

Untersuchungen zur Antigentoxizität von
Eruca sativa-Pflanzenextrakt, sowie eines seiner
Isothiocyanate in humanen Hepatomzellen

Julia Franziska Schröder



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Untersuchungen zur Antigentoxizität von
Eruca sativa-Pflanzenextrakt,
sowie eines seiner Isothiocyanate in humanen Hepatomzellen**

INAUGURAL - DISSERTATION

**zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin (Dr. med.)
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

Julia Franziska Schröder

aus Minden

Gießen im Jahr 2011

Aus dem Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie

der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH

Standort Gießen

Direktor: Prof. Dr. med. Volker Mersch-Sundermann

1. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann

2. Gutachter: Univ. Prof. Dr. med. E. Roeb

Tag der Disputation: 19.11.2012

Meinen Eltern gewidmet

Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle

Albert Einstein

I. Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Herrn Prof. Dr. Volker Mersch-Sundermann für die Überlassung des interessanten Themas, die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen, Geduld und natürlich die Bereitstellung aller für die Experimente erforderlichen Mittel.

Ein sehr herzlicher Dank geht an Frau Dr. Evelyn Lamy für die Einarbeitung in die Methodik und die Ratschläge zur Durchführung der Versuche. Ihre Hilfsbereitschaft und ihr Optimismus waren sehr ermutigend. Die interessante Zeit mit lebhaften Diskussionen in freundschaftlicher Atmosphäre möchte ich nicht missen. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bei ihr bedanken. Ebenso danke ich Herrn Dr. Thorsten Stahl für die hilfreiche Unterstützung durch die chemische Analyse der Isothiocyanate.

Anja Schnecko für die labortechnische Einarbeitung und die Erläuterungen zur Arbeit mit Zellkulturen. Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. Peter Schreiner und Herrn Dipl.-Chem. Mike Kotke (Institut für Organische Chemie, JLU Gießen) für die Synthese von MTBITC und Herrn Dr. Firouz Darroudi (LUMC, Niederlande) für die Bereitstellung der HepG2-Zellen.

Ich möchte meiner Kollegin Yvonne Völkel für die Schaffung einer warmen und motivierenden Atmosphäre während langer Labortage danken. Die gemeinsame Zeit war sehr lehrreich für mich.

Nicht versäumen will ich, mich bei Tobias de Raet für die stilistischen und orthografischen Korrekturvorschläge zu bedanken.

Der größte Dank gebührt allerdings meinen Eltern, Kurt und Brunhilde Schröder, die mir das Medizinstudium und somit auch die Durchführung dieser Arbeit ermöglicht haben. Sie haben in vielfältiger Weise, insbesondere durch Ihre Geduld und Ermutigungen zum Gelingen wesentlich beigetragen. Ein herzliches Dankeschön auch an meinen Freund Matthias Hahn für jedwede Unterstützung und Aufmunterung.

Zum Schluss sei all denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

II. Inhaltsverzeichnis

I.	DANKSAGUNG	I
II.	INHALTSVERZEICHNIS	II
III.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
IV.	TABELLENVERZEICHNIS	VI
V.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG	1
2	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1	Materialien	3
2.1.1	Chemikalien, Lösungen und Testkits	3
2.1.2	Verbrauchsmaterialien und Geräte	6
2.1.3	Lösungsmittel- und Referenzkontrolle	7
2.1.4	Charakteristika der HepG2-Zelllinie	8
2.2	Methoden	11
2.2.1	Probenvorbereitung des Pflanzenmaterials	11
2.2.2	Kultivierungsmethoden der Zellkulturen	13
2.2.3	Alkalische Einzelzellelektrophorese (Cometassay)	14
2.2.4	Messung der GST-Aktivität mittels 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)	22
2.2.5	Apoptose-Messung mittels monoklonaler Antikörper	24
2.2.6	Gaschromatographie und Massenspektrometrie	26
2.2.7	Datenauswertung und Statistik	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	Gentoxische Effekte von Eruca Sativa-Pflanzenextrakt	32
3.2	Antigentoxische Effekte von Eruca Sativa-Pflanzenextrakt	34
3.3	Gentoxische Effekte von MTBITC	36
3.4	Antigentoxische Effekte von MTBITC	39
3.5	Modulation der GST in HepG2-Zellen	41
3.5.1	Eruca sativa-Pflanzenextrakt	41
3.5.2	MTBITC	42
3.6	Apoptose-Induktion in HepG2-Zellen	43
3.7	Quantifizierung von ITC in E. sativa-Pflanzenextrakt	45
3.7.1	ITC-Konzentrationen in der Trockensubstanz	45

4	DISKUSSION	47
4.1	Untersuchungsergebnisse zur Gen- und Antigen-toxizität von <i>E. sativa</i> versus bisherige Studienergebnisse	48
4.2	Chemoprotektive Wirkmechanismen von <i>Eruca sativa</i>	50
4.3	Erzielte Ergebnisse im Kontext der bisherigen Studienlage zu MTBITC	52
4.4	Ambivalente Wirkmechanismen von MTBITC	53
4.5	GST-Induktion und Apoptose begründen die protektiven Effekte des Pflanzenextraktes	55
4.6	<i>Eruca sativa</i> Aufnahme des Menschen	57
4.7	Ausblick	59
5	ZUSAMMENFASSUNG	60
6	LITERATUR	62
7	VERÖFFENTLICHUNGEN	71
8	ERKLÄRUNG	72
9	ANHANG	73

III. Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AITC	Allylithiocyanat
Apaf-1	apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1
B[a]P	Benzo[a]pyren
BITC	Benzylthiocyanat
BPDE	Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepid
CAS	Chemical Abstracts Service
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzen
CHO	Chinesische Hamster Ovarialzellen
CYP	Cytochrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DTC	Dithiocarbamate
D.w.	Dry weight
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FKS	fötale Kälberserum
FG	Frischgewicht
GC-MS/MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
GCS	γ -Glutamylcystein-Synthetase
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Wasserstoffchlorid
HO-1	Hämoxygenase-1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IARC	International Agency for Research on Cancer
ITC	Isothiocyanat
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]-quinolin
LMP	Low melting point
LUMC	Leiden University Medical Center
MeOH	Methanol
MTBITC	4-Methylthiobutylthiocyanat

MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NMP	Normal melting point
Nrf2	NF-E2-related factor 2
OTM	Olive tail moment
OD	Optische Dichte
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
PEITC	Phenylethylisothiocyanat
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
SFN	Sulforaphan
SS	Single Stranded
TL	Tail length, Schweiflänge
TR	Thioredoxin-Redukase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	Trockensubstanz
UDP	Uridindiphosphat

IV. Tabellenverzeichnis

<u>Tab. 2.1:</u>	Chemikalien und deren Hersteller _____	4
<u>Tab. 2.2:</u>	Lösungen und deren Zusammensetzung _____	5
<u>Tab. 2.3:</u>	Testkits und deren Bezugsquelle _____	6
<u>Tab. 2.4:</u>	Geräte und deren Hersteller _____	6
<u>Tab. 2.5:</u>	Ausgewählte Phase-I- und -II-Enzyme der HepG2-Zellen _____	10
<u>Tab. 2.6:</u>	Schäden die im Cometassay je nach Versuchsbedingungen nachgewiesen werden können _____	15
<u>Tab. 2.7:</u>	Parameter der GC-MS/MS _____	28
<u>Tab. 2.8:</u>	Temperaturprogramm des Gaschromatographen _____	29
<u>Tab. 3.1:</u>	OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Extrakt (24 h) _____	32
<u>Tab. 3.2:</u>	TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12, 5 - 50 µl/ml Pflanzenextrakt (24h) _____	33
<u>Tab. 3.3:</u>	OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Pflanzenextrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	35
<u>Tab. 3.4:</u>	TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Pflanzenextrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	36
<u>Tab. 3.5:</u>	OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 µM - 30 µM MTBITC (24h) _____	37
<u>Tab. 3.6:</u>	TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) _____	38
<u>Tab. 3.7:</u>	OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 µM MTBITC (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	39
<u>Tab. 3.8:</u>	TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 µM MTBITC (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	40
<u>Tab. 3.9:</u>	MW GST-Aktivität und MW prozentual zur Lösungsmittelkontrolle nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> - Pflanzenextrakt (24h) _____	42
<u>Tab. 3.10:</u>	MW GST-Aktivität und MW prozentual zur Lösungsmittelkontrolle nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 µM MTBITC (24h) _____	43
<u>Tab. 3.11:</u>	MW der Apoptoseindizes nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) _____	44
<u>Tab. 3.12:</u>	ITC-Konzentration in der TS des <i>Eruca sativa</i> _____	46

V. Abbildungsverzeichnis

<u>Abb. 2.1:</u> Benzo[a]pyren _____	7
<u>Abb. 2.2:</u> Morphologie der HepG2-Zellen _____	8
<u>Abb. 2.3:</u> HepG2-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop _____	15
<u>Abb. 2.4:</u> Schematische Darstellung der Durchführung des Cometassays _____	21
<u>Abb. 2.5:</u> Kalibrierfunktion für MTBITC _____	29
<u>Abb. 3.1:</u> OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Extrakt (24h) _____	33
<u>Abb. 3.2:</u> TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> - Extrakt (24h) _____	34
<u>Abb. 3.3:</u> OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Extrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	35
<u>Abb. 3.4 :</u> TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Extrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	36
<u>Abb. 3.5:</u> OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) _____	37
<u>Abb. 3.6:</u> TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) _	38
<u>Abb. 3.7:</u> OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 µM MTBITC (24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	39
<u>Abb. 3.8:</u> TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 –20 µM MTBITC(24h) und 50 µM B[a]P (24h) _____	40
<u>Abb. 3.9:</u> Modulation der GST-Aktivität [%] in HepG2-Zellen nach Exposition gegenüber 12,5 – 50 µl/ml <i>Eruca sativa</i> -Pflanzenextrakt (24h) _____	42
<u>Abb. 3.10:</u> Modulation der GST-Aktivität [%] in HepG2-Zellen nach Exposition gegenüber 2,5 – 25 µM MTBITC (24h) _____	43
<u>Abb. 3.11:</u> Apoptoseindizes nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) _____	45

1 Einleitung

Krebserkrankungen stellen laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes die zweithäufigste Todesursache dar. Am Beginn des Mehrschrittkonzeptes der Krebsentstehung stehen Mutationen und Deletionen auf Ebene des Genoms. Daraus folgen morphologische Veränderungen der Zelle mit unkontrollierter Proliferation, Invasion des umgebenden Gewebes und schließlich die Metastasierung. Der Plan der Krebs-Chemoprävention sieht vor, durch Arzneimittel, Ernährungsfaktoren und Naturstoffe die Krebsentstehung, sowie den Progress manifester Erkrankungen zu verhindern. Epidemiologische Daten zeigen, dass die Aufnahme von Obst und Gemüse die Entstehung einiger Krebsarten verhindern kann, darunter die Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) (VERHOEVEN et al. 1996). Rucola (*Eruca sativa*) ist ein Mitglied dieser über 350 Gattungen umfassenden Familie. Eine Vielzahl von Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien erbringen den Nachweis, dass *Brassicaceae* einer Krebsentstehung vorbeugen können (VAN POPPEL et al. 1999). Dafür werden sekundäre Pflanzenstoffe der *Brassicaceae*, die Glucosinolate und im speziellen ihre enzymatischen Abbauprodukte, die Isothiocyanate (ITC) verantwortlich gemacht (CONAWAY et al. 2002). Die ITC entstehen durch Hydrolyse der Glucosinolate vermittelt durch das Enzym Myrosinase, welches nach Schneiden oder Kauen des Gemüses frei wird (HOLST, WILLIAMSON 2004). Die chemoprotektiven Effekte der ITC beruhen hauptsächlich auf der Modulation fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Darüber hinaus können einige ITC Zellzyklusarreste und Apoptose induzieren (ZHANG 2004).

In letzter Zeit gingen die Bestrebungen zur Identifikation der in *Eruca sativa* enthaltenen ITC. Eine Studie zu antigentoxischen Effekten des Pflanzenmaterials selbst wurde bisher noch nicht durchgeführt.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der gentoxischen und vor allem antigentoxischen Wirkung von rohem *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt. Um die Effekte des Pflanzenextraktes näher zu definieren, wurde zusätzlich 4-Methylthiobutylisothiocyanat (MTBITC, Erucin), welches durch Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor (GC-MS/MS) in beachtlicher Menge im Pflanzenextrakt bestimmt werden konnte, untersucht. Hierzu wurde die alkalische Einzelzellelektrophorese (Cometassay) eingesetzt, die es ermöglicht, DNA-Schäden auf dem Niveau der einzelnen Zelle zu detektieren. Als Testzelllinie dienten metabolisch kompetente humane Hepatomzellen (HepG2), welche für die Expression von Phase-I- und Phase-II-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus bekannt sind. Da diese Enzyme die chemische Karzinogenese beeinflussen, eignen sich HepG2-Zellen

besonders für Experimente der genetischen Toxikologie (MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004). In den Experimenten zur Antigentoxizität wurden HepG2-Zellen zunächst gegenüber *E. sativa*-Extrakt und anschließend gegenüber Benzo[a]pyren (B[a]P), einem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff (PAK) exponiert. In gleicher Weise wurde die Einzelsubstanz MTBITC getestet. B[a]P ein ubiquitär vorkommendes Mutagen und starkes Karzinogen, wird hauptsächlich über die Ernährung vom Menschen aufgenommen (PHILLIPS 1999). Um die zugrundeliegenden Mechanismen der antigentoxischen Effekte von *E. sativa*-Extrakt näher zu beleuchten wurde die Induktion der Glutathion-S-Transferase (GST) gemessen. GST ist wichtig für die Entgiftung vieler Xenobiotika, so z. B. auch B[a]P (STEINKELLNER et al. 2001a). Zusätzlich wurde die Induktion von Apoptose betrachtet, da bekannt ist, dass ITC auch über Einleitung des programmierten Zelltodes chemoprotektive Wirkung zeigen (PARK et al. 2007).

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Testkits

Alle Substanzen und Lösungen die in den Versuchsreihen und bei der Zellkultivierung Verwendung fanden, sind in diesem Abschnitt genannt.

Eine Auflistung der Chemikalien und ihrer Hersteller findet sich in Tabelle 2.1.

Die Zusammensetzung der Lösungen, die für die Experimente des Cometassay nötig waren, zeigt Tabelle 2.2.

Für die Messung von GST-Aktivität und Apoptoseinduktion wurden Testkits verwendet, diese finden sich in Tabelle 2.3.

MTBITC (Erucin) wurde synthetisiert von der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. Schreiner, Institut für Organische Chemie, Justus-Liebig-Universität Giessen. Mit Hilfe von NMR und GC-MS/MS Analysen wurde die Reinheit und Identität von MTBITC (CAS-Nummer 4430-36-8) überprüft. Es ergab sich ein Reinheitsgrad, der größer als 99,9 % war. MTBITC wurde in sterilem DMSO verdünnt und bei -80°C gelagert.

Tab. 2.1: Chemikalien (Reinheitsangabe in % sofern verfügbar) und deren Hersteller

Chemikalien	Hersteller
Aceton, > 99 %	Merck, Darmstadt
Agarose LMP (Low melting point)	Serva, Heidelberg
Agarose NMP (Normal melting point)	Merck, Darmstadt
Benzo[a]pyren, 98 %	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM (Dulbecco's minimal essential medium)	PAA, Pasching (Austria)
DMSO (Dimethylsulfoxid), > 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA-Titriplex, 100 %	Merck, Darmstadt
Erythrosin-B, 95 %	Merck, Darmstadt
Ethanol, > 99 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethidium-Bromid	Sigma Aldrich, Steinheim
FKS (fötales Kälberserum)	PAA, Pasching (Austria)
Gentamicin	Sigma Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
HCl, 37 %	Merck, Darmstadt
NaCl, $\geq 99,5$ %	Roth, Karlsruhe
NaOH, > 99 %	Roth, Karlsruhe
PBS (Phosphate buffered saline)	PAA, Pasching (Austria)
S1 Nuklease	Invitrogen, Karlsruhe
Tris, 100 %	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin 2,5 %	PAA, Pasching (Austria)

Tab. 2.2: Lösungen und deren Zusammensetzung

Lösungen	Zusammensetzung	Volumenangaben
Agarose	NMP(1 %)	100 mg/10 ml PBS
	NMP (0.7 %)	70 mg/10 ml PBS
	LMP (0.5 %)	50 mg/10 ml PBS
EDTA-PBS-Lösung	EDTA	100 mg
	PBS	500 ml
Elektrophoresepuffer	NaOH (0,3 M)	12 g/l Aqua dest.
	EDTA-Titriplex (1 mM)	0,372 g/l Aqua dest.
Erytrosin-B-Lösung	Erytrosin-B	20 mg
	PBS	50 ml
Ethidium-Bromid-Lösung	Stammlösung:	
	Ethidium-Bromid/Aqua dest.	1 mg/1 ml
	Gebrauchslösung:	
Stammlösung/Aqua dest.	100 µl/900 µl	
Kulturmedium	DMEM	424,5 ml
	FKS	75 ml
	Gentamicin	500 µl
Lyselösung	NaCl (2,5 M)	146,1 g/l Aqua dest.
	EDTA-Titriplex (0,1 M)	37,22 g/l Aqua dest.
	NaOH (0,2 M)	8,0 g/l Aqua dest.
	Triton X-100 (1 %)	2 ml/198 ml
	NaOH (> 99 %)	Einstellen auf pH 10
	HCL (37 %)	
Neutralisationspuffer	Tris (0,4 M)	48,44 g/l Aqua dest.
	HCL (37 %)	Einstellen auf pH 7,5
Trypsin (0,05 %)	Trypsin (2,5 %)	1 ml
	EDTA-PBS-Lösung	49 ml

Tab. 2.3: Testkits und deren Bezugsquelle

Testkit (Katalognummer)	Hersteller
ssDNA Apoptosis ELISA Kit (APT225)	Chemicon International
Glutathione S-Transferase Assay Kit (703302)	Cayman Chemical

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Geräte

Für die Arbeiten wurden die üblichen Labormaterialien und Geräte verwendet, die jedoch hier unaufgeführt bleiben. Tabelle 2.4 zeigt die Geräte, die zusätzlich Verwendung fanden.

Tab. 2.4: Geräte und deren Hersteller

Gerät (Bezeichnung)	Hersteller
Autosampler (Combipal (CTC))	PAL System
Elektrophoresekammer (Hofer HE 100 SuperSub)	Pharmacia Biotech
Elektrophoresestromversorgungsgerät (EPS 300)	Pharmacia Biotech
Mikroplatten- Lesegerät (Infinite M 200)	Tecan
Fluoreszenzmikroskop (DMLS)	Leica
Gaschromatograph (CP-3800)	Varian
Kühlanlage für Elektrophoresekammer (MultiTemp III)	Pharmacia Biotech
Massenspektrometer (Quadrupole MS/MS 1200)	Varian
Schüttler (Roto-Shake Genie)	Scientific Industries Inc.

2.1.3 Lösungsmittel- und Referenzkontrolle

Die Verdünnung der Testsubstanzen MTBITC und B[a]P erfolgte in sterilem DMSO, welches somit als Lösungsmittelkontrolle in den betreffenden Versuchsreihen mitgeführt wurde.

DMSO ist eine klare, farblose, hygroskopische Flüssigkeit. Es hat ausgesprochen gute Lösemittleigenschaften und gehört zu den dipolaren, aprotischen Lösungsmitteln.

DMSO ist sowohl mit Wasser als auch mit vielen organischen Lösemitteln mischbar. Da es schon in geringen Konzentrationen zytotoxische Effekte zeigen kann, so auch bei HepG2-Zellen, wurde eine Endkonzentration von unter einem Prozent im Medium-Zellgemisch gewählt. In den Versuchsreihen mit *E. sativa*-Pflanzenextrakt wurde steriles destilliertes Wasser als Lösungsmittelkontrolle verwendet.

Als Referenz- bzw. Positivkontrolle, diente das zu den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK) gehörende B[a]P. Dieser fünf-Ring-PAK ist von der IARC aufgrund einer neuen Datenlage nun als nachweisliches Humankarzinogen in die Gefahrengruppe 1 klassifiziert worden.

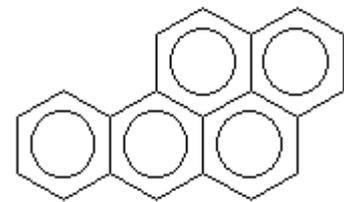


Abb. 2.1: Benzo[a]pyren

PAK sind natürlicher Bestandteil von Kohle und Erdöl und entstehen bei unvollständiger Verbrennung von ebensolchem

organischen Material. Man findet diese Stoffgruppe unter anderem in Kokereiemissionen, Steinkohlenteer, Pech, Ruß und Zigarettenrauch. PAKs lassen sich somit ubiquitär in der Umwelt finden (LUCH 2005).

Die in die Luft emittierten PAKs werden an Partikel wie Pollen und Ruß gebunden und können über Witterungseinflüsse zur Kontamination von Lebensmitteln, insbesondere Getreide und frischem Gemüse, führen. Hohe Konzentrationen von PAKs entstehen bei Gar- und Konservierungsprozessen. Eine weitere wichtige Aufnahmequelle für den Menschen sind somit Räucherwaren und Grillgut (PHILLIPS 1999).

Bei B[a]P handelt es sich um ein Promutagen das auf Zellebene durch Cytochrom P450 Enzyme, insbesondere CYP1A1, metabolisch aktiviert wird. Maßgeblich ist die Bildung von Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepoxid (BPDE), welches kovalent an DNA binden kann. Aus dieser Bindung können Fehler in der DNA-Replikation, als auch Mutationen mit nachfolgender kanzerogener Veränderung der Zielzelle resultieren (MELENDEZ-COLON et al. 1999, MELENDEZ-COLON et al. 2000).

Da sich HepG2-Zellen als besonders sensitiv gegenüber der genotoxischen Wirkung von B[a]P zeigten, wird es seit längerem in dieser Zellkultur als Positivkontrolle verwendet (MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004).

B[a]P wurde für die durchgeführten Versuche in einer Konzentration von 50 μM als Referenz- und Positivkontrolle verwendet. Diese Konzentration wurde durch Versuchsreihen im Vorfeld als optimale Wirkkonzentration ermittelt (Originaldaten s. Anhang).

2.1.4 Charakteristika der HepG2-Zelllinie

Die HepG2-Zelllinie wurde ursprünglich 1972 bei einer Leberbiopsie aus einem primären Hepatoblastom eines elfjährigen Jungen in Argentinien isoliert (ADEN et al. 1979). Die Zellen besitzen eine epithelähnliche Morphologie wie sie charakteristisch für Leberparenchymzellen ist (KNOWLES et al. 1980). Lichtmikroskopisch imponieren HepG2-Zellen flach, polygonal und wachsen als einschichtiger Zellrasen. Die Zellgröße variiert zwischen 12 und 19 μm , wobei der Nukleus mit acht bis zwölf μm Durchmesser im Gegensatz zu Hepatozyten des Menschen außergewöhnlich groß ist. (BOUMA et al. 1989).

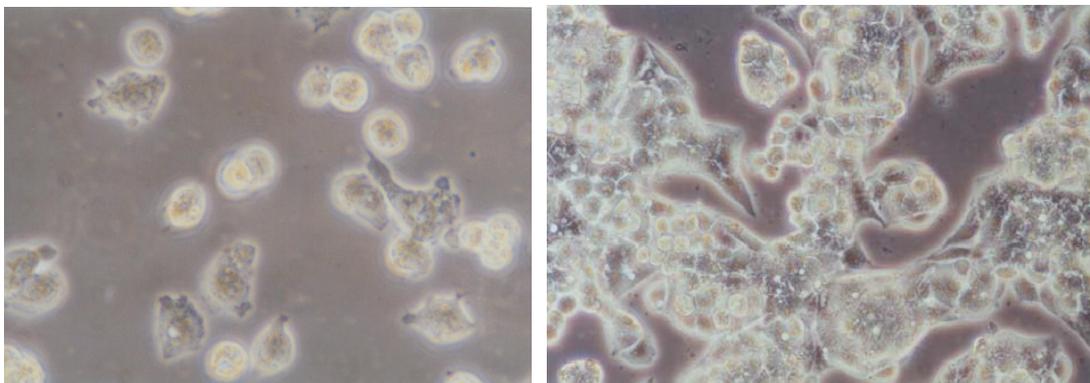


Abb. 2.2: Morphologie der HepG2-Zellen (Wachstumszeit 24 h und 3 Tage)

Die HepG2-Zellen besitzen einen aneuploiden Karyotyp mit einer durchschnittlichen Chromosomenzahl von 52. Ihre Generationszeit liegt zwischen 20 – 28 h (NATARAJAN, DARROUDI 1991). Diese konnte durch eine Studie zum Proliferationsverhalten der HepG2-Zellen bestätigt werden (Originaldaten s. Anhang). Die Kultivierung der Zellen kann in Standardmedien erfolgen (z. B.: DMEM) mit einem Zusatz von 10 – 15 % fötalem Kälberserum, welches wichtige Wachstumsfaktoren liefert.

HepG2-Zellen besitzen viele der zellulären Eigenschaften menschlicher Hepatozyten, so konnten in zytologischen und histochemischen Untersuchungen Gallengänge, Golgi-Apparate als auch Mikrovilli identifiziert werden (BOUMA et al. 1989).

In Kultur sezernieren sie einen Großteil der menschlichen Plasmaproteine, wie zum Beispiel Albumin, Fibrinogen und Transferrin (KNOWLES et al. 1980), sowie Lipide, Apolipoproteine und Lipoproteine (DASHTI, WOLFBAUER 1987).

Der weitverbreitete Einsatz von HepG2-Zellen in der genetischen Toxikologie liegt jedoch vor allem darin begründet, dass sie die wichtigsten Enzyme der ersten und zweiten Phase des Fremdstoffmetabolismus exprimieren. Der Stoffwechsel menschlicher Leberzellen kann mit ihnen nachgeahmt werden und sie besitzen somit Vorteile gegenüber metabolisch inkompetenten Zellen (V 79, CHO) und Bakterien, denen diese Enzyme künstlich zugesetzt werden müssen (z.B. S9-Mix aus Ratten) (NATARAJAN, DARROUDI 1991; KNASMÜLLER et al. 1998).

