen, um diese sinnvoll auf Grenzwerte für die orale oder kutane Aufnahme beim Menschen zu übertragen.

Dass der genotoxische Einfluss von Lasiocarpin und Riddelliin auf Huh6 Zellen im Laborversuch keine kumulative Wirkung zeigte, reicht nicht aus, um eine allgemein gültige Aussage über die Potenzen von PA zu treffen. Die Frage nach den Potenzen von Riddelliin und Lasiocarpin in Kombination bedarf zur weiteren Klärung beispielsweise einer Messung der an der Metabolisierung beteiligten CYP-Enzyme, um herauszufinden, welche Mechanismen bei PA eine Rolle spielen. Dadurch würde auch eine genauere Aussage über die Ergebnisse des Kombinationstests getroffen werden können.

4.2 Ausblick

Schon vor dreißig Jahren informierte die Deutsche Ärzteschaft über Grenzwerte für PA-haltige Arzneimittel (137). Die Europäische Union hat 2020 in einer Verordnung neue Grenzen für den Höchstgehalt an PA in Lebensmitteln erlassen, welche im Juli 2022 in Kraft getreten ist (138). Hier werden zum Beispiel bestimmte Grenzwerte für Tees, NEM und Gewürze festgelegt (34). Die Regelung von Höchstgrenzen auf EU-Ebene ist ein wichtiger Schritt in Richtung Kontrolle der potenziell mit PA kontaminierten Lebensmittel, jedoch geht es in dieser Verordnung um spezifisch ausgewählte PA. In einer Studie aus Norddeutschland wird vorgeschlagen mehr PA zu inkludieren, da ein relevanter Anteil der vorkommenden PA in der EU-Verordnung nicht thematisiert wird (139). Außerdem gibt es keine Empfehlungen über die zeitliche Limitierung zur Aufnahme der PA, was ein wichtiger Aspekt bei PA-kontaminierten Arzneimitteln ist, um toxische Nebenwirkungen zu vermeiden.

Mittlerweile gibt es verschiedene Kontrollmethoden, um Lebensmittel auf PA-Kontamination zu untersuchen. Diese Methoden machen es möglich, auch niedrige

Dosen an PA in Nahrungsmitteln zu detektieren. Ein Beispiel für eine analytische Methode ist die „liquid chromatography tandem mass spectrometry“ (LC-MS/MS-Methode, Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung). Alternative Methoden sind Risikobewertungsinstrumente, die sogenannten „physiologically based kinetic models“, welche es durch einen mechanistischen Ansatz unter Berücksichtigung der Toxikokinetik möglich machen, *in vitro* Daten quantitativ in *in-vivo*-Daten umzuwandeln (21). Somit kann ein besseres Verständnis der Wirkungen in Organismen gewonnen werden.

Außerdem wurden für bestimmte Bereiche, wie zum Beispiel der traditionellen Medizin, Biomonitoring-Verfahren zur Messung von Pyrrol-Addukten entwickelt. Diese Verfahren sind für die klinische Anwendung bei Verdacht auf PA-Intoxikationen gedacht. Genauso können sie aber bei Verdacht auf chronische PA-Exposition angewendet werden (17).

Ein wichtiger Schritt, um den Konsum von mit hepatotoxischen PA kontaminierten Lebensmitteln zu vermeiden, ist mehr Sorgfalt seitens der Lebensmittel-ProduzentInnen im Bereich Tee, NEM und allen weiteren von PA-Kontaminierung betroffenen Lebensmitteln. Die Einnahme von NEM wird immer gängiger. In bestimmten Regionen der Welt nehmen bis zu 70 % der Bevölkerung regelmäßig NEM ein. Die potenziell damit einhergehenden hepatozellulären Schäden betreffen meistens junge Frauen (140). Ein großes Problem ist an dieser Stelle, dass die Datenlage über die toxischen Wirkungen der vielen verschiedenen PA, die Ausbreitung, das Vorkommen in Pflanzenarten und die unterschiedlichen metabolischen Faktoren es erschweren eine eindeutige Aussage bezüglich Verzehreinschränkungen zu treffen. Das Wissen über einzelne PA ist zu gering und die kumulativen Effekte der genotoxischen Wirkungen nicht ausreichend erforscht. Die erwähnten Aspekte erschweren es, fundierte epidemiologische Aussagen über Inzidenz, Prävalenz oder Mortalität zu treffen. Andererseits wäre es wichtig, die exakte Wirkung und die Potenzierung verschiedener PA zu kennen, um eine mögliche Überschätzung der Gefahr der PA-Aufnahme von Menschen zu vermeiden. Die unklare Forschungslage stellt für die Lebensmittelindustrie und HerstellerInnen von Heilkräuter-Zubereitungen eine Belastung dar. Die Frage nach spezifischen genotoxischen Auswirkungen, wie zum Beispiel der Induktion von Doppelstrangbrüchen, wurde in

DISKUSSION

unserer Studie nicht abschließend geklärt. Insbesondere das unvollständige Wissen über vermeintliche Potenzierungen von strukturell unterschiedlichen PA bedarf weiterer Studien. Zur definitiven Klärung wäre eine fokussierte Untersuchung der für die Metabolisierung relevanten Enzyme und der Toxikokinetik notwendig.

5. Zusammenfassung

PA sind natürliche Pflanzeninhaltsstoffe, die wegen ihres genotoxischen Potentials bekannt sind. Nach Applikation mikromolarer Konzentrationen können bei *in vitro* Untersuchungen von Leberzellen chromosomale Schäden detektiert werden. PA stehen im Verdacht nach Aufnahme bei Menschen hepatotoxische und kanzerogene Wirkungen nach sich zu ziehen.

In dieser Studie wurden Lasiocarpin und Riddelliin an der humanen Leberkarzinomzelllinie Huh6 auf Genotoxizität getestet. Die ausgewählten Methoden waren der MK-Test, der alkalische und der FPG Comet Assay und die γ -H2AX-Färbung. In den Vorversuchen mit BaP und CPA wurde gezeigt, dass die Zellen durch Prodrugs genotoxisch geschädigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Riddelliin und Lasiocarpin im MK-Test eine dosisabhängige, genotoxische Wirkung auf die Huh6 Zellen haben. Der Einfluss von Lasiocarpin war im MK-Test im Vergleich zum Einfluss von Riddelliin bei geringerer Konzentration detektierbar. Nach einer simultanen Behandlung der Huh6 Zellen mit verschiedenen PA kann konkludiert werden, dass keine signifikante Erhöhung an DNA-Schäden im Vergleich zu Behandlungen mit den Einzelsubstanzen festgestellt werden konnte, was möglicherweise auf eine Erschöpfung der metabolischen Kapazität der Zellen zurückzuführen ist. Insgesamt ist es den Ergebnissen zufolge wahrscheinlich, dass die Entstehung von Crosslinks durch Lasiocarpin und Riddelliin eher eine Rolle in der Genotoxizitätsinduktion auf Huh6 Zellen spielen als oxidativer Stress. Doppelstrangbrüche konnten nicht als sicherer Induktor von Genotoxizität identifiziert werden. Die Besonderheiten der Stoffwechselwege einzelner PA und die Spezifizierung einzelner, für die Metabolisierung relevanter Enzyme sollte in Zukunft Gegenstand der Forschung sein, um die kumulativen Wirkungen von PA besser nachzuvollziehen und die für den Menschen entstehenden Risiken durch die Aufnahme von PA konkretisieren zu können.

