

Untersuchungen zur Bioaktivität von Erysoiin, Brassinin und Indol(3)carbinol
in humanen HepG2-Hepatomzellen

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Peter Heribert Brenk
aus
Bobenheim-Roxheim

Gießen 2011

Aus dem Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Direktor: Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann

1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Mersch-Sundermann
 2. Gutachter: Frau Prof. Dr. med. E. Roeb
- Tag der Disputation: 19.11.2012

Eidesstattliche 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.“

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1 Grundlagen	9
1.1.1 Kanzerogenese, Gentoxizität und die Rolle der Chemoprävention	9
1.1.1.1. Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese	9
1.1.1.2. Gentoxizität	10
1.1.1.3. Antigentoxizität	10
1.1.1.4. Zytotoxizität	10
1.1.1.5. Chemoprävention	10
1.1.1.6. Fremdstoffmetabolismus	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Chemische Testsubstanzen	12
2.1.2 Geräte und Materialien	14
2.1.3 Lösungsmittel und Positivkontrollen	15
2.1.4 Isothiocyanate	16
2.1.4.1 Chemie und Vorkommen der Glucosinolate	16
2.1.4.2 Bildung der Isothiocyanate aus Glucosinolaten	16
2.1.4.3 Metabolisierung der Isothiocyanate(ITC)	17
2.1.4.4 Charakterisierung der Testsubstanzen	17
2.1.5 Charakterisierung der HepG2-Zelllinie	18
2.1.5.1 Morphologie und Herkunft	18
2.1.5.2 Biochemische Eigenschaften	19
2.1.5.3 Einsatz von HepG2-Zellen in Gentoxizitätsstudien	19
2.2 Methoden	19
2.2.1 Kultivierungsmethoden	19
2.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen	19
2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung	20
2.2.2 Einzelzellgelelektrophorese	21
2.2.2.1 Grundlagen der Methode	21
2.2.2.2 Ursachen der Kometenbildung	21
2.2.2.3 Testprotokoll	22
2.2.3 Der Mikronukleustest	25
2.2.3.1 Grundlagen der Methode	25
2.2.3.2 Bildung von Mikrokernen	26
2.2.3.3 Anwendungsmöglichkeiten	27
2.2.3.4 Testprotokoll	27
2.2.4 WST-1-Assay	28
2.2.4.1 Testprinzip	28
2.2.4.2 Testprotokoll	29

3. Ergebnisse	29
3.1 Statistische Analyse	29
3.2 Ergebnisse im Cometassay	30
3.2.1 DNA-Migration durch Benzo(a)pyren	31
3.2.2 DNA-Migration durch Erysolin	32
3.2.3 DNA-Migration durch Brassinin	33
3.2.4 DNA-Migration durch Indol(3)carbinol	35
3.2.5 Verminderung der DNA-Migration durch Erysolin	37
3.2.6 Verminderung der DNA-Migration durch Brassinin	40
3.2.7 Verminderung der DNA-Migration durch Indol(3)carbinol	42
3.3 Ergebnisse im Mikronukleustest	43
3.3.1 Induktion von Mikrokernen durch Erysolin	44
3.3.2 Induktion von Mikrokernen durch Indol(3)carbinol	45
3.3.3 Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Erysolin	46
3.3.4 Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Indol(3)carbinol	47
3.4. Ergebnisse im WST-1-Assay	48
4. Diskussion	53
4.1 Chemopräventive Eigenschaften von Erysolin	54
4.2 Chemopräventive Eigenschaften von Indol(3)carbinol	57
4.3 Chemopräventive Eigenschaften von Brassinin	60
5. Zusammenfassung	61
5.1 Deutsch	61
5.2 Englisch	62
6. Publikation	63
7. Literaturverzeichnis	64
8. Danksagung	75
9 Anhang	76

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µM	Mikromolar
Abb.	Abbildung
a. d.	destilliertes Wasser
ADH	Alkoholdehydrogenase
AhR	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ALDH	Aldehyddehydrogenase
ARE	Antioxidant response element
B(a)P	Benzo(a)pyren
BNZ	binukläre Zellen
CCD-Kamera	Charge-coupled-device Kamera
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450
DMEM	Dulbecco's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSB	Doppelstrangbrüche
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ery-B	Erythrosin-B
Erys	Erysolin
et al.	et. alii (und andere)
FCS	Fötales Kälberserum
GC/MS	Gaschromatographie / Massenspektrometrie
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
HepG2	Hepatoblastomzellen als Zellmodell für humane Hepatomzellen
I3C	Indol(3)carbinol
ITC	Isothiocyanate
LK	Lösungsmittelkontrolle

LMP	low melting point
MAO	Monoaminoxidase
min.	Minute
MK	Mikrokern(e)
MW	Mittelwert
MG	Molekulargewicht
MRP-1	Multidrug-Resistance-Protein-1
n	Anzahl
NDI	Kernteilungsindex
NMP	normal melting point
OTM	Olive Tail Moment
2-OHE	2-Hydroxyöstron
4-OHE	4-Hydroxyöstron
p	Signifikanz
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
p-Gp	p-Glykoprotein
PH	pH-Wert
rpm	rounds per minute(Umdrehungen pro Minute)
SCGE	Single-Cell-Gelelektrophorese=Cometassay
SD	Standardabweichung
Sig.	Signifikanz
SULT	Sulfotransferasen
Tab.	Tabelle
TD	Tail DNA
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
vs	versus
vgl.	vergleiche
WST-1	Water soluble tetrazolium salt
XRE	Xenobiotic-response-element

1. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass ein wesentlicher Zusammenhang zwischen verschiedenen Ernährungsweisen und der Entstehung von Krebs besteht. Analog dazu wurde seither stets versucht, das Risiko an Krebs zu erkranken, durch diätetische Maßnahmen zu verringern.

So zeigte sich eine obst- und gemüsereiche Ernährungsweise als gute vorbeugende Maßnahme gegen die Entstehung von Krebserkrankungen[1,2]. Verantwortlich für diese chemopräventiven Effekte sind die in Obst oder Gemüse enthaltenen sekundären Pflanzenstoffe, allen voran die Glucosinolate, welche vor allem in Vertretern der *Brassicaceae*-Familie wie z.B. Brokkoli, Blumenkohl, Chinakohl sowie Rucola, Kresse oder Senfsamen vorkommen. Wird die Zellstruktur durch zerkleinern, kauen, oder pürieren zerstört, kommen die Glucosinolate mit dem Enzym Myrosinase in Kontakt und es folgt die hydrolytische Aufspaltung der Glucosinolate in eine Reihe von Spaltprodukten[3] u.a. Isothiocyanate oder Indole, die letztendlich die „krebisprotektiven“ Effekte über verschiedene biochemische Mechanismen auslösen.

Zahlreiche Studien befassten sich daher in der Vergangenheit mit der Identifizierung und Gewinnung der mittlerweile mehr als 120 Glucosinolaten mit entsprechenden Spaltprodukten und untersuchten die verschiedenen ITC und Indole auf ihre chemopräventiven Eigenschaften. Dabei wurden neben chemopräventiven Effekten, wie Apoptoseinduktion, Modulation der Aktivität von Phase-I- und Phase II-Enzymen oder Inhibition des Zellzyklus von Tumorzellen[3,4] allerdings auch genotoxische, karzinogene oder zytotoxische Eigenschaften nachgewiesen[4-9].

In einer zuvor am Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführten Studie wurden die chemopräventiven Effekte von Rucolasaft an HepG2-Zellen als humanes Zell-model untersucht[10]. Auf dieser Studie aufbauend ist das Ziel dieser Dissertation, die chemopräventiven Eigenschaften des darin enthaltenen Erysolin als Vertreter der Isothiocyanate, Indol(3)carbinol aus der Gruppe der Indole, sowie Brassinin, welches sich von Indol(3)carbinol nur anhand der Seitenkette unterscheidet, zu untersuchen.

1.1 Grundlagen

1.1.1 Kanzerogenese, Gentoxizität und die Rolle der Chemoprävention

1.1.1.1 Das Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese

Die Kanzerogenese stellt einen komplexen mehrstufigen Entwicklungsprozess auf molekularer und zellulärer Ebene dar. Ein Karzinom ist die Folge von genetischen und epigenetischen Veränderungen durch Mutationen, von mehreren unabhängigen Genen (Protoonkogene, Tumorsuppressorgene), die in der Wachstumskontrolle der Zelle eine Rolle spielen. Die Krebsentstehung lässt sich in drei Phasen unterteilen:

Die Initiierung einer Zelle erfolgt durch die erste kritische Mutation, das heißt, eine Mutation an Genen, deren Produkte entscheidende Schritte der Zellproliferation und Zelldifferenzierung kontrollieren und stellt so eine irreversible Transformation einer normalen Zelle in einen prämaligen Zustand dar. Zu den Initiatoren zählen genotoxische Kanzerogene, ionisierende Strahlung, Viren sowie die genetische Prädisposition z.B. im Rahmen einer Überexpression von Onkogenen oder einer verminderten Expression von Tumorsuppressor- oder DNA-Reparaturgenen[7].

Durch chemische Tumorpromotoren oder Wachstumsstimuli aber auch im Rahmen chronisch entzündlicher Vorgänge oder durch Fremdkörper, kann die Zelle nun einen selektiven Wachstumsvorteil erhalten, wodurch sie klonal amplifiziert wird (Tumorpromotion). Dadurch entstehen intermediäre Zellpopulationen, die in zunehmendem Maße vom Phänotyp der Ausgangszelle abweichen. Über die Vergrößerung der neoplastischen Zellklone, erfolgt in der Promotionsphase zunächst die Bildung gutartiger Tumore. Mit der Größenzunahme des Zellklons nimmt die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines neuen Phänotyps zu.

In der Progressionsphase entsteht durch weitere genetische und epigenetische Faktoren, wie weitere Mutationen, die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, die maligne Zelle. Diese ist durch unkontrolliertes invasives Wachstum, die Zerstörung der Nachbargewebe, die Umstellung der Synthese auf Zellvermehrung, die Induktion von Bindegewebe und Gefäßbildung sowie der Fähigkeit zur Metastasierung charakterisiert[11]

1.1.1.2 Gentoxizität

D'Arcy und Harron haben 1993 Gentoxizität als „jede Art von schädlicher Veränderung im Genmaterial, ohne Rücksicht auf den Mechanismus, durch den die Veränderung herbeigeführt wird“ definiert[12].

In den Kurzzeitassays, welche als Screeningverfahren auf Mutagene bzw. Kanzerogene eingesetzt werden, werden gentoxische Prozesse erfasst, die Mutationen vorangehen oder als deren Folge anzusehen sind wie z.B. DNA-Basenmodifikationen, DNA-Einzel- oder Doppelstrangbrüche, DNA-Crosslinks, Mikrokerne oder Schwesterchromatidaustausch. Aus diesem Grund verwendet man in Bezug auf die biologische Eigenschaft welche ein solcher Test detektiert, den Begriff Gentoxizität statt Mutagenität.

1.1.1.3 Antigentoxizität

Als Folge dessen wird im Umkehrschluss die Eigenschaft, durch gentoxisches Material induzierte oben genannte DNA-Schädigungen zu verhindern, als Antigentoxizität bezeichnet.

1.1.1.4 Zytotoxizität

Sämtliche unerwünschte Effekte, die eine Substanz über die natürliche Schwankungsbreite hinaus auf die Lebensfähigkeit gesunder Zellen ausübt und in irgendeiner Art des Zelltodes enden, sei es in Form von Apoptose, der aktiven Selbstzerstörung einer isolierten Einzelzelle, oder der Nekrose als passive pathologische Form des Zelluntergangs, werden unter dem Begriff Zytotoxizität zusammengefasst.

1.1.1.5 Chemoprävention

Der Begriff der Chemoprävention wurde erstmals von Sporn et. al 1976 geprägt und bezeichnet im Allgemeinen die Fähigkeit von natürlich gewonnenen oder synthetisch hergestellten Substanzen zur Intervention in den Prozess der Kanzerogenese[7,13-14].

Seit der Zeit wurden in zahlreichen Studien pflanzlichen Nahrungsbestandteilen protektive Eigenschaften zugesprochen. Diese chemopräventiven Pflanzenstoffe sind in der Lage, in spezifische pathogenetische Mechanismen der Kanzerogenese einzugreifen, um so den Körper vor der Entstehung oder Progression mutierter maligner Zellen zu schützen. Mögliche Ansatzpunkte sind:

- Hemmung der Karzinogen-Aktivierung
- Induktion von karzinogen-detoxifizierenden Enzymen
- Abfangen von freien Radikalen durch Antioxidanzien

Korrektur der DNA-Hypomethylierung
Induktion von DNA-Reparatur
Hemmung der Proliferation
Induktion von Apoptose
Redifferenzierung
Beeinflussung der Zellwachstumsregulation(Tumorsuppressorgene, Onkogene)
Modulation des Zellzyklus
Maskierung der DNA [15,16]

1.1.1.6 Fremdstoffmetabolismus

Aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften reichern sich exogen aufgenommene oder endogen anfallende lipophile Substanzen im Organismus an. Über spezielle Biotransformationssysteme, die vor allem in Leber und Dünndarm vorkommen werden diese lipophilen Verbindungen in wasserlösliche Metabolite umgewandelt, um so aus dem Körper ausgeschieden werden zu können. Über diese fremdstoffmetabolisierenden Enzyme werden auch Xenobiotika verstoffwechselt.

In einem ersten Reaktionsschritt, der Phase I(Funktionalisierung) werden durch Oxidoreduktasen wie z. B. die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen(CYP), Monoaminoxidasen(MAO) Cyclooxygenasen(COX) oder Dehydrogenasen (ADH, ALDH) funktionelle Gruppen an den aufgenommenen Verbindungen freigesetzt oder eingeführt, welche dann als Angriffspunkt für die Konjugationsreaktionen in der Phase II dienen[17]. Allerdings werden hier auch mögliche Prokarzinogene in ihre aktive Form überführt. In der Phase II werden dann durch Transferasen wie z. B. Glutathion-S-Transferase(GST), UDP-Glucuronosyltransferasen(UGT) oder Sulfotransferasen(SULT) wasserlösliche Komponenten angefügt und so die renale oder biliäre Ausscheidung der Substanzen ermöglicht.

Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Fremdstoffmetabolismus stellt die Gruppe der Transportproteine dar, die deshalb auch als Phase-III-Moleküle bezeichnet werden. Proteine wie z. B. das Multidrug – Resistance – Protein 1 (MRP1) oder das p – Glykoprotein(p-Gp)sorgen für den aktiven Transport von Metaboliten aus der Zelle heraus[18].

ITC entfalten Ihre chemopräventive Wirkungen durch Hemmung der karzinogen-aktivierenden Phase I-Enzyme als auch durch eine gesteigerte Expression der Phase II-Enzyme, um so für eine forcierte Ausscheidung potentiell toxischer oder karzinogener Metabolite zu sorgen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemische Testsubstanzen

Für die Versuchsreihen wurden ausschließlich die in den Tabellen 1 und 2 aufgeführten Lösungen, Medien und Substanzen verwendet. In Tabelle 2 ist die exakte Herstellung der Lösungen beschrieben.