Tabelle 2.5 zeigt eine Auswahl von Enzymen der Phase-I und -II des Fremdstoffmetabolismus, die man in HepG2-Zellen nachweisen konnte und die für den B[a]P-Metabolismus von großer Bedeutung sind. Dem Pflanzenextrakt von *E. sativa* und seinen Inhaltsstoffen wird eine Modulation dieser Enzyme zugesprochen (vgl. Kapitel 4).

Die Enzymaktivitäten können wesentlich durch die Zusammensetzung des Kulturmediums beeinflusst werden. Es hat sich gezeigt, dass die optimalsten Bedingungen mit „Williams E medium“ oder „Earle’s Minimal Essential medium“ erzielt werden können (DOOSTDAR et al. 1988).

Tab. 2.5: Ausgewählte Phase-I- und -II-Enzyme der HepG2-Zellen (verändert nach KNASMÜLLER et al. 1998)

Enzym	Substrat	Anmerkung	Referenz
Phase-I-Enzyme			
CYP P-450 (CYP)	B[a]P	2,5 pmol/mg	(SASSA et al. 1987)
CYP 1A	B[a]P		(LIMBOSCH 1983)
CYP 1A1/ 1A2	B[a]P		(DIAMOND et al. 1980) (EDDY et al. 1987)
Arylhydrocarbon-Hydroxylase	B[a]P	Aktivität im Überstand nur nach Induktion	(DUVERGER-VAN BOGAERT et al. 1993)
CYP-450-Reduktase	B[a]P	Ähnliche Aktivität wie in menschlichen Hepatozyten	(GRANT et al. 1988)
Phase-II-Enzyme			
Epoxidhydrolase	B[a]P-4,5-oxid		(DEARFIELD et al. 1983)
UDP-Glucuronyltransferase GST Epoxidhydrolase Sulfotransferase	B[a]P		(EDDY et al. 1987)

In den Gentoxizitätstests mit HepG2-Zellen werden biologische Endpunkte wie Zytotoxizität, Lipidperoxidation, Induktion von Mikrokernen, Schwesterchromatidaustausch und der Nachweis von DNA-Migration in der Einzelzellgelelektrophorese untersucht (KNASMÜLLER et al. 2004; MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004).

Verschiedenen Untersuchungen verdeutlichen die Vorteile dieser Zelllinie. So können gentoxische Effekte von Verbindungen (z. B. Safrol und Hexamethylphosphoramid), die in metabolisch inkompetenten Zellen zuvor verborgen blieben, nun untersucht werden (KNASMÜLLER et al. 1998). Verbindungen werden als Nicht-Karzinogene erkannt, die in Tierversuchen zu falsch positiven Ergebnissen führten (z. B. Tamoxifen) (UHL et al. 2000). Darüber hinaus kann man mit der Zelllinie HepG2 das komutagene Verhalten einiger Substanzen studieren. Dabei wird evident, dass Xenobiotika, die allein nicht erbgutschädigend sind, den Effekt gentoxischer Verbindungen verstärken (z. B. Moschus Keton) (MERSCH-SUNDERMANN et al. 2001).

Testsysteme mit HepG2-Zellen ermöglichen außerdem die Unterscheidung von strukturverwandten mutagenen und nicht-mutagenen Verbindungen (z.B. B[a]P und Pyren) (NATARAJAN, DARROUDI 1991).

Ein großes Einsatzgebiet dieser Zelllinie sind außerdem Studien zur Antigenoxizität. Es werden dabei mehrheitlich zytoprotektive Substanzen pflanzlichen Ursprungs untersucht, wie z. B. Sojaprodukte (KINJO et al. 2003; JUN et al. 2003), Polyphenole (JIAO et al. 2003) und Lykopene (SCOLASTICI et al. 2008). Als protektive Wirkmechanismen konnten die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies, DNA schädigenden Elektrophilen, oder Peroxiden in HepG2-Zellen nachgewiesen werden (MERSCH-SUNDERMANN et al. 2004). Eine große Bedeutung wird hierbei der Tatsache beigemessen, dass HepG2-Zellen antioxidativ wirkende Enzymsysteme wie Superoxiddismutase, Glutathion-Peroxidase oder GST entsprechend den menschlichen Hepatozyten exprimieren (LEE et al. 2002).

2.2 Methoden

2.2.1 Probenvorbereitung des Pflanzenmaterials

Herstellung des Pflanzenextraktes

In der vorliegenden Dissertation wurde Pflanzenextrakt der Garten-Senfrauke (*Eruca sativa*) aus der Familie der Kreuzblütengewächse (*Brassicaceae*) untersucht. Sie wird unter der Bezeichnung Rucola zum Verzehr angeboten.

Das *Eruca sativa*-Pflanzenmaterial stammte aus konventionellem Anbau und wurde in einem Supermarkt in Gießen am 17.02.2005 gekauft und direkt verarbeitet.

Zunächst wurde die Rauke mit dem Messer in kleine Stücke zerteilt und mit einem Pürierstab weiter zerkleinert. Damit ein kompletter Aufschluss der Pflanzenmatrix gewährleistet werden konnte, wurde das Pflanzenmaterial zusätzlich in einem Mörser gemahlen. Anschließend wurde die gewonnene Masse in einer Mullkompressen ausgepresst, das Pflanzenextrakt in einem Becherglas aufgefangen und in Reagenzgläser überführt. Um das Extrakt von Schwebstoffen zu befreien wurde es für 20 Minuten, bei 1400 U/min und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand sorgfältig abpipettiert, dann an einer sterilen Werkbank durch einen 0,22 µm Spritzenfilter filtriert und in 0,5 ml-Mikroröhrchen überführt. Die Lagerung der verschlossenen Röhrchen erfolgte bis zur Exposition bei – 80 °C.

Präparation von Pflanzenmaterial für die chromatographische Analyse

Von dem anfallenden Pflanzenmaterial bei der Gewinnung des Pflanzenextraktes wurden für drei Proben jeweils 10 g in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. Im Anschluss wurden 10 ml Lösungsmittel (Cyclohexan–Ethylacetat, 1:1) hinzugegeben und das verschlossene Röhrchen zunächst per Hand geschüttelt. Die Extraktion erfolgte für 60 Minuten auf einem Schüttler. Im Anschluss wurde die Probe 5 Minuten bei 5000 U/min und 20°C zentrifugiert, um eine Trennung von Lösungsmittel und Pflanzenmaterial zu erreichen. Von dem Überstand wurden 5 ml entnommen und durch einen 0,45 µm Teflon-Spritzenfilter in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Der verbleibende Überstand wurde verworfen.

Um alle ITC aus dem Pflanzenmaterial zu extrahieren, erfolgte eine erneute Zugabe von Lösungsmittel, ein Schütteln der Probe und die Zentrifugation. Die mittels eines Spritzenfilters gereinigten 5 ml des Überstandes wurden zu den 5 ml der ersten Extraktion gegeben und beide Phasen auf einem Vortex gemischt. Von dem Gemisch wurde 1 ml in ein Vial pipettiert und bis zur GC-MS/MS-Analyse bei -80°C gelagert.

Ermittlung der Trockensubstanz

Um die Konzentration der ITC in dem *E. sativa*-Pflanzenmaterial ermitteln zu können, wurde die Trockenmasse bestimmt.

Im ersten Schritt wurde das exakte Gewicht einer Plastikwägeschale bestimmt und anschließend 10 g des Pflanzenmaterials darin eingewogen. Die Schale wurde mit Inhalt für eine Woche bei 40 ° C in den Trockenschrank gestellt. Nach vollständiger Trocknung wurde die Probe erneut gewogen und das Trockengewicht in Prozent errechnet.

Beispiel:

- Gewicht der Probe nach einer Woche Trocknung: 2,99 g
- Leergewicht Plastikwägeschale: 2,07 g
- Einwaage Pflanzenmaterial vor Trocknung: 10,00 g

$$\Rightarrow \frac{2,99 \text{ g} - 2,07 \text{ g}}{10,00 \text{ g}} \times 100 = 9,2 \%$$

Um den Wasseranteil ermitteln zu können, wurde von 100 % die Trockensubstanz (TS) abgezogen.

2.2.2 Kultivierungsmethoden der Zellkulturen

Die HepG2-Zellen wurden von Dr. Firouz Darroudi, Universität Leiden (LUMC, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

In den *in vitro*-Experimenten fanden Zellen der Passagen 8 - 25 Verwendung.

Alle im darauffolgenden beschriebenen Arbeiten mit der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank.

Auftauen von Zellkulturen

Die Lagerung der HepG2-Zellen erfolgte bei einer Temperatur von $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen einer Kultur wurde zunächst das Kulturmedium in einem Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Ein Aliquot der gelagerten Zellen wurde ebenfalls bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgetaut und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 ml vorgelegtem Kulturmedium überführt. Die Probe wurde 5 Minuten bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert, dann der Überstand dekantiert. Abschließend wurde das verbliebene Zellpellet in 10 – 20 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (75 cm^2) überführt. Nach 24 Stunden im Wärmeschrank bei einer Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und einer fünfprozentigen CO_2 -Atmosphäre, wurde das Kulturmedium ersetzt, um tote Zellen zu entfernen.

Kultivierung und Passagierung

Die Passagierung der Zellen erfolgte, je nach Wachstumsdichte, alle drei bis vier Tage. An jedem zweiten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugesetzt.

Vor jeder Passagierung wurden das Kulturmedium, PBS und Trypsin (0,05 %) im Wasserbad auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Die Zellkulturen wurden unter dem Inversmikroskop auf das Vorhandensein von pathogenen Keimen untersucht. Im Anschluß wurde das Kulturmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellkultur zweimal mit PBS gewaschen.

Es wurden je nach Größe der Zellkulturflaschen ($75\text{ cm}^2/ 175\text{ cm}^2$) 1-3 ml Trypsin gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und die Zellen 5 Minuten im Brutschrank inkubiert.

Nach Ablauf der Zeit wurde das korrekte Ablösen der Zellen unter dem Mikroskop kontrolliert und die enzymatische Reaktion mittels Kulturmedium gestoppt.

Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und dort mittels einer Einmalspritze und aufgesetzter Injektionsnadel durch mehrfaches Aspirieren vereinzelt.

Danach wurde eine Probe entnommen und dieser im Verhältnis 1:1 Erytrosin B zugesetzt um die Zellzahl zu bestimmen. Die Auszählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Die Zellzahl pro ml konnte mit folgender Formel ermittelt werden:

n x Verdünnungsfaktor x Kammervolumen x ml Zellsuspension.

Unterschiedliche Mengen der Zellsuspension wurde abschließend in vorbereitete, bereits mit Kulturmedium versehene Kulturflaschen pipettiert und diese in den Brutschrank gestellt. Die Menge der eingesäten Zellen richtete sich nach der ermittelten Zellzahl und nach der Zahl für die Versuchsreihen benötigter Zellen.

Anlegen von Subkulturen

Für die Versuchsreihen des Cometassay wurden die Zellen in Zellkulturplatten mit jeweils 12 Vertiefungen kultiviert. Zunächst wurden 2 ml Kulturmedium in jede Vertiefung vorgelegt. Nachdem die Zellkultur, nach den oben beschriebenen Arbeitsschritten, als Suspension vereinzelter Zellen vorlag, wurden 3×10^5 HepG2-Zellen je Vertiefung eingesät. Die Platten wurden für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Für die Versuche des ssDNA-Apoptose-ELISA wurden ebenfalls Zellkulturplatten mit 12 Vertiefungen verwendet, jedoch 10.000 Zellen pro Vertiefung eingesät. Die Platten wurden ebenfalls für 24 Stunden inkubiert.

Für die Experimente zur Messung der Glutathion S-Transferase-Aktivität wurden Zellkulturflaschen (25 cm^2) mit Kulturmedium versehen und pro Flasche 1×10^6 HepG2-Zellen eingesät. Die Inkubation der Zellkulturflaschen erfolgte auch hier für 24 Stunden im Brutschrank.

2.2.3 Alkalische Einzelzellelektrophorese (Cometassay)

Grundlagen der Methode

Mit der Einzelzellelektrophorese (*engl.*: single cell gel electrophoresis) ist es möglich DNA-Schädigung und Reparatur auf dem Niveau der einzelnen Zelle zu detektieren. Hierzu bedient man sich einer elektrophoretischen Technik (FAIRBAIRN et al. 1995; COLLINS 2004).

Zellen, die zuvor genotoxischen Substanzen ausgesetzt waren, werden lysiert und anschließend im elektrischen Feld aufgetrennt. Geschädigte DNA bewegt sich dabei in Richtung der Anode. Die Anfärbung der DNA erfolgt mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid und

ermöglicht eine mikroskopische Auswertung. Aufgrund der Ähnlichkeit der Zellen mit dem Kopf (nicht-migrierte DNA) und Schweif (Wanderungsbereich der DNA) eines Kometen, erhielt dieses Verfahren die Bezeichnung Cometassay.

Der DNA-Gehalt des Kometenschweif und die Schweiflänge (TL) sind ein Maß für die DNA-Schädigung der Zelle, so dass sich ungeschädigte Zellen punktförmig und nicht als „Komet“ darstellen (vgl. Abb. 2.3) (TICE et al. 2000; HARTMANN et al. 2003).

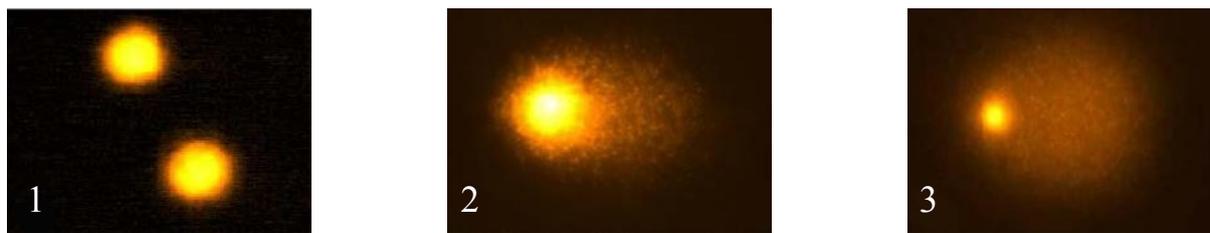


Abb. 2.3: HepG2-Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Vergrößerung 400x) ohne DNA-Migration (1) mit DNA-Migration unterschiedlicher Stärke (2 u. 3) (modifiziert nach Lamy 2008).

Je nach gewähltem pH-Wert bei Lyse und Elektrophorese, können Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, sowie alkalilabile Stellen und DNA-Quervernetzungen, sogenannte Crosslinks, nachgewiesen werden (vgl. Tabelle 2.6).

Tab. 2.6: Schäden die im Cometassay je nach Versuchsbedingungen nachgewiesen werden können (nach TICE et al. 2000)

pH-Kondition	pH 7 - 8	pH 12.1 - 12.5	pH > 13
Nachweis	Doppelstrangbrüche Crosslinks	Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche Crosslinks Exzisions-Reparaturstellen	Einzelstrangbrüche Doppelstrangbrüche Crosslinks Exzisions-Reparaturstellen Alkalilabile Stellen

Verstärkte Migration	Verminderte Migration
Einzel- und Doppelstrangbrüche Alkalilabile Stellen DNA Exzisions-Reparaturstellen	DNA-DNA Strangvernetzung DNA-Protein Strangvernetzung

Es ist sehr einfach möglich, Doppelstrangbrüche (mit den daraus resultierenden ganzen DNA-Fragmenten) im Cometassay nachzuweisen.

Anders verhält es sich mit Einzelstrangbrüchen. Aus ihnen resultieren zunächst keine DNA-Fragmente, erst wenn beide Stränge der DNA voneinander getrennt bzw. denaturiert werden, entstehen DNA-Bruchstücke. Eine Trennung der Doppelhelix erreicht man in einem alkalischen pH-Bereich.

Einzelstrangbrüchen gilt nicht das Hauptinteresse, da sie schnell vom zelleigenen Reparatursystem behoben werden und somit nicht das mutagene Potential eines Stoffes ausmachen (FAIRBAIRN et al. 1995; COLLINS et al. 1997).

Einige genotoxische Substanzen, wie z.B. Dimethylsulfat induzieren nicht direkt DNA-Strangbrüche, vielmehr besitzen sie alkylierende Eigenschaften und verursachen alkalilabile Stellen. An den alkylierten DNA-Stellen findet vermehrt Depurinierung statt mit daraus resultierenden abasischen Stellen, die unter stark alkalischen Bedingungen (pH 13) in der Elektrophorese zu Strangbrüchen führen (COLLINS et al. 1997; KLAUDE et al. 1996).

Brüche in der DNA-Konfiguration können auch kurzfristig im Cometassay in Erscheinung treten, während zellulärer Reparaturvorgängen durch Basen- und Nukleotid-Exzision.

Eine hohe Anzahl detektierter Schäden kann somit einen großen Zellschaden, als auch eine verstärkte Reparatur anzeigen (COLLINS et al. 1997).

Der Nachweis von Crosslinks liegt darin begründet, dass sie nicht sehr schnell vom zelleigenen Reparatursystem behoben werden können. Sie schützen die DNA vor Denaturierung, wie sie unter alkalischen Bedingungen erfolgt, mit dem Resultat einer verminderten DNA-Migration in der Elektrophorese. Intrastrang bzw. interstrang DNA-DNA Crosslinks werden von Chemotherapeutika z. B. Cisplatin, Mitomycin C erzeugt (FAIRBAIRN et al. 1995; SINGH 2000).

Apoptotische Zellen können mit dem Cometassay detektiert werden (YASUHARA et al. 2003). Es existiert die Idee, dass Kometen mit kleinen Köpfen und diffusem Schweif (sog. „hedgehogs“ oder „ghost cells“), apoptotische Zellen darstellen. Yasuhara et al. konnten mit der neutralen Version des Cometassays zwischen apoptotischen Veränderungen und nekrotischen Veränderungen in Zellen unterscheiden. Apoptotische Zellen zeigten einen sehr kleinen Kopf mit großem Schweif, nekrotische Zellen hingegen zeigten kaum Schweifbildung. In ihrer Studie wurden extreme Bedingungen geschaffen, indem man Zellen mit definitiv Apoptose und definitiv Nekrose erzeugenden Stoffen exponierte. Bei einem milderem Zellschaden könnte diese Diskriminierung vielleicht nicht so eindeutig gelingen (YASUHARA et al. 2003). Eine weitere wichtige Tatsache ist, dass die DNA apoptotischer

Zellen im späten Stadium fragmentiert wird bis hin zur Größe von Nukleosomen-Oligomeren. Solche kleinen DNA-Stücke gehen jedoch größtenteils während der Lyse und der Elektrophorese verloren und können nicht das so charakteristische Bild eines „Igel-Kometen“ ergeben (MEINTIÈRES et al. 2003; TICE et al. 2000). Durch Auslassen der Elektrophorese konnte dieser Verlust umgangen werden (MEINTIÈRES et al. 2003). In frühen Apoptosestadien, beginnend mit der Chromatin Kondensierung, ist die Zelle intakt und nicht fragmentiert und kann daher im Cometassay dargestellt werden (YASUHARA et al. 2003).

Erklärung der „Kometenbildung“

Es finden sich zwei anerkannte Theorien, beschrieben bei Östling und Johanson und Klaude et. al. (OSTLING, JOHANSON 1984; KLAUDE et al. 1996). Dort wird deutlich, dass es Unterschiede in der „Kometenbildung“ gibt, je nachdem ob die neutrale oder alkalische Version des Cometassay Anwendung findet.

Nach dem Lysierungsschritt stellt sich die DNA in geordneter Form als Schleifen dar. Sie besitzt immer noch die negative DNA-Superhelix-Form, die vor der Lyse um die Histone der Nukleosomen gewunden war. Durch diese sogenannten „Supercoils“ ist eine freie Rotation der DNA nicht möglich (OSTLING, JOHANSON 1984; COLLINS 2004).

Wirken genotoxische Substanzen auf die DNA ein, entstehen Einzelstrangbrüche. Die Schleifen der DNA werden dadurch gelockert, die gebrochenen „Enden“ winden sich um andere Strangmoleküle und bleiben somit an großen DNA-Stücken befestigt.

Legt man ein elektrisches Feld an, strecken sich die gelockerten Schleifen der negativ geladenen DNA in Richtung der Anode aus. Es ist nur eine limitierte Bewegung der Schleifen vom Kopf des Kometen möglich.

Die Kometen bestehen somit aus vielen langgestreckten DNA-Schleifen und ihre Anzahl zeigt die Menge der DNA-Schäden auf.

Bei zunehmender Schädigung der DNA-Struktur durch genotoxische Agenzien kommt es zu vermehrten Doppelstrangbrüchen, in der Elektrophorese wandern dann neben DNA-Schleifen ganze DNA-Fragmente aus dem Kometenkopf in den Schweif .

Für die alkalische Version des Cometassay findet man beschrieben, dass der Kometenschweif aus zwei Arten von DNA-Fragmenten besteht.

Liegen Brüche in einem DNA-Strang sehr nah beieinander, entspiralisiert sich der Strang komplett und wird als Fragmentstrang frei.

Liegen Bruchstellen auf einem Strang sehr weit voneinander entfernt, lösen sich keine kompletten Einzelstrangfragmente, da die Entspiralisierung nur unvollständig stattfindet.

Auf die Wanderung im elektrischen Feld haben sowohl die gegabelte Form der Strangenden, als auch ihre relative Größe Einfluss. Mit zunehmender Schädigung der DNA-Struktur durch ein Agens nimmt die Zahl der Einzelstrangfragmente zu.

Die o. g. Theorien unterstützend kann man beobachten, dass mit zunehmender Anzahl der DNA-Schäden bzw. Strangbrüche die Intensität, weniger aber die Länge des Kometenschweifs zunimmt.

Insbesondere bei der neutralen Version des Cometassay nimmt die TL nur anfänglich mit steigendem Schaden zu, erreicht dann ein Maximum, welches durch die elektrophoretischen Bedingungen bestimmt wird (OLIVE 2002; FAIRBAIRN et al. 1995).

Die Anwendung des Cometassay, insbesondere der alkalischen Version, erfreut sich immer größerer Beliebtheit, da er im Vergleich zu anderen Genotoxizitätstests einige Vorteile bietet. Es wird nur eine geringe Zellzahl benötigt und man kann mit jeder eukaryontischen Zelle arbeiten. DNA-Schäden können auf dem Niveau der einzelnen Zelle nachgewiesen werden. Die Durchführung ist schnell und kostengünstig. Das Testsystem besitzt eine hohe Sensitivität, es ist möglich, einige hundert Brüche pro Zelle zu erkennen (COLLINS et al. 1997).

Falsch positive Ergebnisse können minimiert werden, indem Zytotoxizitätseffekte im Vorfeld ausgeschlossen werden. Der Cometassay wurde in der vorliegenden Arbeit nach den Beschreibungen von SINGH et al. (1988) und gemäß der Richtlinien von TICE et al. (2000) und KLAUDE et al. (1996) durchgeführt.

Testprotokoll

Vorbereitung der Objektträger

Zunächst wurden angeraute Objektträger mit einem Ethanol/Essigsäure-Gemisch (Verhältnis 1:1) gereinigt. Für die verwendeten Agaroselösungen wurde PBS-Puffer auf 120 °C erhitzt und die jeweilige Agarose darin gelöst (Volumenangaben für LMP (0,5 %), NMP (0,7 %), NMP (1 %) (s. Tab. 2.2). Die Agarosemischungen wurde bei einer Temperatur von 37 °C verwendet.

Die erste Agaroseschicht (NMP 1 %, 85 µl) wurde auf die Objektträger gleichmäßig aufgetragen und mit Deckgläschen bedeckt. Die Aushärtung erfolgte für 24 h im Trockenschrank bei 37 °C. Die zweite Agaroseschicht (NMP (0,7 %), 100µl) wurde nach Entfernung der Deckgläschen gleichmäßig aufgetragen, wieder bedeckt und die Objektträger für 15 Minuten im Kühlschrank gelagert.

Exposition der HepG2-Zellen mit den Testsubstanzen

Für die Untersuchungen zur Gentoxizität wurden die HepG2-Zellen in den Kulturplatten gegenüber zunehmenden Volumina *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt bzw. aufsteigenden Konzentrationen von *Erucin* (MTBITC), sowie der Positiv- und Lösungsmittelkontrolle exponiert. Die Inkubation erfolgte für 24 h im Brutschrank.

In den sich anschließenden Analysen zur Antigentoxizität wurden Pflanzenextraktvolumina bzw. *Erucin*-Konzentrationen verwendet, die keine signifikant gentoxischen Effekte zeigten.

Die ausgesäten HepG2-Zellen wurden zunächst für 24h gegenüber *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt, bzw. *Erucin* exponiert. Dann wurde das Kulturmedium nach einem Waschvorgang der Zellen erneuert und 50 µM B[a]P hinzupipetiert. Die Zellen wurden erneut für 24 h inkubiert.

Zellernte und Vitalitätsbestimmung

Nach Ablauf der Inkubationszeit, wurde das Medium in den Zellkulturplatten abgesaugt und die Zellen zweimalig mit PBS (je 1 ml) gewaschen. Um die Zellen zu Ernten, wurde Trypsin (250 µl (0,05 %), 5 Min, 37 °C) in jede Vertiefung hinzugefügt. Die enzymatische Reaktion wurde anschließend mit 750 µl Kulturmedium pro Vertiefung gestoppt und jede Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und darin mittels Einmalspritze und Injektionsnadel vereinzelt.