5.1 Summary

PA are naturally occurring secondary plant metabolites which are known for their genotoxic potential. *In vitro* studies can detect chromosomal damage after application of micromolar doses. Notoriously, some PA are suspected to cause hepatotoxicity and carcinogenicity in human beings as well as in animals.

In this study the genotoxic effects of Lasiocarpin and Riddelliin were tested on the human hepatoma cell line Huh6. Therefore, the micronucleus test, the alkaline and the FPG Comet Assay and γ -H2AX Assay were performed. The genotoxic potential of these prodrugs on Huh6 cells was proven in preliminary tests with BaP and CPA.

In conclusion, the selected PA Riddelliin and Lasiocarpin induced micronuclei in Huh6 cells in a dose-dependent manner. In comparison to Riddelliin, the influence of Lasiocarpin was detectable at lower concentrations in micronucleus test. After the simultaneous treatment with different structure types of PA it can be observed that there is no significant elevation of DNA damage compared to the single substance tests. Possibly the reason for this is a depletion of the metabolic capacity of the Huh6 cells.

Overall, according to the findings of the performed toxicological tests with Lasiocarpin and Riddelliin, it is likely that the formation of crosslinks plays a more important role in the induction of genotoxicity on Huh6 cells than oxidative stress. Double-strand breaks could not be identified as a reliable inducer of genotoxicity in this study.

The peculiarities of the metabolic pathways of individual PA and the specification of relevant enzymes for metabolization should be subject of future research to create a better understanding of the cumulative effects and the resulting risks to humans from the ingestion of PA.

6. Literaturverzeichnis

1. T. Hartmann, Diversity and variability of plant secondary metabolism: a mechanistic view. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **80**, 177-188 (1996).
2. T. Hartmann, L. Witte, Chemistry, Biology and Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives* **9**, 155-233 (1995).
3. L. W. Smith, C. C. J. Culvenor, Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. *Journal of natural products* **44**, 129-152 (1981).
4. J. Nitzsche, A. Plescher, S. Wahl, Pyrrolizidinalkaloid-haltige Beikräuter in Arznei- und Gewürzpflanzenkulturen - Verbreitung und Gefahr der Kontamination von Ernteprodukten in Deutschland. *28. Deutsche Arbeitsbesprechung über Fragen der Unkrautbiologie und -bekämpfung, Julius-Kühn-Archiv* **458**, 407-417 (2018).
5. D. Selmar *et al.*, Transfer of pyrrolizidine alkaloids between living plants: A disregarded source of contaminations. *Environ Pollut* **248**, 456-461 (2019).
6. J. A. Edgar, R. J. Molyneux, S. M. Colegate, Pyrrolizidine Alkaloids: Potential Role in the Etiology of Cancers, Pulmonary Hypertension, Congenital Anomalies, and Liver Disease. *Chem Res Toxicol* **28**, 4-20 (2015).
7. M. L. Deinzer, P. A. Thomson, D. M. Burgett, D. L. Isaacson, Pyrrolizidine Alkaloids: Their Occurrence in Honey from Tansy Ragwort (*Senecio jacobaea* L.). *Science* **195**, 497-499 (1977).
8. C. C. J. Culvenor, J. A. Edgar, L. W. Smith, C. R. Kumana, H. J. Lin, Heliotropium Lasiocarpum Fisch and Mey identified as cause of veno-occlusive disease due to a herbal tea *The Lancet* **327**, 978 (1986).
9. J. A. Edgar, E. Roeder, R. J. Molyneux, Honey from Plants Containing Pyrrolizidine Alkaloids: A Potential Threat to Health. *J Agric Food Chem* **50**, 2719-2730 (2002).
10. P. P. J. Mulder, P. Lopez Sanchez, A. These, A. Preiss-Weigert, M. Castellari, Occurrence of Pyrrolizidine Alkaloids in food. *External scientific report; EFSA Supporting Publications*, (2015).
11. BfR, Pyrrolizidinalkaloide: Gehalte in Lebensmitteln sollen nach wie vor so weit wie möglich gesenkt werden. *Stellungnahme Nr. 030/2016, geöffnet am 21.01.2022*, (2016).
12. M. Roulet, R. Laurini, L. Rivier, A. Calame, Hepatic veno-occlusive disease in newborn infant of a woman drinking herbal tea. *The Journal of Pediatrics* **112**, 433-436 (1988).
13. BfR, Analytik und Toxizität von Pyrrolizidinalkaloiden sowie eine Einschätzung des gesundheitlichen Risikos durch deren Vorkommen in Honig. *Stellungnahme Nr. 038/2011 des BfR, geöffnet am 21.01.2022*, (2011).
14. EFSA, Dietary exposure assessment to pyrrolizidine alkaloids in the European population. *EFSA Journal* **14**, (2016).
15. J. Wang *et al.*, Determination of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids in Traditional Chinese Herbal Medicines by UPLC-MS/MS and Accompanying Risk Assessment for Human Health. *Molecules* **26**, 1648 (2021).
16. H. Wiedenfeld, E. Roeder, T. Bouaul, J. Edgar, Pyrrolizidine Alkaloids - Structure and Toxicity. *V&R unipress, Bonn University Press, Goettingen, Germany*, (2008).