Tab. 1: Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Agarose, LMP für Comet	Serva, Heidelberg
Agarose, NMP, für Comet	Merck, Darmstadt
Benzo(a)Pyrene	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Brassinin	LKT Laboratories
Cell Proliferation Reagent, WST 1	Roche, Grenzach-Wyhlen
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMEM, low Glucose, ohne Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM. Low Glucose mit L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Erysolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Erythrosin B spirit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Essigsäure (Eisessig)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ethidiumbromid, 10 mg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
FCS, Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Formaldehyde Solution, 37 %	JT Baker, Deventor, NL
Gentamycin Sol.	Invitrogen, Karlsruhe
Hepes, für Gewebebezug	Roth, Karlsruhe
Indol-3-Carbinol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
May-Grünwald-Lösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
PBS, Dulbecco o. Ca/Mg	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure, 37%	Merck, Darmstadt
Titriplex = EDTA	Merck, Darmstadt
Tri-natriumcitrat-dihydrat	Appllichem, Darmstadt
Tris Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Merck, Darmstadt
Trypsin, 10x	Gibco-BRL PAA, Coelbe
Weise, Puffertabletten n. pH 7.2	Merck, Darmstadt
WST-1	Roche, Mannheim

Tab. 2: Lösungen und Puffer

Agarose-Gele 1% - NMP 0,7% - NMP 0,5% - LMP	 0,5 g in 50 ml PBS 0,14 g in 20 ml PBS 0,1 g in 20 ml PBS
EDTA-Titriplex-Puffer 0,1M EDTA-Titriplex Aqua dest.	 18,61 g 500 ml
Elektrophorese-Puffer pH >13 NaOH EDTA-Titriplex-Puffer 0,1M Aqua dest.	 12 g 10 ml erst kurz vor Gebrauch hinzufügen auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen
Ethidiumbromidlösung 0,001% Stammlösung Gebrauchslösung	 EB 10 mg/ml EB 10 µg/ml
Fixierlösung Essigsäure (Eisessig) Ethanol 99,9% Formaldehyd 37%	 50 ml 150 ml 2,5 ml
Hepes 1M pH 7,4 Hepes HCl 1N Aqua dest.	 119,16 g titrieren bis pH 7,4 auf 500 ml Gesamtvolumen auffüllen
Lyselösung EDTA-Titriplex 0,1M NaCl NaOH Triton X-100 Aqua dest.	 37,22 g 146,1 g 8 g 1% Endkonzentration auf 1000 ml Gesamtvolumen auffüllen
Neutralisations-Puffer pH 7,5 Tris 0,4M HCl 37% Aqua dest.	 48,44 g 25 ml auf 1000ml Gesamtvolumen auffüllen

Nährmedium mit Phenolrot	
DMEM low Glucose	414,5 ml
Hepes 1M	10 ml
FCS 15%	75 ml
Gentamycin	500 µl
Nährmedium ohne Phenolrot	100 ml
DMEM low Glucose ohne Phenolrot	81,9 ml
Hepes 1M	2 ml
FCS 15%	15 ml
Gentamycin	100 µl
L – Glutamin	1 ml
Trypsin 1 %	
Trypsin (10x)	10 ml
EDTA – Stocksolution	490 ml

2.1.2 Geräte und Materialien

In den Tabellen 3 und 4 sind die verwendeten Geräte, Softwareprodukte, sowie die benötigten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tab. 3: Geräte und Materialien

Bildanalysesoftware	Kinetic Imaging 5.5, Optilas, München
Elektrophoresekammer	Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluoreszenzmikroskop	Leica DMLS, Wetzlar Filter: Excitation BP 546/10 nm Barriere: 590 nm
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Quecksilber-UV-Lampe, 254 nm, 50W/AC	Osram, München
Spektrometer Tecan-Reader Infinite M200	Tecan, Crailsheim
Zentrifuge Eppendorf Universal	Eppendorf, Hamburg
Magellan Software	Tecan, Crailsheim

Tab. 4: Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24 x 60 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen steril 2ml, 10ml, 20 ml	Braun, Melsungen
Filter Bottle Top 250 ml, 0,22µm D45 mm	Millipore, Becton Dickenson, USA
Kanülen 20 G steril	Becton Dickenson, USA
Mikroplatte 96 well	Greiner, Frickenhausen
Objektträger angeraut 76x27 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen blau 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen standard gelb 200 µl	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen, Falcon 15 ml + 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflaschen T 175, T50, T25	Fischer, Frankfurt am Main
Zellkulturplatte 12 well NUNC	Sigma – Aldrich, Taufkirchen
Zellkulturplatte 6 well	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur, Quadriperm steril, 4 Kammern	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen, Falcon 25 ml, 50 ml	Becton Dickenson, USA

2.1.3 Lösungsmittel und Positivkontrollen

Sämtliche Testsubstanzen sowie die Positivkontrolle wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

Das farblose, hygroskopische DMSO, dient als Lösungsmittel sowohl für polare als auch lipophile Stoffe. Da es jedoch schon in geringer Konzentration zytotoxische Effekte auf komplexe Säugerzellsysteme, also auch auf die HepG2-Zellen ausüben kann, darf eine Endkonzentration von einem Prozent in Medium Zellgemischen nicht überschritten werden. Eine Ausnahme stellt die Kryokonservierung der HepG2-Zellen dar, wo DMSO zur Cytoprotektion gegen Kristallisationsprozesse auch in zehnpromzentiger Lösung verwendet werden darf.

Als Positivkontrolle wurde das ubiquitär vorkommende Promutagen Benzo(a)pyren (B(a)P) verwendet. Dieser fünf-Ring-PAK entsteht hauptsächlich durch die unvollständige Verbrennung von organischem und fossilem Material, sowie durch pyrolytische Vorgänge. Durch Phase – 1 – Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus kann es zur Bildung von

hochreaktiven Epoxiden kommen, die genotoxisch wirksam sind. Ohne diese metabolische Aktivierung ist B(a)P nicht reaktiv und wird daher als Prokarzinogen bezeichnet. Im initialen Schritt kommt es durch die Cytochrom – P450 – abhängigen Monooxygenasen zur Bildung von Epoxiden, die zu Diolen hydrolysiert werden. Durch eine weitere Oxidation der entstandenen Diole kommt es zur Bildung von Dihydrodiolepoxiden, die mit der DNA zu kovalenten Addukten reagieren können[19]

Unter Anwendung verschiedener Endprodukte (z.B. Cometassay) reagierte B(a)P genotoxisch in HepG2-Zellen und wird seit längerem in dieser Zellkultur als Positivkontrolle verwendet[20,21].

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete B(a)P wurde in sterilem DMSO gelöst. Es stellt als repräsentatives DNA-schädigendes Agens die Positivkontrolle in den durchgeführten Versuchen dar. Die Endkonzentration beträgt 50 µM.

2.1.4 Isothiocyanate

2.1.4.1 Chemie und Vorkommen der Glucosinolate

Isothiocyanate sind die Abbauprodukte der Glucosinolate, welche vorwiegend in Pflanzen der Kreuziferen vorkommen und dort für deren typischen Geschmack verantwortlich sind. Alle Glucosinolate besitzen eine gemeinsame Grundstruktur.

Sie bestehen aus einem Glucosesechtring einer N-Hydroxylsulfatgruppe sowie einem Aglukonrest. In der Pflanze werden Glucosinolate in Vakuolen gespeichert[22,23]

Die Glucosinolat-Konzentrationen in den *Brassicaceae* unterscheiden sich sortenabhängig. Aber auch innerhalb einer Brassica-Art sind starke Schwankungen möglich, da die Konzentrationen von folgenden Faktoren abhängig sind:

Entwicklungsstufe und Alter der Pflanze

Umweltfaktoren, wie Standort, Bodentyp Stickstoffverfügbarkeit

Zeitpunkt der Ernte

Lagerung

[25-27]

2.1.4.2 Bildung der Isothiocyanate aus Glucosinolaten

Voraussetzung für die Bildung der Isothiocyanate ist die Spaltung der Glucosinolate welche durch das Enzym Myrosinase erfolgt. Diese liegt in der Pflanzenzelle räumlich getrennt von den Glucosinolaten vor, so dass mechanische Einwirkungen wie schneiden, kauen oder

passieren notwendig sind, um die Myrosinase freizusetzen. Nicht hydrolysierte Glucosinolate können zu 10-20% durch die intestinale Mikroflora abgebaut werden[3, 27-29].

Durch Abspaltung der Glucoseeinheit entsteht aus dem Glucosinolat ein instabiles Aglukon, aus welchem weitere Abbauprodukte wie Thiocyanat, Nitril und Isothiocyanat, abhängig von den vorhandenen Bedingungen gebildet werden. Bei neutralem pH-Wert werden vermehrt Isothiocyanate gebildet[27-29].

2.1.4.3 Metabolisierung der Isothiocyanate (ITC)

ITC werden im oberen Gastrointestinaltrakt schnell absorbiert. Nach der Absorption erfolgt die durch die Glutathion-S-Transferase katalysierte Konjugation von ITC mit Glutathion zu Dithiocarbamat. Weitere enzymatische Reaktionen sorgen für den raschen Abbau über den Mercaptursäureweg zu Cysteinyl-glycin-, Cystein- und N-acetylcystein-Konjugaten, die bereits innerhalb der ersten 24 h nach Aufnahme mit dem Urin ausgeschieden werden. Die Katalyse durch GST erfolgt durch alle vier wichtigen Isoformen, allerdings mit unterschiedlicher Aktivität[30, 32, 33].

2.1.4.4 Charakterisierung der Testsubstanzen

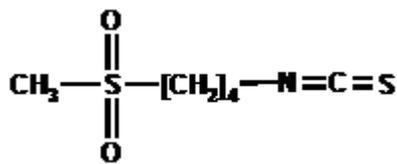


Abb. 1: Erysolin

Erysolin(4-Methylsulfonylbutylisothiocyanat) entsteht nach der hydrolytischen Spaltung von Glucoerysolin und ist ein Strukturanalogon des bereits stark beforschten Sulforaphan. Im Vergleich zu Sulforaphan besitzt Erysolin ein zweifach oxidiertes Schwefelatom. In der Natur kommt es vermehrt in Rucola und Brokkoli vor.

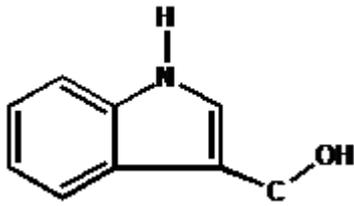


Abb. 2: Indol(3)carbinol

Indol(3)carbinol(1H-indol-3-ylmethanol) entsteht nach Hydrolyse aus Glucobrassicin. Vorkommend u.a. in Brokkoli und Blumenkohl, ist Indol(3)carbinol eines der meist beforschten sekundären Pflanzenstoffe.

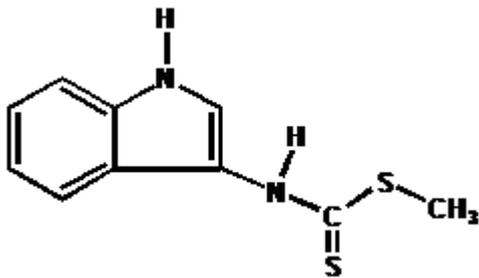


Abb. 3: Brassinin

Brassinin(Methyl-(1H-indol-3-ylmethylamino)methanedithioat) geht nach Hydrolyse ebenfalls aus Glucobrassicin hervor und ist ebenso wie Indol(3)carbinol der Gruppe der Indole zuzuordnen. In der Natur kommt es besonders in Chinakohl vor[31].

2.1.5 Charakterisierung der HepG2 – Zelllinie

2.1.5.1 Morphologie und Herkunft

Bei der HepG2 - Zelllinie handelt es sich um menschliche Zellen, die 1979 aus einem Hepatoblastom eines elfjährigen argentinischen Jungen isoliert wurden(Aden et al.1979). Sie ähneln in ihren morphologischen Eigenschaften den humanen Leberparenchymzellen. Die Zellen besitzen einen aneuploiden Karyotyp mit durchschnittlich 52 Chromosomen pro Zelle. Die Zellzyklusdauer beträgt 20 bis 28 Stunden und ist somit deutlich länger als die Generationszeit von anderen routinemäßig eingesetzten Säugerzelllinien wie CHO oder V-79 [34].

Die in den Experimenten verwendeten Zellen wurden von Dr. Firouz Darroudi (University Medical Center[LUMC], Leiden, Niederlanden)zur Verfügung gestellt. Es wurden nur Zellen der Passagen 9 – 30 verwendet.

2.1.5.2 Biochemische Eigenschaften

Die HepG2- Zellen besitzen im Gegensatz zu metabolisch inkompetenten Zelllinien (z.B. V-79) die Fähigkeit, zahlreiche Phase-1 und Phase- 2 Enzyme des Fremdstoffmetabolismus zu exprimieren und sind so in der Lage Fremdstoffe zu aktivieren und detoxifizieren, ohne dass diese Enzyme künstlich exogen zugesetzt werden müssen. Dadurch spiegeln sie den Fremdstoffmetabolismus im menschlichen Körper besser wieder als andere inkompetente Zellen[35, 36]. In Kultur sezernieren sie die meisten Plasmaproteine wie Fibrinogen, Apolipoproteine oder Albumin, die auch für humane Hepatozyten charakteristisch sind[34, 37]

2.1.5.3 Einsatz von HepG2 – Zellen in Gentoxizitätsstudien

In Gentoxizitätsstudien zeigen HepG2 – Zellen eine hohe Sensitivität gegenüber PAK und gentoxische Effekte bei Karzinogenen, die bei metabolisch inkompetenten Zellen zu falsch negativen Ergebnissen führten [38]. In Studien werden HepG2 – Zellen zur Untersuchung der folgenden biologischen Endpunkte eingesetzt: Zytotoxizität, Lipidperoxidation, Induktion von Mikrokernen und DNA-Addukten sowie der Nachweis von DNA - Strangbrüchen und Schwesterchromatidaustausch in der Einzelzellgelelektrophorese. Inzwischen existieren zahlreiche Studien in denen HepG2 – Zellen eingesetzt wurden um co- und antigentoxische Effekte chemischer Stoffe zu untersuchen und mögliche protektive Wirkmechanismen wie Inaktivierung von Peroxiden, Elektrophilen oder reaktiven Sauerstoffspezies chemopräventiver Substanzen zu identifizieren [21, 38].

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierungsmethoden

2.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Lagerung der HepG2 Zellen bis zu Ihrer Verwendung erfolgte in flüssigen Stickstoff bei minus 200 °C. Zum Einfrieren der Kultur wurden die Zellen passagiert (siehe Anleitung in Abschnitt 2.2.1.2), mit 6 ml Nährmedium (s.o.) in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1500 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet für die Kryokonservierung mit einem Einfriermedium (5,4 ml Nährmedium und 0,6 ml DMSO) resuspendiert. Die Endkonzentration von DMSO betrug 10 Prozent, die Zelldichte lag bei etwa 10^6 Zellen pro ml Einfriermedium. Die verwendeten

Substanzen wurden zuvor steril filtriert. Es folgte die Überführung von jeweils einem ml des Gemisches in Kryoröhrchen, die in einer Polystyrol-Box bei minus 80 °C für zwölf Stunden eingefroren wurden. Die Zellen kühlten dabei mit einer Geschwindigkeit von zirka 1 °C/min. ab. Anschließend wurden die Zellen in Stickstofftanks bei minus 200 °C gelagert.

Zum erneuten Auftauen der Zellen wurden zunächst alle dabei verwendeten Substanzen im Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Das aus dem Stickstofftank entnommene Kryoröhrchen wurde ebenfalls im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend in zehn ml Nährmedium pipettiert. Das in Nährmedium gelöste Zellalliquot wurde nun für fünf Minuten bei 1200 U/min und 20 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet erneut in Nährmedium gelöst. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Nachdem der Überstand ein zweites Mal durch frisches Medium ersetzt und das Zellpellet erneut resuspendiert wurde, erfolgte die Überführung der Suspension in eine Zellkulturflasche (T25). Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und einem Kohlendioxidanteil von fünf Prozent. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediaustausch, um tote Zellen zu entfernen.

2.2.1.2 Kultivierung und Passagierung

Alle 48 Stunden wurden die Zellen zweimal mit je zehn ml PBS gewaschen und das Kulturmedium ausgetauscht. Die Passagierung der in den Zellkulturflaschen (T 50) herangewachsenen Zellen erfolgte je nach Konfluenz alle drei bis sechs Tage.

Zunächst erfolgte eine Untersuchung der herangewachsenen Zellen auf pathogene Keime unter dem Inversmikroskop. Bei einwandfreiem Befund wurden die Zellen zweimal mit je zehn ml PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Ablösung der adhärenen Zellkultur vom Flaschenboden mit 0,1 % Trypsin-EDTA-Lösung (Inkubation im Brutschrank für 4 min. bei 37 °C).

Nach Resuspendierung des Gemisches mit Kulturmedium, erfolgte die Bestimmung der Zellzahl. Dazu wurde eine Probe der Zellsuspension mit Erythrosin B im Verhältnis 1:1 angefärbt und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt (4 Gruppenquadrate bestehend aus 16 Kleinquadraten). 5×10^6 Zellen wurden in neue T 50 Kulturflaschen überführt, auf 20 ml Gesamtvolumen mit Kulturmedium aufgefüllt und für die weitere Kultivierung in den Brutschrank gestellt.

2.2.2 Einzelzellgelelektrophorese – Cometassay

2.2.2.1 Grundlage der Methode

Mit der Einzelzellgelelektrophorese (Cometassay) ist es möglich, DNA-Schädigung und Reparatur auf Einzelzellniveau mittels Elektrophorese zu detektieren [39,40].

Nach der Lyse des Zellmaterials, erfolgt durch Migration geschädigter DNA in Richtung der Anode die Auftrennung im elektrischen Feld. Nach der Elektrophorese wird die DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Bei der Mikroskopischen Auswertung erinnert das Bild der migrierten DNA an einen Schweif, die nicht migrierte DNA an den Kopf eines Kometen.