Um die Vitalität der Zellen zu bestimmen wurden 100 µl von jeder Zellsuspension entnommen und mit Erythrosin B im Verhältnis 1:1 in einem Mikroröhrchen vermischt. Anschließend erfolgte die Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer, als ein Beleg für die Zellvitalität wurde die Prozentzahl ungefärbter Zellen gewertet:

$$\% \text{ lebende Zellen} = \frac{\text{Erythrosin B-negative Zellen}}{\text{Erythrosin B-pos. Zellen} + \text{Erythrosin B-neg. Zellen}} \times 100$$

Erythrosin B (Dinatrium-2,4,5,7-tetraiodfluoreszeinat) gehört zu den sauren Xanthenfarbstoffen. Dieser Farbstoff wird von intakten Zellen nicht aufgenommen (intakte Zellen = farblos). Tote Zellen, insbesondere eine defekte Plasmamembran ermöglichen ein ungehindertes Eindringen des geladenen Farbstoffes (tote Zellen= rot).

Um falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden die Versuche zur Gen- und Antigen-toxizität bis zu einer durchschnittlichen Zellvitalität von > 70 % durchgeführt (Originaldaten siehe Anhang).

Die einzelnen Zellsuspensionen wurden bei 1200 U/min für fünf Minuten zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Zellrückstand wurden mit 150 µl 0,5 %iger LMP-Agarose vermischt und 100 µl davon auf die zuvor präparierten Objektträger aufgetragen. Die mit Deckgläschen abgedeckten Objektträger wurden für 15 Minuten bei 4 °C gelagert.

Die Chemikalien der folgenden Versuchsschritte wurden mit einer Arbeitstemperatur von 4 °C verwendet, um eine Verfälschung der Versuchsergebnisse, z.B. durch veränderte Enzymaktivitäten der Zellen, vorzubeugen. Eine Zellschädigung durch ultraviolette Strahlung wurde durch die Arbeit bei Rotlicht verhindert.

Lyse

Nach Entfernung der Deckgläschen wurden die Objektträger in eine Schifferdecker-Kammer einsortiert und in Lyselösung (Zusammensetzung vgl. Tab. 2.2) für eine Stunde bei 4 °C eingelegt.

Elektrophorese

Die Lyselösung wurde verworfen, die Objektträger mit Aqua dest. gewaschen und anschließend in die mit gekühlter alkalischer Pufferlösung (vgl. Tab. 2.2) befüllte, Elektrophoresekammer einsortiert. Um eine DNA-Entspiralisierung zu erzielen, ruhten die Objektträger für 20 Minuten.

Dann wurde die Elektrophoresekammer mittels einer daran angeschlossenen Kühlanlage heruntergekühlt (ca. 0 °C). Durch Zugabe von Elektrophoresepuffer (s.Tab. 2.2) wurde ein pH-Wert von 30 eingestellt und die Kammer für 25 Minuten bei 300 mA und 25 V betrieben.

Neutralisation

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger erneut in eine Schifferdecker-Kammer einsortiert und in Neutralisationslösung (vgl. Tab. 2.2) für 10 Minuten im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden sie mit destilliertem Wasser abgespült.

Färbung

Nach fünfminütiger Trocknungszeit wurde zur Färbung auf jeden Objektträger 80 µl Ethidiumbromid-Lösung aufgetragen und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Die

Lagerung erfolgte in einer feuchten Kammer im Kühlschrank um ein Eintrocknen der Agarose zu verhindern.

Auswertung

Die Auswertung des Cometassays, also eines jeden Objektträgers, erfolgte bei 400facher Vergrößerung an einem Fluoreszenzmikroskop mit einer daran angeschlossenen Kamera, deren Daten mit der Auswertungssoftware Comet 3.1 Europe (Kinetic imaging) von einem Computer verarbeitet wurden. Das Programm ermöglicht es, das Ausmaß der DNA-Schädigung der einzelnen Zelle zu ermitteln. Es wurden 102 Zellen pro Objektträger ausgewertet. Die Auswertungssoftware kann aufgetrennte Zellteile in Kometenkopf bzw. Schweif differenzieren und kann Parameter wie TL, % der DNA im Schweif oder Olive Tail Moment (OTM) messen (vgl. Kapitel 3).

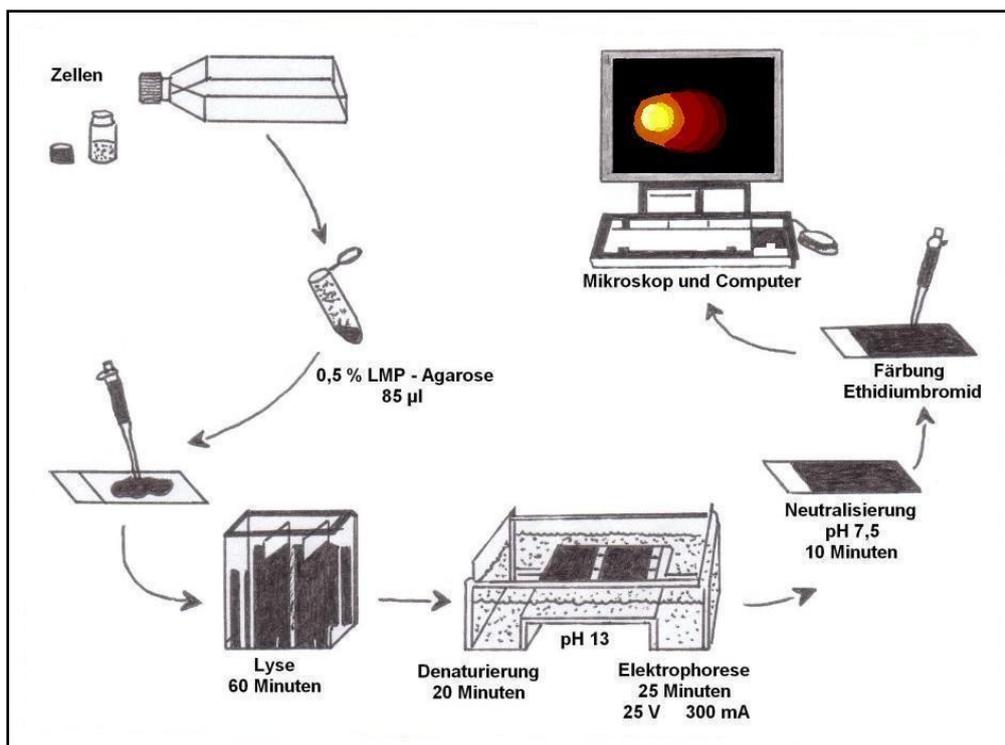


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Durchführung des Cometassays (modifiziert nach PLAPPERT et al. 1995)

2.2.4 Messung der GST-Aktivität mittels 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB)

Grundlagen der Methode

GST sind eine multifunktionale Enzymfamilie, die in nahezu allen Zellen des menschlichen Körpers vorkommt. Sie nehmen eine Schlüsselrolle in der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus bei der Entgiftung vieler unterschiedlicher endogener und exogener Stoffe ein. Den Inhaltsstoffen des getesteten *Eruca sativa*-Pflanzenextrakts wird eine Einflussnahme auf die GST-Aktivität zugesprochen.

In der menschlichen Leber katalysieren GST die Konjugation von Glutathion an eine Vielzahl potentiell genotoxischer Xenobiotica. Durch diese Anlagerung wird eine Neutralisation elektrophiler Seiten erzielt, welche die Produkte wasserlöslicher und besser ausscheidbar macht (BOYLAND, CHASSEAUD 1969). Ein weiterer Ausscheidungsweg führt über die Metabolisierung der entstandenen Glutathion-Konjugate zu Merkaptursäure, die über Niere und Leber ausgeschieden wird.

Aufgrund von Sequenzhomologien, immunologischen und enzymatischen Eigenschaften hat man GSTs in speziesspezifische Isoenzymklassen eingeteilt. Diese beinhalten auch die nomenklatorische Unterscheidung von zytosolischen und mikrosomalen Enzymen (MANNERVIK et al. 1985).

Die Grundlage des Tests beruht auf der Anheftung eines reduzierten Glutathions an das künstliche Substrat CDNB durch die GST. Das entstehende S-2,4-Dinitrophenylglutathion (DNPG) lässt sich über eine Zunahme der Absorption bei 340 nm messen. Der Zuwachs der Absorption ist direkt proportional zur gesamten GST-Aktivität (zytosolische- und mikrosomale Aktivität) in der Probe (HABIG et al. 1975).

Testprotokoll

Exposition der HepG2-Zellen mit den Testsubstanzen

Nach einer 24stündigen Wachstumsphase in den Zellkulturflaschen (25 cm²) mit anschließendem Wechsel des Kulturmediums wurden die HepG2-Zellen gegenüber *Eruca sativa*- Pflanzenextrakt (12,5 – 50 µl/ml), MTBITC (2,5 – 25 µmol/l) und destilliertem Wasser bzw. DMSO exponiert. Die Inkubation erfolgte für weitere 24h im Brutschrank.

Probenaufbereitung

Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers vorsichtig geerntet, in Zentrifugenröhrchen überführt und 10 Minuten bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der

Überstand dekantiert und der Zelleniederschlag in 2 ml kaltem PBS resuspendiert. Die Zellen wurden erneut 10 Minuten bei 2000 U/min und 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Zelleniederschlag in 80 µl kaltem PBS resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in Mikroröhrchen überführt, auf Eis gelagert und darin der Lyse mittels Ultraschall (Impuls, 50 sec.) zugeführt. Schließlich wurde das Zellmaterial für 20 Minuten bei 16.000 U/min und 4°C zentrifugiert und der jeweilige Überstand (ca. 250 µl) in vorbereitete Mikroröhrchen überführt.

Durchführung der Analyse

Alle benötigten Reagenzien des Testkits wurden nach Anleitungshandbuch vorbereitet, es handelte sich um: Analysenpuffer, Probenpuffer (für die GST-Verdünnung), GST (Kontrolle, Lösung beinhaltet GST der Rattenleber), Glutathion (Lösung beinhaltet reduziertes Glutathion) und CDNB-Lösung.

Alle Reagenzien wurden bei Raumtemperatur (ca. 23 °C) verwendet.

In eine Mikrotiterplatte (96-well) wurde als nicht-enzymatische Kontrolle ein sog. „Background“ pipetiert, bestehend aus 170 µl Analysenpuffer mit Zugabe von 20 µl reduziertem Glutathion. Die Positivkontrolle wurde aus 150 µl Analysenpuffer mit Zugabe von 20 µl reduziertem Glutathion und 20 µl GST erstellt. Für die einzelnen Proben wurden jeweils 20 µl des Überstandes aus den Mikroröhrchen mit 150 µl Analysenpuffer und 20 µl reduziertem Glutathion vermischt. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Probenkonzentration (GST-Menge) so gewählt, dass ein Absorptionszuwachs von mindestens 0,012 – 0,064 pro Minute gemessen werden konnte.

Der Reaktionsstart erfolgte durch schnelle Zugabe von 10 µl CDNB in jedes zuvor befüllte Nöpfchen der Mikrotiterplatte (Endvolumen 200µl /Vertiefung). Der genaue Zeitpunkt des Reaktionsstarts wurde vermerkt und die Platte für ein paar Sekunden geschüttelt. Anschließend wurde die Absorption bei 340 nm mit einem 96-well Mikroplatten-Lesegerät in Ein-Minuten-Abständen für zehn Minuten gemessen. Die Proben und Standards wurden jeweils in doppelter Ausfertigung dreimal untersucht.

Berechnung der GST-Konzentration

Die totale, also zytosolische und mikrosomale GST-Aktivität wurde in Bezug zur Aktivität der Kontrollzellen („Background“) ermittelt. Die weitere Berechnung wird in Kapitel 3.5 beschrieben.

2.2.5 Apoptose-Messung mittels monoklonaler Antikörper

Grundlagen der Methode

Die Apoptose, als eine Form des programmierten Zelltodes, wird von der Zelle aktiv durchgeführt und ist Teil des Zellstoffwechsels. Dabei kommt es zu einer Kaskade an Enzymreaktionen, wobei die proteolytische Aktivität sogenannter Caspasen im Mittelpunkt steht. Apoptose kann in der Zelle zum einen extrinsisch (z.B. Hormone, Wachstumsfaktoren, Toxine), als auch über einen intrinsischen Weg (z.B. Glukokortikoide, virale Infektionen, radioaktive Strahlung) induziert werden. Eine der vielen Funktionen dieses „Selbstmordprogrammes“ ist die Eliminierung mutierter Zellen und die Verhinderung von Tumorwachstum (PARK et al. 2007). Ein Mechanismus der chemopräventiven Einflussnahme durch *Erucin* wird in der Apoptose-Induktion gesehen (vgl. Kapitel 4) (FIMOGNARI et al. 2004 c).

Apoptotische Zellen zeigen morphologische und biochemische Charakteristika, wie Zellschrumpfung, sogenanntes Plasmamembran-„blebbing“, Kern-Fragmentierung, Chromatin-Kondensation und Fragmentierung chromosomaler DNA.

Die durchgeführte Testmethode basiert auf der selektiven DNA-Denaturierung apoptotischer Zellen durch Formamid mit Nachweis der einzelsträngigen DNA durch monoklonale Antikörper.

Formamid, ein Amid der Ameisensäure, denaturiert lediglich DNA apoptotischer Zellen. Nekrotische Zellen, aber auch Zellen mit DNA-Strangbrüchen die keine Apoptose durchführen, bleiben unberührt. Die hohe Empfindlichkeit von DNA apoptotischer Zellen gegenüber Formamid ist somit nicht in DNA-Strangbrüchen zu sehen, sondern vielmehr in den Veränderungen des Chromatins während der Apoptose (z. B. Chromatin-Kondensation, Verdauung DNA-stabilisierender Proteine) (FRANKFURT, KRISHAN 2001b).

Im Test wird nach Behandlung der Zellen mit Formamid, in einem Einschnittverfahren zur Färbung der einzelsträngigen DNA, eine Mischung aus primärem und Peroxidase-makiertem sekundären Antikörper hinzugegeben. Der Vorteil dieser Methode liegt in der größeren Sensitivität und schnelleren Durchführbarkeit im Vergleich zur klassischen Immunfärbung in zwei Schritten (FRANKFURT, KRISHAN 2001 a).

Testprotokoll

Exposition der HepG2-Zellen mit den Testsubstanzen

Nach 24stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen gegenüber aufsteigenden Konzentrationen MTBITC (5 $\mu\text{mol/l}$ – 50 $\mu\text{mol/l}$) und DMSO als Lösungsmittelkontrolle exponiert und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert.

Versuchsvorbereitung

Zunächst wurde in eine 96-well Mikrotiterplatte die Test interne Positivkontrolle aus Einzelstrang-DNA -Lösung pipetiert (100 μl / Vertiefung). Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei 37 °C im Inkubator getrocknet.

Vor Testbeginn wurden folgende Lösungen nach Gebrauchsanleitung hergestellt: Fixierungslösung aus 80 % MeOH in PBS (160 μl MeOH + 40 μl PBS/ Vertiefung), dreiprozentige Trockenmilch in destilliertem Wasser (6 μl Magermilch + 194 μl Aqua dest./ Vertiefung). Die S1-Nuklease wurde in zwei Schritten zunächst mittels Verdünnungspuffer, dann mit Reaktionspuffer und destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 U/ml gebracht.

Um die Spezifität der Bindung der monoklonalen Antikörper zu bestätigen, wurde als Negativkontrolle die DNA unbehandelter Zellen mit S1-Nuklease in Einzelstrang-DNA überführt.

Probenaufbereitung

Nach 24stündiger Exposition gegenüber den Testsubstanzen wurde das Medium aus jedem Nöpfchen der Zellkulturplatten in Reagenzgläser überführt. Nach einmaligem Waschen (1 ml PBS) erfolgte die Zellernte mit 250 μl Trypsin je Vertiefung für fünf Minuten bei 37 °C. Die Reaktion wurde mit Kulturmedium gestoppt und die gelösten Zellen in ihre jeweiligen Reagenzgläser überführt. Dort wurden sie mit Hilfe einer Spritze und Injektionsnadel vereinzelt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Aus den jeweiligen Zellsuspensionen wurden 200.000 Zellen in neue Reagenzgläser überführt und diese für sechs Minuten bei 2000 U/ min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann dekantiert und der Zelleniederschlag in 2 ml Fixierungslösung langsam resuspendiert. Jeder Zellsuspension wurden 100 μl entnommen und in ein Nöpfchen einer 96-well Mikrotiterplatte pipetiert, diese dann für eine Stunde bei 37 °C im Inkubator getrocknet. Die Platte wurde gründlich getrocknet um ein gutes Anhaften der Zellen zu gewährleisten.

Testdurchführung

In die getrocknete Mikrotiterplatte wurden je Vertiefung 50 µl Formamid zugegeben und die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Denaturierung der DNA apoptotischer Zellen zu erreichen, wurde die Platte auf 75 °C für 20 Minuten erwärmt. Anschließend fünf Minuten im Kühlschrank abgekühlt und das Formamid wieder entfernt.

Für die Näpfehen der Negativkontrolle wurden 100 µl S1-Nuklease hinzupipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS (100 µl/ Vertiefung) wurden jeweils 200 µl dreiprozentige Trockenmilch zugesetzt um unspezifische Bindungen zu blockieren. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit bei 37 °C im Trockenschrank.

Anschließend wurde die Trockenmilch durch 100 µl Antikörpermischung ersetzt und die Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (250 µl/ Vertiefung) wurden in jedes Näpfehen 100 µl ABTS-Lösung zur Farbentwicklung zugegeben und die Mikrotiterplatte für etwa 50 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 100 µl Stop-Lösung (HCl) beendet und die Absorption bei 410 nm mit einem 96-well Mikroplatten-Lesegerät gemessen. Die Proben und Standards wurden jeweils in doppelter Ausfertigung dreimal untersucht.

Auswertung

Die Auswertung der Apoptoseinduktion durch MTBITC wird in Kapitel 3.6 ausführlich erläutert.

2.2.6 Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Grundlagen

Zur qualitativen und quantitativen Analyse der *Eruca sativa*-Proben wurde die Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor (GC/MS-MS) verwendet. Die Analysen wurden durch Dr. Thorsten Stahl durchgeführt.

Gaschromatographie

Die Chromatographie ist eine Methode zur Trennung von Stoffgemischen. Hierbei wird ausgenutzt, dass die einzelnen Komponenten des Gemisches in einer mobilen Phase eine unterschiedlich starke Adsorption an eine stationäre Phase haben.

Die Gaschromatographie ist eine Verteilungschromatographie, bei der ein Gas die mobile Phase bildet. Damit das Gas nicht mit dem Analysat reagiert, sollte ein chemisch inertes Gas

gewählt werden. Hierzu eignen sich besonders Edelgase, wie zum Beispiel Helium, welches auch in der vorliegenden Arbeit als Trägergas verwendet wurde (SKOOG et al. 1996). Als stationäre Phase wurde eine feste Phase aus Phenyl (5 %) und Dimethylpolysiloxan (95 %) eingesetzt.

Ein Gaschromatograph besteht aus drei wesentlichen Bauteilen einem Injektor, einer Trennsäule und einem Detektor. In dem Injektor wird die Probe zunächst verdampft und mit dem Trägergas (Eluent) durch die Trennsäule transportiert (Elution). Auf Grund der Wechselwirkungen mit der stationären Phase und der unterschiedlichen Siedepunkte wird das Analysat getrennt. Die Stärke der Wechselwirkungen wird durch die Struktur und die funktionellen Gruppen der einzelnen Probenkomponenten bestimmt. Sind die Wechselwirkungen der chemischen Verbindungen mit der stationären Phase schwach, so werden sie nur wenig retardiert und treten früh aus der Säule aus. Sind sie stark, eluieren die Moleküle erst spät, woraus sich unterschiedliche Retentionszeiten für die Probenkomponenten ergeben. Die eluierenden Moleküle werden von dem massenspektrometrischen Detektor in elektrische Signale umgewandelt. Diese Signale werden letztlich von einem Aufzeichnungsgerät in Form von Spitzen (engl. peaks) visualisiert und ein Chromatogramm erstellt. Die unterschiedlichen Peaks dienen der qualitativen Analyse der Probe, eine Quantifizierung erfolgt über die Peakflächen (CAMMANN 2001).

Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine wichtige Methode der analytischen Chemie mit deren Hilfe die Struktur und Zusammensetzung von Verbindungen bestimmt werden kann. Hierzu werden Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis getrennt, bei bekannter Ladung lässt sich die Masse der Ionen ermitteln. Um eine bleibende Ionisierung mit ungestörten, fokussierbaren Ionenstrahlen zu ermöglichen, findet die Massenspektrometrie in einem Hochvakuum statt (CAMANN 2001).

Ein Massenspektrometer besteht im Wesentlichen aus 4 Komponenten. Einem Einlasssystem, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und einem Detektor. Über das Einlasssystem wird die zu analysierende Probe in das Spektrometer eingebracht. Die Ionenquelle wandelt die einzelnen Probenkomponenten in freie Anionen und Kationen um. Diese Ionisierung erfolgt durch Beschuss mit Elektronen, Ionen, Photonen oder Molekülen. Für die Massenauftrennung wird eine elektrische Spannung angelegt, in der die Ionen beschleunigt werden. Die anschließende Trennung nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis erfolgt im Massenanalysator. Hierbei entsteht ein selektiver Ionenstrom, der von dem Detektor in

elektrische Signale umgewandelt wird. Ein Computer errechnet anschließend das Massenspektrum, welches Molekularmasse, Summenformel und Fragmentierungsmuster der zu analysierenden Probe enthält und eine Identifizierung der Komponenten ermöglicht (SKOOG et al. 1996).

Gaschromatographie – Massenspektrometrie / Massenspektrometrie

Die Gaschromatographie – Massenspektrometrie / Massenspektrometrie (GC-MS/MS) ist eine kombinierte Methode zur Analyse komplexer organischer und biochemischer Verbindungen.

Die Kopplung eines Gaschromatographen mit einem Massenspektrometer (GC-MS) bildet den ersten funktionellen Anteil der GC-MS/MS. Hierbei dient das Gaschromatographiegerät der Auftrennung des untersuchten Stoffgemisches, das Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert die einzelnen Komponenten.

Die zweite funktionelle Untereinheit ist ein Tandem-Massenspektrometer (MS/MS). Hierzu werden zwei Massenspektrometer hintereinander geschaltet. Dies dient zum einen der weiteren Fragmentierung von Ionen, zum anderen kann durch diese Kopplung die Sensibilität und die Selektivität des Analyseverfahrens entscheidend verbessert werden.

Chemische Analyse

Bei dieser Dissertation wurde zur Analyse der ITC aus den *Eruca sativa*- Proben die Gaschromatographie – Massenspektrometrie / Massenspektrometrie eingesetzt. Die Parameter der GC-MS/MS und das Temperatur-Programm des Gaschromatographen sind aus den Tabellen 2.7 und 2.8 zu entnehmen.

Tab. 2.7: Parameter der GC-MS/MS

Verwendete Parameter	
Autosampler, Spritze wird vor und nach der Aufgabe der Probe gespült	
Injektionsvolumen:	1 µl
Splitless-Injektion	
Säule VF 35 ms, Länge 30 m, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,5 µm	
MS-Einstellungen:	Filament-Spannung 70 eV Elektronenstossionisations-Modus Massenbereich 90-180 g/mol

Tab. 2.8: Temperaturprogramm des Gaschromatographen

	T [°C]	T-Rate [°C/min]	T-Hold [min]
1	30		0,50
2	90	5,00	5,00
3	160	5,00	5,00
4	280	30,00	10,00

Kalibrierfunktionen für die ITC

Um die ITC-Konzentrationen in den *Eruca sativa*-Proben zu ermitteln, mussten zunächst Kalibrierfunktionen der einzelnen ITC erstellt werden. Die Kalibrierung erfolgte mit Standardlösungen der verschiedenen ITC in den Konzentrationen 5 µg/l, 10 µg/l, 50 µg/l, 100 µg/l, 500 µg/l und 1000 µg/l. Für jede Konzentration wurden drei Lösungen analysiert. Aus dem Chromatogramm wurden die Peakflächen der ITC bestimmt, die Mittelwerte berechnet und eine Kalibrierfunktion erstellt. Das Bestimmtheitsmaß für die Kalibrierfunktion von Erysolin lag bei $R^2 = 0,9433$, von MTBITC bei $R^2 = 0,9983$, von PEITC bei $R^2 = 0,9998$ und von Sulforaphan bei $R^2 = 0,9989$. Die Abbildung 2.5 zeigt beispielhaft die Kalibrierfunktion für MTBITC.

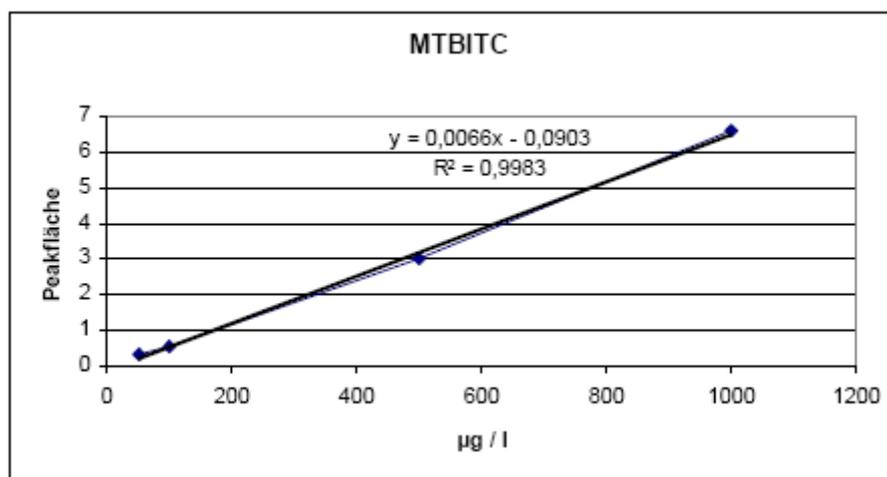


Abb. 2.5: Kalibrierfunktion für MTBITC (nach HÖFER 2005)

Ermittlung der ITC-Konzentrationen in *Eruca sativa*

Die Bestimmung der ITC in den Proben erfolgte, wie auch die Messung der Standardlösungen, in Dreifachbestimmung. Um die jeweiligen ITC eindeutig zu identifizieren wurden die Retentionszeiten der Peakflächen und die Massenspektren der *Eruca sativa*-Proben mit denen der Standardlösungen verglichen. Mit Hilfe der GC-Software wurden die Integrale der Peaks berechnet. Anschließend wurden die Werte der einzelnen ITC summiert und die MW mit deren Standardabweichungen gebildet. Über die Regressionsgerade der Kalibrierfunktion konnte dem jeweiligen Integral eine eindeutige Konzentration [$\mu\text{g/l}$] zugeordnet werden.