17. D. Schrenk *et al.*, Pyrrolizidine alkaloids in food and phytomedicine: Occurrence, exposure, toxicity, mechanisms, and risk assessment - A review. *Food Chem Toxicol* **136**, 111107 (2020).
18. E. Teuscher, U. Lindequist, Biogene Gifte. *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart* **3. Auflage**, 583-598 (2010).
19. C. C. J. Culvenor, Alkaloids and human disease. *Toxicology in the tropics*, 124-141 (1980).
20. R. Schoental, P. N. Magee, Further observations on the subacute and chronic liver changes in rats after a single dose of various pyrrolizidine (Senecio) alkaloids *J Path Bact* **78**, 471-482 (1959).
21. L. Chen, A. Peijnenburg, L. de Haan, I. M. C. M. Rietjens, Prediction of in vivo genotoxicity of lasiocarpine and riddelliine in rat liver using a combined in vitro-physiologically based kinetic modelling-facilitated reverse dosimetry approach. *Arch Toxicol* **93**, 2385-2395 (2019).
22. P. P. Fu, Q. Xia, G. Lin, M. W. Chou, Pyrrolizidine Alkaloids-Genotoxicity, Metabolism Enzymes, Metabolic Activation, and Mechanisms. *Drug Metab Rev* **36**, 1-55 (2004).
23. T. N. Pereira, R. I. Webb, P. E. B. Reilly, A. A. Seawright, A. S. Prakash, Dehydromonocrotaline generates sequence-selective N-7 guanine alkylation and heat and alkali stable multiple fragment DNA crosslinks. *Nucleic Acids Research* **26**, 5441-5447 (1998).
24. A. Allemang, C. Mahony, C. Lester, S. Pfuhler, Relative potency of fifteen pyrrolizidine alkaloids to induce DNA damage as measured by micronucleus induction in HepaRG human liver cells. *Food Chem Toxicol* **121**, 72-81 (2018).
25. T. Chen, N. Mei, P. P. Fu, Genotoxicity of pyrrolizidine alkaloids. *J Appl Toxicol* **30**, 183-196 (2010).
26. R. Moreira, D. M. Pereira, P. Valentao, P. B. Andrade, Pyrrolizidine Alkaloids: Chemistry, Pharmacology, Toxicology and Food Safety. *Int J Mol Sci* **19**, (2018).
27. M. Lechtenberg, A. Hensel, B. Steinhoff, Hepatotoxisch und karzinogen-Pyrrolizidinalkaloide in Arznei- und Lebensmitteln sorgen für Probleme. *Deutsche Apotheker Zeitung, geöffnet am 22.09.20* **31**, 32 (2017).
28. World Health Organization, Pyrrolizidine alkaloids. *Environmental Health Criteria* **80**, (1988).
29. J. Ning, L. Chen, I. Rietjens, Role of toxicokinetics and alternative testing strategies in pyrrolizidine alkaloid toxicity and risk assessment; state-of-the-art and future perspectives. *Food Chem Toxicol* **131**, 110572 (2019).
30. L. Williams *et al.*, Toxicokinetics of riddelliine, a carcinogenic pyrrolizidine alkaloid, and metabolites in rats and mice. *Toxicol Appl Pharmacol* **182**, 98-104 (2002).
31. T. Danninger, U. Hagemann, V. Schmidt, P. S. Schönhöfer, Zur Toxizität Pyrrolizidinalkaloid-haltiger Arzneipflanzen. *Pharmazeutische Zeitung* **128. Jahrgang**, 289-303 (1983).
32. Löffler, Petrides, Heinrich, Müller, Graeve, Biochemie und Pathobiochemie. *Springer*, 22 (2014).

33. T. Hartmann, Pyrrolizidine alkaloids between plants and insects: a new chapter of an old story. *Chemoecology* **5**, 139-146 (1994).
34. H. K. Knutsen et al., Risks for human health related to the presence of pyrrolizidine alkaloids in honey, tea, herbal infusions and food supplements. *EFSA Journal* **15**, (2017).
35. A. R. Mattocks, I. N. H. White, The conversion of pyrrolizidine alkaloids to N-oxides and to dihydropyrrolizidine derivatives by rat-liver microsomes in vitro *Chem-Biol Interactions* **3**, 383-396 (1971).
36. R. Schoental, J. B. Cavanagh, Brain and Spinal Cord Tumors in Rats Treated With Pyrrolizidine Alkaloids. *Journal of the National Cancer Institute* **49**, 665–671 (1972).
37. BfR, Fragen und Antworten zu Pyrrolizidinalkaloiden in Lebensmitteln. *Aktualisierte FAQ des BfR vom 17. Juni 2020, geöffnet am 21.01.2022*, (2020).
38. X. Yang, J. Ye, X. Li, Q. Li, Y.-H. Song, Pyrrolizidine alkaloids-induced hepatic sinusoidal obstruction syndrome: Pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, treatment, and outcomes. *World J Gastroenterol* **25**, 3753-3763 (2019).
39. D. C. Valla, D. Cazals-Hatem, Sinusoidal obstruction syndrome. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* **40**, 378-385 (2016).
40. L. D. DeLeve, H. M. Shulman, G. B. McDonald, Toxic Injury to Hepatic Sinusoids: Sinusoidal Obstruction Syndrome (Veno-Occlusive Disease). *Seminars in liver disease* **22**, 27-41 (2002).
41. D. B. Jelliffe, G. Bras, K. L. Stuart, Veno-occlusive disease of the liver. *Pediatrics* **14**, 334–339 (1954).
42. E. Röder, Wie verbreitet und wie gefährlich sind Pyrrolizidinalkaloide? *Pharmazie in unserer Zeit* **13**, 33-38 (1984).
43. A. R. Mattocks, H. E. Drivera, R. H. Barbourb, D. J. Robins, Metabolism and toxicity of synthetic analogues of macrocyclic diester pyrrolizidine alkaloids. *Chem-Biol Interactions* **58**, 95-108 (1986).
44. BfR, Pyrrolizidinalkaloide in Lebensmitteln: Eine Herausforderung für Landwirtschaft und Verbraucherschutz. *BfR-Forum Verbraucherschutz- Presseinformationen*, 37/2015, geöffnet am 18.08.2020, (2015).
45. International Programme on Chemical Safety, Pyrrolizidine alkaloids *Environmental Health Criteria 80*, WHO, (1988).
46. J. A. Edgar, S. M. Colegate, M. Boppre, R. J. Molyneux, Pyrrolizidine alkaloids in food: a spectrum of potential health consequences. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* **28**, 308-324 (2011).
47. J. A. Edgar, Food contaminants capable of causing cancer, pulmonary hypertension and cirrhosis. *Med J Aust* **200**, 73-74 (2014).
48. M. Khordadmehr, F. Rezazadeh, J. Ashrafi-Helan, M. M. Hosseini-Ghomi, The first report of pyrrolizidine alkaloid poisoning in a gazelle (*Gazella Subgutturosa*) - histopathologic diagnosis. *Interdiscip Toxicol* **9**, 30-33 (2016).
49. J. E. Peterson, M. V. Jago, Comparison of the toxic effects of dehydroheliotridine and heliotrine in pregnant rats and their embryos. *J. Pathol.* **131**, 339–355 (1980).