Je nach Versuchsbedingungen können, in Abhängigkeit vom eingestellten pH-Wert, Einzel-, Doppelstrangbrüche der DNA sowie alkalilabile Stellen und DNA-Crosslinks nachgewiesen werden.

2.2.2.2 Ursachen der Kometenbildung

Die Bildung von Kometen lässt sich mittels zweier generell akzeptierter Theorien von Östling und Johanson(1984) und Klaude et al. (1996) erklären[42, 43]. Diesen Theorien zufolge gibt es grundsätzliche Unterschiede was die Ursache der Kometenbildung angeht, je nachdem ob es sich um die neutrale oder alkalische Version des Testprotokolls handelt.

Nach Östling und Johanson (1984) besteht die DNA-Struktur unter den Versuchsbedingungen bei neutralem pH-Wert auch nach der Zellyse noch in der geordneten Form von Schleifen, welche die vielfach gewundene Struktur, die zuvor in den Nukleosomen enthalten war, beibehalten. Durch das Einwirken genotoxischer Agenzien entstehen Einzelstrangbrüche in der DNA, welche die Schleifen lockern. Die Enden der gebrochenen Einzelstränge bleiben jedoch weiterhin an größeren DNA-Stücken befestigt, z. B. indem sie sich mit anderen Strangmolekülen des Kernmaterials verwinden. Im elektrischen Feld können sich die gelockerten Schleifen des negativ geladenen DNA-Materials in Richtung der Anode lediglich strecken, das heißt, sie entfernen sich nur wenig vom Kopf des Kometen. Die gegabelte Form solcher Strangenden sowie ihre relative Größe, kann dabei zusätzlich hindernd auf eine Wanderung im elektrischen Feld wirken [43]. Bei zunehmender Schädigung der DNA-Struktur durch genotoxische Substanzen entstehen vermehrt Doppelstrangbrüche. So wandern dann ganze DNA-Fragmente während der Elektrophorese aus dem Kopf in den Schweif des Kometen.

In der alkalischen Version des Cometassays besteht der Schweif nach Klaude et al. (1996) grundsätzlich aus zwei Arten von Fragmenten. Kommt es in einem Strang in unmittelbarer Nähe zu Brüchen, entspiralisiert sich der DNA-Strang komplett und wird als einzelner Fragmentstrang frei. Befinden sich die Bruchstellen weiter voneinander entfernt, können sich keine kompletten Einzelstrangfragmente bilden, da die Entspiralisierung der Doppelhelix unterbrochen wird. Die Zahl der Einzelstrangfragmente nimmt mit wachsender Schädigung durch ein Agens zu[43].

Diesen Modellvorstellungen zu Folge soll die Anzahl der DNA-Strangbrüche proportional zu der gemessenen Intensität des Kometenschweifes und nicht proportional zu dessen Länge zunehmen. Beobachtungen zufolge nimmt die Länge vor allem in der neutralen Protokollversion anfangs mit wachsendem Schaden zu. Aufgrund der vorgegebenen Bedingungen der Elektrophorese wird hier jedoch schnell ein Maximum erreicht.

Bis heute wurde eine Vielzahl an genotoxischen Substanzen mit dem Cometassay untersucht (vgl. [21, 38, 44-47]). Dabei kann mit praktisch allen eukaryontischen Zellen gearbeitet werden.

Die Vorteile des Cometassays liegen in der kostengünstigen schnellen Durchführung sowie der Möglichkeit DNA-Schäden auf Einzelniveau zu identifizieren. Dabei wird nur eine geringe Anzahl an Zellen benötigt. Nach Collins et al. (1997) ist eine sehr hohe Empfindlichkeit des Testsystems gegeben, welche eine Erkennung von bis zu einigen hundert Brüchen pro Zelle ermöglicht[47].

Allerdings muss auch in diesem Testsystem beachtet werden, dass zytotoxische Substanzen zum Absterben behandelter Zellen führen können und so DNA-Migration induzieren, die nicht auf einer direkten Interaktion der Testsubstanz oder ihrer reaktiven Metaboliten beruht. Aus diesem Grund müssen zytotoxische Effekte zur Vermeidung falsch positiver Effekte ausgeschlossen werden [48].

2.2.2.3 Testprotokoll

Vorbereitung der Objektträger:

Angeraute Objektträger wurden mit einem Ethanol/Essigsäuregemisch im Verhältnis 1:1 gereinigt um eine optimale Haftung der folgenden Agaroseschichten zu gewährleisten.

Nach dem Auftragen der ersten Schicht Agarose (NMP 1%), wurden die Slides zum Aushärten im Trockenschrank für 24 h bei 37°C gelagert. Danach wurde die zweite Schicht jetzt mit NMP 0,7% aufgetragen. Die zweite Schicht wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und zum Trocknen für mind. 15 Minuten in den Kühlschrank gestellt. Durch

vorsichtiges Abziehen des Deckgläschens im Anschluss wird eine optimale Oberflächenglätte erreicht.

Passage in Multiwell-Platten

Für diese Versuchsreihen wurden HepG2-Zellen der Passagen 11-24 verwendet. Nach der Zellernte (vgl. Kultivierung und Passagierung) wurden die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt, 3×10^5 Zellen pro Well in eine 12-Multiwellplatte eingesät. Im Anschluss wurden 2ml Kulturmedium hinzupipettiert und die Platten 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Exposition der HepG2-Zellen mit den Testsubstanzen

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 1ml PBS gewaschen (vgl. Abschnitt Kultivierung und Passagierung). Anschließend wurden 2ml Medium vorgelegt und die HepG2-Zellen gegenüber 20 µl der Testsubstanzen bzw. der Positiv- und Negativkontrolle exponiert. Die Zellen wurden anschließend weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Exposition mit Benzo(a)pyren

Zur Untersuchung des chemopräventiven Potentials der Testsubstanzen wurden die HepG2-Zellen in einer zweiten Versuchsreihe nach nochmaligem Waschen mit 1ml PBS gegenüber 20µl B(a)P 50µM für weitere 24 h exponiert.

Die für die folgenden Arbeitsschritte benötigten Chemikalien hatten eine Arbeitstemperatur von vier °C, um bei deren Zellkontakt eine Verfälschung der Versuchsergebnisse durch veränderte Enzymaktivität auszuschließen. Zur Vorbeugung von Zellschädigungen durch UV-Strahlung wurden alle jetzt folgenden Schritte im abgedunkelten Labor bei Rotlicht durchgeführt.

Zellernte und Bestimmung der Zellvitalität

Durch Trypsinisierung wurden die behandelten Zellen geerntet und je ein Aliquot auf Zytotoxizität mit Erythrosin B überprüft. Dazu wurde eine Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Erythrosin B-Lösung (10 mg/ 25 ml PBS) suspendiert. Danach erfolgte die Auszählung der Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer. Die Prozentzahl an Zellen, die Erythrosin B nicht aufnahmen, wurde als Indikator für die Zellvitalität (%lebende Zellen) verwendet.

Lyse

Die Zellsuspensionen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 1200 rpm 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die abzentrifugierten Zellen in 120µl LMP-Agarose 0,5% resuspendiert und gut gemischt. 100 µl der Agarose-Zellsuspension wurden auf die vorbereiteten Objektträger als dritte Schicht aufgetragen, erneut mit einem Deckgläschen versehen und für mind. 15 Minuten bei 4 C° getrocknet. Danach wurden nach Entfernung der Deckgläschen die jetzt fertigen Slides in eine Schifferdeckerkammer einsortiert und in 100 ml Lyselösung (pH 10) für mindestens 1 Stunde bei 4°C eingelegt.

DNA-Entspiralisierung

Nach Spülung mit 4°C kaltem Aqua dest. wurde die Lyselösung durch den alkalischen Elektrophoresepuffer (pH 13) ersetzt. Die Objektträger wurden dafür in die bereits heruntergekühlte und mit Elektrophoresepuffer gefüllte Elektrophoresekammer einsortiert und darin 20 Minuten bei 4 °C liegen lassen.

Elektrophorese

Nach Ende der Entspiralisierungsphase wurde die gekühlte Elektrophoresekammer für 25 Minuten bei 300 mA und 25 V betrieben.

Neutralisation

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Objektträger zur Neutralisation für zehn Minuten in Tris-Puffer (pH 7,5) eingelegt. Anschließend wurde dieser durch zweimaliges Spülen mit gekühltem Aqua dest. entfernt und die Objektträger getrocknet.

Färben

Nach dem Trocknen der Objektträger wurden die Gele mit 80µl Ethidiumbromidlösung eingefärbt und mit einem Deckgläschen blasenfrei abgedeckt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank auf einer feuchten Unterlage, um ein Eintrocknen der Agarose zu verhindern.

Die Auswertung der fertigen Präparate erfolgte bei 400-facher Vergrößerung und einer Anregungswellenlänge von 254nm. Mittels CCD-Kamera wurden die Bilder zum Computer übertragen und mit der Software Comet 5.5 Europe, Kinetic Imaging ausgewertet.

Das Programm ist so konzipiert, dass es die aufgetrennten Zellteile in einen Kometenkopf und dessen Schweif differenzieren und verschiedene Parameter wie Schweiflänge, den prozentualen Anteil der DNA im Schweif oder den Olive Tail Moment messen bzw. berechnen kann.

2.2.3 Der Mikronukleustest

2.2.3.1 Grundlagen der Methode

Chromosomenaberrationen stellen in der Karzinogenese ein wichtiges Ereignis dar. Solche chromosomale Abnormitäten in der Zelle sind als direkte Folge von Schäden auf DNA-Niveau anzusehen[49].

Mit Hilfe des Mikronukleustests können chromosomale Schäden indirekt detektiert werden. Der Nachweis des genotoxischen Potentials einer Substanz wird in diesem Bioassay durch die Induktion von Mikrokernen (MK) erbracht[50-52].

Erfasst werden genotoxische Ereignisse, welche den Verlust ganzer Chromosomen, chromosomaler Brüche und Neuarrangements von Chromosomen zur Folge haben. Außerdem lassen sich zytogenetische Schäden wie Apoptose und Nekrose erkennen.

Veränderungen wie der Verlust ganzer Chromosomen können durch Fehler am Spindelapparat oder dem Centromer einer Zelle ausgelöst werden.

Da die Mikrokernbildung an die Kernteilung der Zelle gebunden ist, wurde von Fenech et al. (1985) eine Methode zur Hemmung der Zytokinese entwickelt[53]. Durch diese Methode wird die Auswertung der Mikrokernfrequenz in binukleären Zellen ermöglicht und außerdem sichergestellt, dass die ausgewerteten Zellen exakt eine Teilung abgeschlossen haben. Da genotoxische Substanzen in höheren Konzentrationen häufig auch eine zytotoxische Wirkung auf das Zellmaterial haben, was wiederum in einer verminderten Zellteilung resultiert, ist der Nachweis einer erfolgreichen Mitose unabdingbar um eine falsche Beurteilung des genotoxischen Potentials einer Substanz zu vermeiden. Außerdem ist die vollständige Teilung der Zellen wichtig, da es noch nicht geklärt ist wie sich MK bei weiteren Zellteilungen verhalten [50].

Zur Zytokinese-Hemmung wird Cytochalasin B verwendet. Dieses wirkt am Zytoskelett der Zelle indem es die Polymerisation des G-Actins zu F-Actin hemmt, welches für die Bildung des Mikrofilament-Ringes notwendig ist. Dieser bindet das Zytoplasma zwischen den Tochterkernen in der Telophase der Mitose ab. Dadurch wird die Zytokinese der sich teilenden Zellen nach vollendeter Karyokinese blockiert. Die beiden Tochterkerne sind nur

von einem gemeinsamen Zytoplasma umgeben. So kann eine erfolgreiche Zellteilung durch eine doppelkernige Zelle leicht erkannt werden.

2.2.3.2 Bildung von Mikrokernen

Sowohl in vivo als auch in vitro enthalten Mikrokerne Chromatin, welches von einer doppelten Kernmembran umgeben ist. Die Ultrastruktur der Mikrokerne ähnelt den eigentlichen Hauptkernen von Zellen. Ihre Kernhülle besitzt Poren, im Inneren befinden sich Hetero und Euchromatin. Die MK befinden sich wie der Hauptkern der Zelle im Zytoplasma, höchstens zwei Hauptkerndurchmesser von diesem entfernt. Im Vergleich zum Hauptkern sind die MK mit einem Durchmesser von maximal einem Drittel des Nukleus erheblich kleiner. Die Häufigkeit spontaner MK-Bildung variiert in Abhängigkeit zur jeweiligen Zelllinie. In HepG2-Zellen beträgt die Häufigkeit 2%, in Leukozyten kommt es mit 0,1 bis 0,2 prozentiger Häufigkeit zur Bildung von MK.

Während der Mitose liegt das Chromatin in kondensierter Form als Chromosomen vor. Bei Gentoxinen, die chromosomenbrechend wirken, sogenannte Klastogene, können Bruchstücke eines Chromosoms während der Verteilung auf die Tochterkerne verloren gehen.

Ursache dafür ist das Fehlen eines Zentromers bei den Chromosomenfragmenten. Dieses wird als Andockstelle für die Spindelfasern benötigt, die die Chromosomen dann in die prospektive Kernregion der Tochterzelle transportieren. Diese azentrischen Chromosomenfragmente bleiben nach Abschluss der Mitose in der Äquatorialebene als MK zurück. Benzo(a)pyren wirkt erst nach metabolischer Aktivierung klastogen, während Substanzen wie Bleomycin oder Mytomicin C direkt klastogen wirken.

Aneugene Substanzen wie z.B. Vinblastin oder Colchizin sind in der Lage den Verlust ganzer Chromosomen zu bewirken. Über eine Schädigung des Spindelapparates oder des Zentromers, ist eine Verlagerung der Chromosomen zu den Zentren der beiden neuentstehenden Tochterzellen nicht möglich.

Während der Telophase werden die verlorengegangenen Chromosomen bzw. Chromatinfragmente von einer Kernhülle umgeben. Im weiteren Verlauf bildet sich diese morphologisch zu einem kleineren Interphasekern dem Mikrokern um.

Klastogene und Aneugene können mittels Telomer- und Zentromerfärbung der Mikrokerne differenziert werden.

2.2.3.3 Anwendungsmöglichkeiten

Der in vitro-Mikronukleustest ist ein schnelles und nur mit geringem Aufwand durchführbares Testsystem, welches seine Hauptanwendung im Screening von Chemikalien auf genotoxisches Potential, aber auch im Biomonitoring genetischer Schäden findet. Inzwischen existieren standardisierte Testprotokolle aus größeren Ringversuchen[54]. Prinzipiell können Mikrokerne in allen Zelllinien induziert werden, sofern diese sich teilen oder zur Teilung provozieren lassen.

2.2.3.4 Testprotokoll

Vorbereitung der Objektträger

Die gereinigten Objektträger werden mit einem Gemisch aus 100%igem Ethanol und Aceton im Verhältnis 1:1 entfettet, und nach dem Trocknen in Alufolie eingewickelt und autoklaviert.

Für die folgenden Versuchsreihen wurden nur Zellen der Passagen 15 -18 verwendet.

Einsaat

Die sterilen Objektträger wurden nach Abflammen beider Seiten unter dem Bunsenbrenner, kurz auskühlen lassen und anschließend in Quadripermschalen gelegt. Die Zellen wurden wie im Abschnitt Kultivierung und Passagierung mit Trypsin geerntet, vereinzelt und ausgezählt. Nach Vorlegen von 5 ml Kulturmedium wurden pro Objektträger 8×10^4 Zellen mäandrierend eingesät und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Exposition der HepG2-Zellen gegenüber den Testsubstanzen

Nach dem Waschen der Zellen mit 3 ml PBS und Vorlage von 5 ml frischem Medium wurden die Zellen gegenüber 50µl der Testsubstanzen sowie der Positiv – und Lösungsmittelkontrolle exponiert und anschließend für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Exposition mit Benzo(a)pyren

Zur Untersuchung des chemopräventiven Potentials der Testsubstanzen wurden die HepG2-Zellen in einer zweiten Versuchsreihe nach nochmaligem Waschen mit 3 ml PBS gegenüber 50µl B(a)P 50µM für weitere 24 h exponiert.

Hemmung der Zytoplasmateilung mit Cytochalasin B

Die Zellen wurden nach nochmaligem Waschen und Mediumwechsel mit 10µl Cytochalasin B für 24 Stunden inkubiert.