Anhand der Messergebnisse für MTBITC soll die weitere Berechnung exemplarisch dargestellt werden.

Der MW der MTBITC-Peakflächen lag bei 24,07, was einer Konzentration von 3684,00 $\mu\text{g/l}$ entspricht. Dieser Wert muss nun auf 20 ml Probenvolumen bezogen werden.

$$3684 \mu\text{g/l} \quad \Rightarrow \quad \frac{3684 \mu\text{g/l}}{50} = 73,68 \mu\text{g} / 20 \text{ ml}$$

In diesem 20 ml Probenvolumen wurden 10 g eingewogenes Pflanzenmaterial extrahiert. Daher ergibt sich:

$$73,68 \mu\text{g} / 20 \text{ ml} = 73,68 \mu\text{g} / 10 \text{ g Pflanzenmaterial}$$

Die MTBITC-Konzentration in mg/kg Frischgewicht (FG) kann nun wie folgt berechnet werden.

$$\Rightarrow \frac{73,68 \mu\text{g} \times 100}{10 \text{ g} \times 100} = 7,368 \text{ mg/kg FG}$$

Unter Einbeziehung der TS wird nun die MTBITC-Konzentration in mg/kg TS berechnet. Die TS = 9,20 % des FG

$$\Rightarrow \frac{7,368 \text{ mg/kg FG}}{9,20 \%} \times 100 \% = 80,09 \text{ mg/kg TS}$$

2.2.7 Datenauswertung und Statistik

Die Ergebnisse des Cometassays, sowie der GST- und der Apoptose-Messung sind in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Darstellungen der OTM-Werte des Cometassays sind kombiniert mit den Ergebnissen der Zellvitalitätsbestimmung in Form eines zusätzlichen Liniendiagrammes. In den Versuchsreihen zur Apoptose wurde lediglich MTBITC getestet, da sich im Cometassay mit *Eruca sativa* kein Anhaltspunkt für Apoptose als möglichen zugrundeliegenden Mechanismus fand.

Alle Grafiken wurden aus den arithmetischen MW von mindestens drei unabhängigen Versuchsdurchläufen erstellt, welche bei den Untersuchungen zu GST und Apoptose in Doppelbestimmung durchgeführt wurden.

Die Bestimmung der jeweiligen Standardabweichung, sowie der Nachweis der statistischen Signifikanz mittels t-Test nach Student erfolgte mit dem Programm Microsoft Excel. Bei dem t-Test wurde eine Normalverteilung der Daten vorausgesetzt. Der Test wurde beidseitig durchgeführt.

Bei den Untersuchungen zur Gentoxizität, GST und Apoptose wurden die gemittelten Ergebnisse mit dem MW der Lösungsmittelkontrolle (Aqua dest. bzw. DMSO) verglichen, bei den Versuchsreihen zur Antigentoxizität mit dem MW der Referenzkontrolle bzw. Positivkontrolle. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*), ein p-Wert von $\leq 0,01$ als hochsignifikant (**) betrachtet.

Tabellarisch ist die statistische Versuchsauswertung für jede Konzentration der Testsubstanzen, sowie für die Kontrollen dargestellt. Die Tabellen beinhalten neben den MW, die Zahl der Testdurchläufe (n), die Standardabweichung (STABW) sowie die statistische Signifikanz (t-Test).

3 Ergebnisse

Zur Ergebnisdarstellung des Cometassay wurden die Parameter OTM und „tail length“ (TL) verwendet. Der OTM ist das Produkt aus TL und relativer Schweifintensität:

$$|m_k m_s| \times \text{DNA}_{\text{Schweif}}$$

mit $|m_k m_s|$ als Abstand zwischen Massenmittelpunkt des Kopfes und Massenmittelpunkt des Schweifs (OLIVE 2002).

Die TL ist als Funktion der elektrophoretischen Bedingungen (Spannung, Zeit) zu sehen.

Die Auswertung von OTM und TL basierte auf den Messungen von insgesamt 102 Zellen (zwei Objektträger mit jeweils 51 ausgewerteten Zellen) je Substanzkonzentration bzw. Kontrolle.

3.1 Gentoxische Effekte von *Eruca Sativa*-Pflanzenextrakt

In Abbildung 3.1 findet sich neben der Zellvitalität, die Darstellung der DNA-Migration in HepG2-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (12,5 – 50 µl/ml) als OTM. Das Extrakt induzierte keine signifikante DNA-Migration. Bei der höchsten Konzentration von 50 µl/ml Extrakt erreichte der OTM einen Wert von $0,87 \pm 0,36$ und zeigte damit einen ähnlichen Wert wie die Lösungsmittelkontrolle ($0,60 \pm 0,11$). Die MW der Zellvitalität lagen in allen Experimenten über 80 %.

Tab. 3.1: OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Extrakt (24 h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
Aqua dest.	0,60	4	0,11	
12,5 µl/ml	0,76	4	0,16	0,1455
25 µl/ml	0,78	4	0,14	0,0921
37,5 µl/ml	0,86	4	0,36	0,2543
50 µl/ml	0,87	4	0,36	0,2301
B[a]P 50µM	4,00	4	0,27	0,00003

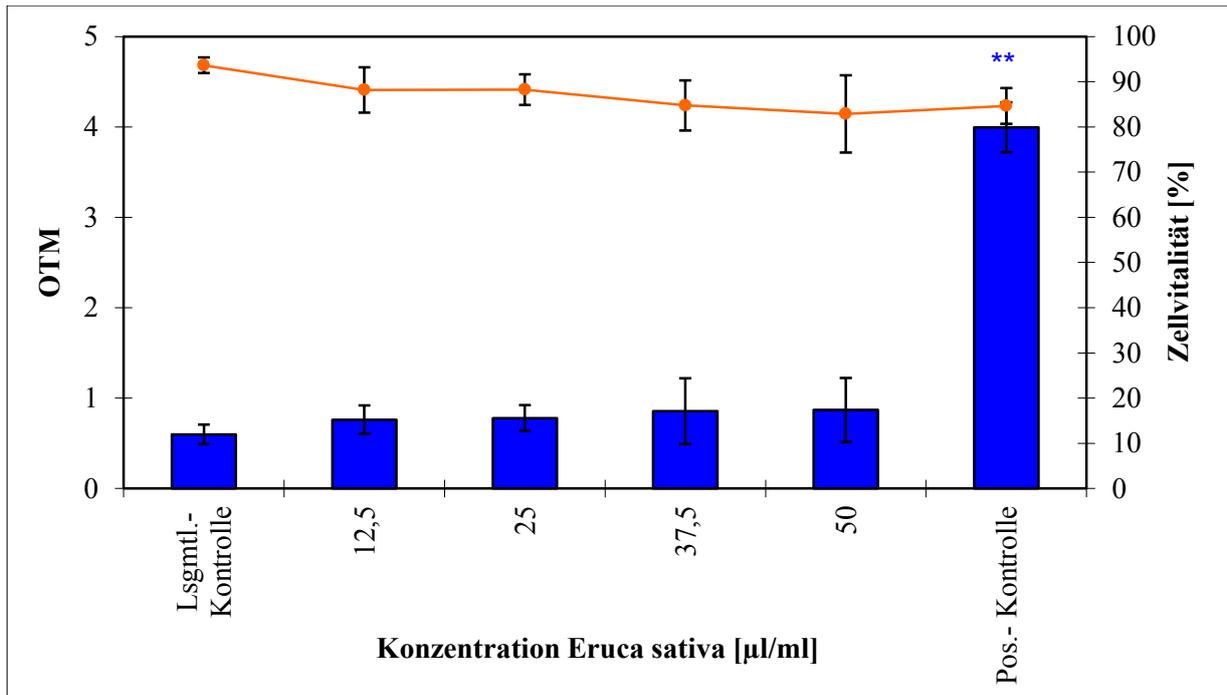


Abb. 3.1: OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Extrakt (24h). Die Balken repräsentieren die MW \pm SD, die Linie den Einfluss von *Eruca sativa* auf die Zellvitalität (MW \pm SD), n=4

Entsprechend konnte keine signifikante Zunahme des Parameters TL beobachtet werden (vgl. Abb. 3.2). Die höchste Konzentration von 50 $\mu\text{l/ml}$ Pflanzenextrakt zeigte ähnliche Werte wie die Lösungsmittelkontrolle. Der TL -Wert betrug im Mittel $12,52 \pm 1,81$.

Tab. 3.2: TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 $\mu\text{l/ml}$ Pflanzenextrakt (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	Stabw	t-Test
Aqua dest.	10,34	4	0,32	
12,5 $\mu\text{l/ml}$	11,73	4	1,11	0,0829
25 $\mu\text{l/ml}$	12,03	4	1,14	0,0543
37,5 $\mu\text{l/ml}$	12,34	4	1,66	0,0933
50 $\mu\text{l/ml}$	12,52	4	1,81	0,0926
B[a]P 50 μM	45,18	4	2,66	0,0001

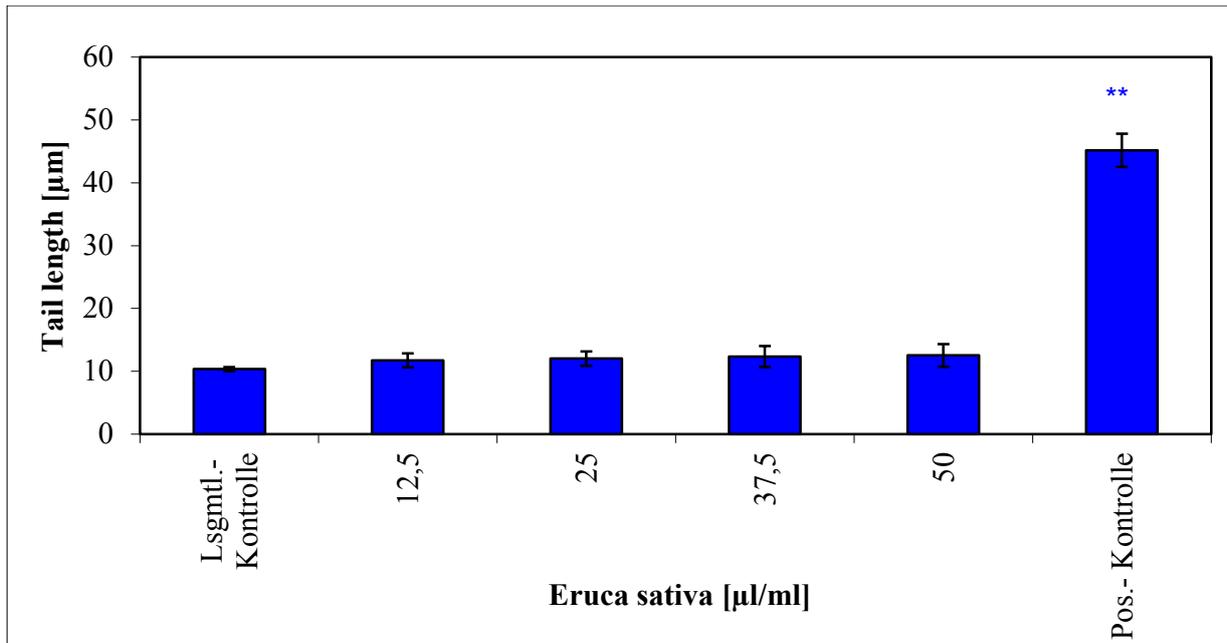


Abb. 3.2: TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12, 5 - 50 µl/ml *Eruca sativa* - Extrakt (24h) (MW ± SD), n=4

3.2 Antigenoxische Effekte von *Eruca Sativa*-Pflanzenextrakt

In Abbildung 3.3 ist die DNA-Migration von HepG2-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber 3 bis 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt und anschließender Aussetzung gegenüber 50 µM B[a]P (24h) als OTM dargestellt.

Der OTM, der bei einer Exposition der Zellen gegenüber 3 µl/ml Extrakt erreicht wurde ($3,13 \pm 0,32$) unterschied sich unwesentlich von dem OTM der Referenzkontrolle (B[a]P 50 µM, OTM: $3,46 \pm 0,27$). In den Konzentrationen 6 µl/ml und 50 µl/ml war der OTM im Vergleich zur Positivkontrolle durchschnittlich 1,57-fach signifikant vermindert. Eine Exposition der Zellen gegenüber 12,5 µl/ml und 37,5 µl/ml Pflanzenextrakt resultierte in einer durchschnittlich 2,33-fachen Verminderung des OTM zur Positivkontrolle. 25 µl/ml Pflanzenextrakt (OTM: $0,69 \pm 0,03$) reduzierten die DNA-Migration 5,01-fach im Vergleich zu den Zellen die lediglich mit 50 µM B[a]P (OTM: $3,46 \pm 0,27$) exponiert wurden.

Die MW für die Vitalität der Zellen lagen bei allen Experimenten über 80 %.

Tab. 3.3: OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h) und 50 μM B[a]P (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
Aqua dest. + Aqua dest.	0,59	3	0,02	0,0027
50 $\mu\text{l/ml}$ + 50 $\mu\text{l/ml}$	0,64	3	0,10	0,001
3 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	3,13	3	0,32	0,2366
6 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	2,39	3	0,28	0,0084
12,5 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	1,52	3	0,14	0,0014
25 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	0,69	3	0,03	0,0029
37,5 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	1,46	3	0,05	0,0045
50 $\mu\text{l/ml}$ + B[a]P 50 μM	2,06	3	0,08	0,0074
B[a]P 50 μM + B[a]P 50 μM	3,46	3	0,27	

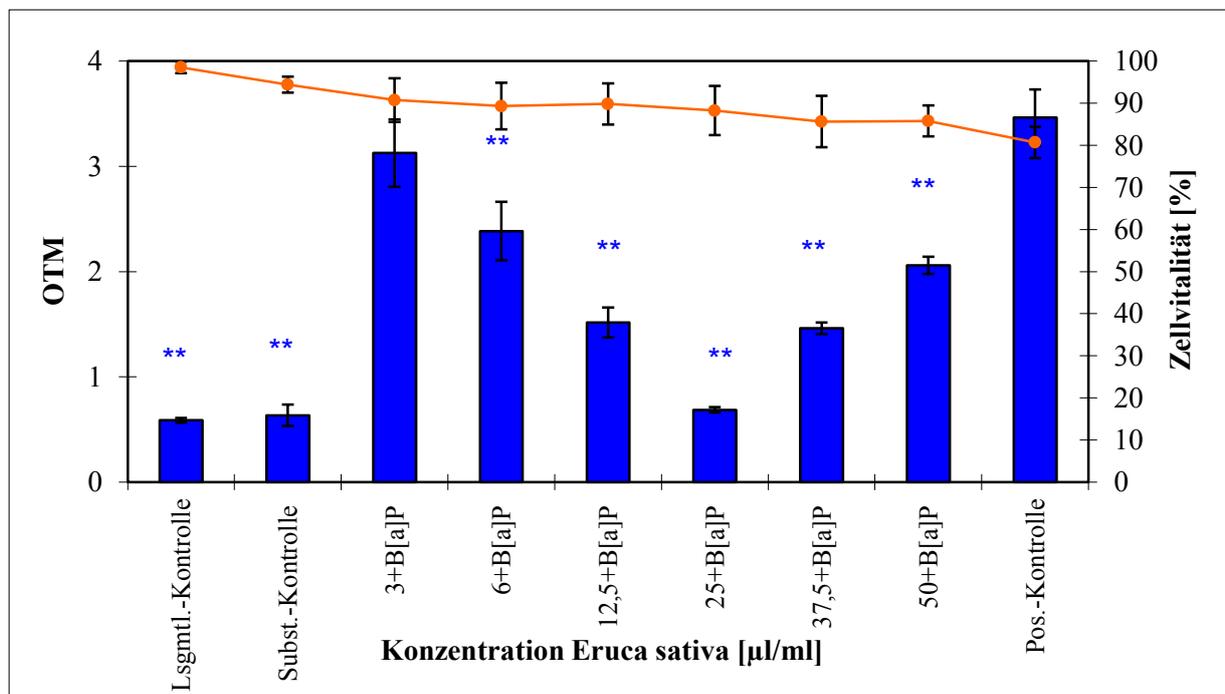


Abb. 3.3: OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Extrakt (24h) und 50 μM B[a]P (24h). Die Balken repräsentieren die MW \pm SD, die Linie den Einfluss der Kombinationsexposition auf die Zellvitalität (MW \pm SD), n=3

Ein ähnliches Bild zeigte der Parameter TL (Abb. 3.4). Die Konzentrationsbereiche von 6 $\mu\text{l/ml}$ und 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt zeigten eine signifikante Reduktion der TL im Vergleich zur Referenzkontrolle. Die Exposition der Zellen gegenüber 12,5, 25, 37,5 $\mu\text{l/ml}$ Extrakt resultierte in einer hochsignifikanten Abnahme der TL. Der TL-Wert der niedrigsten getesteten Pflanzenextraktkonzentration (3 $\mu\text{l/ml}$) unterschied sich nicht von der TL der ausschließlich mit 50 μM B[a]P behandelten Zellen.

Tab. 3.4: TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
Aqua dest. + Aqua dest.	9,26	3	0,35	0,0057
50 µl/ml + 50 µl/ml	9,32	3	0,55	0,0052
3 µl/ml + B[a]P 50 µM	32,94	3	2,39	0,2793
6 µl/ml + B[a]P 50 µM	25,14	3	0,34	0,0336
12,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	17,81	3	0,87	0,0097
25 µl/ml + B[a]P 50 µM	11,18	3	0,56	0,0061
37,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	19,67	3	2,96	0,0042
50 µl/ml + B[a]P 50 µM	24,34	3	2,32	0,0134
B[a]P 50 µM + B[a]P 50 µM	36,16	3	3,64	

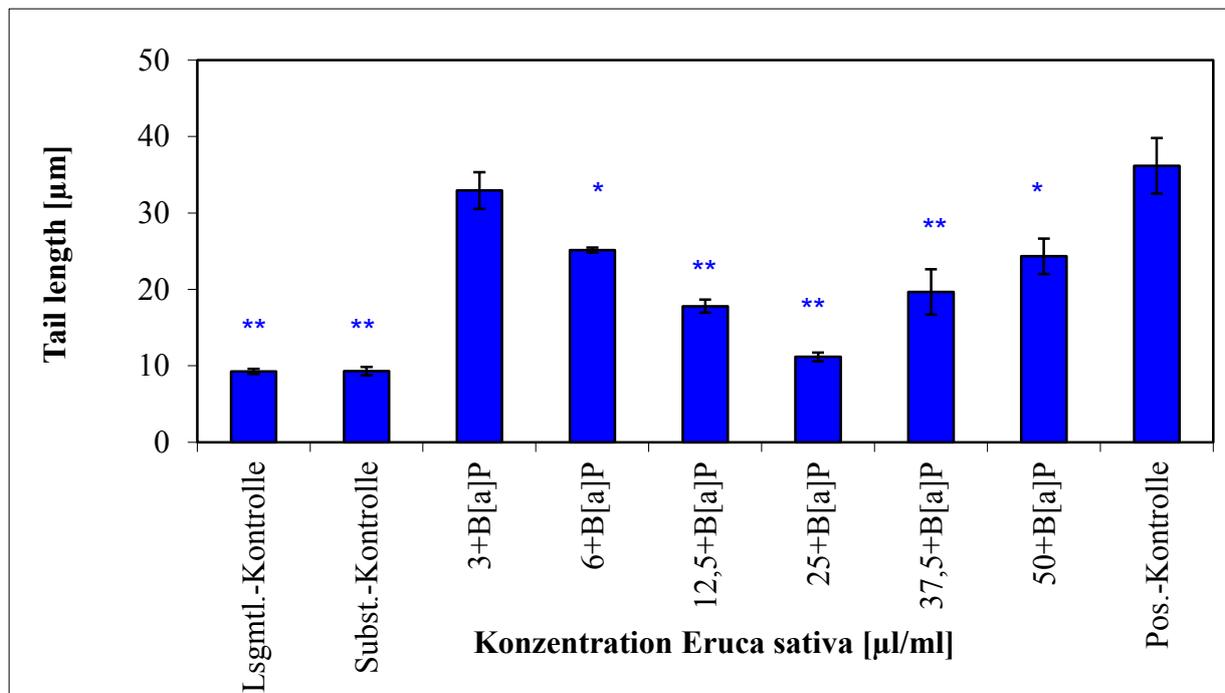


Abb. 3.4 : TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 - 50 µl/ml *Eruca sativa*-Extrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h) (MW ± SD), n=3

3.3 Gentoxische Effekte von MTBITC

Abbildung 3.5 zeigt neben der Zellvitalität die OTM-Werte von HepG2-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber 2,5 – 30 µM MTBITC. Ein OTM-Wert von $0,72 \pm 0,07$ zeigte bei einer Konzentration von 10 µM einen signifikanten Unterschied zur Lösungsmittelkontrolle. Bis zu einer Konzentration von 20 µM induzierte MTBITC

insgesamt betrachtet jedoch keine wesentliche Steigerung der OTM-Werte. Deutliche signifikante und hochsignifikante Abweichungen wiesen die Konzentrationen 25 und 30 μM auf. Ihre OTM-Werte betragen $5,81 \pm 1,25$ und $4,88 \pm 0,76$. Dies entspricht im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle einer Erhöhung um das 10,96-fache bzw. 9,21-fache. Die Zellvitalität (MW) lag in fast allen Versuchen über 75 %. Hingegen zeigte sich bei 30 μM MTBITC ein zytotoxisches Potential, nach Exposition lebten im Mittel noch 61,70 % der Zellen.

Tab. 3.5: OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 μM - 30 μM MTBITC (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
DMSO	0,53	3	0,07	
2,5 μM	0,61	3	0,02	0,1702
5 μM	0,64	3	0,02	0,1028
10 μM	0,72	3	0,07	0,0334
20 μM	0,66	3	0,14	0,247
25 μM	5,81	3	1,25	0,0178
30 μM	4,88	3	0,76	0,0096
B[a]P 50 μM	4,10	3	0,21	0,0005

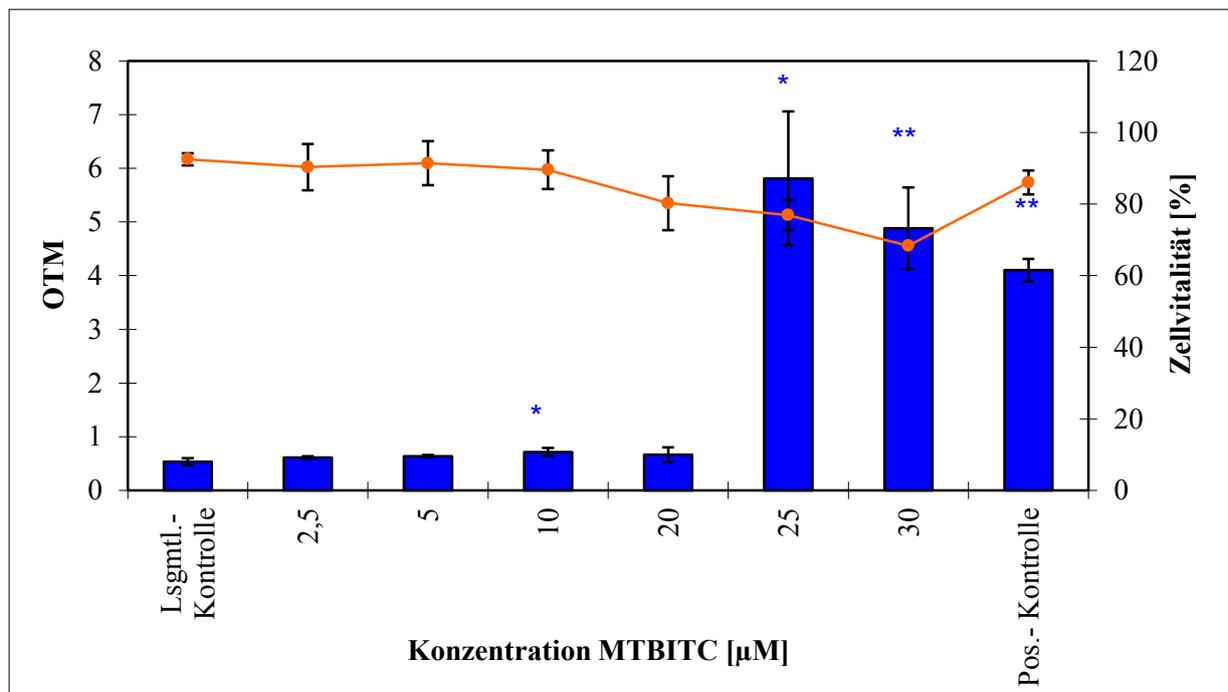


Abb. 3.5: OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 μM MTBITC (24h). Die Balken repräsentieren die MW \pm SD, die Linien die Zellvitalität (MW \pm SD), n=3

In ähnlicher Weise stellte sich die TL dar (Abb. 3.6). Bis zu einer Konzentration von 20 μM MTBITC zeigte sich keine wesentliche Änderung des Parameter TL. Eine Exposition der Zellen gegenüber 25 μM MTBITC (TL: $55,83 \pm 4,88$) resultierte in einer 5,00-fach erhöhten TL verglichen zur Lösungsmittelkontrolle ($11,16 \pm 1,31$). 30 μM MTBITC (TL: $52,97 \pm 5,26$) boten mit einer 4,75-fachen Zunahme des TL ebenso einen hochsignifikanten Unterschied.