50. IARC, Some Naturally Occurring Substances. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to man* **10**, 265-342 (1976).
51. U.S. Department of Health, Education and Welfare, Bioassay of Lasiocarpine for possible Carcinogenicity. *National Cancer Institute, Carcinogenesis, Technical report series* **39**, (1978).
52. U.S. Department of Health and Human Services, Toxicology and Carcinogenesis studies of Riddelliine. *National Toxicology Program, Technical Report* **03-4442**, (2003).
53. R. A. Swick, P. R. Cheeke, N. M. Patton, D. R. Buhler, Absorption and excretion of pyrrolizidine (senecio) alkaloids and their effects on mineral metabolism in rabbits. *Journal of Animal Science* **55**, 1417-1424 (1982).
54. S. Hessel *et al.*, Structure-activity relationship in the passage of different pyrrolizidine alkaloids through the gastrointestinal barrier: ABCB1 excretes heliotrine and echimidine. *Mol Nutr Food Res* **58**, 995-1004 (2014).
55. R. Lindigkeit *et al.*, The two faces of pyrrolizidine alkaloids: the role of the tertiary amine and its N-oxide in chemical defense of insects with acquired plant alkaloids. *Eur. J. Biochemie* **245**, 626-636 (1997).
56. BfR, Salatmischung mit Pyrrolizidinalkaloid-haltigem Geiskraut verunreinigt. *Stellungnahme Nr. 028/2007, geöffnet am 21.01.2022*, (2007).
57. S. Schramm, N. Köhler, W. Rozhon, Pyrrolizidine Alkaloids: Biosynthesis, Biological Activities and Occurrence in Crop Plants. *Molecules* **24**, 498 (2019).
58. X. Yan *et al.*, Identification of Toxic Pyrrolizidine Alkaloids and Their Common Hepatotoxicity Mechanism. *Int J Mol Sci* **17**, 318 (2016).
59. R. A. Cooper, R. J. Huxtable, A simple procedure for determining the aqueous half-lives of pyrrolic metabolites of pyrrolizidine alkaloids *Toxicol* **34**, 604-607 (1996).
60. A. R. Mattocks, Toxicity of Pyrrolizidine Alkaloids. *Nature* **217**, 723-728 (1968).
61. H.-Y. Kim, F. R. Stermitz, J. K.-K. Li, R. A. Coulombe Jr., Comparative DNA Cross-linking by Activated Pyrrolizidine Alkaloids. *Food Chem Toxicol* **37**, 619-625 (1999).
62. Q. Xia, M. W. Chou, J. A. Edgar, D. R. Doerge, P. P. Fu, Formation of DHP-derived DNA adducts from metabolic activation of the prototype heliotridine-type pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Cancer Lett* **231**, 138-145 (2006).
63. Q. Xia, M. W. Chou, F. F. Kadlubar, P. C. Chan, P. P. Fu, Human Liver Microsomal Metabolism and DNA Adduct Formation of the Tumorigenic Pyrrolizidine Alkaloid, Riddelliine. *Chem Res Toxicol* **16** 66–73 (2003).
64. M. Yang, J. Ruan, P. P. Fu, G. Lin, Cytotoxicity of pyrrolizidine alkaloid in human hepatic parenchymal and sinusoidal endothelial cells: Firm evidence for the reactive metabolites mediated pyrrolizidine alkaloid-induced hepatotoxicity. *Chem Biol Interact* **243**, 119-126 (2016).
65. X. He, Q. Xia, K. Woodling, G. Lin, P. P. Fu, Pyrrolizidine alkaloid-derived DNA adducts are common toxicological biomarkers of pyrrolizidine alkaloid N-oxides. *J Food Drug Anal* **25**, 984-991 (2017).

LITERATURVERZEICHNIS

66. Q. Xia *et al.*, Pyrrolizidine Alkaloid-Derived DNA Adducts as a Common Biological Biomarker of Pyrrolizidine Alkaloid-Induced Tumorigenicity. *Chem Res Toxicol* **26**, 1384-1396 (2013).
67. R. J. Huxtable, Activation and pulmonary toxicity of pyrrolizidine alkaloids. *Pharmac. Ther.* **47**, 371-389 (1990).
68. Q. Xia, L. Ma, X. He, L. Cai, P. P. Fu, 7-Glutathione Pyrrole Adduct: A Potential DNA Reactive Metabolite of Pyrrolizidine Alkaloids. *Chem Res Toxicol* **28**, 615-620 (2015).
69. BfR, Aktualisierte Risikobewertung zu Gehalten an 1,2-ungesättigten Pyrrolizidinalkaloiden (PA) in Lebensmitteln. *Stellungnahme Nr. 026/2020 geöffnet am 21.01.2022*, (2020).
70. Bundesgesundheitsamt, Bekanntmachung über die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln. *Bundesanzeiger*, (1992).
71. Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC)/EMA, Public statement on the use of herbal medicinal products containing toxic, unsaturated pyrrolizidine alkaloids (PAs). (2014).
72. Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde, Arbeitskreis Nahrungsergänzungsmittel, Code of Practice zur Vermeidung und Verringerung der Kontamination pflanzlicher Nahrungsergänzungsmittel mit Pyrrolizidinalkaloiden. (2019).
73. M. Waldherr *et al.*, Use of HuH6 and other human-derived hepatoma lines for the detection of genotoxins: a new hope for laboratory animals? *Arch Toxicol* **92**, 921-934 (2018).
74. I. Goldstein *et al.*, Chemotherapeutic agents induce the expression and activity of their clearing enzyme CYP3A4 by activating p53. *Carcinogenesis* **34**, 190-198 (2013).
75. H. Hosomi, T. Fukami, A. Iwamura, M. Nakajima, T. Yokoi, Development of a Highly Sensitive Cytotoxicity Assay System for CYP3A4-Mediated Metabolic Activation. *Drug Metab Dispos* **39**, 1388-1395 (2011).
76. M. Misik *et al.*, Cytome Micronucleus Assays with a Metabolically Competent Human Derived Liver Cell Line (Huh6): A Promising Approach for Routine Testing of Chemicals? *Environmental and molecular mutagenesis* **60**, 134-144 (2019).
77. M. Fenech, Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc* **2**, 1084-1104 (2007).
78. M. Kirsch-Volders, A. Elhajouji, E. Cundari, P. Van Hummelen, The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **392**, 19-30 (1997).
79. H. Stopper, S. O. Müller, Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview. *Toxicology in Vitro* **11**, 661-667 (1997).
80. W. Schmid, The micronucleus test. *Mutation Research* **31**, 9-15 (1975).
81. D. Schiffmann, U. De Boni, Dislocation of chromatin elements in prophase induced by diethylstilbestrol: a novel mechanism by which micronuclei can arise.

- Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **246**, 113-122 (1991).
82. H. Hintzsche *et al.*, Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* **771**, 85-98 (2017).
 83. European Chemicals Agency, Benzo[def]chrysene (Benzo[a]pyrene). *SVHC Support Document*, (2016).
 84. M. E. de Jonge, A. D. R. Huitema, S. Rodenhuis, J. H. Beijnen, Clinical Pharmacokinetics of Cyclophosphamide. *Clin Pharmacokinet* **44**, 1135-1164 (2005).
 85. T. R. Crook, R. L. Souhami, ., G. D. Whyman, A. E. M. McLean, Glutathione Depletion as a Determinant of Sensitivity of Human Leukemia Cells to Cyclophosphamide. **46**, 5035-5038 (1986).
 86. OECD, OECD Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline 487: In Vitro Micronucleus Test. 1-13 (2004).
 87. P. L. Olive, J. P. Banath, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* **1**, 23-29 (2006).
 88. D. W. Fairbairn, P. L. Olive, K. L. O'Neill, The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology* **339**, 37-59 (1995).
 89. N. P. Singh, M. T. McCoy, R. R. Tice, E. L. Schneider, A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research* **175**, 184-191 (1988).
 90. R. R. Tice *et al.*, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environmental and molecular mutagenesis* **35**, 206-221 (2000).
 91. Y. Miyamae *et al.*, Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens using the single cell gel electrophoresis (Comet) assay, 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **393**, 107-113 (1997).
 92. A. R. Collins, The Comet Assay for DNA Damage and Repair. *Molecular Biotechnology* **26**, 249-261 (2004).
 93. M. Klaude, S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnström, The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutation Research/DNA Repair* **363**, 89-96 (1996).
 94. M. Uhl, C. Helma, S. Knasmüller, Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **468**, 213-225 (2000).
 95. A. Prakash, S. Doublie, S. S. Wallace, The Fpg/Nei Family of DNA Glycosylases: Substrates, Structures, and Search for Damage. *Prog Mol Biol Transl Sci* **110**, 71-91 (2012).
 96. G. Speit, P. Schütz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann, Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* **146**, 151-158 (2004).
 97. M. Dusinska, A. Collins, Detection of Oxidised Purines and UV-induced Photoproducts in DNA of Single Cells, by Inclusion of Lesion-specific Enzymes in the Comet Assay. *ATLA* **24**, 405-411 (1996).