Fixierung der Zellen

Nach Entfernung des Mediums erfolgte die Behandlung mit 0,15%iger Trisodiumcitrat – Lösung für 5 Minuten im Brutschrank. Durch die Behandlung mit dieser hypotonen Salzlösung quellen die Zellen samt Chromatin auf und verbessern dadurch die Bedingungen beim Auszählen der Mikrokerne. Anschließend wurde das Trisodiumcitrat abgesaugt und die Zellen mit einer 4°C kühlen frisch hergestellten Fixierlösung aus Ethanol Eisessig und Formaldehyd (siehe Tabelle Chemikalien und Lösungen) für 5 Minuten im Kühlschrank fixiert. Dieser Schritt wurde ein zweites Mal wiederholt.

Färbung

Nach der Fixierung wurden die fertigen Objektträger drei Minuten in May-Grünwaldlösung und nach Spülung mit Weise-Puffer 20 Minuten in Giemsalösung gefärbt. Nach nochmaligem Abspülen mit Weise-Puffer und Trocknung der Objektträger konnten diese bei 1000facher Vergrößerung ausgewertet werden.

2.2.4 WST-1 –Assay

2.2.4.1 Testprinzip

Beim WST-1-Assay, handelt es sich um ein weiteres Testverfahren zur Bestimmung der Zytotoxizität von Stoffen. Hierbei macht man sich die Mitochondrienaktivität intakter HepG2-Zellen zu Nutze. Deren Mitochondrien reduzieren dabei mittels der Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase das schwach rötliche, wasserlösliche Tetrazoliumsalz WST-1 (4-[3-(4-Jodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat) in das dunkelrote Formazan[55]. Die Bestimmung der Absorption der einzelnen Ansätze erfolgt bei einer Wellenlänge von 450nm gegen eine Referenzwellenlänge von 650 nm, wobei sich die Mitochondrienaktivität lebender HepG2-Zellen im Assay proportional zu der im Spektralphotometer gemessenen Absorption verhält.

Den Endwert der einzelnen Versuchsansätze erhält man durch Subtraktion des Mediumleerwertes (Absorptionswert des Mediums) vom Absorptionswert des jeweils untersuchten Wells.

Als Referenzwert für die relative Zellvitalität [%] im jeweiligen Experiment gilt der Mittelwert aus drei Versuchsreihen.

Je höher die Absorption, desto höher die Mitochondrienaktivität, desto höher die Zellvitalität. In der vorliegenden Arbeit gelten Werte < 70 % als zytotoxisch.

2.2.4.2 Testprotokoll

Einsatz und Exposition

Aufgrund der Absorptionsmessung im Elisa-Reader wird zur Durchführung der WST-1-Versuchsreihen anstelle des bisher verwendeten Kulturmediums, ein farbloses Vollmedium verwendet(vgl. Tabelle 2).

Die Zellpassagierung der HepG2-Zellen erfolgt wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Für die folgenden Versuchsreihen werden 1×10^4 /Well mit 100 μl Medium in eine 96-Well-Mikrotiterplatte eingesät und für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit einer Lösung aus 90 μl Medium und 10 μl Testsubstanz für weitere 24 h inkubiert.

Im Fall der Antigentoxizitätstests erfolgt jetzt nach Absaugen des Mediums die Exposition gegenüber 10 μl Benzo(a)pyren 50 μM und 90 μl Medium für weitere 24 h.

Als gemeinsame Endstrecke werden nach Inkubation mit der Testsubstanz oder B(a)P die Zellen nun für eine Stunde mit 10 μl WST-Reagenz im Brutschrank inkubiert.

Anschließend erfolgt die Messung im ELISA-Reader.

Positivkontrolle

Als Positivkontrolle wird sowohl in den Gentoxizitäts- als auch den Antigentoxizitätsversuchsreihen Triton-X-100 verwendet. Dazu wird eine Reihe unbehandelter und nur mit Medium versetzter Zellen für eine Stunde mit 10 μl 0,1%iger Triton-X-100-Lösung bei 37°C im Brutschrank belastet. Anschließend erfolgt die Exposition gegenüber WST-1-Reagenz.

3. Ergebnisse

3.1 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2003. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) wurden aus drei unabhängigen Wiederholungsexperimenten berechnet. Zur Bestimmung der Signifikanzniveaus wurde der Student's t-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse von Mikronukleustest, Cometassay und WST-1-Assays werden in Form von Balkendiagrammen dargestellt. Bei Voraussetzung einer Normalverteilung werden p-Werte von $< 0,05$ als signifikant (*) angesehen, p-Werte von $< 0,01$ als hoch signifikant (**).

3.2 Ergebnisse im Cometassay

Zur Darstellung der Ergebnisse im Cometassay wurden die Parameter Olive Tail Moment (OTM) und Tail DNA [%] herangezogen.

Der OTM ist das Produkt aus Schweiflänge und relativer Schweifintensität und stellt somit den Versuch dar die Informationen über Schweiflänge und Schweifintensität zu kombinieren:

$$|m_k m_s| \times \text{DNAschweif}$$

$|m_k m_s|$ = Abstand zwischen Massenmittelpunkt des Kopfes und Massenmittelpunkt des Schweifes.

Die Tail DNA [%] beschreibt den Anteil der migrierten DNA in % gegenüber der nicht migrierten DNA im Kopf des Kometen:

$$\text{Tail DNA [\%]} = \text{DNA}_{\text{ges}}[\%] - \text{DNA}_{\text{head}}[\%]$$

Bei dieser Quantifizierungsmethode handelt es sich um eine lineare Funktion, über die der Anteil der DNA-Brüche im Schweif mit der DNA-Menge im Kopf übereinstimmt.



Abb. 4.:

HepG2-Zelle nach SCGE gefärbt mit Ethidiumbromid 400-fach vergrößert. Die blauen Balken stellen die Messmarkierungen für den Cometenkopf, der weiße Balken die Markierung für das Schweifende dar.

Für die Auswertung von OTM und Tail-DNA[%], wurden bei den durchgeführten Messungen je 102 Zellen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen bewertet.

Die Einwirkzeit der Testsubstanzen betrug 24 Stunden.

Parallel zu den Gentoxizitätsuntersuchungen wurde die Zellvitalität mit dem Erythrosin-B-Test als lebende Zellen [%] bestimmt. Eine Vitalität der HepG2-Zellen von >80% nach Fremdstoffexposition zeigten hier akzeptable Zytoxizitätswerte an.

3.2.1 DNA-Migration durch Benzo(a)pyren

Zur Darstellung einer Dosis-Wirkbeziehung des in den späteren Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendeten B(a)P, wurden die HepG2-zellen gegenüber 25-100 μM B(a)P exponiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung im Cometassay. Hier wurde als Parameter für die DNA- Schädigung nur der OTM herangezogen,

Hinweise auf relevante Zytotoxizität gab es bei den hier durchgeführten Versuchsreihen nicht. Die Zellvitalität lag bei allen gemessenen Konzentrationen $> 80\%$.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, zeigen sämtliche untersuchte B(a)P-Konzentrationen nach 24-stündiger Exposition eine konzentrationsabhängige signifikante bzw. hochsignifikante Zunahme der DNA-Migration.

Die in den übrigen Versuchsreihen als Positivkontrolle verwendete Konzentration von 50 μM B(a)P zeigte hier eine 4,5 fache Erhöhung des OTM gegenüber DMSO.

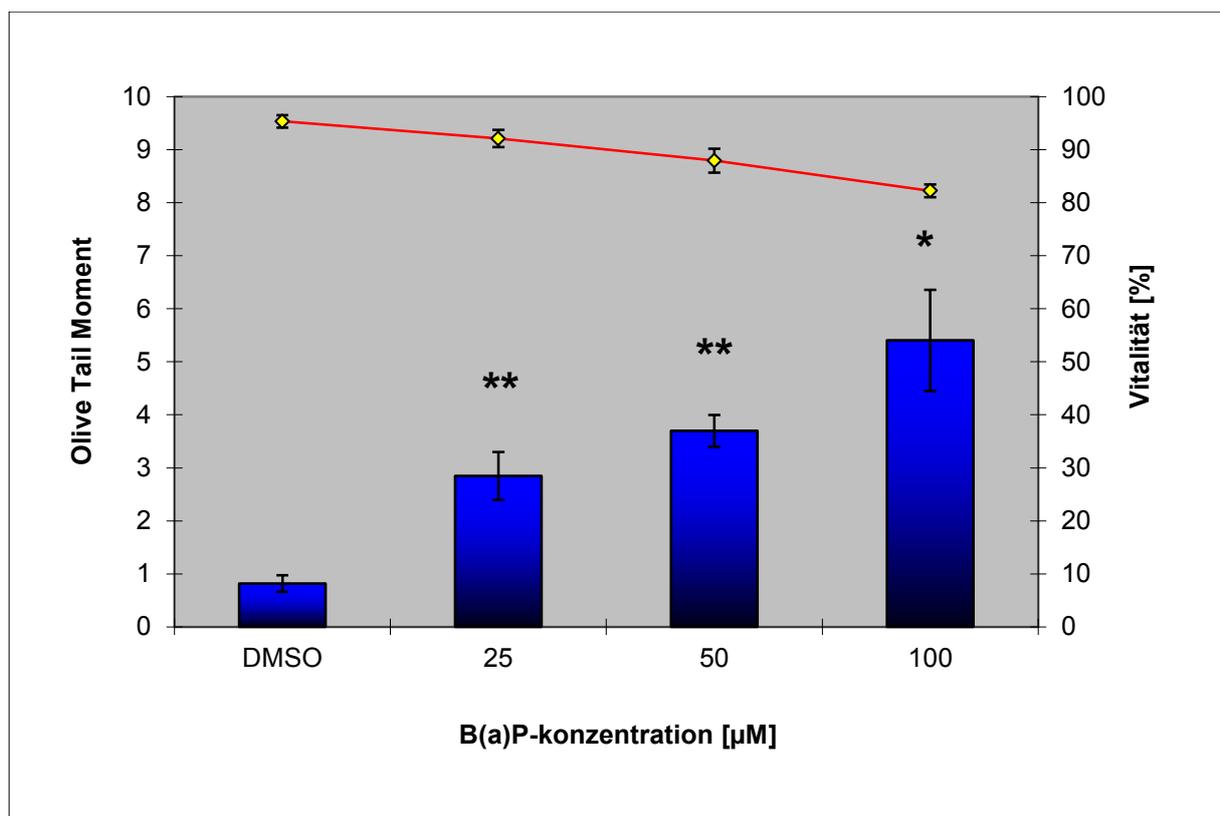


Abb. 5:

Effekt von B(a)P auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber B(a)P in einem Konzentrationsbereich von 25 μM - 100 μM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) \pm die Standardabweichung ($n=3$, * $p\leq 0,05$ ** $p\leq 0,01$). Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

3.2.2 DNA Migration durch Erysolin

Die HepG2 - Zellen wurden für 24 Stunden mit Erysolin inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung im Cometassay. Bis zu einer Konzentration von 20 μM konnte zunächst kein signifikanter Anstieg der DNA-Migration durch Erysolin beobachtet werden. Bei einer Erysolinkonzentration von 30 μM zeigte sich ein Anstieg des OTM auf 130% der Negativkontrolle DMSO verbunden mit einer konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellvitalität auf 55,06% (siehe Abb.3).

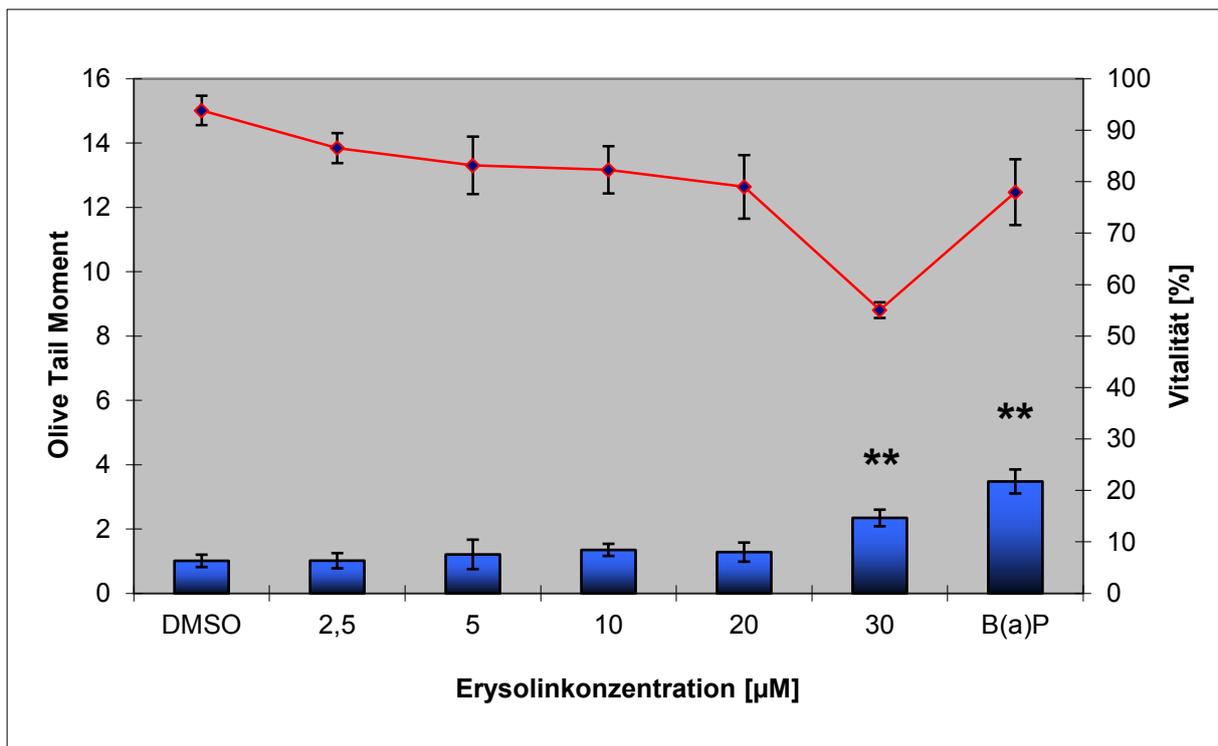


Abb. 6:

Effekt von Erysolin auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 2,5 μM - 30 μM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) \pm die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50 μM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Auch bei der Betrachtung des Anteils der Tail-DNA[%] kam es erst bei einer Konzentration von 30 μM Erysolin zu einem hochsignifikanten Anstieg der DNA im Kometenschweif. Dieser lag bei durchschnittlich 5,96[%] was einer 1,7 fachen Erhöhung der DNA-Migration gegenüber DMSO entspricht.

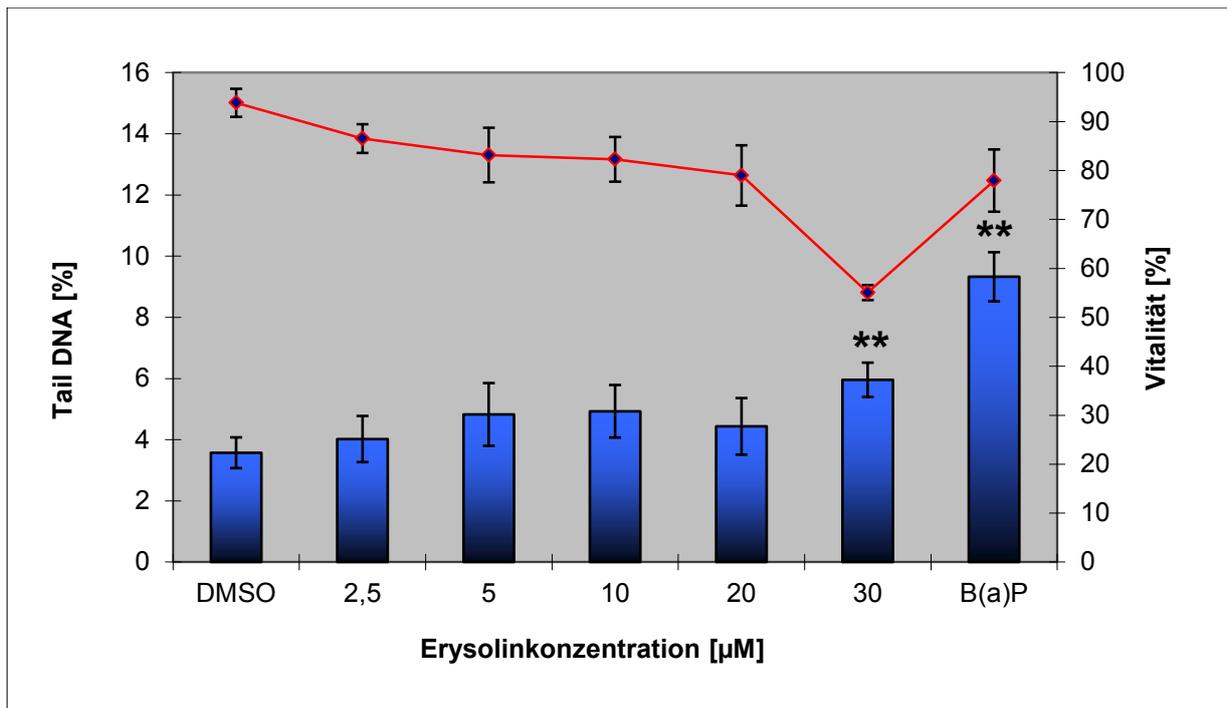


Abb. 7:

Effekt von Erysolin auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 2,5 µM - 30 µM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

3.2.3 DNA-Migration durch Brassinin

Nach 24-stündiger Exposition der HepG2-Zellen gegenüber Brassinin in einem Konzentrationsbereich zwischen 60 µM und 140 µM und Untersuchung im Cometassay konnte nach Betrachtung des OTM sowie der Tail-DNA[%] auch hier keine konzentrationsabhängige Zunahme der DNA-Migration durch Brassinin festgestellt werden.