Tab. 3.6: TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 μM MTBITC (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
DMSO	11,16	3	1,31	
2,5 μM	10,83	3	0,48	0,7109
5 μM	10,86	3	1,45	0,7985
10 μM	11,80	3	1,80	0,6498
20 μM	11,64	3	2,11	0,7602
25 μM	55,83	3	4,88	0,0024
30 μM	52,97	3	5,26	0,0035
B[a]P 50μM	45,25	3	3,25	0,0009

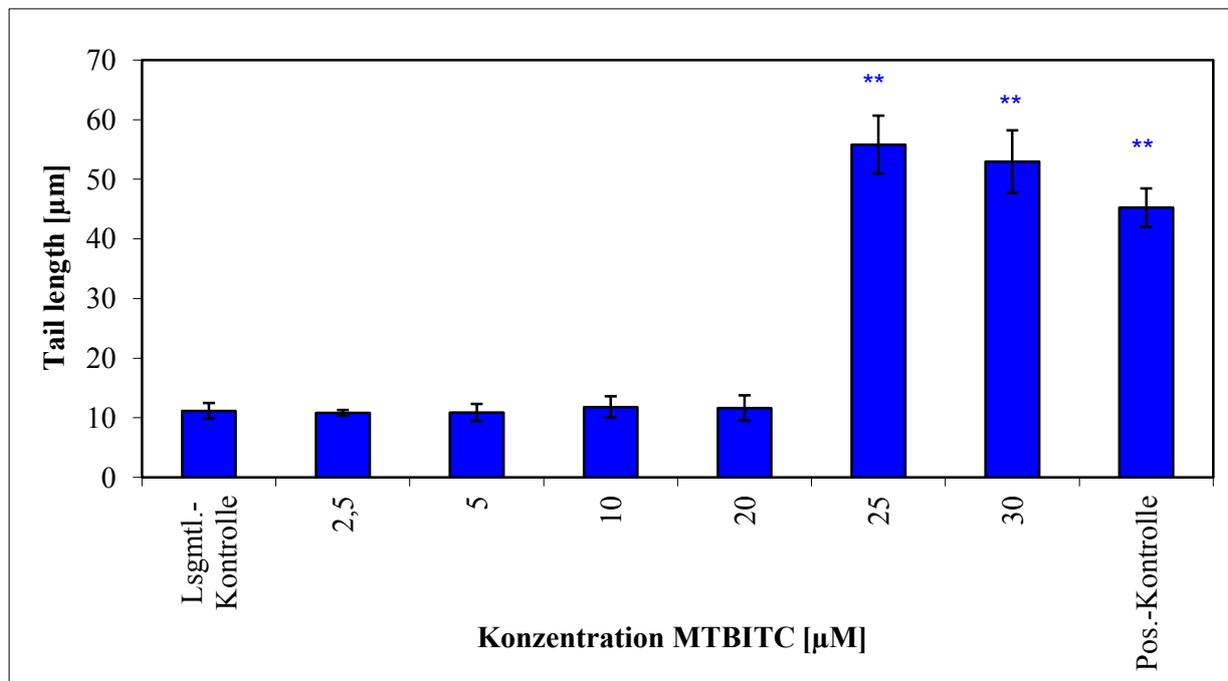


Abb. 3.6: TL nach Exposition von HepG2-Zellen mit 2,5 - 30 μM MTBITC (24h) (MW \pm SD), n=3

3.4 Antigentoxische Effekte von MTBITC

Die Auswertung der gemessenen OTM-Werte bei der Exposition der Zellen gegenüber MTBITC und B[a]P zeigt Abbildung 3.7. Der Konzentrationsbereich von 2,5 μM bis 10 μM MTBITC zeigte eine hochsignifikante Reduktion der DNA-Migration, durchschnittlich 2,27-fach im Vergleich zur Positivkontrolle bzw. Referenzkontrolle. Bei einer Exposition der Zellen gegenüber 20 μM MTBITC konnte ein OTM-Wert von $7,21 \pm 0,11$ detektiert werden, welcher eine hochsignifikante Verstärkung der DNA-Migration zeigte. Die Zellvitalität lag bei allen Experimenten über 70 %.

Tab. 3.7: OTM-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 μM MTBITC (24h) und 50 μM B[a]P (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
DMSO + DMSO	0,74	3	0,07	0,0000
20 μM + 20 μM	0,62	3	0,07	0,0000
2,5 μM + B[a]P 50 μM	1,74	3	0,01	0,0005
5 μM + B[a]P 50 μM	1,47	3	0,02	0,0002
10 μM + B[a]P 50 μM	2,02	3	0,05	0,0000
20 μM + B[a]P 50 μM	7,21	3	0,11	0,0000
B[a]P 50 μM + B[a]P 50 μM	3,90	3	0,08	

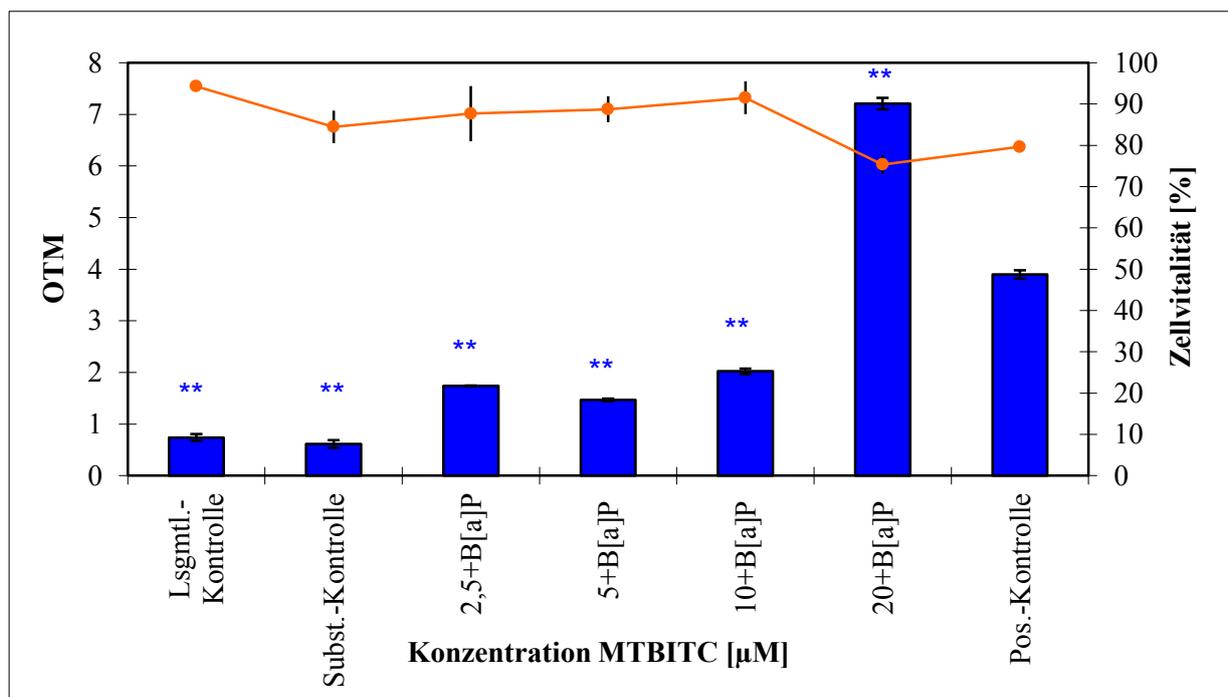


Abb. 3.7: OTM und Zellvitalität nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 μM MTBITC (24h) und 50 μM B[a]P (24h). Die Balken repräsentieren die MW \pm SD, die Linie die Zellvitalität (MW \pm SD), n=3

Die TL reduzierte sich ebenfalls im Konzentrationsbereich von 2,5 μM bis 10 μM MTBITC (Abb. 3.8). Sie betrug bei 2,5 μM 18,51 $\mu\text{m} \pm 2,88$ und wich hochsignifikant von der Positivkontrolle mit 33,43 $\mu\text{m} \pm 2,01$ ab. Dies entspricht einer TL-Reduktion um das 1,81-fache. Bei einer Konzentration von 20 μM MTBITC war die TL mit 53,04 $\mu\text{m} \pm 2,39$ im Vergleich zur Referenzkontrolle mit 33,43 $\mu\text{m} \pm 2,01$ hochsignifikant erhöht.

Tab. 3.8: TL-MW nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 μM MTBITC (24h) und 50 μM B[a]P (24h), n, STABW und t-Test

	MW	n	STABW	t-Test
DMSO + DMSO	9,52	3	0,34	0,0019
20 μM + 20 μM	8,58	3	0,67	0,0009
2,5 μM + B[a]P 50 μM	18,51	3	2,88	0,0028
5 μM + B[a]P 50 μM	15,90	3	0,88	0,0013
10 μM + B[a]P 50 μM	22,22	3	5,24	0,0512
20 μM + B[a]P 50 μM	53,04	3	2,39	0,0005
B[a]P 50 μM + B[a]P 50 μM	33,43	3	2,01	

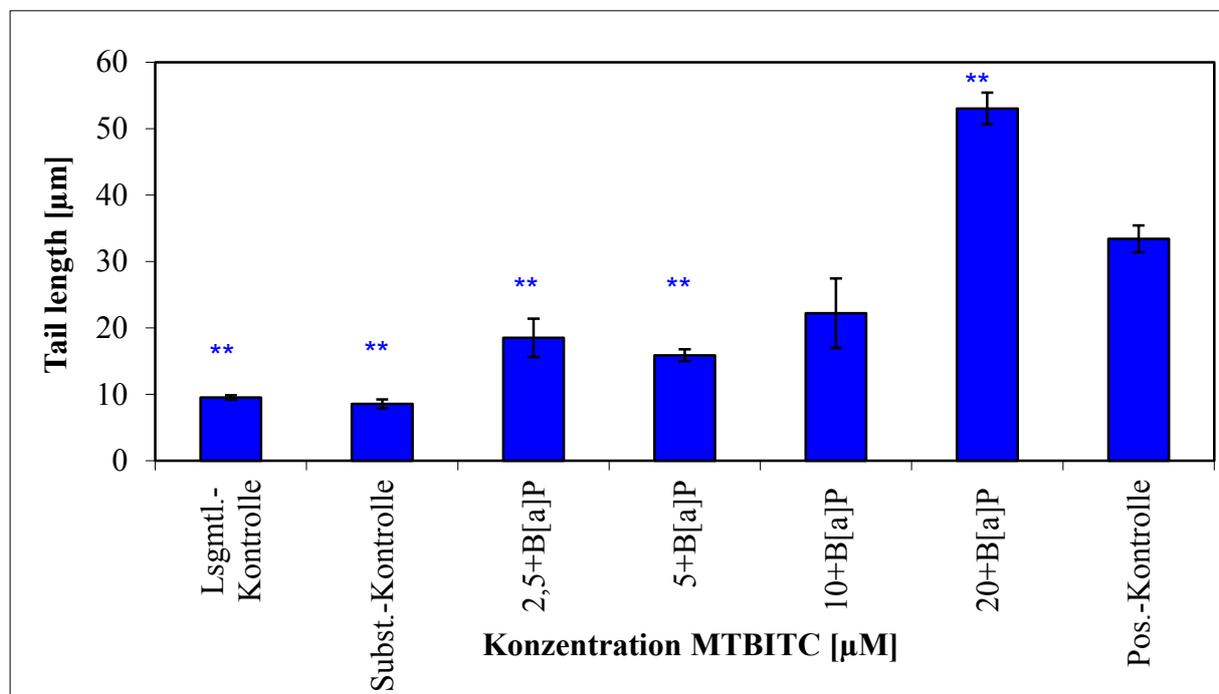


Abb. 3.8: TL nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 μM MTBITC (24h) und 50 μM B[a]P (24h) (MW \pm SD), n=3

3.5 Modulation der GST in HepG2-Zellen

Die totale (zytosolische und mikrosomale) GST-Aktivität wurde in Bezug zur Aktivität der Kontrollzellen („Hintergrund“) wie folgt berechnet:

Zunächst wurde der Absorptionszuwachs (ΔA_{340}) der Proben bestimmt. Aus der Kurve der Absorptionswerte (A_{340}) als Funktion der Zeit (min) wurden zwei Punkte eines linearen Abschnitts gewählt und mit folgender Formel konnte der Absorptionszuwachs berechnet werden:

$$\Delta A_{340}/\text{min} = \frac{A_{340}(\text{Zeitpunkt 2}) - A_{340}(\text{Zeitpunkt 1})}{\text{Zeitpunkt 2 (min)} - \text{Zeitpunkt 1 (min)}}$$

Anhand des Absorptionszuwachses der Proben wurde die GST-Aktivität mittels folgender Formel ermittelt.

$$\text{GST-Aktivität} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min}}{0.00503 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.2 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \times \text{Probenverd\u00fcnnung}$$

(nmol/ml/min)

Entsprechend wurde die GST-Aktivität des „Hintergrund“ berechnet und dieser Wert von der Enzymaktivität der Proben abgezogen. Man erhält demzufolge die absolute Aktivität der GST.

3.5.1 *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt

Die Ergebnisse der GST-Aktivitäts-Messung durch Exposition der HepG2-Zellen mit *Eruca sativa*-Proben ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Die Exposition gegenüber 25 $\mu\text{l/ml}$ Pflanzenextrakt hatte eine signifikante Erhöhung der GST-Aktivität um 21 % auf 121 % \pm 7 % verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle zur Folge. Höhere Konzentrationen führten zu einer Reduktion der Glutathion S-Transferase-Aktivität. Bei Inkubation mit 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Extrakt ließ sich eine Abnahme der Aktivität um 22 % auf 88 % \pm 4 % beobachten.

Tab. 3.9: MW GST-Aktivität und MW prozentual zur Lösungsmittelkontrolle nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 - 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h), n, STABW und t-Test

	MW GST-Aktivität	MW [% zu A.d.]	n	STABW [% zu A.d.]	t-Test
Aqua dest.	7,19	100	3		
12,5 µl/ml	8,05	112	3	5	0,057
25 µl/ml	8,73	121	3	7	0,034
37,5 µl/ml	6,71	93	3	7	0,240
50 µl/ml	6,30	88	3	4	0,029

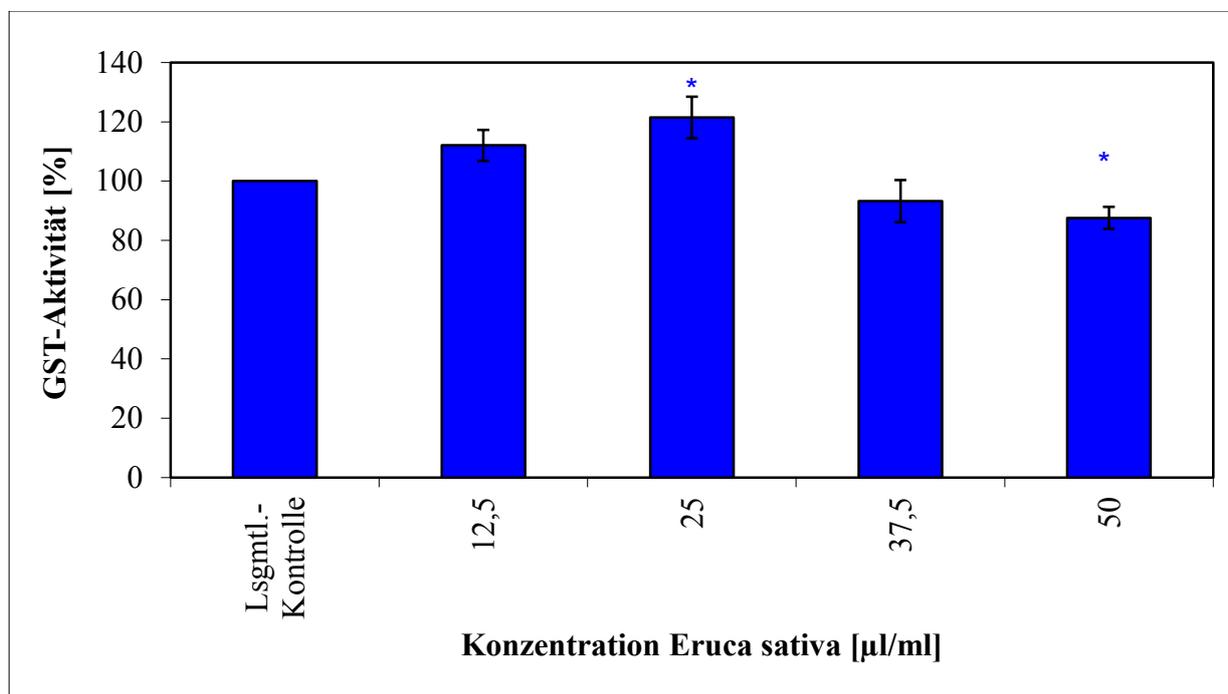


Abb. 3.9: Modulation der GST-Aktivität [%] in HepG2-Zellen nach Exposition gegenüber 12,5 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h) (MW ± SD), n=3

3.5.2 MTBITC

Die Abbildung 3.10 stellt die GST-Aktivitäts-Messung der mit MTBITC behandelten Zellen dar. Die Exposition des HepG2-Zellen gegenüber 2,5 µM MTBITC wies einen signifikanten Anstieg der GST-Aktivität von 24 % auf 124 % ± 6 % im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Ein ähnliches Ergebnis ergab die Exposition gegenüber 5 µM. Eine Inkubation gegenüber 20 µM MTBITC führte zu einer Reduktion der GST-Aktivität um 59 % auf 41 % ± 12 % bezogen auf DMSO.

Tab. 3.10: MW GST-Aktivität und MW prozentual zur Lösungsmittelkontrolle nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 20 μM MTBITC (24h), n, STABW und t-Test

	MW GST-Aktivität	MW [% zu DMSO]	n	STABW [% zu DMSO]	t-Test
DMSO	4,23	100	3		
2,5 μM	5,21	124	3	6	0,020
5 μM	5,19	123	3	5	0,016
10 μM	3,94	93	3	7	0,204
20 μM	1,69	41	3	12	0,013
25 μM	1,69	41	3	16	0,023

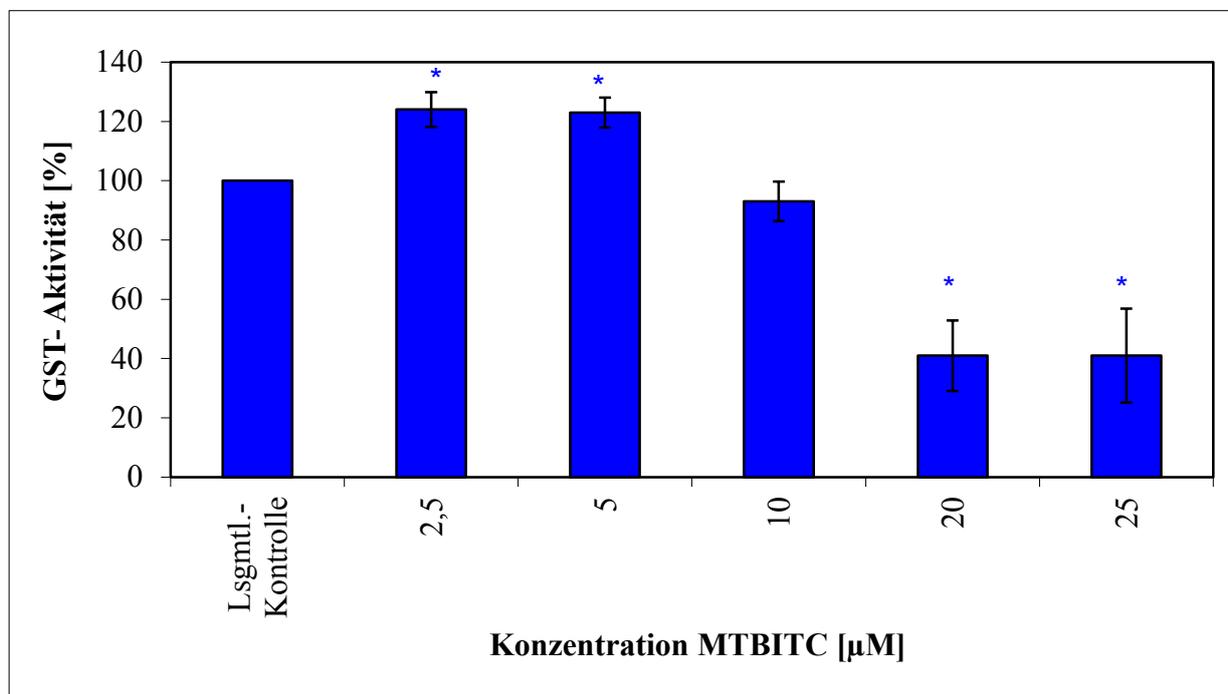


Abb. 3.10: Modulation der GST-Aktivität [%] in HepG2-Zellen nach Exposition gegenüber 2,5 – 25 μM MTBITC (24h) (MW \pm SD), n=3

3.6 Apoptose-Induktion in HepG2-Zellen

Der Absorptionswert jeder Probe wurde gemessen und dann in einen Apoptoseindex umgerechnet, wobei die unbehandelten Zellen mit einem Index von eins definiert wurden. Der Apoptoseindex der jeweiligen Probe wurde somit per Dreisatz ermittelt, wobei der Absorptionswert der Probe mit 1 multipliziert wurde und durch den Absorptionswert der unbehandelten Zellen geteilt wurde.

MTBITC

Die Auswertung der Apoptose-Messung mittels monoklonaler Antikörper wird in Abbildung 3.11 dargestellt. Zellen, welche mit MTBITC-Konzentration von 2,5 μM oder 5 μM exponiert wurden, wiesen keine Apoptoseinduktion auf. Lediglich eine Inkubation mit 20 μM MTBITC führte zu einer signifikanten Erhöhung des Apoptoseindex auf $1,73 \pm 0,19$. MTBITC-Konzentrationen von 10 μM und 25 μM führten, verglichen mit der Negativkontrolle, zu einer Induktion der Apoptose von ca. 20 %.

Tab. 3.11: MW der Apoptoseindizes nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 μM MTBITC (24h), n, STABW und t-Test

	MW Index	n	STABW	t-Test
Unbehandelte Zellen	1,00	3		0,393
DMSO	1,13	3	0,21	
2,5 μM	0,72	3	0,28	0,115
5 μM	1,00	3	0,13	0,118
10 μM	1,22	3	0,14	0,616
20 μM	1,73	3	0,19	0,023
25 μM	1,22	3	0,16	0,617
30 μM	0,98	3	0,24	0,468
50 μM	1,17	3	0,15	0,835

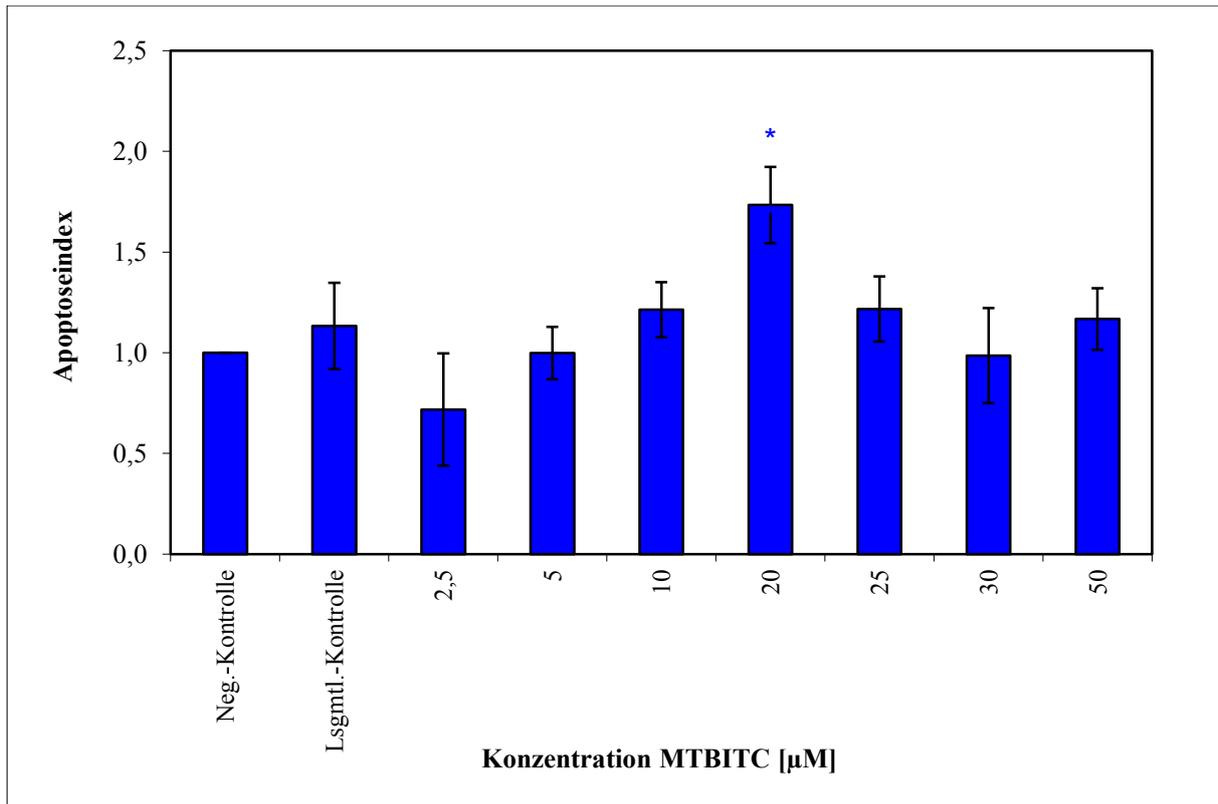


Abb. 3.11: Apoptoseindizes nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 - 30 µM MTBITC (24h) (MW ± SD), n=3

3.7 Quantifizierung von ITC in *E. sativa*-Pflanzenextrakt

Der Anteil der TS im untersuchten *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt betrug 9,20 %.

3.7.1 ITC-Konzentrationen in der Trockensubstanz

In Tabelle 3.12 sind die Einzelkonzentrationen der ITC in der TS des untersuchten *Eruca sativa*-Pflanzenextraktes aufgeführt. Unter den ITC auf die das *Eruca sativa*-Extrakt untersucht wurde, lagen Allylithiocyanat (AITC) und Benzylithiocyanat (BITC) in jeder Probe unter der Nachweisgrenzen (< 5 µg/µl).