98. M. Bhagwat, J. A. Gerlt, 3'- and 5'-Strand Cleavage Reactions Catalyzed by the Fpg Protein from *Escherichia coli* Occur via Successive β - and δ -Elimination Mechanisms, Respectively. *Biochemistry* **35**, 659–665 (1996).
99. B. Rotman, B. W. Papermaster, Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **55**, 134-141 (1966).
100. G. Koppen *et al.*, The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* **32**, 397-408 (2017).
101. L. J. Kuo, L.-X. Yang, γ -H2AX – A Novel Biomarker for DNA Double-strand Breaks. *in vivo* **22**, 305-310 (2008).
102. HepaRG, Origins of the HepaRG cell line. *geöffnet am 19.03.2022*.
103. C. Guguen-Guillouzo, A. Guillouzo, General review on in vitro hepatocyte models and their applications. *Methods Mol Biol* **640**, 1-40 (2010).
104. L. Le Hegarat *et al.*, Performance of comet and micronucleus assays in metabolic competent HepaRG cells to predict in vivo genotoxicity. *Toxicol Sci* **138**, 300-309 (2014).
105. S. Knasmüller *et al.*, Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* **198**, 315-328 (2004).
106. S. Wilkening, F. Stahl, A. Bader, Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties. *Drug Metab Dispos* **31**, 1035-1042 (2003).
107. I. Doi, Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gan* **67**, 1-10 (1976).
108. J. A. Heddle, M. Fenech, M. Hayashi, J. T. MacGregor, Reflections on the development of micronucleus assays. *Mutagenesis* **26**, 3-10 (2011).
109. M. Nüsse, K. Marx, Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **392**, 109-115 (1997).
110. K. A. Mills, R. Chess-Williams, C. McDermott, Novel insights into the mechanism of cyclophosphamide-induced bladder toxicity: chloroacetaldehyde's contribution to urothelial dysfunction in vitro. *Arch Toxicol* **93**, 3291-3303 (2019).
111. M. Haubitz, Acute and Long-term Toxicity of Cyclophosphamide. *Transplantationsmedizin* **19**, (2007).
112. C. Ponticelli, P. Passerini, Alkylating Agents and Purine Analogues in Primary Glomerulonephritis with Nephrotic Syndrome. *Nephrol Dial Transplant* **6**, 381-388 (1991).
113. M. Lawson, A. Vasilaras, A. De Vries, P. Mactaggart, D. Nicol, Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide. *Scand J Urol Nephrol* **42**, 309-317 (2008).
114. C. Mukhtyar *et al.*, EULAR recommendations for the management of primary small and medium vessel vasculitis. *Ann Rheum Dis* **68**, 310-317 (2009).
115. O. M. Colvin, An Overview of Cyclophosphamide Development and Clinical Applications. *Current Pharmaceutical Design* **5**, 555-560 (1999).

116. S. R. Subramaniam, R. A. Cader, R. Mohd, K. W. Yen, H. A. Ghafor, Low-dose cyclophosphamide-induced acute hepatotoxicity. *Am J Case Rep* **14**, 345-349 (2013).
117. J. R. Chapman, M. R. G. Taylor, S. J. Boulton, Playing the End Game: DNA Double-Strand Break Repair Pathway Choice. *Mol Cell* **47**, 497-510 (2012).
118. E. E. Bankoglu, C. Schuele, H. Stopper, Cell survival after DNA damage in the comet assay. *Arch Toxicol* **95**, 3803-3813 (2021).
119. A. R. Collins, S. J. Duthie, V. L. Dobson, Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* **14**, 1733-1735 (1993).
120. L. M. Schott, In vitro Untersuchung zur Genotoxizität ausgewählter Pyrrolizidinalkaloide. *Dissertation, Universität Würzburg*, (2021).
121. L. Brulikova, J. Hlavac, P. Hradil, DNA Interstrand Cross-Linking Agents and their Chemotherapeutic Potential. *Curr Med Chem* **19**, 364-385 (2012).
122. J. Hilton, Deoxyribonucleic acid crosslinking by 4-Hydroperoxycyclophosphamide in cyclophosphamide-sensitive and -resistant L1210 cells. *Biochemical Pharmacology* **33**, 1867-1872 (1984).
123. H. Sies, Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol* **11**, 613-619 (2017).
124. N. S. A. Hadi *et al.*, Genotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids in human hepatoma cell lines HepG2 and Huh6. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **861-862**, 503305 (2021).
125. J.-E. Seo *et al.*, Quantitative comparison of in vitro genotoxicity between metabolically competent HepaRG cells and HepG2 cells using the high-throughput high-content CometChip assay. *Arch Toxicol* **93**, 1433-1448 (2019).
126. D. Kirkland *et al.*, Updated recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **795**, 7-30 (2016).
127. J. Louise *et al.*, Determination of genotoxic potencies of pyrrolizidine alkaloids in HepaRG cells using the γ H2AX assay. *Food Chem Toxicol* **131**, 110532 (2019).
128. J. R. Hincks *et al.*, DNA Cross-Linking in Mammalian Cells by Pyrrolizidine Alkaloids: Structure-Activity Relationships. *Toxicology and applied pharmacology* **111**, 90-98 (1991).
129. T. Bessho, Induction of DNA Replication-mediated Double Strand Breaks by Psoralen DNA Interstrand Cross-links. *J Biol Chem* **278**, 5250-5254 (2003).
130. M. L. G. Dronkert, R. Kanaar, Repair of DNA interstrand cross-links. *Mutation Research* **486**, 217-247 (2001).
131. B. Kopp, L. Khoury, M. Audebert, Validation of the γ H2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch Toxicol* **93**, 2103-2114 (2019).
132. N. Quesnot *et al.*, Evaluation of genotoxicity using automated detection of γ H2AX in metabolically competent HepaRG cells. *Mutagenesis* **31**, 43-50 (2016).
133. L. Khoury, D. Zalko, M. Audebert, Validation of High-Throughput Genotoxicity Assay Screening Using γ H2AX In-Cell Western Assay on HepG2 Cells. *Environmental and molecular mutagenesis* **54**, 737-746 (2013).