Wie in den Abb. 5 und 6 dargestellt, war hier kein signifikanter Anstieg von OTM und Tail DNA[%] gegenüber DMSO bei ansteigender Brassinkonzentration fest zu stellen.

Auffällig war hier eine deutliche dosisabhängige Abnahme der Zellvitalität ab einer Konzentration von 120 µM Brassinin welche mit steigender Brassinindosis weiter zunahm. Bei einer Brassininkonzentration von 140 µM lag die Vitalität nur noch bei 58,85%.

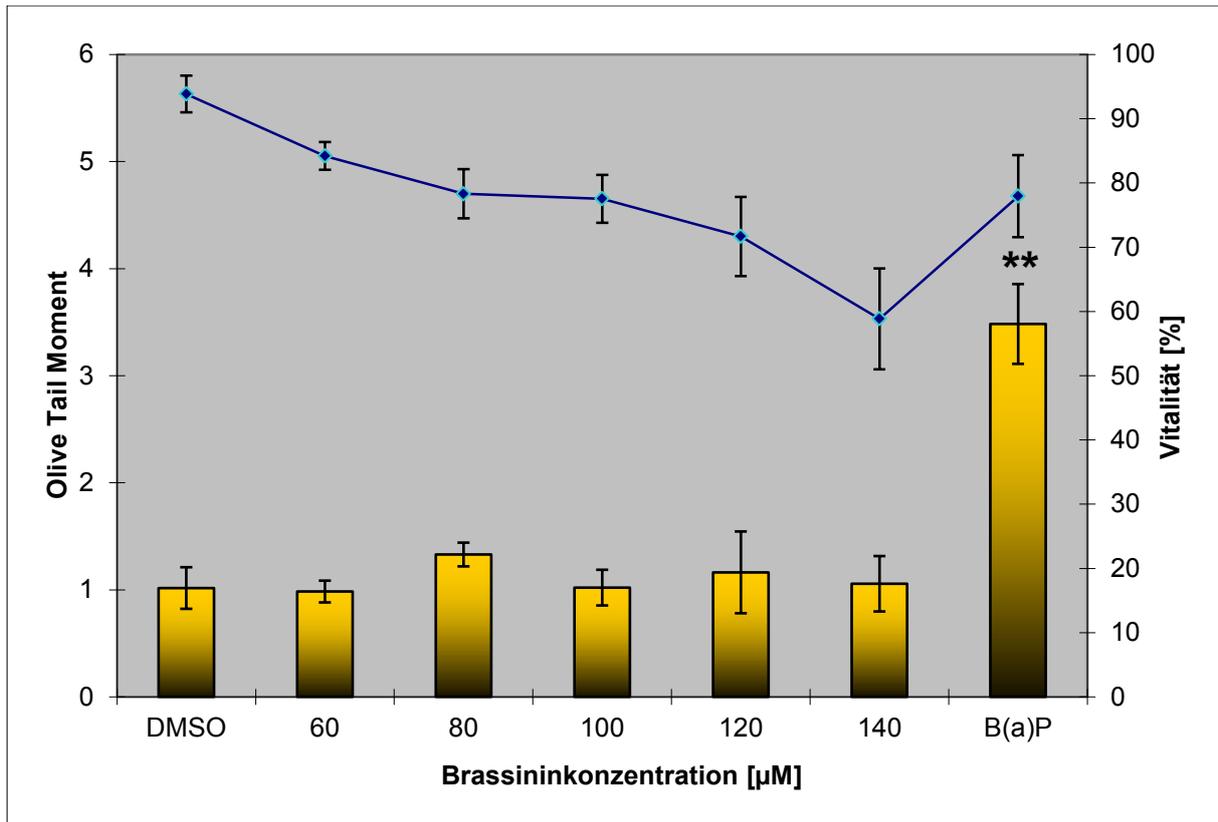


Abb. 8:

Effekt von Brassinin auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Brassinin in einem Konzentrationsbereich von 60 μM - 140 μM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50μM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

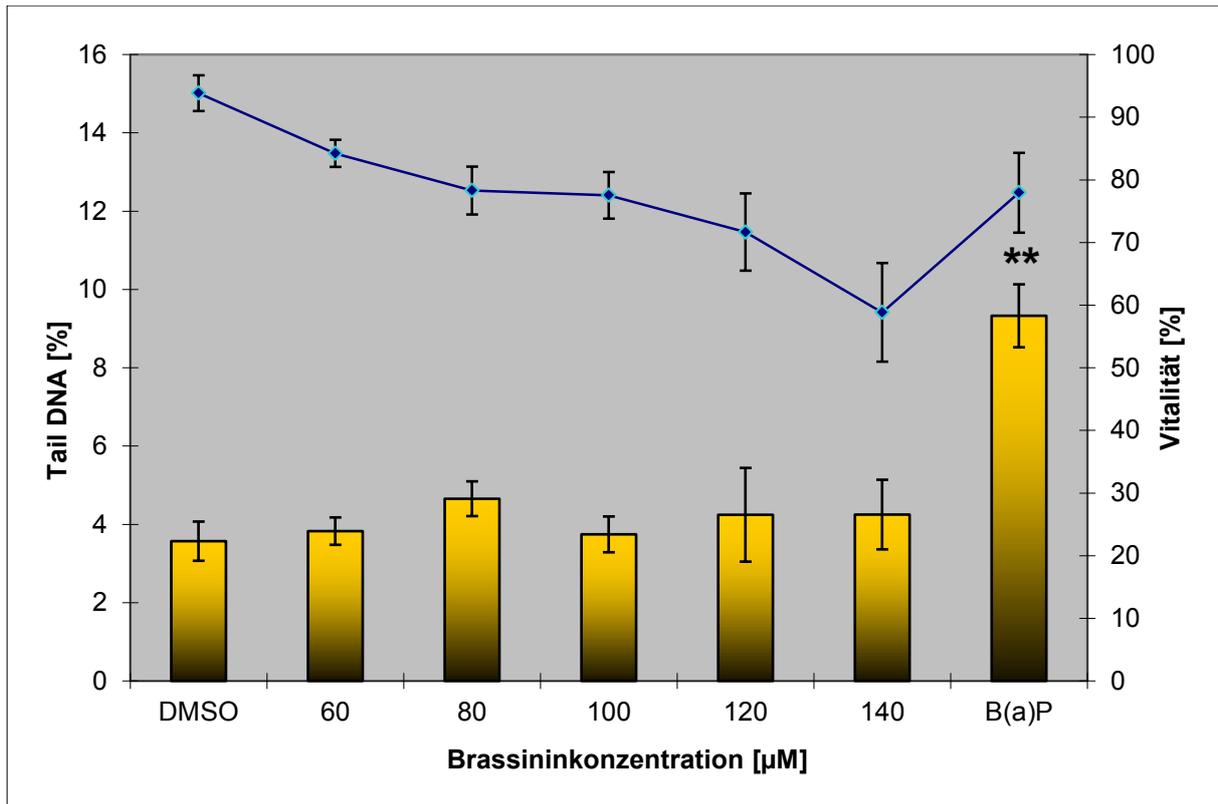


Abb. 9:

Effekt von Brassinin auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Brassinin in einem Konzentrationsbereich von 60 µM - 140 µM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

3.2.4 DNA-Migration durch Indol(3)carbinol

In den Versuchsreihen wurden die HepG2 Zellen für 24 Stunden mit Indol(3)carbinol in Konzentrationen von 100 µM bis 500 µM inkubiert. Anschließend wurden wie auch in den vorherigen Versuchsreihen die Parameter OTM und Tail DNA im Cometassay untersucht.

Hier zeigte sich wie in Abb. 8 zu sehen ist, dass es bereits ab einer Konzentration von 100 µM Indol(3)carbinol zu einer dosisabhängigen Erhöhung des OTM kommt. Mit einer Zunahme um 54,36% gegenüber DMSO bei p = 0,04 (Daten nicht gezeigt) lag die Steigerung der durch I3C bedingten DNA-Migration damit im signifikanten Bereich. Mit steigender Konzentration nahm der OTM weiter zu und erreicht sein Maximum bei 500 µM. Hier lag der OTM im Mittel bei 1,85 und ist damit gegenüber der Negativkontrolle DMSO dreimal so hoch.

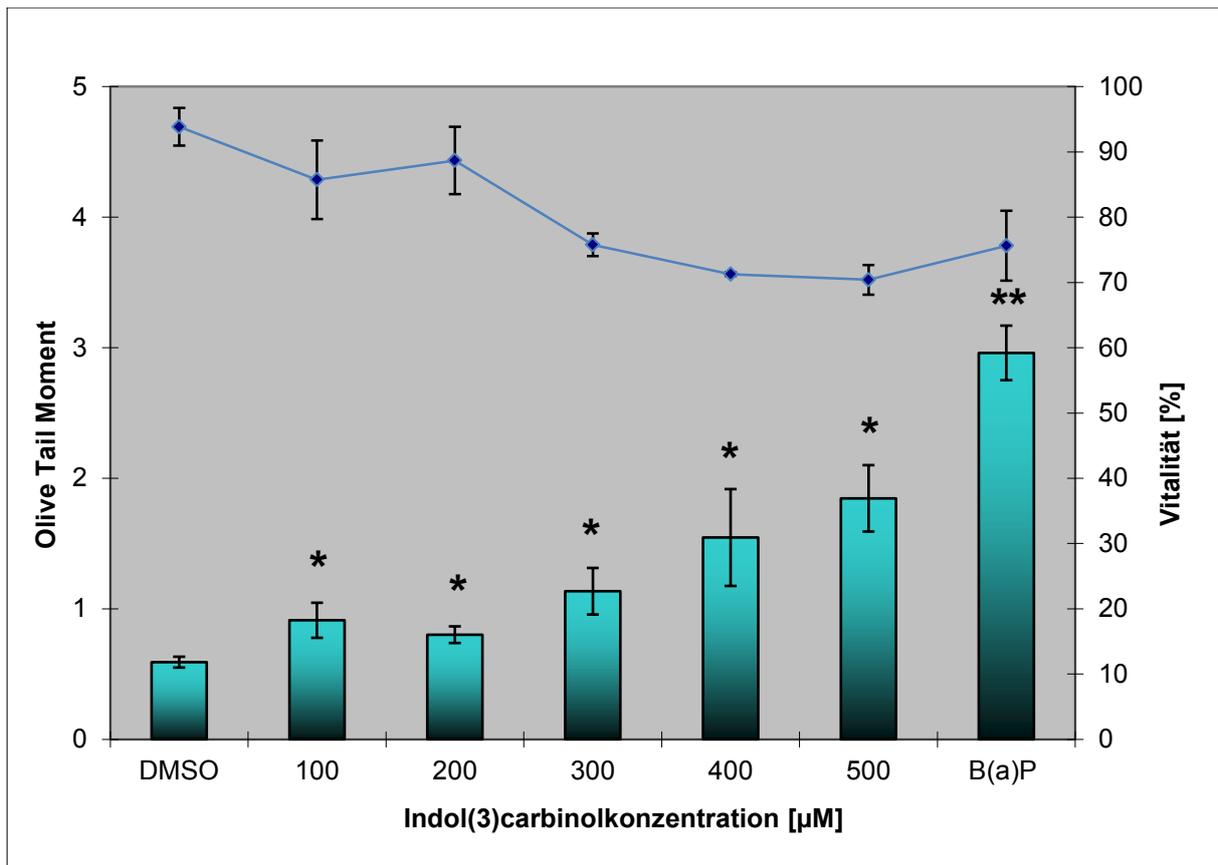


Abb. 10:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 100 μM – 500 μM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50μM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Bei der Betrachtung der Tail-DNA[%] fiel ebenfalls eine dosisabhängige Zunahme der DNA-Migration auf. Bei einer Konzentration von 300 μM war bereits eine Erhöhung der Tail-DNA[%] um 105 % verglichen mit der Negativkontrolle zu erkennen, die jedoch aufgrund zu großer Standardabweichungen nicht im signifikanten Bereich (p=0,15) lagen. Hochsignifikante Unterschiede gegenüber DMSO zeigten sich ab einer Konzentration von 500 μM, wo sich der Anteil der Tail-DNA[%] im Vergleich zu DMSO analog zu den OTM-ergebnissen verdreifacht hatte (s. Abb. 8)

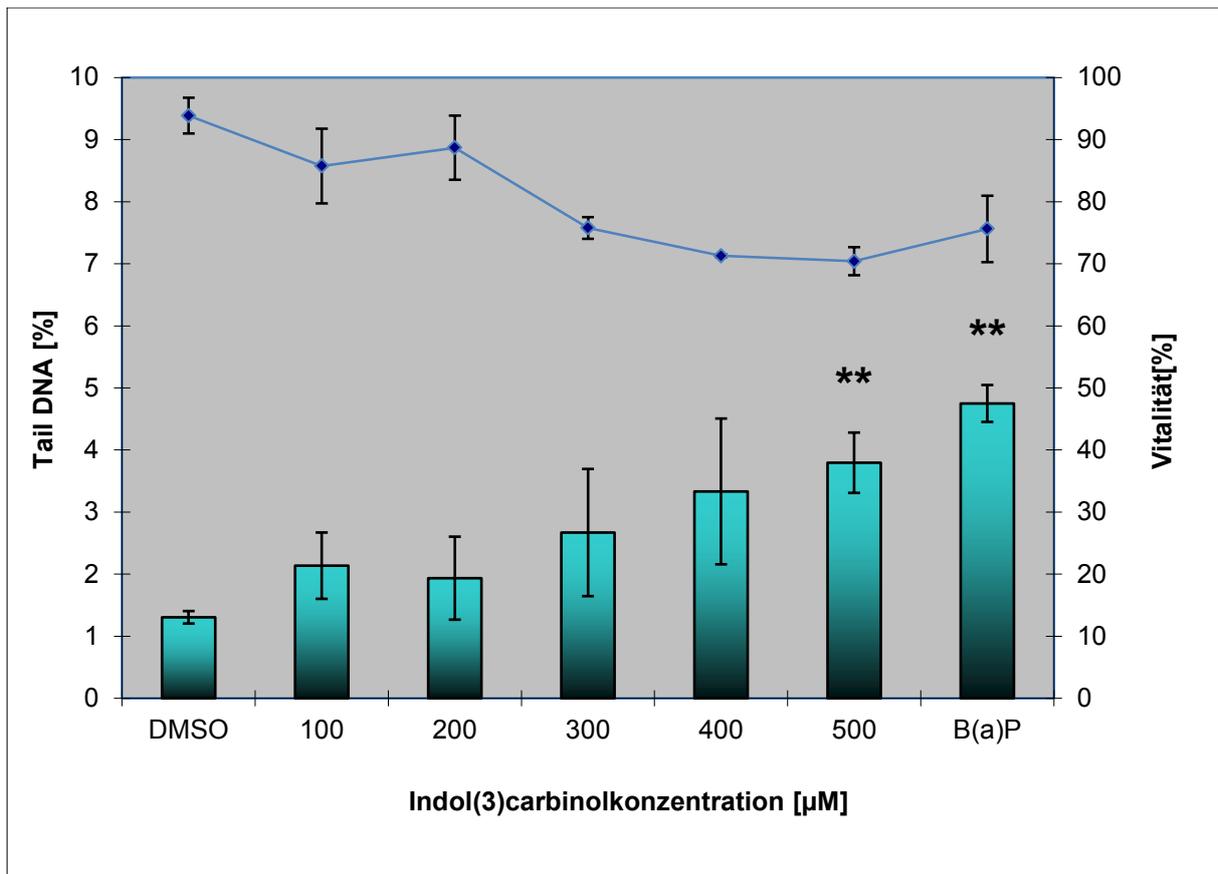


Abb. 11:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 100 μM - 500 μM exponiert und anschließend in der SCGE analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50μM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

3.2.5 Verminderung der DNA-Migration durch Erysolin

In einer zweiten Versuchsreihe wurden nun die HepG2 –Zellen für 24 Stunden zuerst mit Erysolin, nach einem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden mit Benzo(a)pyren 50μM behandelt und anschließend im Cometassay untersucht.