Tab. 3.12: ITC-Konzentration in der TS des *Eruca sativa* (mg/kg TS)

Substanz	n	ITC-Konzentration [mg/kg TS]
MTBITC	3	80,09
Phenylethylisothiocyanat (PEITC)	3	0,64
SFN	3	135,92
Erysolin	3	57,38

4 Diskussion

Rucola (*Eruca sativa*) gehört zur großen, etwa 350 Gattungen zählenden, Pflanzenfamilie der *Brassicaceae*, welche auch beliebte Kulturpflanzen wie Weißkohl und Brokkoli umfaßt. In jüngster Vergangenheit erfreut sich Rucola beim Verbraucher immer größerer Beliebtheit, sei es als Salat, in Soßen oder als gedämpftes Blattgemüse. Charakteristisch ist sein schwach nussiges, mandel-ähnliches Aroma (JIROVETZ et al. 2002). Studien mit Zellkulturen, Tierversuche und auch epidemiologische Studien geben Hinweise darauf, dass Pflanzen der *Brassicaceae* einer Tumorentstehung entgegenwirken. So zeigten verschiedene *in vitro*-Studien, dass die Exposition von Testzellen (z. B. HepG2-Zellen) gegenüber eines DNA-schädigenden Agens in Kombination mit einem *Brassica*-Extrakt (z.B. Extrakt aus Senfsprossen) einen deutlich reduzierten DNA-Schaden erbrachte (UHL et al. 2003; GILL et al. 2004).

Resümiert man die große Anzahl von Versuchen mit Fütterung von *Brassicaceae*-Bestandteilen an Nager, zeigt sich eine Reduktion der Tumorentstehung. Diese antikarzinogenen Effekte können jedoch aufgrund des Artenunterschiedes und sehr hoher Konzentrationen der Testsubstanzen, die nicht der menschlichen Ernährung entsprechen, nicht auf den Menschen extrapoliert werden (VERHOEVEN et al. 1997). Dennoch, auch die bisher durchgeführten epidemiologischen Studien (Kohortenstudien, Fallkontrollstudien) zeigten eine umgekehrte Beziehung zwischen der Aufnahme von *Brassicaceae* und dem Krebsrisiko. Diese Tatsache wurde besonders deutlich bei Tumoren der Lunge und des Gastrointestinaltraktes (VERHOEVEN et al. 1996; VAN POPPEL et al. 1999; LYNN et al. 2006).

In letzter Zeit gehen die Bestrebungen der Forschung an *Eruca sativa* zur Identifikation des Gehaltes an sekundären Pflanzenstoffen und dabei insbesondere zur Analyse der enthaltenen ITC (BENNETT et al. 2002; BENNETT et al. 2006).

Studien zu gentoxischen oder chemopräventiven Eigenschaften des Rucola-Pflanzenmaterials als solchem wurden bisher noch nicht durchgeführt.

Die hier vorliegende Arbeit soll die gentoxischen, insbesondere jedoch die antigentoxischen Effekte von *E. sativa*-Pflanzenextrakt in humanen, metabolisch kompetenten Zellen untersuchen. Des Weiteren sollen die protektiven Mechanismen von MTBITC, als einem ITC welches in der Pflanzenmatrix in bedeutender Menge mittels GC-MS/MS Analysen nachgewiesen wurde, beleuchtet werden.

4.1 Untersuchungsergebnisse zur Gen- und Antigentoxizität von *E. sativa* versus bisherige Studienergebnisse

Eine Reihe zuvor mit Gemüseextrakten der *Brassica*-Arten durchgeführter Studien ergaben gentoxische Effekte des Pflanzenmaterials und auch der darin enthaltenen ITC, wenngleich sich diese Effekte erst in höheren Konzentrationsbereichen einstellten. Es wird berichtet, dass *Brassicaceae*-Gemüsesäfte in Bakterien zu Punktmutationen und in Säugetierzellen zu DNA-Schäden führen. Kassie et al. studierten neben Extrakten aus Phytopharmazeutika und Gewürzen verschiedener *Brassica*-Arten auch die gentoxischen Effekte von acht rohen Pflanzensäften (KASSIE et al. 1996). Die *Brassicaceae* Blumen-, Grün-, Rosen-, Weißkohl, Brokkoli, Kohlrabi, Steckrübe und Rettich wurden auf die Induktion von Punktmutationen im *Salmonella*-Mutagenitätstest mit den *S. typhimurium* Stämmen TA98 und TA100 überprüft. Es wurden reparable DNA-Schäden in *E. coli* K-12-Zellen sowie klastogene Effekte in chinesischen Hamster Ovarialzellen (CHO) und SV₄₀-transformierten Zellen des indischen Muntjak (SVM) analysiert.

In den Bakterientestsystemen induzierten alle Gemüsesäfte (je 100 µl bis 400 µl) gentoxische Effekte in Abfolge von Rosenkohl > Weißkohl > Blumekohl > Grünkohl > Kohlrabi > Brokkoli > Steckrübe > Rettich. Merkwürdig reduziert wurde dieser mutagene Effekt durch Zugabe eines exogenen metabolischen Systems (S9-Mix) (vgl. Kapitel 2.1.4), wenngleich sich die genannte Reihenfolge nicht änderte. Diese Beobachtung lässt eine Detoxifizierung der Testsubstanzen und ihrer Inhaltsstoffe vermuten.

In den Versuchsreihen mit Säugetierzellen induzierten sechs der untersuchten Pflanzensäfte (je 40-80 µl/ml Medium) messbare Effekte in Form von chromosomalen Abberationen und Schwesterchromatidaustauschen. Es ergab sich folgende Reihenfolge der klastogenen Auswirkungen: Rosenkohl > Weißkohl > Grünkohl > Blumenkohl ≈ Brokkoli ≈ Kohlrabi. Beachtenswert ist, dass die beobachteten gentoxischen Effekte von einer ausgeprägten Zunahme der Zytotoxizität begleitet waren.

Hingegen ergaben die Untersuchungen auf Gentoxizität von *Eruca sativa* im Cometassay, im Vergleich zu den Forschungsergebnissen von Kassie et al., keine signifikant mutagenen Effekte.

Vielmehr zeigte sich eine starke antigentoxische Wirkung des *E. sativa*-Pflanzenextraktes in HepG2-Zellen. Schon eine Zugabe von 6 µl/ml *E. sativa*-Extrakt bewirkte eine hochsignifikante Abnahme des durch B[a]P induzierten DNA-Schadens.

Dieses wiederum steht in Einklang mit Studien, die zuvor antigentoxische Auswirkungen von *Brassica*-Arten nachwiesen.

Gill et al. untersuchten neben den Auswirkungen des Verzehrs von *Brassica*-Sprossen, auch die Einflussnahme eines aus verschiedenen Sprossenarten (u.a. Brokkoli, Rettich) gewonnenen Extraktes gegenüber durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2) verursachten DNA-Schäden *in vitro* (GILL et al. 2004). Es wurde ein Sprossen-Extrakt gewählt, da vermeintlich protektiv wirksame Verbindungen, wie z. B. ITC, in Keimen in höheren Konzentrationen (10-100fach erhöht) vorliegen.

HT29-Zellen, isoliert aus einem humanen Adenokarzinom des Kolons, wurden zunächst für eine Stunde, dann für 24 Stunden mit *Brassica*-Sprossenextrakt (je 100 bzw. 200 μ l/ml), anschließend mit 75 μ M H_2O_2 (1h/24h) inkubiert. Das Ausmaß der DNA-Schädigung durch H_2O_2 wurde mit dem Cometassay gemessen. Es zeigte sich ein signifikant antigentoxischer Effekt, insbesondere eine 24-stündige Exposition mit 100 μ l/ml Extrakt zeigte eine etwa 50 % Abnahme der DNA-Migration.

Zhu und Loft untersuchten das Extrakt von gekochtem Rosenkohl auf chemopräventive Wirkungen hinsichtlich eines H_2O_2 -induzierten DNA-Schadens (ZHU, LOFT 2003). Hepa1c1c7-Zellen (Hepatomazelllinie der Maus) wurden zunächst mit 0,5 – 50 μ g/ml Rosenkohlextrakt behandelt (1h, 24h) und anschließend mit 100 μ M H_2O_2 für 5 Minuten. DNA-Strangbrüche durch H_2O_2 wurden, gemessen mit dem Cometassay, konzentrationsabhängig reduziert.

In einer weiteren Studie wurden HepG2-Zellen gegenüber dem Extrakt von Senfsprossen (0,25 - 2,00 μ l/ml) für 24 Stunden und anschließend mit 150 μ M B[a]P (24h) exponiert. Auch hier konnte eine konzentrationsabhängige Reduktion gentoxischer Effekte, induziert durch ein Mutagen, nachgewiesen werden (UHL et al. 2003).

Kassie et al. lieferten erste Anhaltspunkte für eine chemopräventive Wirkung von Gartenkresse gegenüber dem Karzinogen 2-Amino-3-Methylimidazol [4,5-f]-quinolin (IQ) (KASSIE et al. 2002). F344-Ratten erhielten per Sonde jeweils 0,8 ml Gartenkresseextrakt (Zeitraum: 3 Tage). 24 Stunden nach der letzten Gabe wurden einmalig 90mg/kg IQ sondiert. Nach 4-stündiger Expositionszeit wurden die Tiere getötet, Leber- und Kolonzellen isoliert und mit dem Cometassay ausgewertet. Eine signifikante Reduktion IQ-induzierter DNA-Schäden konnte gemessen werden.

Die oben erwähnten Studien, inklusive der vorliegenden Untersuchung, geben deutliche Hinweise auf chemopräventive Eigenschaften von *Brassicaceae* und deren Inhaltsstoffen. Eine Beschränkung der Aussagekraft dieses Vergleichs muss in den verschiedenen Faktoren, wie dem gewählten Testsystem, dem Zielgewebe und dessen Enzymausstattung, Art des Karzinogens, Konzentration und Behandlungszeitpunkt und schlussendlich der Art und

chemischen Struktur des Antikarzinogens gesehen werden (VERHOEVEN et al. 1997). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass je nach Zellpassage der HepG2-Zellen erhebliche Unterschiede in der Expression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus bestehen (WILKENING et al. 2003). So wurde bei CYP1A1 in den Zellpassage 1-5 eine zunehmende, fast achtfache, Steigerung beobachtet. CYP1A1 ist für die Aktivierung von B[a]P sehr wichtig.

4.2 Chemoprotektive Wirkmechanismen von *Eruca sativa*

In den Untersuchungen zur vorliegenden Dissertation konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die genotoxische Wirkung von B[a]P durch Vorbehandlung von HepG2-Zellen mit *E. sativa*-Extrakt vollständig aufgehoben werden konnte (vgl. Abb. 3.3). Die Form der ermittelten Dosis-Wirkungskurve lässt an einen Hormesis-Effekt denken (STEBBING 1982). Für diese starken antigentoxischen Effekte von *E. sativa*-Pflanzenextrakt werden hauptsächlich die Metabolite der in *Brassicaceae* enthaltenen Glucosinolate, die ITC verantwortlich gemacht (CONAWAY et al. 2002; HECHT 1999). Glucosinolate werden beim Zerschneiden oder Kauen des Gemüses enzymatisch abgebaut. Der Abbau erfolgt zum einen durch das pflanzenspezifische Enzym Myrosinase, welches bei Aufschluss der Pflanzenmatrix aus einem separaten Zellkompartiment frei wird. Zum anderen kann auch eine Aufspaltung über die Mikroflora des Intestinums erfolgen. Alle Glucosinolate bestehen aus einem Basisgerüst und unterscheiden sich lediglich in der Konfiguration der Seitenketten. Somit entstehen in Abhängigkeit von dem jeweiligen Glucosinolat-Substrat und Reaktionsbedingungen (pH-Wert, Fe²⁺-Präsenz) neben den bereits erwähnten ITC Metabolite wie Nitrile, Thiocyanate und Indole (HOLST, WILLIAMSON 2004; LYNN et al. 2006; VERHOEVEN et al. 1996).

ITC können über vielfältige antikarzinogene Mechanismen wirken (ZHANG 2004). Als Hauptwirkungsweg wird die Modulation von Enzymen der Biotransformation gesehen (STEINKELLNER et al. 2001b).

Viele chemische Karzinogene können ihre starke biologische Aktivität erst erlangen, nachdem sie die ersten Phase des Fremdstoffmetabolismus durchlaufen haben (CONAWAY et al. 2002). Durch Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse werden funktionelle Gruppen in unipolare, lipophile Verbindungen eingeführt. CYP-P450-Enzyme, membrangebundene Monooxygenasen, sind die wichtigsten Enzyme des oxidativen Metabolismus.

ITC besitzen die Fähigkeit, Enzyme des Phase-I-Metabolismus zu inhibieren, somit die Reaktion mit wichtigen Makromolekülen und eine DNA-Addukt-Bildung zu verhindern (CONAWAY et al. 2002). Die Einflussnahme verschiedener ITC auf Enzyme, insbesondere der CYP450-Familie, wurde vielfach untersucht (CONAWAY et al. 2002; GOOSEN et al. 2000). Eine Minderung der Enzymaktivität kann durch kompetitive, nicht-kompetitive Hemmung, kovalente Bindung oder durch Inhibierung der mikrosomalen Expression von CYP450-Mitgliedern erfolgen (KEUM et al. 2004; YANG et al. 1994; MORSE et al. 2000). Dabei zeigen die ITC bei der Hemmung von CYP450-Enzymen Unterschiede in Selektivität und Potenz, welche durch experimentelles Design, Behandlungszeitpunkt, Zielgewebe und der gemessenen Monooxygenase bedingt sind (CONAWAY et al. 2002).

Besonderes Augenmerk wurde in der vorliegenden Arbeit auf die Fähigkeit der ITC zur Induktion detoxifizierender Enzyme der Phase-II des Fremdstoffmetabolismus gelegt. Die in der ersten Phase modifizierten Fremdstoffe, werden im zweiten Schritt mit körpereigenen Stoffwechselprodukten (z. B. Glucuronsäure, Sulfat, Glutathion) enzymatisch konjugiert. Dadurch werden sie wasserlöslich und besser ausscheidbar. Wichtige Enzyme die diese Reaktionen katalysieren sind neben den hier im Speziellen betrachteten GST (vgl. Kapitel 4.5), Epoxidhydrolasen, Sulfotransferasen, UDP-Glucuronyltransferasen, NADPH-Chinon-Reduktasen (VERHOEVEN et al. 1997).

Pflanzensäfte aus Brunnenkresse und Rosenkohl wiesen bereits eine deutliche Fähigkeit zur Induktion von GST, aber auch von CYP1A1 auf (STEINKELLNER et al. 2001b). Die beobachtete Bifunktionalität der *Brassicaceae*-Säfte könnte aber auch daraufhin deuten, dass neben ITC als potentiell wirksame Stoffe noch andere wichtige Verbindungen für die chemopreväntive Wirkung eine Rolle spielen. Unsere Arbeitsgruppe konnte dahingehend nachweisen, dass weder *E. sativa*-Pflanzenextrakt noch das einzeln getestete ITC MTBITC einen messbaren Effekt auf die Proteinexpression von CYP1A1 hatte. Es zeigte sich lediglich ein Trend zur Minderung der CYP1A1 Aktivität (LAMY et al. 2008). Somit wäre auch denkbar, dass MTBITC in niedrigeren Konzentrationen als in dieser Studie getestet, Aktivitäts inhibierend wirkt.

In *Eruca sativa* wurden viele weitere sekundäre Pflanzenstoffe wie polyphenolische Verbindungen, Vitamin C und Carotinoide (Lutein, β -Carotin) gefunden, deren chemopräventiven Eigenschaften bereits gesichert sind (TSUDA et al. 2004; MARTÍNEZ-SANCHEZ et al. 2007; STEINMETZ, POTTER 1991). Ein Zusammenwirken vieler Verbindungen scheint somit ursächlich für die in den Untersuchungen beobachtete starke antientoxische Wirkung von *E. sativa* zu sein. Dieses wird auch von Studien untermauert,

die die Wirkungsweise gereinigter Verbindungen im Vergleich zu Komplexgemischen darstellten (FIMOGNARI et al. 2004 a; EBERHARDT et al. 2000).

Ein weiterer Mechanismus, der bei der antigentoxische Wirkung von *E. sativa* eine Rolle gespielt haben könnte, ist die Modulation der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS). ITC sind in der Lage die Transkription von Genen zu aktivieren, welche die antioxidative Kapazität der Zelle verstärken. ITC, als extrazelluläre Stimuli, induzieren die Signalübertragung durch Proteinkinasen hin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2. Dieser transloziert in den Nukleus und bindet dort an ein sogenanntes antioxidatives Antwortelement (engl. antioxidant responsive element, ARE). Hieraus resultiert eine Transkriptionsaktivierung detoxifizierender Enzyme (KEUM et al. 2004). Unter anderem wird die Synthese von γ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS), Thioredoxin-Redukase (TR), oder Hämoxxygenase-1 (HO-1) aktiviert.

Zusammenfassend betrachtet ist ein optimales Zusammenwirken der oben erwähnten Mechanismen bis zu dem mit 25 μ l Pflanzenextrakt erreichten Punkt minimaler DNA-Migration denkbar. Insbesondere an eine Hochregulierung der B[a]P-metabolisierenden GST (vgl. Kapitel 4.5) ist zu denken. Nach dem Scheitelpunkt der Konzentrations-Wirkungskurve konnten die B[a]P-Effekte hochsignifikant gemindert werden. Die Mechanismen, die in höheren Konzentrationsbereichen eine Rolle spielen, werden später in diesem Kapitel diskutiert.

4.3 Erzielte Ergebnisse im Kontext der bisherigen Studienlage zu MTBITC

Um die chemoprotektiven Effekte des Pflanzenmaterials weiter aufschlüsseln zu können, wurde MTBITC, welches neben dem bekannten SFN in beachtlicher Menge mittels GC-MS/MS-Analyse nachgewiesen wurde (vgl. Kapitel 3.7) mit dem Cometassay untersucht. Die Quantifizierung der ITC in der TS ergab für SFN 135,92 mg/kg TS, für MTBITC 80,09 mg/kg TS, für Erysolin 57,38 mg/kg TS und für PEITC 0,64 mg/kg TS. MTBITC zeigte in den Untersuchungen des Cometassay eine starke antigentoxische Wirkung.

Obwohl MTBITC schon 1976 als Verbindung in *Brassicaceae* beschrieben wurde, gehen die Bestrebungen erst in jüngerer Zeit zur Identifikation chemoprotektive Eigenschaften über (BUTTERY et al. 1976).

Fimognari et al. untersuchte die Fähigkeiten von MTBITC, den Prozess der Krebsentstehung zu blockieren. Die Exposition von Jurkat T-Leukämiezellen gegenüber MTBITC zeigte eine

Induktion von Zellzyklus-Arresten (8-24h), nach längerer Expositionszeit kam es insbesondere in höheren Konzentrationsbereichen (10 μM) zur Apoptose-Induktion (FIMOIGNARI et al. 2004 b). Im Vergleich dazu konnten keine Effekte von MTBITC gegenüber untransformierten T-Lymphozyten gefunden werden (FIMOIGNARI et al. 2004 c). In den Versuchsreihen der vorliegenden Arbeit führte MTBITC in höheren Konzentrationsbereichen ($>20 \mu\text{M}$) zu einer starken Zunahme der DNA-Schädigung, was dazu veranlasste, die von Fimognari et al. beschriebene Apoptose-Induktion hier näher zu untersuchen (vgl. Kapitel 4.5).

MTBITC ist außerdem in den Mittelpunkt des Interesses gerückt, da eine enge Beziehung zu SFN aufgefunden wurde. SFN wurde bis heute intensiv beforscht und hat sich als potentester Induktor von Phase-II-Enzymen erwiesen (STEINKELLNER et al. 2001b). Kassahun et al. konnten zeigen, dass SFN *in vivo* zum strukturanalogen MTBITC oxidiert wird. Ratten erhielten einmalig eine Konzentration von 50 mg/kg SFN und anschließend wurden Gallenflüssigkeit sowie Urin mittels LC-MS/MS untersucht. MTBITC machte dabei 67 % der gemessenen SFN-Metabolite aus (KASSAHUN et al. 1997).

Die enge Verwandtschaft zu Sulforophan und somit eine gute Fähigkeit zur GST-Induktion, scheint auch die in dieser Arbeit beobachteten starken antigentoxischen Effekte von MTBITC zu begründen (vgl. Kapitel 4.5).

4.4 Ambivalente Wirkmechanismen von MTBITC

Ein Vergleich der Ergebnisse des Cometassays erzielt mit *E. sativa* und MTBITC legt die Vermutung nahe, dass ein Hauptteil der chemoprotektiven Wirkung des Pflanzenmaterials MTBITC zugeschrieben werden kann. 25 μl des *E. sativa*-Extrakt enthielten 1,14 μM MTBITC (vgl. Kapitel 4.6). Die antigentoxisch effektivsten MTBITC-Konzentrationen lagen somit nahe denen enthalten in 25 μl Pflanzenextrakt, der potentesten Extraktkonzentration. Der Schwachpunkt dieses Vergleichs ist, dass niedrigere Konzentrationen MTBITC, somit die exakte Menge der potentesten Extraktkonzentration, nicht getestet wurden. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch in weiteren Experimenten zeigen, dass auch 1 μM MTBITC B[a]P-erzeugte DNA-Schäden deutlich reduzieren kann (LAMY et al. 2008).

Der dafür zugrundeliegende Mechanismus könnte, wie in Kapitel 4.5 dargestellt, eine Induktion von GST durch ITC, in diesem Fall vor allem durch MTBITC, sein. Die Ergebnisse zur GST-Induktion werden später dargestellt.

Die Einzeltestung von MTBITC im Cometassay zeigte in hohen Konzentrationsbereichen eine ausgeprägte DNA-Schädigung. Diese Tatsache verdeutlicht die zweischneidigen Wirkmechanismen von ITC. In vielen Studien konnten genetische Veränderungen, induziert durch verschiedene ITC, festgestellt werden. Kassie et al. konnten nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber $\geq 5\mu\text{M}$ BITC und PEITC signifikante DNA-Migration im Cometassay detektieren (KASSIE et al. 2003).

AITC und PEITC zeigten in gewissen Abstufungen im *Salmonella*-Mutagenitätstest, im DNA-Reperaturassay mit *E. coli* und im Mikrokerntest mit HepG2-Zellen gentoxische Effekte (KASSIE, KNASMÜLLER 2000).

Eine Zunahme von oxidativem Stress könnte die gentoxischen Effekte von MTBITC erklären. Obwohl ITC einerseits über die Induktion antioxidativ wirkender Proteine Zellen vor oxidativem Stress schützen, können sie andererseits selbst als Oxidationsmittel wirken. Die intrazelluläre Akkumulation über eine Konjugation mit Thiolen, insbesondere Glutathion (GSH), führt zu einer Erschöpfung des zellulären Thiol Vorrats (ZHANG 2000). Dies könnte die Funktionsabläufe der Zelle verändern und somit einen oxidativen Impuls für Apoptose darstellen. Ferner können aus ITC reaktive Sauerstoffspezies entstehen, da die $-\text{N}=\text{C}=\text{S}$ Gruppe eine spontane Hydrolyse mit der Bildung von Wassertstoffperoxid eingehen kann (MURATA et al. 2000). Eine Vielzahl an Studien hat gezeigt, dass verschiedene ITC die Krebsentstehung im Gastrointestinaltrakt, oder der Harnblase von Nagern induzieren und fördern. Die Versuchstiere wurden jedoch mit deutlich höheren Konzentrationen von ITC exponiert, als sie der menschlichen Ernährung entsprechen (ZHANG 2004). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass MTBITC eine „Janus“ Charakteristik besitzt. In Versuchsreihen mit dem Cometassay und dem Mikrokerntest zeigten die untersuchten ITC, darunter MTBITC, abhängig vom Konzentrationsbereich gentoxische wie auch antigentoxische Eigenschaften (LAMY et al 2009b).

In den Versuchen zur Antigentoxizität von MTBITC wurden lediglich diejenigen Konzentrationen eingesetzt, die zuvor kein gentoxisches Potential aufwiesen. Dennoch konnte mit $20\ \mu\text{M}$ MTBITC eine nahezu Verdopplung des B[a]P-induzierten DNA-Schadens detektiert werden (vgl. Kapitel 3.4). Die kombinierte Exposition deckte das gentoxische Potential von MTBITC in dieser Konzentration auf, da die Zellen nach Einwirken eines zusätzlich schädigenden Agens die Fehler im Genom wahrscheinlich nicht mehr beheben konnten. Es ist bekannt, dass ein geringer Zellschaden zum Zellzyklusarrest mit Behebung des DNA-Schadens führt, ausgedehnte Erbgutschäden jedoch zur Induktion von Apoptose führen. Die nähere Betrachtung von MTBITC in einem weiteren Test mit monoklonalen

Antikörpern zeigte apoptotische Veränderungen, die zuvor im Cometassay eine Rolle gespielt zu haben scheinen.

4.5 GST-Induktion und Apoptose begründen die protektiven Effekte des Pflanzenextraktes

In der vorliegenden Arbeit wurde die Modulation der GST-Aktivität durch *E. sativa* Pflanzenextrakt und durch MTBITC mit einem enzymatisch-photometrischen Test, basierend auf der Reaktion mit CDNB, nach 24h-Exposition gemessen. 25 µl *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt zeigte sich als effektivste Konzentration deckungsgleich mit den Ergebnissen im Cometassay. Diese Konzentration bewirkte eine 20-prozentige, signifikante Zunahme der GST-Aktivität.

2,5 und 5µM MTBITC induzierten, kongruent den Ergebnissen des Cometassay, eine signifikante Steigerung der GST-Aktivität um mehr als 20 %. Bekräftigend die Annahme, dass in höheren Konzentrationsbereichen andere Mechanismen eine Rolle spielten, erzeugten ≥ 20 µM eine signifikante Reduktion der GST-Aktivität. Die Experimente verdeutlichen, dass die protektiven Auswirkungen des Pflanzenmaterials gegenüber eines B[a]P-induzierten DNA-Schadens mit der Stärke der GST-Induktion korreliert.