134. J. Ning *et al.*, Use of an in vitro-in silico testing strategy to predict inter-species and inter-ethnic human differences in liver toxicity of the pyrrolizidine alkaloids lasiocarpine and riddelliine. *Arch Toxicol* **93**, 801-818 (2019).
135. I. Geburek, D. Schrenk, A. These, In vitro biotransformation of pyrrolizidine alkaloids in different species: part II-identification and quantitative assessment of the metabolite profile of six structurally different pyrrolizidine alkaloids. *Arch Toxicol* **94**, 3759-3774 (2020).
136. L. Chen, J. Ning, J. Louisse, S. Wesseling, I. M. C. M. Rietjens, Use of physiologically based kinetic modelling-facilitated reverse dosimetry to convert in vitro cytotoxicity data to predicted in vivo liver toxicity of lasiocarpine and riddelliine in rat. *Food Chem Toxicol* **116**, 216-226 (2018).
137. Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft, Nutzen/Risiko-Bewertung Pyrrolizidinalkaloid-haltiger Fertigarzneimittel. *Deutsches Ärzteblatt, geöffnet am 23.01.2022* **89**, (1992).
138. Europäische Kommission, Verordnung (EU) 2020/2040 der Kommission vom 11. Dezember 2020 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 hinsichtlich der Höchstgehalte an Pyrrolizidinalkaloiden in bestimmten Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union*, (2017).
139. I. Mädge, M. Gehling, C. Schöne, P. Winterhalter, A. These, Pyrrolizidine alkaloid profiling of four Boraginaceae species from Northern Germany and implications for the analytical scope proposed for monitoring of maximum levels. *Food Addit Contam Part A* **37**, 1339-1358 (2020).
140. P. Grewal, J. Ahmad, Severe liver injury due to herbal and dietary supplements and the role of liver transplantation. *World J Gastroenterol* **25**, 6704-6712 (2019).

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

I. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
BaP	Benzo(a)pyren
BSA	bovine serum albumine (Rinderserumalbumin)
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BMDL ₁₀	Benchmark Dose Lower Confidence Limit, 10 Prozent
bzw.	beziehungsweise
CBPI	Cytokinesis block proliferation index (Zytokinese-Block-Proliferationsindex)
CPA	Cyclophosphamid
Cyto-B	Cytochalasin-B
DABCO	1,4-Diazabicyclo(2,2,2)octan
D	Deutschland
DHP	6,7-Dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin
DKZ	Doppelkernige Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFSA	European Food Safety Authority (Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit)
EKZ	Einkernige Zelle
et al.	et alii
etc.	et cetera
FBS	fetal bovine serum (Fetales Kälberserum)
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FPG	Formamidopyrimidin-Glykosylase

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

g/mg/μg	Gramm/Milligramm/Mikrogramm
GSH	Glutathion (γ-L-Glutamyl-L-cysteinylglycin)
h	Stunde(n)
HPM-Agarose	high melting point agarose (Agarose mit hohem Schmelzpunkt)
l/ml/μl	Liter/Milliliter/Mikroliter
kg	Kilogramm
Lasio	Lasiocarpin
LMP-Agarose	low melting point agarose (Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt)
m/cm/mm	Meter/Zentimeter/Millimeter
M/mM/μM	Molar/Millimolar/Mikromolar
min	Minute(n)
MK	Mikrokern(e)
n	Zahl der Replikate
NaOH	Natriumhydroxid
NEM	Nahrungsergänzungsmittel
NK	Negativkontrolle
PA	Pyrrolizidinalkaloid(e)
PBS	phosphate buffered saline (Phosphatpuffersalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
pH	negative dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Prof.	Professor
Ridd	Riddelliin
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

VOD	veno-occlusive disease (venös-okklusive Leberkrankheit)
γ -H2AX	phosphoryliertes Histon H2AX

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

II. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: GRUNDSTRUKTUR DER PYRROLIZIDINALKALOIDE; BIZYKLISCHE NECINBASE (A) MIT UNGESÄTTIGTER DOPPELBINDUNG AN 1,2-POSITION (SIEHE PFEIL), ÜBER CARBOXYLGRUPPEN MIT DER NECINBASE VERESTERTE NECINSÄURE (B); DIE STRUKTURFORMEL WURDE NACH MOREIRA ET AL. (26) SKIZZIERT.	2
ABBILDUNG 2: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL VON OTONECIN (A) UND PLATYNECIN (B) NACH VORLAGE AUS MOREIRA ET AL. (26)	2
ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL VON LASIOCARPIN NACH VORLAGE AUS SCHRENK ET AL. (17).....	3
ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL VON RIDDELLIIN NACH VORLAGE AUS NING ET AL. (29). 3	
ABBILDUNG 5: CHEMISCHE STRUKTURFORMELN EINES RETRONECIN-TYPS (A) UND EINES HELIOTRIDIN-TYPS (B) NACH VORLAGE AUS MOREIRA ET AL. (26).	4
ABBILDUNG 6: METABOLISIERUNGSWEGE VON PYRROLIZIDINALKALOIDEN AM BEISPIEL VON RIDDELLIIN; ROT MARKIERTE STOFFWECHSELWEGE KENNZEICHNEN GIFTUNGSMECHANISMEN, GRÜN MARKIERTE ENTGIFTUNGSMECHANISMEN; MODIFIZIERTE, SCHEMATISCHE DARSTELLUNG NACH MOREIRA ET AL. (26) UND NING ET AL. (29); DHP: 6,7-DIHYDRO-7-HYDROXY-1-HYDROXYMETHYL-5H-PYRROLIZIN, GSH: GLUTATHION, PA-N-OXID: PYRROLIZIDINALKALOID-N-OXID.	10
ABBILDUNG 7: GEFÄRBTES MIKROKERNPRÄPARAT UNTER DEM MIKROSKOP IM MIKROKERNTEST, ZELLKERNE SIND UMGEHEN VON ORANGE GEFÄRBTEM ZYTOSOL; A: EINKERNIGE ZELLE MIT GRÜN GEFÄRBTEM ZELLKERN (PFEIL); B: DOPPELKERNIGE ZELLE MIT MIKROKERN (PFEIL); C: APOPTOTISCHE ZELLE (PFEIL) MIT CHARAKTERISTISCHER PYKNOTISCHER MORPHOLOGIE; D: ZELLE IN DER MITOSE (PFEIL) MIT CHARAKTERISTISCHER MORPHOLOGIE.	23
ABBILDUNG 8: LINKS IST EINE ZELLE MIT ZELLKERN VOR DER GABE DES ZYKINESE-INHIBITORS CYTOCHALASIN-B (CYTO-B) SKIZZIERT; RECHTS EINE BEHANDELTE ZELLE MIT ZELLKERN NACH 48 H INKUBATION MIT CYTOCHALASIN-B; ZU ERKENNEN IST NACH ERFOLGTER KERNTHEILUNG DIE ENTSTEHUNG EINES MIKROKERNS (KLEINER PFEIL).	24
ABBILDUNG 9: REPRÄSENTATIVES BEISPIEL VON ZELLKERNEN DER ZELLINIE HUH6 UND DEREN DNA-SCHWEIF NACH EINZELZELLEKTROPHORESE UND FÄRBUNG; A: POSITIVKONTROLLE MIT VIEL DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG MIT CYCLOPHOSPHAMID; B: NEGATIVKONTROLLE MIT WENIG BZW. KEINER DNA IM SCHWEIF; FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG UNTER 200-FACHER VERGRÖßERUNG.	27
ABBILDUNG 10: REPRÄSENTATIVES BEISPIEL EINER GEISTERZELLE DER ZELLINIE HUH6 UND DEREN DNA-SCHWEIF NACH EINZELZELLEKTROPHORESE UND FÄRBUNG; FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG UNTER 200-FACHER VERGRÖßERUNG.	30
ABBILDUNG 11: MIKROKERNINDUKTION DURCH BENZO(A)PYREN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTIEGENDER	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