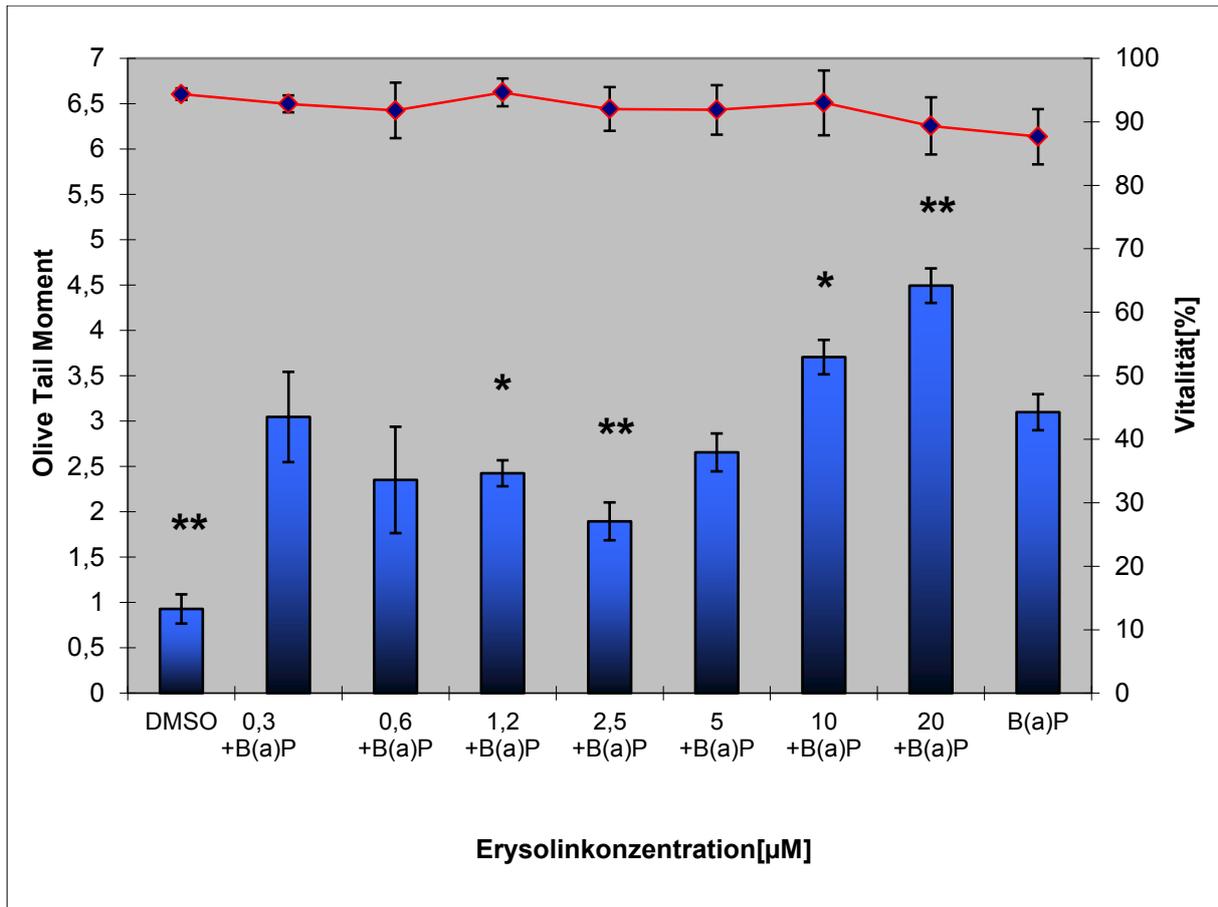


Abb. 12:

Effekt von Erysolin auf die B(a)P-induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 0,3 µM – 20 µM und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50µM exponiert. Danach erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Wie in Abb. 10 zu sehen, kam es bei einer Konzentration von 1,25 µM Erysolin zu einer signifikanten bei 2,5 µM Erysolin zu einer hochsignifikanten Verminderung des OTM von 22% bzw. 40% im Vergleich zu B(a)P. In höheren Konzentrationen von 10 µM und 20 µM wurde dagegen eine mit 20% bzw. 45% im signifikanten bzw. hochsignifikanten Bereich liegende Erhöhung des OTM über B(a)P-Niveau beobachtet. Die Zellvitalität lag bei dieser Versuchsreihe stets über 80%.

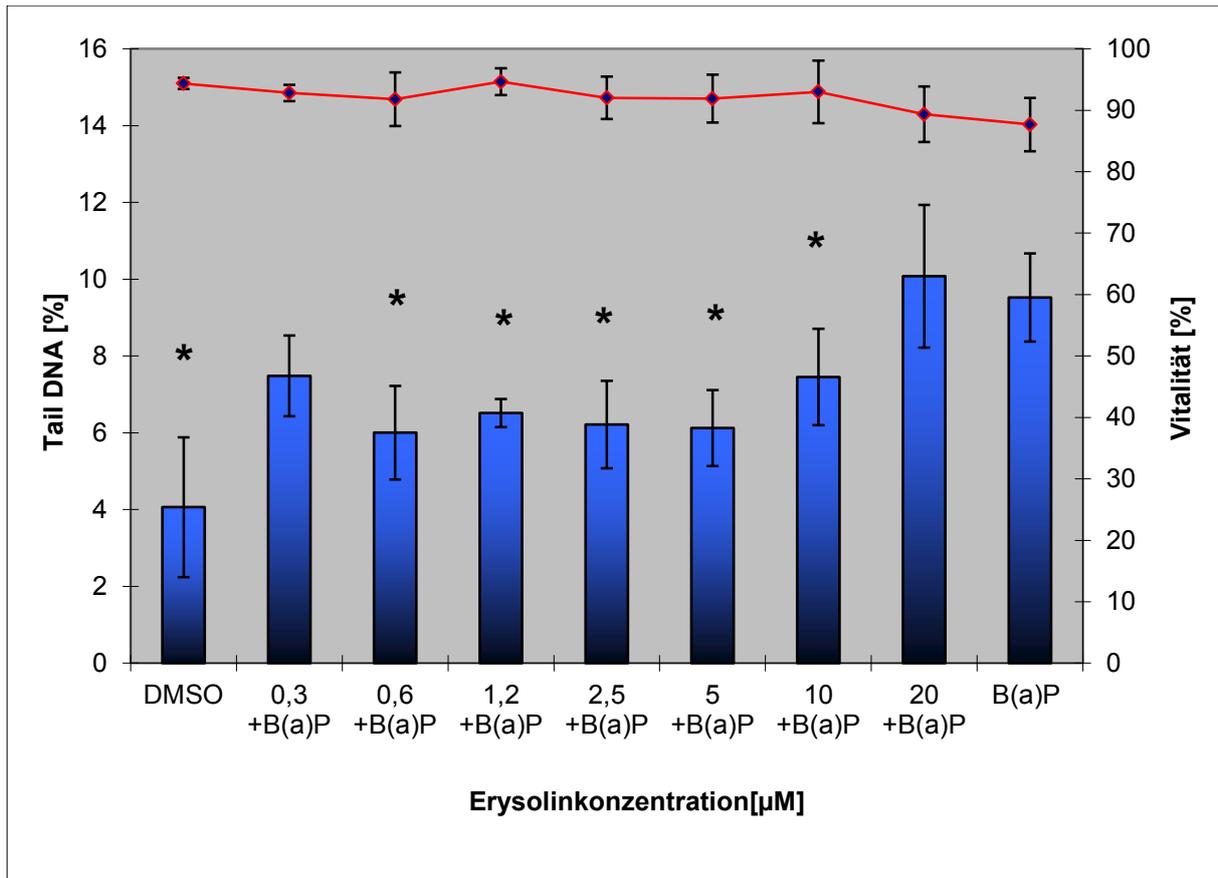


Abb. 13:

Effekt von Erysolin auf die B(a)P induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 0,3 µM - 20 µM und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 µM exponiert. Anschließend erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Tail DNA-Bestimmung, so war hier bereits ab einer Konzentration von 0,6 µM eine signifikante Reduktion der DNA im Kometenschweif von 37% im Vergleich zu B(a)P festzustellen. Bei 1,2µM Erysolinkonzentration sah man eine Verminderung der Tail-DNA[%] von 32% bei 2,5µM war der Anteil der Tail-DNA[%] um 35% niedriger als bei der Positivkontrolle. Dieser Effekt wurde hier bis zu einer Konzentration von 5µM Erysolin (36%-ige Verminderung der Tail-DNA[%]) beobachtet. Eine signifikante Erhöhung der DNA-Migration wie sie bei den Messungen des OTM bei Konzentrationen von ≥ 10 µM zu sehen waren, konnte hier nicht beobachtet werden(vgl. Abb. 10).

3.2.6 Verminderung der DNA-Migration durch Brassinin

Analog zu den Erysolintestungen wurden die HepG2-zellen vor B(a)P-exposition für 24 Stunden mit Brassinin inkubiert und nach anschließendem Mediumwechsel für weitere 24 Stunden gegenüber B(a)P exponiert.

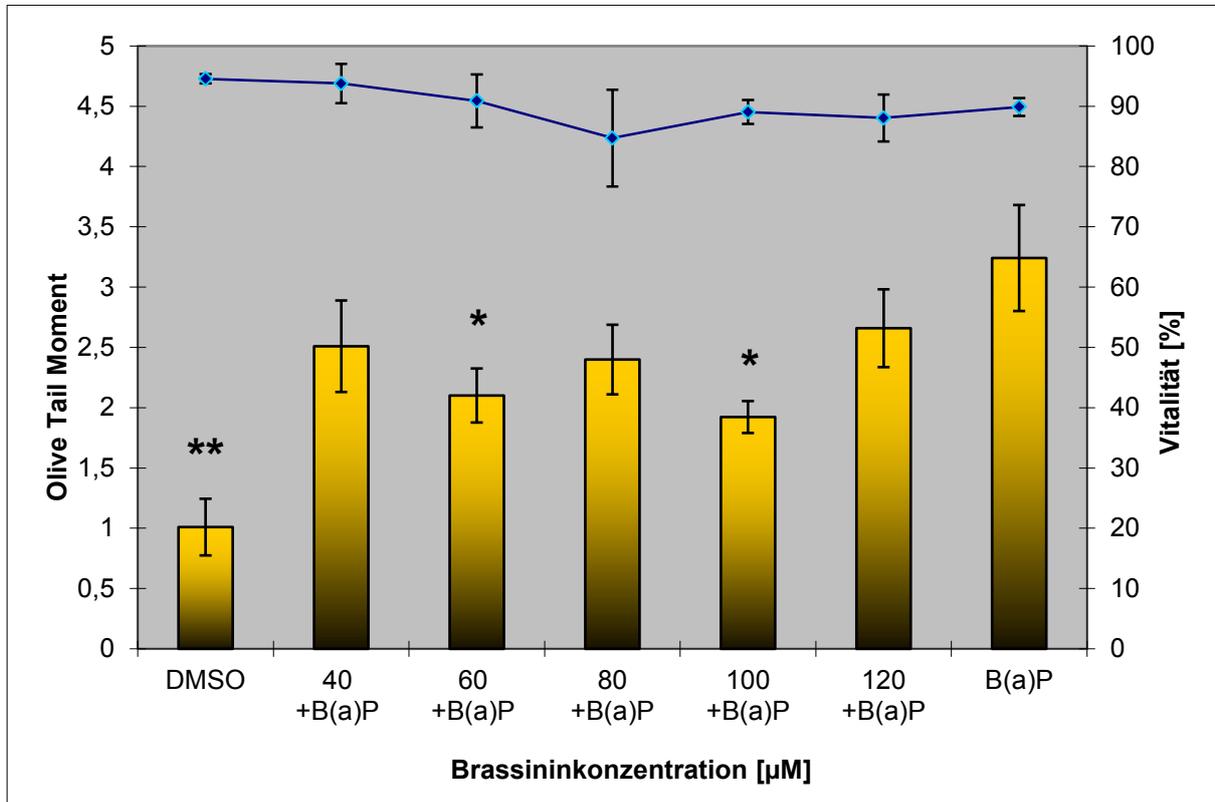


Abb. 14:

Effekt von Brassinin auf die B(a)P-induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Brassinin in einem Konzentrationsbereich von 40 µM – 120 µM exponiert und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50µM exponiert. Danach erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Wie in Abb. 12 dargestellt, wurden bei der Untersuchung des OTM mit 35% und 40% gegenüber B(a)P, signifikante Verminderungen des OTM bei Konzentrationen von 60 µM und 100 µM Brassinin beobachtet. Eine Dosis-Wirkungsbeziehung konnte im getesteten Konzentrationsbereich nicht festgestellt werden.

Zum Ausschluss eines Verdünnungsfehlers bei der Herstellung der einzelnen Brassininlösungen, wurde die Versuchsreihe mit drei unabhängig voneinander hergestellten

Verdünnungsreihen durchgeführt. Dabei zeigte sich in allen Versuchen ein ähnliches Bild wie oben in Abb. 12 zu sehen ist (Daten nicht gezeigt).

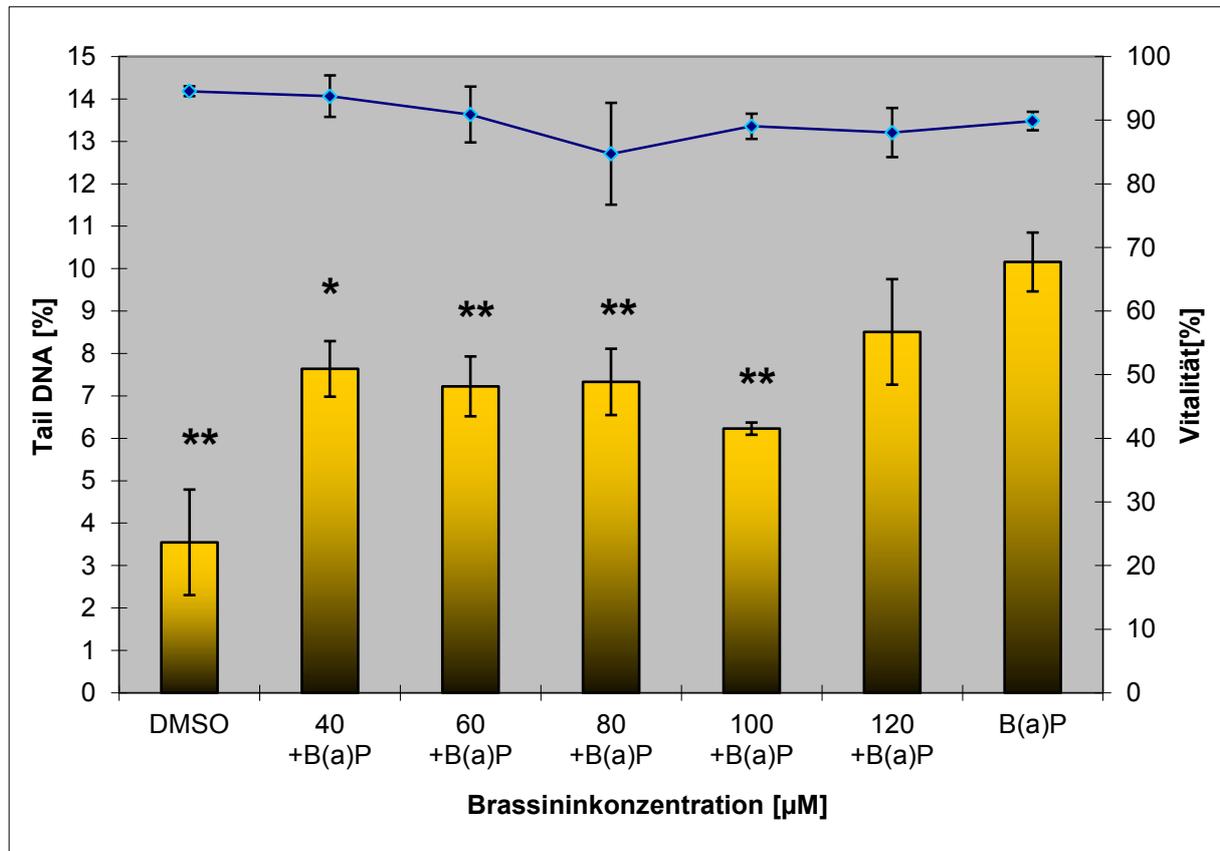


Abb. 15:

Effekt von Brassinin auf die B(a)P induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Brassinin in einem Konzentrationsbereich von 40 μM - 120 μM und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 μM exponiert. Anschließend erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) \pm die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50 μM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Durch Vorbehandlung der HepG2-zellen mit Brassinin in Konzentrationen von 60 μM bis 100 μM kam es zu einer hochsignifikanten Verminderung des Tail DNA-Gehaltes kam. Diese hatte ihre maximale Ausprägung bei 100 μM mit 40 % im Vergleich zur Positivkontrolle Ein signifikanter Effekt ist bereits ab einer Konzentration von 40 μM mit einer Tail-DNA-Reduktion von 25% zu erkennen. Eine eindeutige Dosiswirkungsbeziehung zeigte sich jedoch auch hier nicht.