Wie oben bereits erwähnt, wurden weiterführende Untersuchungen zur Modulation von Phase-I-Enzymen durchgeführt. Dies ist von Interesse, da B[a]P über CYP-450-Monooxygenasen zu elektrophilen Metaboliten, die kovalent an DNA, RNA oder Proteine binden, aktiviert wird (ZYTEKOVICZ et al. 1981). Über die Aktivierung des Aryl-Hydrocarbon-Rezeptors (AhR) kommt es zur gesteigerten Produktion von CYP1A1 somit zur Bildung reaktiver B[a]P-Metaboliten und das führt weiterhin zur Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (ELBEKAI et al. 2004). Aus diesem Hintergrund wurde die Modulation des Proteinlevels von CYP1A1, eines der wichtigsten Enzyme für die Toxifizierung von B[a]P, durch *E. sativa*-Extrakt und seiner ITC untersucht. Weiterhin die Wirkung von *E. sativa*-Pflanzenextrakt auf B[a]P-induzierte CYP1A1-Aktivität, da bekannt ist, dass die in *Brassicaceae* enthaltenen ITC auf posttranskriptionalem Niveau Enzyme modulieren können. Dies geschieht durch kovalente Proteinmodifikation, oder die Bindung an nukleophile Stellen von CYP450-Enzymen (NAKAJIMA et al. 2001; GOOSEN et al. 2000). Es zeigte sich, dass weder der Pflanzenextrakt noch einzelne ITC einen Effekt auf die Expression von CYP1A1 hatten. Es deutete sich lediglich an, dass der Pflanzenextrakt die

CYP1A1-Aktivität etwas minderte, Erysolin hingegen inhibierte die CYP1A1 Aktivität signifikant (LAMY et al. 2008).

Um ein wenig Licht in die Mechanismen jenseits der effektivsten Konzentrationen, insbesondere von MTBITC zu bringen, wurde die Induktion von Apoptose mittels monoklonaler Antikörper gemessen.

Die Apoptose ist ein genetisch programmierter Zelltod, welcher für die zelluläre Homöostase im Organismus und dabei für die Elimination geschädigter, aber auch überzähliger gesunder Zellen essenziell ist (PARK et al. 2007). Liegen Änderungen im Erbgut der Zelle vor wird durch verschiedene Überwachungsstellen im Zellzyklus verhindert, dass diese in die Mitose übergeht. Dies geschieht erst, wenn die Zelle chromosomale Schäden repariert hat. Bei schweren, irreparablen Schäden führt der Zellzyklusarrest jedoch zur Apoptose. Viele ITC können das Wachstum von Tumorzellen in Kultur beeinflussen durch Modulation von Zellzyklusarrest, Apoptose und Differenzierung (HAYES et al. 2008).

20 μ M MTBITC verdoppelten den B[a]P-induzierten DNA-Schaden im Cometassay nahezu, dieses war begleitet von einer signifikanten Abnahme der GST-Aktivität. Nach 24-stündiger Expositionszeit konnten bei dieser Konzentration deutliche apoptotische Vorgänge in HepG2-Zellen durch Nachweis von einzelsträngiger apoptotischer DNA gemessen werden. Eine weiterführende Studie unserer Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass bereits nach 6-stündiger Exposition MTBITC Apoptose induziert. Dies wurde zusätzlich auch mittels Durchflusszytometrie und internucleosomaler DNA-Fragmentierung, welche nach Auftrennung auf einem Agarose Gel und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert wurde, gemessen (LAMY et al 2009a). Einige andere Studien konnten ebenso apoptotische Veränderungen durch ITC nachweisen, allerdings variieren insbesondere die Expositionszeiten und Konzentrationen der eingesetzten ITC deutlich. Park et al. zeigte, dass sich gegenüber 20 μ M SFN exponierte HepG2-Zellen im „SubG1-Test“, dabei werden apoptotische Zellen nach Färbung durchflusszytometrisch quantifiziert, nach 48h Stunden deutlich positiv färbten (PARK et al. 2007). In einer anderen Studie wurden HepG2-Zellen gegenüber 20 μ M PEITC exponiert, welche sich nach 6h TUNEL- und „SubG1-Gehalt“ negativ zeigten, nach 12h hingegen positiv (ROSE et al. 2003). Über die TUNEL-Methode kann die bruchstückhafte DNA apoptotischer Zellen mittels enzymatischer Anlagerung markierter Nukleotide sichtbar gemacht werden. Die Untersuchungen von Rose et al. ergaben weiterhin, dass die Caspase-3-Aktivität, als Marker für Apoptose, jedoch bereits nach einer Stunde signifikant anstieg. Viele Studien konnten einen mitochondrialen Schaden durch Exposition von Testzellen gegenüber ITC und auch das Freiwerden von Cytochrom C

nachweisen (ZHANG et al. 2006). In der Studie von Rose et al. zeigte sich weiterhin, dass 20 μM PEITC keinerlei Einfluss auf den Zellzyklus der HepG2-Zellen hatte. Ein Arrest in der G2/M-Phase, zuerst nach 6 Stunden, konnte nur bei 5 und 10 μM PEITC beobachtet werden. Dieser Zellzyklusarrest zeigte sich lediglich bei 10 μM irreversibel. Ein Großteil der HepG2-Zellen verharrte in der G2/M-Phase innerhalb der ersten vierundzwanzig Stunden. Im gleichen Zeitraum konnten apoptotische Vorgänge gemessen werden, passend zur Abnahme der metabolischen Aktivität.

In einer weiteren Studie in unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass MTBITC den Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase erzeugt. Dabei waren die durch MTBITC direkt verursachten DNA-Strangbrüche vermutlich der erste Schritt in der Proliferationsinhibition. Die DNA-Schäden waren von einem Anstieg des Tumorsuppressorgens p53 begleitet. Der p53 Proteinlevel begünstigt in niedrigen Konzentrationen den Zellzyklusarrest, hohe Konzentrationen bewirken hingegen den Übergang in die Apoptose. Die Hochregulierung von p53 wurde als Antwort auf die beobachteten chromosomalen Schäden im Cometassay gesehen (LAMY, 2008). Eine Aktivierung des Tumorsuppressor p53-Proteins zur Induktion von Apoptose nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 20 μM MTBITC, wäre eine mögliche Erklärung für den starken DNA-Schaden im Cometassay in der vorliegenden Arbeit. Zu beachten ist dennoch, dass Apoptose scheinbar auch p53 unabhängig eingeleitet werden kann. Beevi et al. exponierten p53 kompetente Krebszelllinien wie HeLa (Zervixkarzinom), A549 (Bronchialkarzinom) und MCF-7-Zellen (Mammakarzinom) und p53 mangelnde Zellen wie PC-3 (Prostatakarzinom) mit Rettich-Extrakt. In allen Zellen wurde durch das Extrakt, welches reich an MTBITC war, innerhalb von 12 Stunden Apoptose induziert. Somit wurde ein p53 unabhängiger Weg zur Einleitung von Apoptose postuliert (BEEVI et al. 2010).

Da keine weitreichenderen Untersuchungen zu den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen durchgeführt wurden, bleibt lediglich festzuhalten, dass neben den beobachteten antigentoxischen Effekten, MTBITC in höheren Konzentrationsbereichen scheinbar auch gentoxische Schäden verursacht, die zur Induktion des kontrollierten apoptotischen Zelltodes führen.

4.6 *Eruca sativa* Aufnahme des Menschen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit deuten auf eine starke chemopräventive Wirkung von *Eruca sativa* hin. Daher ist es wichtig zu betrachten, inwieweit die getesteten

Konzentrationen der täglichen Ernährung entsprechen. Laut De Martin et al. nehmen Erwachsene 2,7 g Rucola pro Tag zu sich (DE MARTIN, RESTANI 2003). Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung (DGE) empfiehlt täglich drei Portionen Gemüse, insgesamt 400 g, zu verzehren. Eine 400g Rucola-Portion würde 363,3 ml entsprechen. Dieses auf einen 60 kg menschlichen Körper umgerechnet, vorausgesetzt einer oralen Bioverfügbarkeit von 100 % und gleichmäßiger Verteilung im Organismus, würde eine Pflanzenextraktkonzentration von 6,05 $\mu\text{l/g}$ KG im menschlichen Gewebe ergeben. Somit wäre es möglich eine Pflanzenextraktkonzentration zu erreichen, wie sie in den Zellkulturen eingesetzt wurde.

Unsere Arbeitsgruppe analysierte im Weiteren die ITC-Konzentration im Pflanzenextrakt. Dies ergab für 25 μl , als effektivste Konzentration, 1,14 μM MTBITC, 0,7 μM Erysolin, 1,77 μM SFN und 9,2 pM PEITC (LAMY et al. 2008).

Es gibt bisher nur wenige Studien zur Pharmakokinetik der ITC im menschlichen Körper. Liebes et al. zeigten, dass nach oraler Aufnahme von 40 mg PEITC die höchste Plasmakonzentration mit 1,04 μM gesamt PEITC nach 4,6 Stunden erreicht wurde (LIEBES et al. 2001). In einer anderen Studie gab man vier männlichen Probanden ein Extrakt aus Broccoli, welches durch Myrosinase hydrolysiert war. Es enthielt 200 μmol ITC, darunter 77 % SFN und 23 % MTBITC. Im Plasma wurde nach Aufnahme die Konzentration der Dithiocarbamate (DTC) gemessen, denn durch den Metabolismus der ITC entstehen unter anderem N-acetylcystein-ITC, oder Cystein-ITC, allesamt DTC. Im Plasma wurde nach 1 Stunde eine Maximum von 2 μM erreicht (YE et al. 2002). Nach dem Konsum von Broccoli-Suppe wurde das Plasmamaximum von SFN und seinen Metaboliten nach eineinhalb bis 2 Stunden erreicht. Die maximalen Konzentrationen lagen bei 2,3 μM nach Aufnahme einer normalen Broccoli-Suppe bis hin zu 7,3 μM einer Broccoli-Suppe aus super Broccoli, welcher reich an Glucosinolaten ist (GASPER et al. 2005). Vergleicht man die in den Studien ermittelten Plasmakonzentrationen, so wird deutlich, dass sie im Bereich der Konzentrationen enthalten in 25 μl Pflanzensaft liegen. Zieht man jedoch in Betracht, dass in den Versuchsreihen 25 μl Pflanzensaft zu 2 ml eines Kulturmediums zugegeben wurde, erkennt man, dass in den Versuchsreihen beachtliche Mengen eingesetzt wurden. Das Blutvolumen des Menschen beträgt schließlich 6-8 Liter.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass die eingesetzten Konzentrationen dieser *in vitro* Studie, als auch vieler *in vivo* Studien deutlich höher angesetzt sind als in menschlichen Interventionsstudien (LAMY et al. 2011). Um die beobachteten Effekte der ITC in der Zellkultur mit *in vivo* Ergebnisse zu vergleichen, müssten systematische Studien durchgeführt

werden. Durch den Einsatz gleicher Ausgangskonzentrationen wäre es möglich mehr über Dosisabhängigkeit und Sättigungsverhalten aussagen zu können.

4.7 Ausblick

Da die in dieser Arbeit getesteten Konzentrationen von *E. sativa*-Pflanzenextrakt durchaus mit der täglichen Ernährung erreicht werden können, stellt dies eine vielversprechende Basis für weitere Studien dar. Insbesondere mit der Zukunftsperspektive des Einsatzes zur Prävention und Therapie von malignen Erkrankungen. Die Antigentoxizität von *E. sativa* sollte definiert werden, indem man die zugrundeliegenden Mechanismen noch detaillierter untersucht. Es würde sich anbieten, den Pflanzenextrakt auch in anderen Zellsystemen zu studieren. Besonders interessant wäre die Wirkung des Pflanzenextraktes auf Zellen, die aus unterschiedlichen Tumorentitäten isolierten wurden. Da man die Ergebnisse dieser *in-vitro*-Studie nicht direkt auf den Menschen übertragen kann, sollten sich Humanexperimente anschließen. Man könnte mit massenspektrometrischen Verfahren die Aufnahme und Bioverfügbarkeit von *Eruca sativa* und seinen Inhaltsstoffen messen (ZHANG 2004). Dabei wäre auch die Einflussnahme von *E. sativa* auf verschiedene Körperzellen von Interesse. Eine qualitative Analyse mittels GC-MS/MS möglichst aller Verbindungen in *E. sativa* wäre wichtig um die protektiven Wirkmechanismen zuweisen zu können. Ferner sollte zusätzlich eine Quantifizierung aller sekundären Pflanzenstoffe vorgenommen werden, um anhand des Vergleichs mit antigenoxischen Wirkkonzentrationen in Studien therapeutisch wirksame Konzentrationen zu ermitteln.

5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat Rucola (*Eruca sativa*) in der europäischen Küche als Salat und Gewürz große Beliebtheit gewonnen. Rucola gehört zu den *Brassicaceae*, deren chemopräventiven Eigenschaften bereits belegt werden konnten. ITC, die Abbauprodukte der in *Brassica*-Gemüse enthaltenen Glucosinolate, werden für die Inhibition der Tumorentstehung verantwortlich gemacht. Obwohl bereits einiges über die ITC-Zusammensetzung von *E. sativa* bekannt ist, wurden noch nie die antigentoxischen Effekte des Pflanzenmaterials an sich studiert. In dieser Arbeit wurde die chemopräventive Wirksamkeit von frisch gewonnenem *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt und die zugrundeliegenden Mechanismen in metabolisch kompetenten HepG2-Zellen untersucht. Der in seiner alkalischen Version verwendete Cometassay zeigte keine gentoxischen Effekte in zuvor mit *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt exponierten HepG2-Zellen. Die Untersuchungen zur Antigentoxizität von *E. sativa* ergaben die Hemmung einer durch B[a]P induzierte DNA-Schädigung durch den Pflanzenextrakt in Form einer U-förmigen Konzentrations-Wirkungsbeziehung. Dieser Effekt wurde begleitet von einer signifikanten Induktion der GST, nachgewiesen durch einen enzymatisch-photometrischen Test. In der chemischen Analyse des Pflanzenmaterials durch Gaschromatographie mit massenspektrometrischem Detektor konnten die ITC MTBITC, SFN, Erysolin und PEITC identifiziert werden. MTBITC in beachtlicher Menge von 80,07 mg/kg TS im Pflanzenmaterial enthalten, zeigte eine effiziente antigentoxische Aktivität gegenüber einer B[a]P-induzierten DNA-Migration in HepG2-Zellen. Dabei war in niedrigen Konzentrationen die Hochregulierung des detoxifizierenden Phase-II-Enzyms GST messbar, in höheren eine durch MTBITC vermittelte Induktion von Apoptose mittels monoklonaler Antikörper detektierbar. Schlussfolgernd ist eine synergistische Wirkung von ITC und anderen in *Eruca sativa* enthaltenen sekundären Pflanzenstoffen denkbar. Die signifikante Induktion der GST-Aktivität und damit eine B[a]P-Entgiftung scheinen wesentlich für die beobachteten starken antigentoxischen Eigenschaften verantwortlich zu sein. Durch täglichen Verzehr von Rucola können Konzentrationen im Körper erreicht werden, die in den Untersuchungen starke chemopräventive Effekte im Zellkulturmodell zeigten. Die vorliegende Studie bietet zum ersten Mal eine Einschätzung der bioaktiven Effekte von Rucola-Pflanzenextrakt in einem humanen Zellkultursystem und gibt Anhaltspunkte für vielversprechende Einsatzmöglichkeiten von *Eruca sativa* im Rahmen der Krebsprävention.

Abstract

Over the past years rocket plant (*Eruca sativa*) enjoys more popularity, foremost in European cooking, as a salad and as a spice. Rocket plant belongs to the Brassicaceae, whose chemopreventive effect could be verified through several studies. Isothiocyanates (ITC), the products of decompensation from glucosinolates, which are contained in Brassica-vegetables, are said to be responsible for the inhibition of the development of tumors. Although there is already quite a bit known about the ITC composition of *E. sativa*, the antigenotoxic effects of the plant matter itself has never been studied. The analysis at hand aims to investigate the chemopreventive effectiveness and the underlying mechanisms of crude *E. sativa* extract in metabolic competent HepG2 cells. In the used alkaline version of the comet assay no genotoxic effects could be observed in HepG2 cells after exposure to *E. sativa* extract. The analysis regarding the antigenotoxicity of *E. sativa* showed an inhibition of the DNA damage, induced via benzo(a)pyrene, caused by the extract in an u-shaped dose-effectiveness-relationship. This effect was accompanied by a significant induction of the glutathione S-transferase (GST) which was detected through an enzymatic-photometric test via 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). The chemical analysis of the plant matter by gas chromatography with a mass spectrometric detector identified the ITC 4-methylthiobutyl isothiocyanate (MTBITC), sulforaphane (SFN), erisolin and phenylethyl isothiocyanate (PEITC). Since there was a remarkable amount of 80,09 mg/kg d.w. MTBITC in the plant matter, this substance was analysed separately. In the comet assay MTBITC showed an efficient antigenotoxic activity towards a benzo(a)pyrene induced DNA migration in HepG2-cells. In the process the upregulation of the detoxifying phase-II enzyme GST was measurable at low concentrations. In higher ranges of concentration an induction of apoptosis via monoclonal antibodies, which had been transmitted through MTBITC could be detected. The gained results suggest the assumption, that a synergistic effect of ITCs and other secondary plant products with proven chemopreventive activities contained in *Eruca sativa* have been responsible. The significant induction of GST activity and therefore a B(a)P-detoxification seems to be responsible for the high antigenotoxic attributes that were monitored. Through daily consumption of rocket plant it is possible to absorb concentrations which showed a high chemopreventive effect in this *in vitro* study. The present study offers for the first time an appraisal on bioactive effects of *E. sativa* extract in a human cell culture system and therefore gives indications for promising application possibilities of *Eruca sativa* within the scope of cancer prevention.

6 Literatur

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB (1979): Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616
- Bennett RN, Mellon FA, Botting NP, Eagles J, Rosa EAS, Williamson G (2002): Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L. (salad rocket). *Phytochemistry* 61, 25–30
- Bennett RN, Rosa EAS, Mellon FA, Kroon PA (2006): Ontogenic profiling of glucosinolates, flavonoids, and other secondary metabolites in *Eruca sativa* (salad rocket), *Diplotaxis eruroides* (wall rocket), *Diplotaxis tenuifolia* (wild rocket), and *Bunias orientalis* (Turkish rocket). *J Agric Food Chem* 54, 4005–4015
- Beevi SS, Mangamoori LN, Subathra M, Edula JR (2010): Hexane extract of *Raphanus sativus* L. roots inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human cancer cells by modulating genes related to apoptotic pathway. *Plant Foods Hum Nutr* 65, 200-209
- Bouma ME, Rogier E, Verthier N, Labarre C, Feldmann G (1989): Further cellular investigation of the human hepatoblastoma-derived cell line HepG2: morphology and immunocytochemical studies of hepatic-secreted proteins. *In Vitro Cell Dev Biol* 25, 267–275
- Boyland E, Chasseaud LF (1969): The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 32, 173–219
- Buttery R, Guadagni D, Ling L, Seifert R, Lipton W (1976): Additional Volatile Components of Cabbage, Broccoli, and Cauliflower. *J Agric Food Chem* 24(4), 829-832
- Cammann K (Hrsg.) (2001): *Instrumentelle analytische Chemie – Verfahren, Anwendungen, Qualitätssicherung*. Spektrum Verlag, Heidelberg
- Collins AR, Dobson VL, Dusinská M, Kennedy G, Stětina R (1997): The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375, 183–193
- Collins AR (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26, 249–261
- Conaway CC, Yang Y, Chung F (2002): Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: their biological activities and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab* 3, 233–255
- Dashti N, Wolfbauer G (1987): Secretion of lipids, apolipoproteins, and lipoproteins by human hepatoma cell line, HepG2: effects of oleic acid and insulin. *J Lipid Res* 28, 423–436

- De Martin S, Restani P (2003): Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. *Food Addit Contam* 20, 787–792
- Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Brown NA, Williams JR (1983): Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutat Res* 108, 437–449
- Diamond L, Kruszewski F, Aden DP, Knowles BB, Baird WM (1980): Metabolic activation of benzo[a]pyrene by a human hepatoma cell line. *Carcinogenesis* 1, 871–875
- Doostdar H, Duthie SJ, Burke MD, Melvin WT, Grant MH (1988): The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line. *FEBS Lett* 241, 15–18
- Duverger-van Bogaert M, Dierickx PJ, Stecca C, Crutzen MC (1993): Metabolic activation by a supernatant from human hepatoma cells: a possible alternative in mutagenic tests. *Mutat Res* 292, 199–204
- Eberhardt MV, Lee CY, Liu RH (2000): Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 405, 903–904
- Eddy EP, Howard PC, McCoy GD, Rosenkranz HS (1987): Mutagenicity, unscheduled DNA synthesis, and metabolism of 1-nitropyrene in the human hepatoma cell line HepG2. *Cancer Res* 47, 3163–3168
- Elbekai RH, Korashy HM, Wills K, Gharavi N, El-Kadi AOS (2004): Benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene and beta-naphthoflavone induce oxidative stress in hepatoma hepa 1c1c7 Cells by an AHR-dependent pathway. *Free Radic Res* 38, 1191–1200
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 339, 37–59
- Fimognari C, Nüsse M, Berti F, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P (2004 a): A mixture of isothiocyanates induces cyclin B1- and p53-mediated cell-cycle arrest and apoptosis of human T lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 554, 205–214
- Fimognari C, Nüsse M, Berti F, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P (2004 b): Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: molecular pathway on human transformed and non-transformed cells. *Biochem Pharmacol* 68, 1133–1138
- Fimognari C, Nüsse M, Iori R, Cantelli-Forti G, Hrelia P (2004 c): The new isothiocyanate 4-(methylthio)butylisothiocyanate selectively affects cell-cycle progression and apoptosis induction of human leukemia cells. *Invest New Drugs* 22, 119–129
- Frankfurt OS, Krishan A (2001b): Identification of apoptotic cells by formamide-induced DNA denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem* 49, 369–378

- Frankfurt OS, Krishan A (2001 a): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the specific detection of apoptotic cells and its application to rapid drug screening. *J Immunol Methods* 253, 133–144
- Gaspar AV, Al-Janobi A, Smith JA, Bacon JR, Fortun P, Atherton C et al. (2005): Glutathione S-Transferase M1 polymorphism and metabolism of sulforaphane from standard and high-glucosinolate broccoli. *Am J Clin Nutr* 82, 1283-1291
- Gill CIR, Haldar S, Porter S, Matthews S, Sullivan S, Coulter J et al. (2004): The effect of cruciferous and leguminous sprouts on genotoxicity, in vitro and in vivo. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13, 1199–1205
- Goosen TC, Kent UM, Brand L, Hollenberg PF (2000): Inactivation of cytochrome P450 2B1 by benzyl isothiocyanate, a chemopreventative agent from cruciferous vegetables. *Chem Res Toxicol* 13, 1349–1359
- Grant MH, Duthie SJ, Gray AG, Burke MD (1988): Mixed function oxidase and UDP-glucuronyltransferase activities in the human Hep G2 hepatoma cell line. *Biochem Pharmacol* 37, 4111–4116
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1975): Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249, 7130–7139
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P et al. (2003): Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18, 45–51
- Hayes JD, Kelleher MO, Eggleston IM (2008): The cancer chemopreventive actions of phytochemicals derived from glucosinolates. *Eur J Nutr* 47 Suppl 2, 73–88
- Hecht SS (1999): Chemoprevention of cancer by isothiocyanates, modifiers of carcinogen metabolism. *J Nutr* 129, 768S-774S
- Höfer N (2005): Untersuchungen zur genetischen Toxizität und Chemoprävention von Brassica-Pflanzensäften in humanen Hepatomzellen (Hep G2). Masterarbeit, Institut für Ernährungswissenschaften, JLU, Gießen
- Holst B, Williamson G (2004): A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds. *Nat Prod Rep* 21, 425–447
- Jiao H, Ye P, Zhao B (2003): Protective effects of green tea polyphenols on human HepG2 cells against oxidative damage of fenofibrate. *Free Radic Biol Med* 35, 1121–1128
- Jirovetz L, Smith D, Buchbauer G (2002): Aroma compound analysis of *Eruca sativa* (Brassicaceae) SPME headspace leaf samples using GC, GC-MS, and olfactometry. *J Agric Food Chem* 50, 4643-4646

- Jun H, Kim S, Sung M (2003): Protective effect of soybean saponins and major antioxidants against aflatoxin B1-induced mutagenicity and DNA-adduct formation. *J Med Food* 5, 235–240
- Kassahun K, Davis M, Hu P, Martin B, Baillie T (1997): Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: identification of phase I metabolites and glutathione conjugates. *Chem Res Toxicol* 10, 1228–1233
- Kassie F, Knasmüller S (2000): Genotoxic effects of allyl isothiocyanate (AITC) and phenethyl isothiocyanate (PEITC). *Chem Biol Interact* 127, 163–180
- Kassie F, Parzefall W, Musk S, Johnson I, Lamprecht G, Sontag G, Knasmüller S (1996): Genotoxic effects of crude juices from Brassica vegetables and juices and extracts from phytopharmaceutical preparations and spices of cruciferous plants origin in bacterial and mammalian cells. *Chem Biol Interact* 102, 1–16
- Kassie F, Laky B, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Lhoste E, Knasmüller S (2003): Effects of garden and water cress juices and their constituents, benzyl and phenethyl isothiocyanates, towards benzo(a)pyrene-induced DNA damage: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Chem Biol Interact* 142, 285–296
- Kassie F, Rabot S, Uhl M, Huber W, Qin HM, Helma C et al. (2002): Chemoprotective effects of garden cress (*Lepidium sativum*) and its constituents towards 2-amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]quinoline (IQ)-induced genotoxic effects and colonic preneoplastic lesions. *Carcinogenesis* 23, 1155–1161
- Keum Y, Jeong W, Kong ANT (2004): Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms. *Mutat Res* 555, 191–202
- Kinjo J, Hirakawa T, Tsuchihashi R, Nagao T, Okawa M, Nohara T, Okabe H (2003): Hepatoprotective constituents in plants. 14. Effects of soyasapogenol B, sophoradiol, and their glucuronides on the cytotoxicity of tert-butyl hydroperoxide to HepG2 cells. *Biol Pharm Bull* 26, 1357–1360
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363, 89–96
- Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, Darroudi F, Huber WW, Hoelzl C et al. (2004): Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology* 198, 315–328
- Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M et al. (1998): Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res* 402, 185–202