REIHENFOLGE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	33
ABBILDUNG 12: MIKROKERNINDUKTION DURCH CYCLOPHOSPHAMID IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, * = $P \leq 0,05$ VS. KONTROLLE IM T-TEST.....	34
ABBILDUNG 13: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH BENZO(A)PYREN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	35
ABBILDUNG 14: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH CYCLOPHOSPHAMID IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	35
ABBILDUNG 15: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH BENZO(A)PYREN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	36
ABBILDUNG 16: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH CYCLOPHOSPHAMID IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	37
ABBILDUNG 17: MIKROKERNINDUKTION DURCH RIDDELLIIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, * = $P \leq 0,05$ VS. KONTROLLE IM T-TEST.....	38
ABBILDUNG 18: MIKROKERNINDUKTION DURCH LASIOCARPIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, * = P ≤ 0,05 VS. KONTROLLE IM T-TEST.....	39
ABBILDUNG 19: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH RIDDELLIIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	40
ABBILDUNG 20: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH LASIOCARPIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, * = P ≤ 0,05 VS. KONTROLLE IM T-TEST.....	40
ABBILDUNG 21: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH RIDDELLIIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.....	41
ABBILDUNG 22: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH LASIOCARPIN IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE, IN AUFSTEIGENDER REIHENFOLGE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	41
ABBILDUNG 23: MIKROKERNINDUKTION DURCH 0,32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 10 µM RIDDELLIIN (RID) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	42
ABBILDUNG 24: MIKROKERNINDUKTION DURCH 32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 320 µM RIDDELLIIN (RID) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: TOTALE ANZAHL DER MK-HALTIGEN ZELLEN PRO 1000 DOPPELKERNIGEN ZELLEN (DKZ); CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, * = P ≤ 0,05 VS. KONTROLLE IM T-TEST; ▲ = P ≤ 0,05 VS. 32 µM LASIOCARPIN UND 320 µM RIDDELLIIN IM T-TEST.	43
ABBILDUNG 25: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH 0,32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 10 µM RIDDELLIIN (RID) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	44
ABBILDUNG 26: INDUKTION VON APOPTOSE IM MIKROKERNTEST DURCH 32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 320 µM RIDDELLIIN (RIDD) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: APOPTOSEN PRO 1000 ZELLEN; CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	44
ABBILDUNG 27: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH 0,32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 10 µM RIDDELLIIN (RIDD) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	45
ABBILDUNG 28: INDUKTION VON MITOSE IM MIKROKERNTEST DURCH 32 µM LASIOCARPIN (LASIO) UND 320 µM RIDDELLIIN (RIDD) IN HUH6 LEBERZELLEN; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: MITOSEN PRO 1000 ZELLEN; CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX (CBPI) DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT.	46
ABBILDUNG 29: DARSTELLUNG DER PROZENTUALEN MENGE AN DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 0,32 µM LASIOCARPIN (LASIO), 100 µM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 µM CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: PROZENTUALER ANTEIL AN DNA IM SCHWEIF; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP; VITALITÄT DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT.	48
ABBILDUNG 30: DARSTELLUNG DER PROZENTUALEN MENGE AN DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 32 µM LASIOCARPIN (LASIO), 320 µM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 µM CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: PROZENTUALER ANTEIL AN DNA IM SCHWEIF; N=3, MITTELWERT ± STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP; VITALITÄT DURCH SCHWARZEN GRAPHEN DARGESTELLT.	48
ABBILDUNG 31: INDUKTION VON GEISTERZELLEN IM COMET ASSAY NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 0,32 µM LASIOCARPIN (LASIO), 100 µM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 µM CPA	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- (CYCLOPHOSPHAMID, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: ANZAHL AN GEISTERZELLEN PRO 100 ZELLEN; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.49
- ABBILDUNG 32:** INDUKTION VON GEISTERZELLEN IM COMET ASSAY NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 32 μ M LASIOCARPIN (LASIO), 320 μ M RIDDELLIIN (RID) UND 100 μ M CPA (CYCLOPHOSPHAMID, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: ANZAHL AN GEISTERZELLEN PRO 100 ZELLEN; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.49
- ABBILDUNG 33:** DARSTELLUNG DER PROZENTUALEN MENGE AN DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 0,32 μ M LASIOCARPIN (LASIO), 100 μ M RIDDELLIIN (RID) UND 100 μ M CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE) IM VERGLEICH ZWISCHEN PUFFER- (RAHMENLOS, JEWEILS LINKS) UND FPG-BEHANDLUNG (MIT RAHMEN, JEWEILS RECHTS); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: PROZENTUALER ANTEIL AN DNA IM SCHWEIF; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.50
- ABBILDUNG 34:** DARSTELLUNG DER DIFFERENZ DER DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG MIT 0,32 μ M LASIOCARPIN (LASIO), 100 μ M RIDDELLIIN (RID) UND 100 μ M CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE) IM VERGLEICH ZWISCHEN PUFFER- UND FPG-BEHANDLUNG; EINFARBIGE BALKEN: DNA-SCHADEN-DIFFERENZ ZUGUNSTEN DER MIT FPG-BEHANDELTE ZELLEN; GEMUSTERTER BALKEN: DNA-SCHADEN-DIFFERENZ ZUGUNSTEN DER PUFFERBEHANDLUNG; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: DIFFERENZ DER DNA IM SCHWEIF IN PROZENT; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT; AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.51
- ABBILDUNG 35:** DARSTELLUNG DER PROZENTUALEN MENGE AN DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 32 μ M LASIOCARPIN (LASIO), 320 μ M RIDDELLIIN (RID) UND 100 μ M CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE) IM VERGLEICH ZWISCHEN PUFFER- (RAHMENLOS, JEWEILS LINKS) UND FPG-BEHANDLUNG (MIT RAHMEN, JEWEILS RECHTS); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: PROZENTUALER ANTEIL AN DNA IM SCHWEIF; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.52