3.2.7 Verminderung der DNA-Migration durch Indol(3)carbinol

Auch hier wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Hep G2-Zellen zuerst für 24 h mit Indol(3)carbinol vorbehandelt und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 µM exponiert.

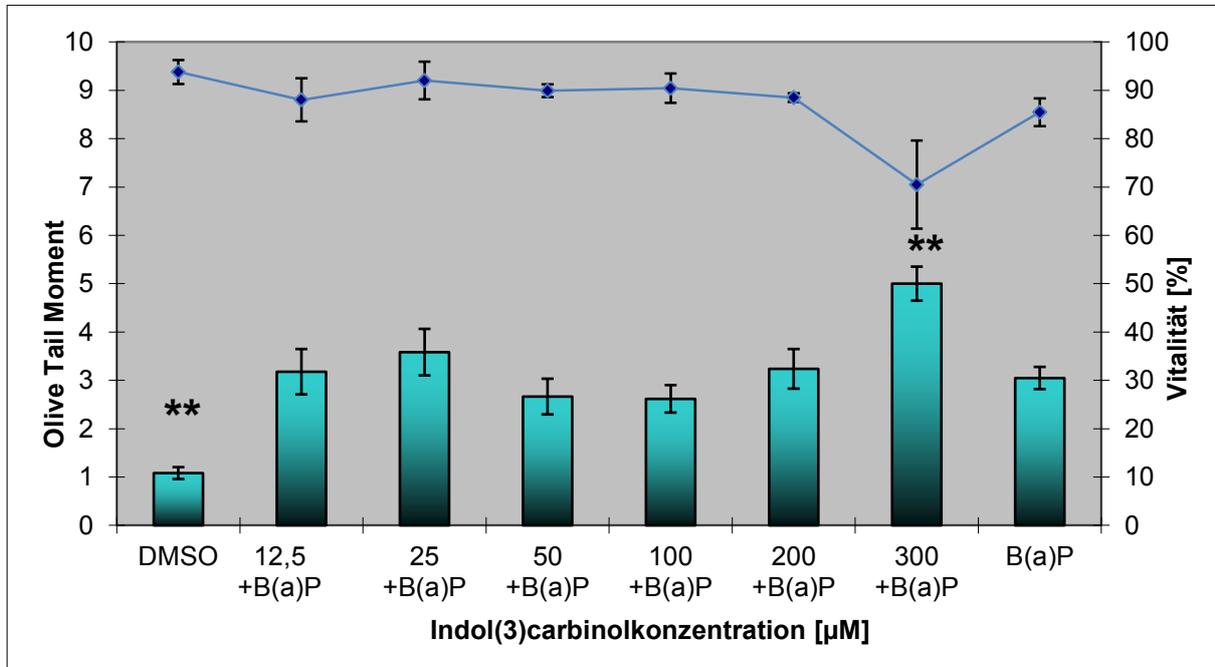


Abb. 16:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die B(a)P-induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 12,5 µM – 300 µM exponiert und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50µM exponiert. Danach erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert des Olive Tail Moment (OTM) ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50 µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

Bei der Betrachtung der Daten der OTM-Auswertung ließ sich keine Dosis abhängige Reduktion des OTM erkennen. Auffällig war hingegen ein hochsignifikanter Anstieg des OTM von 65% über B(a)P-niveau bei Co-Exposition gegenüber 300 µM I3C und B(a)P 50 µM. Allerdings ist hier auch ein deutlicher Abfall der Zellvitalität zu erkennen (s. Abb. 14).

Schaut man sich die Daten in Bezug auf den Anteil der Tail-DNA[%] an, zeigt sich ein ähnliches Bild. Auch hier ist keine Dosisabhängigkeit zu erkennen. Ähnlich wie beim OTM zeigt sich auch hier ein signifikanter Anstieg der Tail-DNA bei 300 µM Indol(3)carbinol plus B(a)P welcher 30% über B(a)P-niveau liegt.

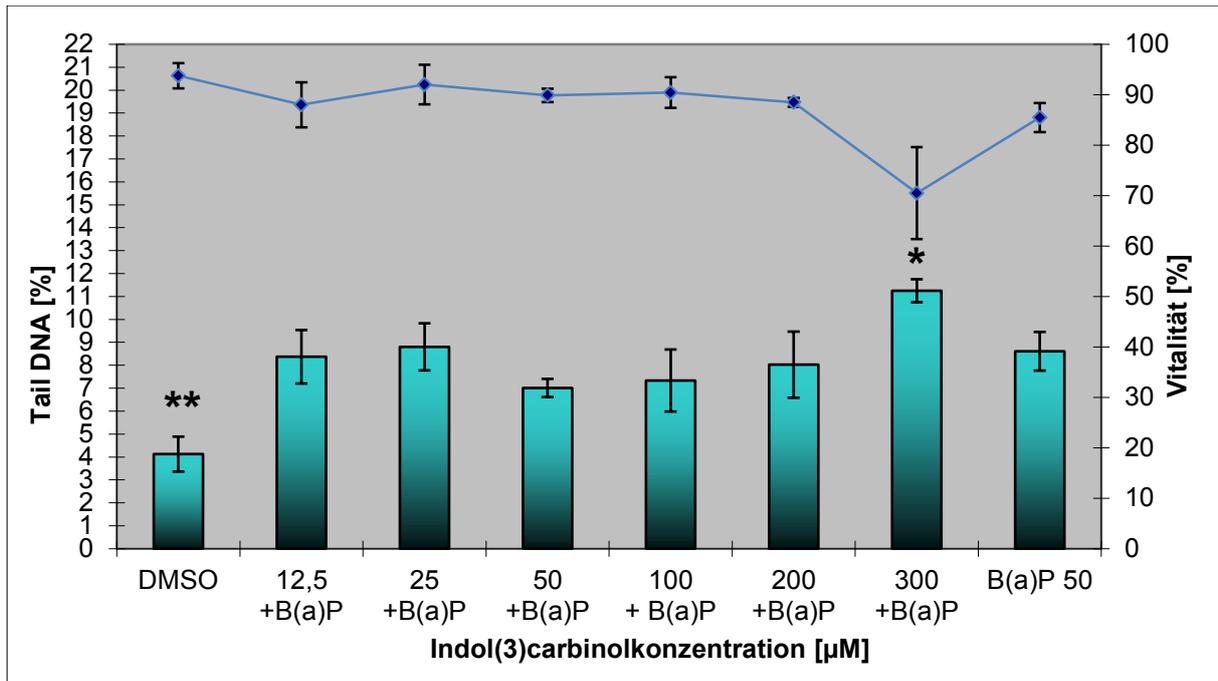


Abb. 17:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die B(a)P induzierte DNA-Migration in HepG2-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 12,5 µM - 300 µM und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 µM exponiert. Anschließend erfolgte die Analyse in der SCGE. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Tail DNA% (TD) ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle B(a)P 50 µM verwendet. Die dargestellte Linie repräsentiert die Zellvitalität.

3.3 Ergebnisse im Mikronukleustest

Im Mikronukleustest bestand jede Versuchsreihe aus Lösungsmittel-, Positivkontrolle(50 µM B(a)P) sowie den Konzentrationen der Testsubstanzen von 1,25 -20 µM Erysolin und 50 -300 µM Indol(3)carbinol. Jeder Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander mit je drei parallelen Ansätzen pro Substanz durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch das Auszählen von Mikrokernen in 1000 binukleären Zellen. Zur Detektion zytotoxischer oder mitogener Effekte der getesteten Substanzen wurde der Kernteilungsindex(NDI) nach Eastmond und Tucker (1989)bestimmt. Hierfür wurden 500 Zellen gezählt und die Häufigkeit von mono-, bi-, tri-, oder tetranukleären Zellen bestimmt.

Der NDI berechnet sich wie folgt:

$$NDI=(1x(K1)+2x(K2)+3x(K3)+4x(K4))/n$$

Dabei ist K die Kernzahl und n die Zellzahl (in diesem Fall n=500)

Ein Kernteilungsindex von $\geq 1,5$ steht dabei für keine relevante Zytotoxizität.

3.3.1 Induktion von Mikrokernen durch Erysolin

Wie in Abb. 16 zu erkennen ist kam es nach 24-stündiger Exposition mit Erysolin 10 μM - 30 μM zu einem hochsignifikanten Anstieg der Mikrokernfrequenz gegenüber DMSO exponierten HepG2-Zellen.

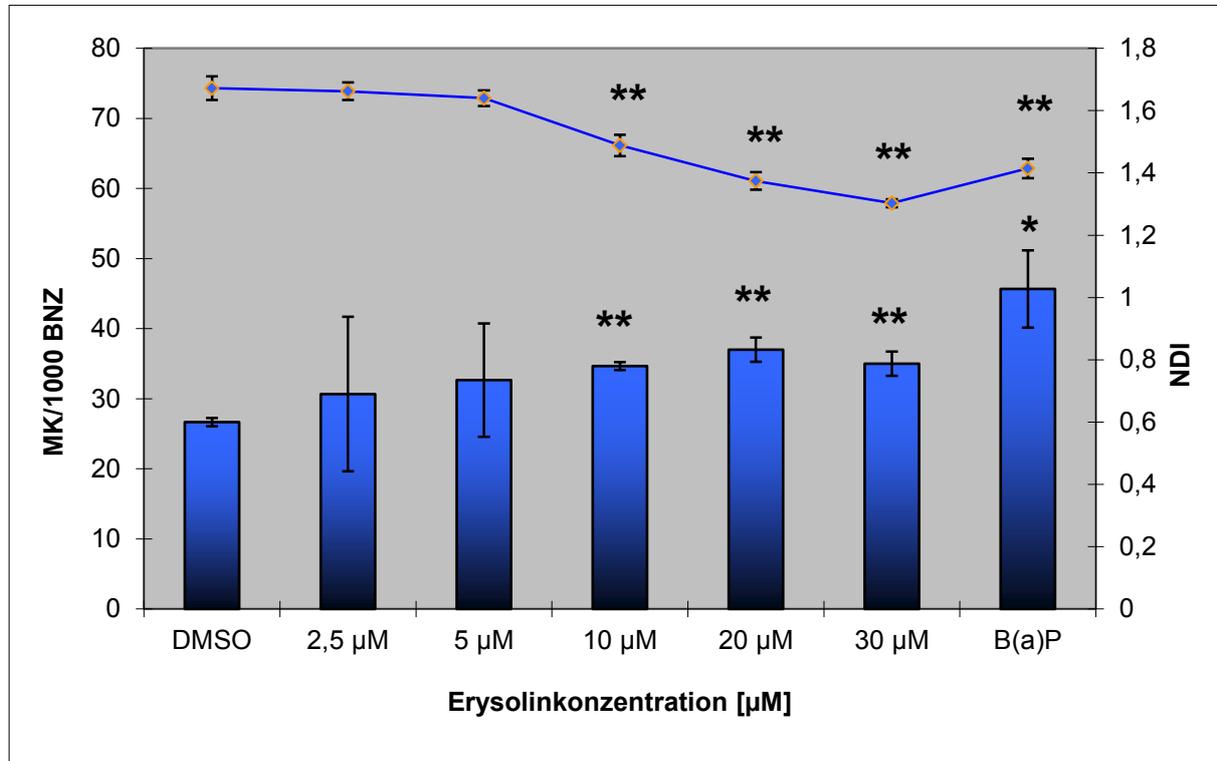


Abb. 18:

Effekt von Erysolin auf die Mikrokernfrequenz/1000 BNZ. Die HepG2-Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 2,5 μM - 30 μM exponiert. Nach Behandlung mit Cytochalasin B für weitere 24 h erfolgte die Bestimmung der Mikrokernfrequenz in 1000 BNZ bei 1000 facher Vergrößerung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Mikrokernfrequenz/1000 BNZ \pm die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO, als Positivkontrolle B(a)P 50 μM verwendet. Die Linie repräsentiert den Kernteilungsindex (NDI).

Mit 35 lag die MK-frequenz hier um 30 % höher als bei DMSO-exponierten Zellen. Diese Frequenz stieg mit steigender Erysolinkonzentration an und erreichte mit 37 \pm 1,73 MK/1000BNZ bei 20 μM Erysolinlösung ihr Maximum, was einem Anstieg um 37% entspricht. Die MK-frequenz von B(a)P 50 μM exponierten Zellen lag bei 45,67 \pm 5,51. Allerdings führte die Zellexposition gegenüber Erysolin in einer Konzentration ≥ 10 μM zu einer hochsignifikanten Reduktion des NDI unter 1,5, welcher ebenfalls mit steigender

Erysolinkonzentration zunahm, so dass hier zytotoxische Effekte nicht ausgeschlossen werden können.

3.3.2 Induktion von Mikrokernen durch Indol(3)carbinol

Analog zur Exposition mit Erysolin wurden die HepG2-Zellen in einer weiteren Versuchsreihe mit Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 100 μ M -400 μ M für 24 Stunden exponiert und anschließend die MK-frequenz/1000 BNZ sowie der NDI bestimmt.

Hier zeigte sich ab einer Konzentration von 100 μ M ein hochsignifikanter Anstieg der MK-frequenz/1000 BNZ, welche mit 54 ± 3 MK/1000 BNZ mehr als doppelt so hoch wie die der Lösungsmittelkontrolle DMSO war.

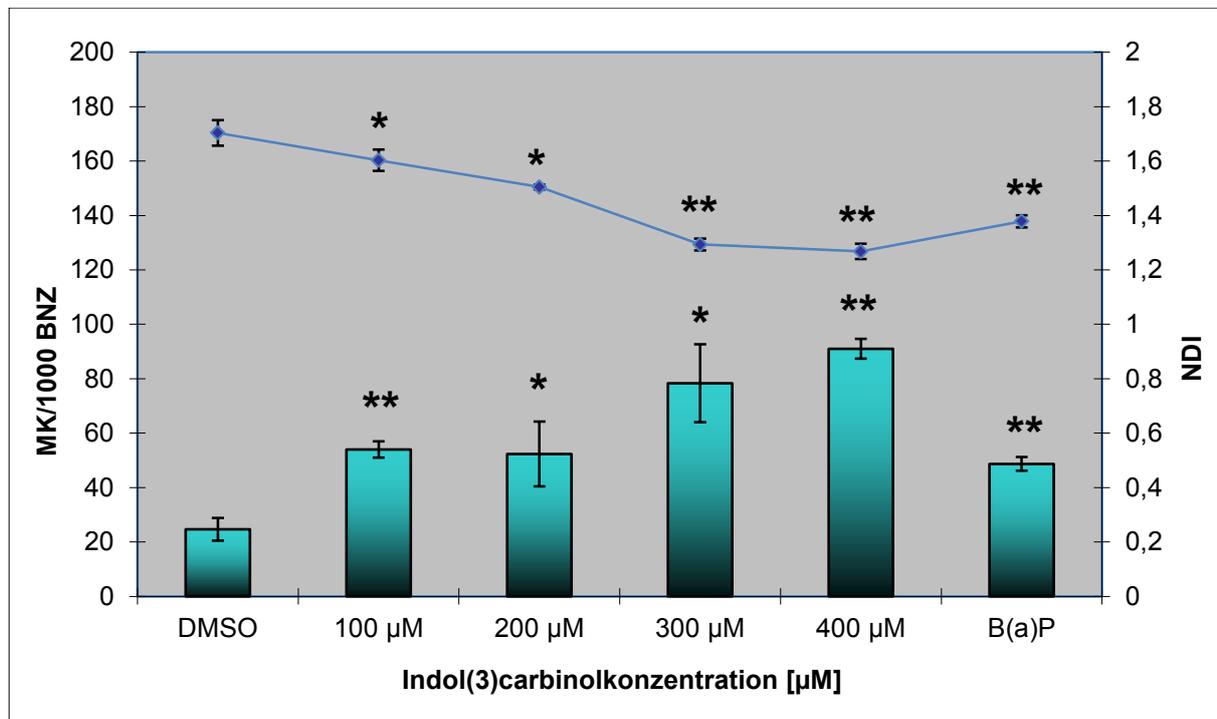


Abb. 19:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die Mikrokernfrequenz/1000 BNZ. Die HepG-Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 100 μ M - 400 μ M exponiert. Nach Behandlung mit Cytochalasin B für weitere 24 h erfolgte die Bestimmung der Mikrokernfrequenz in 1000 BNZ bei 1000 facher Vergrößerung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Mikrokernfrequenz/1000 BNZ \pm die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n= 3, * $p\leq 0,05$ ** $p\leq 0,01$). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO, als Positivkontrolle B(a)P 50 μ M verwendet. Die Linie repräsentiert den Kernteilungsindex (NDI).