- Knowles BB, Howe CC, Aden DP (1980): Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. *Science* 209, 497–499
- Lamy E, Schröder J, Paulus S, Brenk P, Stahl T, Mersch-Sundermann V (2008): Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erysolin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. *Food Chem Toxicol* 46, 2415–2421
- Lamy E (2008): MTBITC – induced apoptosis and cell cycle arrest of human hepatoma (HepG2) cells: A link between p53 and human telomerase? Dissertation, Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie, JLU, Gießen
- Lamy E, Mersch-Sundermann V (2009a): MTBITC mediates cell cycle arrest and apoptosis induction in human HepG2 cells despite its rapid degradation kinetics in the in vitro model. *Environ Mol Mutagen* 50, 190-200
- Lamy E, Crößmann C, Saeed A, Schreiner PR, Kotke M, Mersch-Sundermann V (2009b): Three structurally homologous isothiocyanates exert “Janus“ characteristics in human HepG2-cells. *Environ Mol Mutagen* 50, 164-170
- Lamy E, Scholtes C, Herz C, Mersch-Sundermann V (2011): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates. *Drug Metab Rev* 2011, 1-21
- Lee Y, Kim H, Jung H, Shin YH, Hong SM, Park E et al. (2002): Activities of antioxidant and redox enzymes in human normal hepatic and hepatoma cell lines. *Mol Cells* 14, 305–311
- Liebes L, Conaway CC, Hochster H, Mendoza S, Hecht SS, Crowell J et al. (2001): High-performance liquid chromatography-based determination of total isothiocyanate levels in human plasma: Application to studies with 2-phenethyl isothiocyanate. *Anal Biochem* 291, 279-289
- Limbosch S (1983): Benzo[a]pyrene- and aldrin-metabolizing activities in cultured human and rat hepatoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 71, 281–286
- Luch A (2005): Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 113–125
- Lynn A, Collins A, Fuller Z, Hillman K, Ratcliffe B (2006): Cruciferous vegetables and colorectal cancer. *Proc Nutr Soc* 65, 135–144
- Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir MK, Warholm M, Jörnvall H (1985): Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7202–7206

- Martínez-Sánchez A, Llorach R, Gil MI, Ferreres F (2007): Identification of new flavonoid glycosides and flavonoid profiles to characterize rocket leafy salads (*Eruca vesicaria* and *Diplotaxis tenuifolia*). *J Agric Food Chem* 55, 1356–1363
- Meintières S, Nessler F, Pallardy M, Marzin D (2003): Detection of ghost cells in the standard alkaline comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environ Mol Mutagen* 41, 260–269
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM (1999): Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* 20, 1885–1891
- Melendez-Colon VJ, Luch A, Seidel A, Baird WM (2000): Formation of stable DNA adducts and apurinic sites upon metabolic activation of bay and fjord region polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell cultures. *Chem Res Toxicol* 13, 10–17
- Mersch-Sundermann V, Schneider H, Freywald C, Jenter C, Parzefall W, Knasmüller S (2001): Musk ketone enhances benzo(a)pyrene induced mutagenicity in human derived Hep G2 cells. *Mutat Res* 495, 89–96
- Mersch-Sundermann V, Knasmüller S, Wu X, Darroudi F, Kassie F (2004): Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198, 329–340
- Morse MA, Lu J, Stoner GD, Murphy SE, Peterson LA (2000): Metabolism of N-nitrosobenzylmethylamine by human cytochrome P-450 enzymes. *J Toxicol Environ Health A* 58, 397–411
- Murata M, Yamashita N, Inoue S, Kawanishi S (2000): Mechanism of oxidative DNA damage induced by carcinogenic allyl isothiocyanate. *Free Radic Biol Med* 28, 797–805
- Nakajima M, Yoshida R, Shimada N, Yamazaki H, Yokoi T (2001): Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate. *Drug Metab Dispos* 29, 1110–1113
- Natarajan AT, Darroudi F (1991): Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens. *Mutagenesis* 6, 399–403
- Olive PL (2002): The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* 203, 179–194
- Ostling O, Johanson KJ (1984): Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291–298

- Park SY, Kim GY, Bae S, Yoo YH, Choi YH (2007): Induction of apoptosis by isothiocyanate sulforaphane in human cervical carcinoma HeLa and hepatocarcinoma HepG2 cells through activation of caspase-3. *Oncol Rep* 18, 181–187
- Phillips DH (1999): Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet. *Mutat Res* 443, 139–147
- Rose P, Whiteman M, Huang SH, Halliwell B, Ong CN (2003): beta-Phenylethyl isothiocyanate-mediated apoptosis in hepatoma HepG2 cells. *Cell Mol Life Sci* 60, 1489–1503
- Sassa S, Sugita O, Galbraith RA, Kappas A (1987): Drug metabolism by the human hepatoma cell, Hep G2. *Biochem Biophys Res Commun* 143, 52–57
- Scolastici C, Alves de Lima RO, Barbisan LF, Ferreira ALA, Ribeiro DA, Salvadori DMF (2008): Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. *Toxicol In Vitro* 22, 510–514
- Singh NP (2000): Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutat Res* 455, 111–127
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184–191
- Skoog DA, Leary JJ (1996): *Instrumentelle Analytik – Grundlagen, Geräte, Anwendungen*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg 455, 623-675
- Stebbing AR (1982): Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22, 213–234
- Steinkellner H, Rabot S, Freywald C, Nobis E, Scharf G, Chabicovsky M et al. (2001b): Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. *Mutat Res* 480-481, 285–297
- Steinkellner H, Rabot S, Kassie F, Knasmüller S (2001a): Dietary induction of phase II enzymes: a promising strategy for protection against DNA-reactive intermediates in man? *Adv Exp Med Biol* 500, 629–633
- Steinmetz KA, Potter JD (1991): Vegetables, fruit, and cancer. I. Epidemiology. *Cancer Causes Control* 2, 325–357
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H et al. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206–221
- Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, Fujita K, Matsuda E, Iigo M et al. (2004): Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinet* 19, 245–263

- Uhl M, Helma C, Knasmüller S (2000): Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. *Mutat Res* 468, 213–225
- Uhl M, Laky B, Lhoste E, Kassie F, Kundi M, Knasmüller S (2003): Effects of mustard sprouts and allylisoithiocyanate on benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human-derived cells: a model study with the single cell gel electrophoresis/Hep G2 assay. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl* 1, 273–282
- van Poppel G, Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA (1999): Brassica vegetables and cancer prevention. *Epidemiology and mechanisms. Adv Exp Med Biol* 472, 159–168
- Verhoeven DT, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA (1996): Epidemiological studies on brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5, 733–748
- Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G (1997): A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables. *Chem Biol Interact* 103, 79–129
- Wilkening S, Bader A (2003): Influence of culture time on the expression of drug-metabolizing enzymes in primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hep G2. *J Biochem Mol Toxicol* 17 (4), 207-213
- Yang CS, Smith TJ, Hong JY (1994): Cytochrome P-450 enzymes as targets for chemoprevention against chemical carcinogenesis and toxicity: opportunities and limitations. *Cancer Res* 54, 1982s-1986s
- Yasuhara S, Zhu Y, Matsui T, Tipirneni N, Yasuhara Y, Kaneki M, Rosenzweig A, Jeevendra Martyn JA (2003): Comparison of comet assay, electron microscopy, and flow cytometry for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 51, 873-885
- Ye L, Dinkova-Kostova AT, Wade KL, Zhang Y, Shapiro TA, Talalay P (2002): Quantitative determination of dithiocarbamates in human plasma, serum, erythrocytes and urine: pharmacokinetics of broccoli sprout isothiocyanates in humans. *Clin Chim Acta* 316, 43-53
- Zhang Y (2000): Role of glutathione in the accumulation of anticarcinogenic isothiocyanates and their glutathione conjugates by murine hepatoma cells. *Carcinogenesis* 21, 1175–1182
- Zhang Y (2004): Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action. *Mutat Res* 555, 173–190
- Zhang Y, Song Y, Jun L (2006): Vegetable-derived isothiocyanates: anti-proliferative activity and mechanism of action. *Proc Nutr Soc* 65, 68-75

- Zhu C, Loft S (2003): Effect of chemopreventive compounds from Brassica vegetables on NAD(P)H:quinone reductase and induction of DNA strand breaks in murine hepa1c1c7 cells. Food Chem Toxicol 41, 455–462
- Zytkovicz TH, Moses HL, Spelsberg TC (1981): Covalent binding of benzo[a]pyrene metabolites to DNA, RNA and chromatin proteins in the AKR mouse embryo cell-line. Chem Biol Interact 35, 39–54

Internetquellen:

- Robert Koch-Institut (Hrsg) (2006): Gesundheit in Deutschland, Gesundheitsberichterstattung des Bundes [online] Homepage: Gesundheitsberichterstattung des Bundes
URL: <http://www.gbe-bund.de/> [PDF-Datei, S. 40] [Stand 28.06.2011].
- Deutsches Pflanzengenom-Forschungsprogramm GABI (Hrsg) : Brassicaceae
URL: <http://www.pflanzenforschung.de/wissenalphabetisch/detail/brassicaceae>
[Stand 29.06.2011]

7 Veröffentlichungen

Lamy E, **Schröder J**, Paulus S, Brenk, P, Stahl T, Mersch-Sundermann V: Antigenotoxic properties of *Eruca sativa* (rocket plant), erucin and erucosin in human hepatoma (HepG2) cells towards benzo(a)pyrene and their mode of action. **Food Chem Toxicol.** 2008 Jul, 46 (7): 2415 – 21.

Lamy E, **Schröder J**, Völkel Y, Mersch-Sundermann V: Studies on the chemopreventive effects of *Eruca Sativa* (Rucola) and its Isothiocyanates in Human Cell Systems, präsentiert auf dem 45. Kongress der Society of Toxicology (SOT), **San Diego, USA (2006)** und auf dem 22. Kongress der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung (GUM), **Darmstadt, Germany (2006)**.

Lamy E, **Schröder J**, Völkel Y, Mersch-Sundermann V, Untersuchungen des chemopräventiven (antigentoxischen) Effektes von *Eruca Sativa* (Rucola) und seinen Isothiocyanaten in humanen Zellsystemen, präsentiert auf dem 47. Kongress der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), **Mainz, Germany (2006)**

8 Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Gelsenkirchen, den 20.11.11

Julia Franziska Schröder

9 Anhang

Tabelle 1: OTM nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 25-100 μM B[a]P (24h). n=3

	Test 1	Test 2	Test 3	MW	STABW
DMSO	0,94	0,77	0,83	0,85	0,09
B[a]P 25 μM	3,66	3,30	3,34	3,43	0,20
B[a]P 50 μM	3,58	4,16	4,32	4,02	0,39
B[a]P 100 μM	3,47	3,94	3,30	3,57	0,33

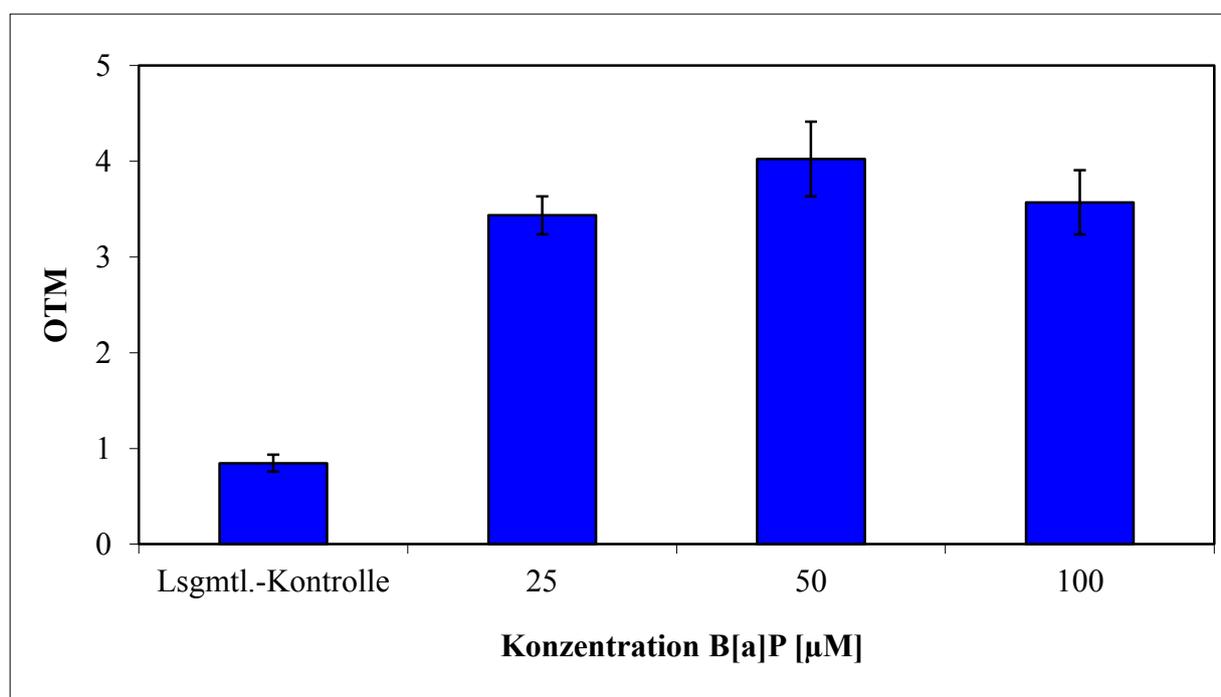


Abbildung 1: OTM nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 25-100 μM B[a]P (24 h). Die Balken repräsentieren die MW \pm SD. n=3

Tabelle 2: Zellvitalität [% lebenden Zellen (LZ)] nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 $\mu\text{l/ml}$ *Eruca sativa*-Extrakt (24h). n=3

	Test 1 [% LZ]	Test 2 [% LZ]	Test 3 [% LZ]	MW
Aqua dest.	95,50	91,30	93,70	93,50
12,5 $\mu\text{l/ml}$	92,10	87,10	81,50	86,90
25 $\mu\text{l/ml}$	92,90	88,20	84,80	88,63
37,5 $\mu\text{l/ml}$	89,20	81,60	89,70	86,83
50 $\mu\text{l/ml}$	90,30	78,00	89,90	86,07
B[a]P 50 μM	80,40	89,30	82,60	84,10

Tabelle 3: Zellvitalität [% lebenden Zellen (LZ)] nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 30 µM MTBITC (24h). n=3

	Test 1 [% LZ]	Test 2 [% LZ]	Test 3 [% LZ]	MW
DMSO	90,90	94,30	92,40	92,53
2,5 µM	90,40	96,80	83,80	90,33
5 µM	94,60	95,40	84,30	91,43
10 µM	95,80	87,30	85,70	89,60
20 µM	88,90	76,90	75,00	80,27
25 µM	78,60	80,00	72,20	76,93
30 µM	63,60	60,00	61,50	61,70
B[a]P 50µM	89,30	82,60	86,30	86,07

Tabelle 4: Zellvitalität [% lebenden Zellen (LZ)] nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 – 50µl/ml *Eruca sativa*-Extrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h). n=3

	Test 1 [% LZ]	Test 2 [% LZ]	Test 3 [% LZ]	MW
Aqua dest. + Aqua dest.	100,00	97,30	98,20	98,50
50 µl/ml + 50 µl/ml	92,60	96,40	94,20	94,40
3 µl/ml + B[a]P 50µM	88,90	86,70	96,60	90,73
6 µl/ml + B[a]P 50µM	85,30	87,00	95,60	89,30
12,5 µl/ml + B[a]P 50µM	89,30	85,20	94,90	89,80
25 µl/ml + B[a]P 50µM	89,80	81,80	93,10	88,23
37,5 µl/ml + B[a]P 50µM	84,70	80,00	92,10	85,60
50 µl/ml + B[a]P 50µM	87,20	81,60	88,50	85,77
B[a]P 50µM + B[a]P 50µM	80,00	77,30	84,70	80,67

Tabelle 5: Zellvitalität [% lebenden Zellen (LZ)] nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 µM MTBITC (24h) und 50µM B[a]P (24h). n=3

	Test 1 [% LZ]	Test 2 [% LZ]	Test 3 [% LZ]	MW
DMSO + DMSO	94,70	93,20	95,00	94,30
20 µM + 20 µM	84,00	88,60	80,80	84,47
2,5 µM + B[a]P 50µM	92,30	80,00	90,70	87,67
5 µM + B[a]P 50µM	86,40	92,30	87,50	88,73
10 µM + B[a]P 50µM	86,90	93,80	93,80	91,50
20 µM + B[a]P 50µM	61,10	77,80	75,00	71,30
B[a]P 50µM + B[a]P 50µM	79,60	80,80	78,50	79,63

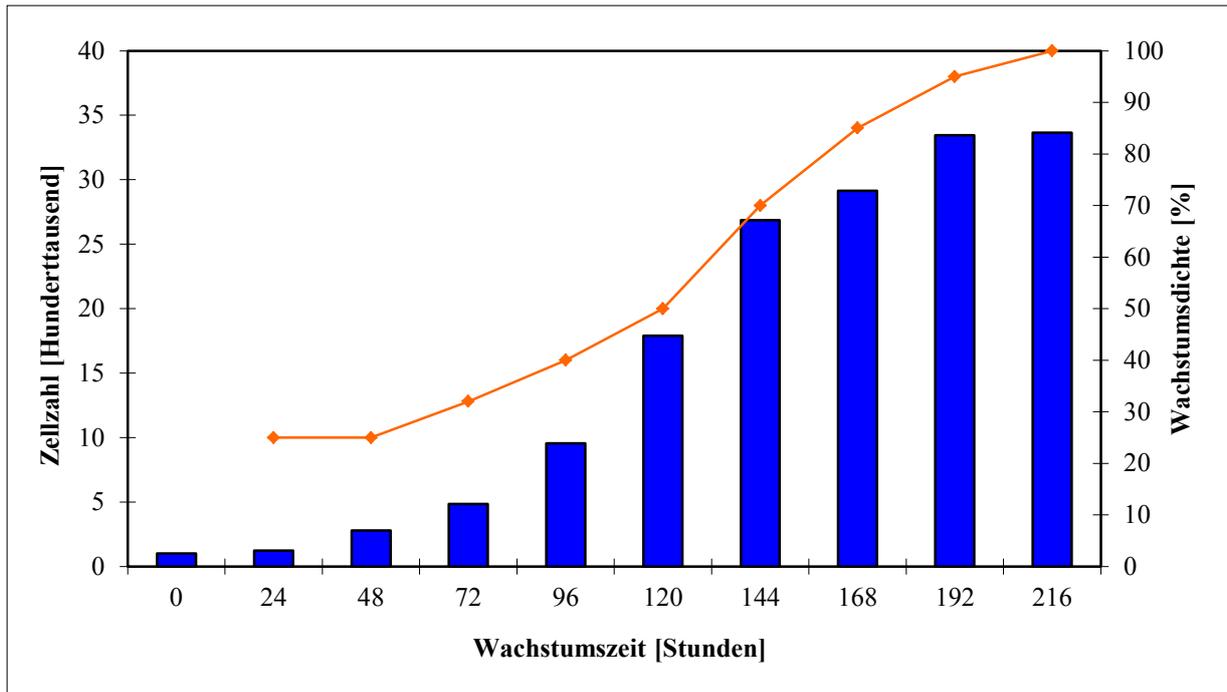


Abbildung 2: Zellzahl und Wachstumsdichte von HepG2-Zellen. Die Balken repräsentieren die Zellzahl, die Linie die Wachstumsdichte

Tabelle 6: OTM-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Extrakt (24 h)

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Aqua dest.	0,48	0,72	0,55	0,64
12,5 µl/ml	0,98	0,64	0,76	0,67
25 µl/ml	0,98	0,65	0,75	0,73
37,5 µl/ml	1,38	0,60	0,81	0,63
50 µl/ml	1,40	0,69	0,70	0,67
B[a]P 50µM	3,68	4,21	4,24	3,86

Tabelle 7: TL-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Extrakt (24 h)

	Test 1	Test 2	Test 3	Test 4
Aqua dest.	10,07	10,50	10,07	10,72
12,5 µl/ml	12,37	10,75	12,95	10,83
25 µl/ml	12,42	10,90	13,45	11,35
37,5 µl/ml	14,51	10,69	12,67	11,48
50 µl/ml	14,94	12,82	11,40	10,91
B[a]P 50µM	44,99	41,86	48,34	45,53

Tabelle 8: OTM-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
Aqua dest. + DMSO	0,58	0,61	0,57
50 µl/ml + 50 µl/ml	0,60	0,56	0,75
3 µl/ml + B[a]P 50 µM	3,12	3,45	2,81
6 µl/ml + B[a]P 50 µM	2,50	2,60	2,07
12,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	1,56	1,63	1,36
25 µl/ml + B[a]P 50 µM	0,69	0,71	0,66
37,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	1,51	1,40	1,48
50 µl/ml + B[a]P 50 µM	2,15	2,05	1,98
B[a]P 50 µM	3,58	3,65	3,16

Tabelle 9: TL-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 3 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h) und 50 µM B[a]P (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
Aqua dest. + DMSO	9,37	8,87	9,55
50 µl/ml + 50 µl/ml	9,64	8,68	9,64
3 µl/ml + B[a]P 50 µM	30,69	32,69	35,44
6 µl/ml + B[a]P 50 µM	24,88	25,02	25,52
12,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	18,14	16,82	18,46
25 µl/ml + B[a]P 50 µM	11,77	11,10	10,67
37,5 µl/ml + B[a]P 50 µM	18,81	17,23	22,96
50 µl/ml + B[a]P 50 µM	22,55	23,50	26,96
B[a]P 50 µM	39,57	32,32	36,59

Tabelle 10: OTM-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 30 µM MTBITC (24 h)

	Test 1	Test 2	Test 3
DMSO	0,47	0,53	0,60
2,5 µM	0,59	0,64	0,61
5 µM	0,63	0,62	0,66
10 µM	0,73	0,78	0,64
20 µM	0,82	0,62	0,55
25 µM	5,90	4,53	7,01
30 µM	5,75	4,37	4,52
B[a]P 50µM	4,21	4,24	3,86

Tabelle 11: TL-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 30 µM MTBITC (24 h)

	Test 1	Test 2	Test 3
DMSO	9,66	11,96	11,87
2,5 µM	11,17	11,05	10,27
5 µM	12,02	11,31	9,24
10 µM	11,98	13,50	9,91
20 µM	14,06	10,63	10,23
25 µM	58,96	50,20	58,31
30 µM	57,80	47,37	53,73
B[a]P 50µM	41,86	48,34	45,53

Tabelle 12: OTM-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 µM MTBITC (24h) und 50 µM B[a]P (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
DMSO + DMSO	0,81	0,68	0,73
20 µM + 20 µM	0,58	0,56	0,70
2,5 µM + B[a]P 50 µM	1,74	1,74	1,73
5 µM + B[a]P 50 µM	1,49	1,46	1,45
10 µM + B[a]P 50 µM	2,02	2,08	1,97
20 µM + B[a]P 50 µM	7,08	7,26	7,29
B[a]P 50 µM + B[a]P 50 µM	3,81	3,97	3,92

Tabelle 13: TL-Werte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 20 µM MTBITC (24h) und 50 µM B[a]P (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
DMSO + DMSO	9,32	9,32	9,91
20 µM + 20 µM	7,81	8,89	9,04
2,5 µM + B[a]P 50 µM	21,73	17,64	16,18
5 µM + B[a]P 50 µM	16,87	15,65	15,17
10 µM + B[a]P 50 µM	28,11	20,45	18,09
20 µM + B[a]P 50 µM	51,26	52,11	55,75
B[a]P 50 µM + B[a]P 50 µM	32,80	35,68	31,80

Tabelle 14: GST-Aktivitätswerte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 12,5 – 50 µl/ml *Eruca sativa*-Pflanzenextrakt (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
Aqua dest.	7,26	6,51	7,80
12,5 µl/ml	8,55	7,21	8,40
25 µl/ml	9,39	7,70	9,10
37,5 µl/ml	7,36	5,77	7,01
50 µl/ml	6,66	5,62	6,61

Tabelle 15: GST-Aktivitätswerte nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 25 µM MTBITC (24h)

	Test 1	Test 2	Test 3
DMSO	4,67	4,32	3,68
2,5 µM	5,82	5,07	4,74
5 µM	5,82	5,07	4,67
10 µM	4,52	4,18	3,13
20 µM	1,44	1,64	1,99
25 µM	1,34	1,54	2,19

Tabelle 16: Absorptionswerte (OD) nach Exposition von HepG2-Zellen gegenüber 2,5 – 50 µM MTBITC (24h), (Apoptoseindizes)

	Test 1	Test 2	Test 3
Unbehandelte Zellen	1,09 (1,00)	0,80 (1,00)	0,86 (1,00)
DMSO	0,44 (1,38)	1,07 (0,98)	0,89 (1,04)
2,5 µM	0,45 (1,03)	0,53 (0,49)	0,55 (0,63)
5 µM	0,47 (1,00)	0,94 (0,87)	0,97 (1,13)
10 µM	0,54 (1,24)	1,16 (1,07)	1,15 (1,34)
20 µM	1,73 (1,59)	1,55 (1,95)	1,43 (1,66)
25 µM	0,36 (1,10)	1,25 (1,15)	1,21 (1,40)
30 µM	0,40 (1,24)	0,85 (0,78)	0,81 (0,93)
50 µM	0,41 (1,28)	1,08 (0,99)	1,06 (1,23)



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5968-2



9 78 3 8359 5968 2