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- ABBILDUNG 36:** DARSTELLUNG DER DIFFERENZ DER DNA IM SCHWEIF NACH BEHANDLUNG MIT 32 μM LASIOCARPIN (LASIO), 320 μM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 μM CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE) IM VERGLEICH ZWISCHEN PUFFER- UND FPG-BEHANDLUNG; EINFARBIGE BALKEN: DNA-SCHADEN-DIFFERENZ ZUGUNSTEN DER MIT FPG-BEHANDELTEN ZELLEN; GEMUSTERTER BALKEN: DNA-SCHADEN-DIFFERENZ ZUGUNSTEN DER PUFFERBEHANDLUNG; X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: DIFFERENZ DER DNA IM SCHWEIF IN PROZENT; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. AUSWERTUNG DER ZELLEN MIT DEM FLUORESZENZMIKROSKOP.52
- ABBILDUNG 37:** IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNG DES PHOSPHORYLIERTEN HISTONS H2AX ZUR DETEKTION VON PA-INDUZIERTEN DOPPELSTRANGBRÜCHEN DER DNA IN HUH6 ZELLEN; REPRÄSENTATIVE BILDER DER γ -H2AX-FÄRBUNG NACH INKUBATION DER ZELLEN MIT DER NEGATIVKONTROLLE 2% DIMETHYLSULFOXID (DMSO, A) UND DER POSITIVKONTROLLE 32 μM LASIOCARPIN (LASIO, B).....53
- ABBILDUNG 38:** DARSTELLUNG DER DURCHSCHNITTLICHEN FLUORESZENZINTENSITÄT NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 0,32 μM LASIOCARPIN (LASIO), 10 μM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 μM CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: DURCHSCHNITTLICHE FLUORESZENZINTENSITÄT PRO ZELLE; ANZAHL DER FOTOS PRO OBJEKTTRÄGER: 2-7; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. DMSO: DIMETHYLSULFOXID (NEGATIVKONTROLLE).54
- ABBILDUNG 39:** DARSTELLUNG DER DURCHSCHNITTLICHEN FLUORESZENZINTENSITÄT NACH BEHANDLUNG DER HUH6 ZELLEN MIT 32 μM LASIOCARPIN (LASIO), 320 μM RIDDELLIIN (RIDD) UND 100 μM CYCLOPHOSPHAMID (CPA, POSITIVKONTROLLE); X-ACHSE: KONZENTRATIONEN DER SUBSTANZ, MIT DER BEHANDELT WURDE; Y-ACHSE: DURCHSCHNITTLICHE FLUORESZENZINTENSITÄT PRO ZELLE; ANZAHL DER FOTOS PRO OBJEKTTRÄGER: 2-7; N=3, MITTELWERT \pm STANDARDFEHLER, ES WURDE KEINE STATISTISCHE SIGNIFIKANZ DETEKTIERT. DMSO: DIMETHYLSULFOXID (NEGATIVKONTROLLE).54

TABELLENVERZEICHNIS

III. Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: MIKROSKOPE UND KAMERAS; D: DEUTSCHLAND.	15
TABELLE 2: PUFFER, MEDIUM UND DESSEN ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR; D: DEUTSCHLAND; FBS: FETAL BOVINE SERUM BZW. FETALES KÄLBERSERUM; NAOH: NATRIUMHYDROXID; PBS: PHOSPHAT BUFFERED SALINE BZW. PHOSPHATPUFFERSALZLÖSUNG.	15
TABELLE 3: ZUSAMMENSTELLUNG DER BENUTZTEN PUFFER/LÖSUNGEN; ABCAM PLC (CAMBRIDGE, VEREINIGTES KÖNIGREICH); BIOCHROM GMBH (BERLIN, D); BIOTREND CHEMIKALIEN GMBH (KÖLN, D); CARL ROTH GMBH & CO. KG (KARLSRUHE, D); MERCK KGAA (DARMSTADT, D); SIGMA-ALDRICH GMBH (MÜNCHEN BZW. STEINHEIM, D); BSA: BOVINE SERUM ALBUMINE; DABCO: 1,4-DIAZABICYCLO(2,2,2)OCTAN; D: DEUTSCHLAND; DMSO: DIMETHYLSULFOXID; EDTA: ETHYLENDIAMINTETRAESSIGSÄURE; FDA: FLUORESCINDIACETAT; HMP-AGAROSE: HIGH MELTING POINT AGAROSE; LMP-AGAROSE: LOW MELTING POINT AGAROSE; NAEL: NATRIUMCHLORID; NAOH: NATRIUMHYDROXID; PBS: PHOSPHAT BUFFERED SALINE BZW. PHOSPHATPUFFERSALZLÖSUNG; PFA: PARAFORMALDEHYD; TRIS: TRIS(HYDROXYMETHYL)AMINOMETHAN.	16
TABELLE 4: SPEZIFIZIERUNG DER HUH6 ZELLINIE; MODIFIZIERTE DARSTELLUNG DER DATEN NACH WALDHERR ET AL. (73).	20
TABELLE 5: WICHTIGE ENDPUNKTE DES MIKROKERNTESTS, TABELLARISCH AUFGEFÜHRT; CBPI: CYTOKINESIS BLOCK PROLIFERATION INDEX BZW. ZYTOKINESE-BLOCK-PROLIFERATIONSINDEX; DKZ: DOPPELKERNIGE ZELLEN.....	24
TABELLE 6: MITTELWERTE DER PROZENTWERTE VITALER ZELLEN IM VITALITÄTSTEST (N=3) ± STANDARDFEHLER IN PROZENT; RIDD: RIDDELLIIN, LASIO: LASIOCARPIN, CPA: CYCLOPHOSPHAMID.	46

DANKSAGUNG

IV. Danksagung

Frau Prof. Dr. Stopper, vielen Dank, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, meine Doktorarbeit bei Ihnen schreiben zu dürfen. Es half mir sehr zu wissen, dass Sie immer ein offenes Ohr für Probleme und Fragen aller Art haben.

Meiner Betreuerin Dr. Ezgi Eylül Bankoglu danke ich für die großartige Unterstützung, den positiven Zuspruch in komplizierten Phasen der Arbeit und für die herzliche Arbeitsatmosphäre. Du hast mir vieles erleichtert, und das weiß ich sehr zu schätzen.

Danke an meine ehemaligen Kolleginnen und Kollegen Geema, Lea, Hauke und Jana aus meiner Arbeitsgruppe des toxikologischen Instituts für die tatkräftige Unterstützung und eure Hilfe, die man besonders als Anfängerin im Labor braucht.

Danke an Phytolab GmbH & Co. KG, Steigerwald Arzneimittelwerk GmbH bzw. Bayer AG für die Bereitstellung der Pyrrolizidinalkaloide.

Mein Dank gilt außerdem dem Verband der Chemischen Industrie e.V. für die Unterstützung und der dadurch entstandenen Möglichkeit, die Ergebnisse meiner Arbeit in Rennes vorstellen zu dürfen.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freundinnen und Freunden von ganzem Herzen für die unermüdliche Unterstützung danken.

LEBENS LAUF

V. Lebenslauf

VI. Veröffentlichungen und Kongressteilnahmen

Teile dieser Dissertation wurden auf einer internationalen Konferenz präsentiert bzw. veröffentlicht:

2019 Investigating the genotoxic potential of selected pyrrolizidine alkaloids *in vitro*,

Vanessa Magali Ramge, Dr. Ezgi Eyluel Bankoglu, Prof. Dr. Helga Stopper

„EEMGS/SFTG Meeting“, 19.-23. Mai 2019, Rennes, Frankreich

2021 Genotoxicity of selected pyrrolizidine alkaloids in human hepatoma cell lines

HepG2 and Huh6,

Naji Said Aboud Hadi, Dr. Ezgi Eyluel Bankoglu, Lea Schott, Eva Leopoldsberger,

Vanessa Ramge, Olaf Kelber, Hartwig Sievers, Prof. Dr. Helga Stopper

Journal: Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 861-862 (2021) 503305