Dieser Effekt nahm konzentrationsabhängig zu und erreichte bei einer Konzentration von 400µM sein Maximum. Hier wurde mit 91±4 MK/1000 BNZ ein Anstieg der MK-frequenz um 264% gegenüber der Lösungsmittelkontrolle beobachtet.

Wie in Abb. 17 dargestellt kam es bei dieser Versuchsreihe mit steigender Indol(3)carbinolkonzentration zu einer hochsignifikanten Suppression des Kernteilungsindex, welcher mit 1,29±0,02 bei 300 µM bzw. 1,26±0,03 bei 400µM Lösung deutlich unter 1,5 lag, womit zytotoxische Effekte nicht sicher ausgeschlossen werden können.

3.3.3 Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Erysolin

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die HepG2-Zellen für 24 Stunden gegenüber Erysolin in einer Konzentration von 1,25 µM – 20 µM vorbehandelt und anschließend nach Mediumwechsel für weitere 24 Stunden gegenüber 50 µM B(a)P-Lösung exponiert. Danach wurde die MK-Frequenz gegenüber B(a)P-exponierter Zellen mittels T-Test nach Student verglichen.

Hier zeigte sich eine konzentrationsabhängige Reduktion der MK-frequenz in 1000 binukleären Zellen, welche bei einer Konzentration von 2,5 µM ihren maximalen Effekt zeigte(vgl. Abb. 18). Mit einer MK-frequenz von 24±4 wurden Werte erzielt, die nur minimal über denen der mit DMSO behandelten Zellen(23±4) lagen. Dies entspricht einer Reduktion der Mikrokernbildung in binukleären Zellen auf mehr als die Hälfte(53%) gegenüber B(a)P. Mit steigender Erysolinkonzentration nahm der Effekt ab. Eine signifikante Reduktion der MK-frequenz war bis zu einer Erysolinkonzentration von 10µM nachweisbar. Mit 40,33±MK/1000 BNZ waren im Durchschnitt 10 MK weniger als in der Referenzgruppe mit B(a)P 50µM induziert worden(50,67±3,06) was einer Reduktion von 20% entspricht.

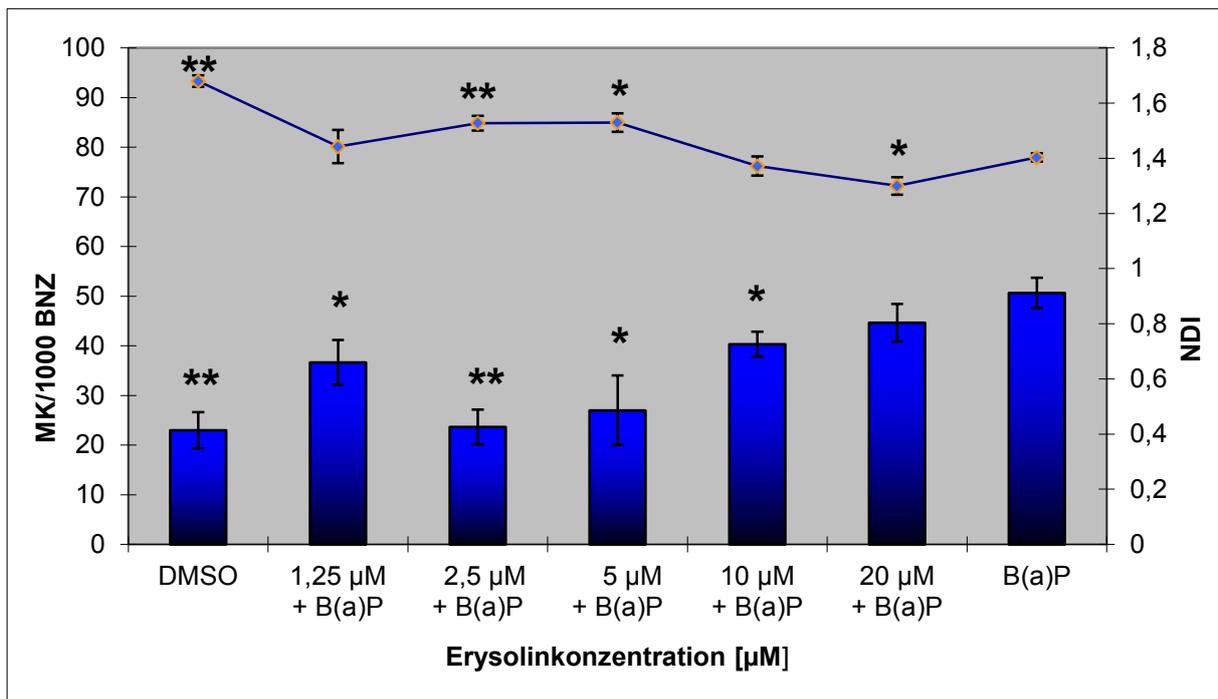


Abb. 20:

Effekt von Erysolin auf die B(a)P-induzierte Mikrokernbildung/1000 BNZ. Die HepG2-Zellen wurden für 24 h gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 2,5 µM-30 µM und anschließend für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 µM exponiert. Nach Behandlung mit Cytochalasin B für weitere 24 h erfolgte die Bestimmung der Mikrokernfrequenz in 1000 BNZ bei 1000 facher Vergrößerung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Mikrokernfrequenz/1000 BNZ ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO, als Positivkontrolle B(a)P 50 µM verwendet. Die Linie repräsentiert den Kernteilungsindex (NDI).

Wie in Abb. 18 zu erkennen kam es mit steigender Erysolinkonzentration auch zu einer Suppression des Kernteilungsindex unter 1,5 welcher bei 20µM Erysolinkonzentration mit 1,3 ±0,03 sogar unter B(a)P-niveau (1,4±0,01)lag.

3.3.4 Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Indol(3)carbinol

Analog zu den Erysolintestungen wurden die HepG2-Zellen in einer weiteren Versuchsreihe auch zuerst mit Indol(3)carbinol behandelt(24h) und nach Mediumwechsel mit 50 µM B(a)P für weitere 24 Stunden exponiert. Anschließend wurden auch hier NDI und MK-Frequenz in 1000 binukleären Zellen bestimmt.

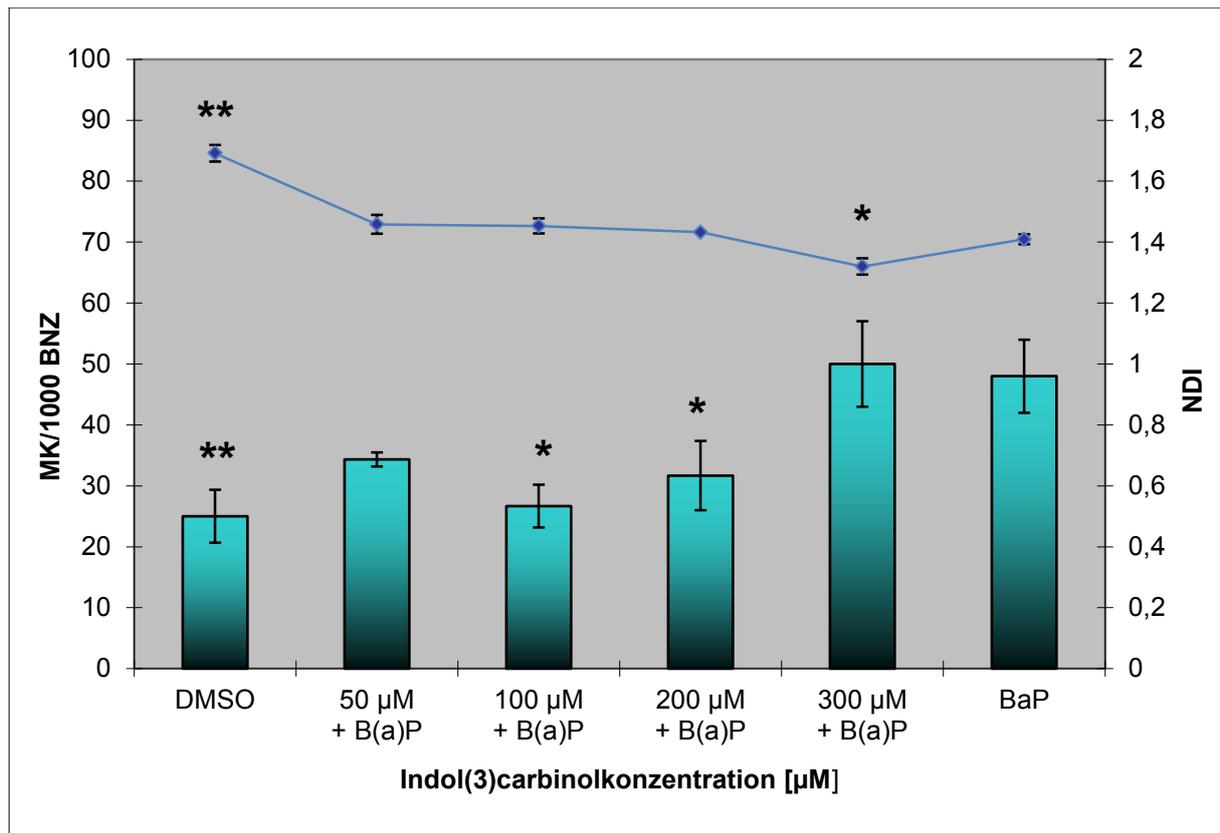


Abb. 21:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die B(a)P-induzierte Mikrokernbildung/1000 BNZ. Die HepG-Zellen wurden für 24 h gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 100 µM - 400 µM exponiert. Nach Behandlung mit Cytochalasin B für weitere 24 h erfolgte die Bestimmung der Mikrokernfrequenz in 1000 BNZ bei 1000 facher Vergrößerung. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Mikrokernfrequenz/1000 BNZ ± die Standardabweichung gegenüber der Positivkontrolle (n= 3, *p≤0,05 ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO, als Positivkontrolle B(a)P 50 µM verwendet. Die Linie repräsentiert den Kernteilungsindex (NDI).

Bei einer Konzentration von 100 µM Indol(3)carbinol ließ sich hier eine signifikante Reduktion der MK-frequenz gegenüber B(a)P-exponierten Zellen nachweisen. Mit 27±4 MK/1000 BNZ wurde die MK-Bildung auf fast die Hälfte(44%) gegenüber B(a)P (48±6) reduziert. Mit steigender Konzentration nahm der Effekt wieder ab, bei 300 µM Lösung lag die MK-frequenz sogar leicht jedoch nicht signifikant über B(a)P-niveau(4,2%). Außerdem war auch hier mit steigender Indolkonzentration eine Suppression des NDI zu beobachten. Diese erreichte bei 300 µM-Lösung ihr Maximum und lag mit einem Kernteilungsindex von 1,32±0,03 unter B(a)P-niveau(1,41±0,02).

3.4 Ergebnisse im WST-1-Assay

In dieser Versuchsreihe wurde mittels Absorptionsmessung die Zellviabilität von HepG2-Zellen nach 24-stündiger Exposition gegenüber Erysolin und Indol(3)carbinol untersucht. Ziel waren weitere Erkenntnisse bezüglich der zytotoxischen Eigenschaften der verwendeten Isothiocyanate. Werte < 70% gelten als zytotoxisch.

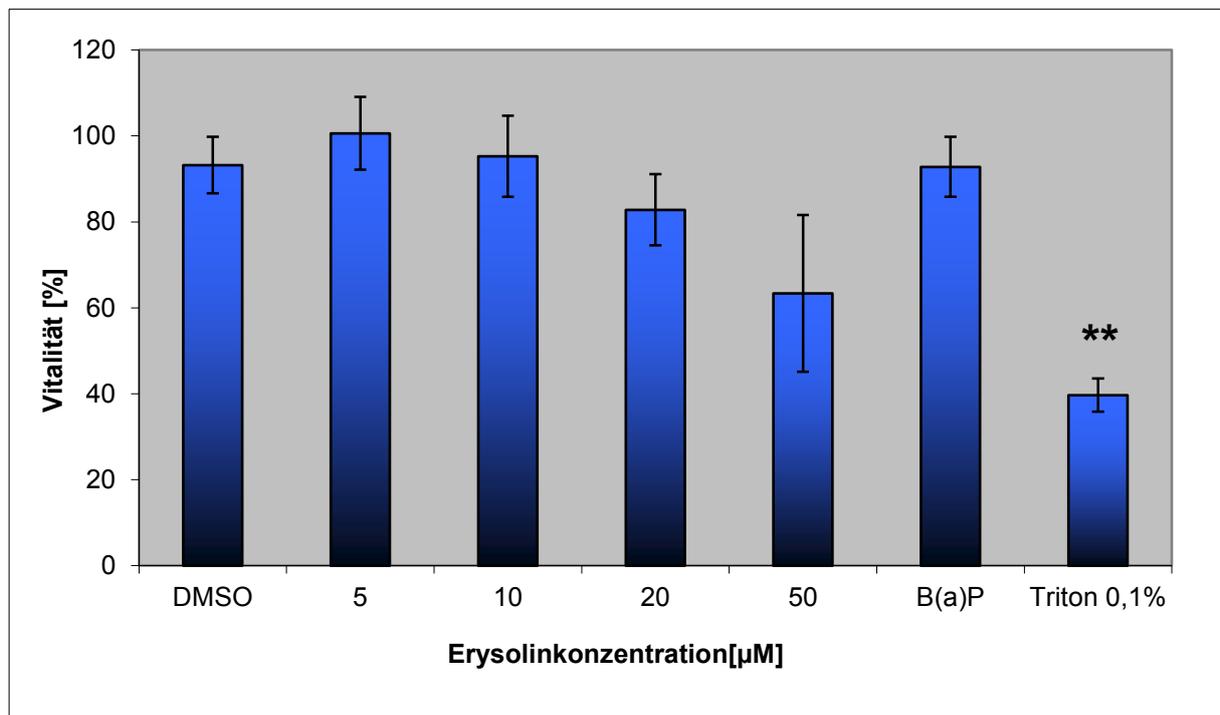


Abb. 22:

Effekt von Erysolin auf die Vitalität von HepG2-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 5 µM – 50 µM für 24 h exponiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit WST-1-Reagenz inkubiert und im ELISA-Reader analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Zellvitalität ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n=3, * p≤0,05, ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle Triton X-100 0,1% verwendet.

Wie in Abb. 20 dargestellt kommt es bei einer Konzentration von 50 µM Erysolin zu einer deutlichen Reduktion der relativen Zellviabilität von 32,1% im Vergleich zu DMSO. Dieser Wert liegt jedoch nicht im signifikanten Bereich.

Ein ähnliches Bild ergab die Absorptionsmessung nach Inkubation der HepG2-Zellen mit Indol(3)carbinol. Auch hier wurde eine Abnahme der Zellviabilität mit steigender I3C-Konzentration beobachtet (maximal 32% bei 500 µM I3C). Allerdings bestand auch hier wie keine Signifikanz gegenüber DMSO.

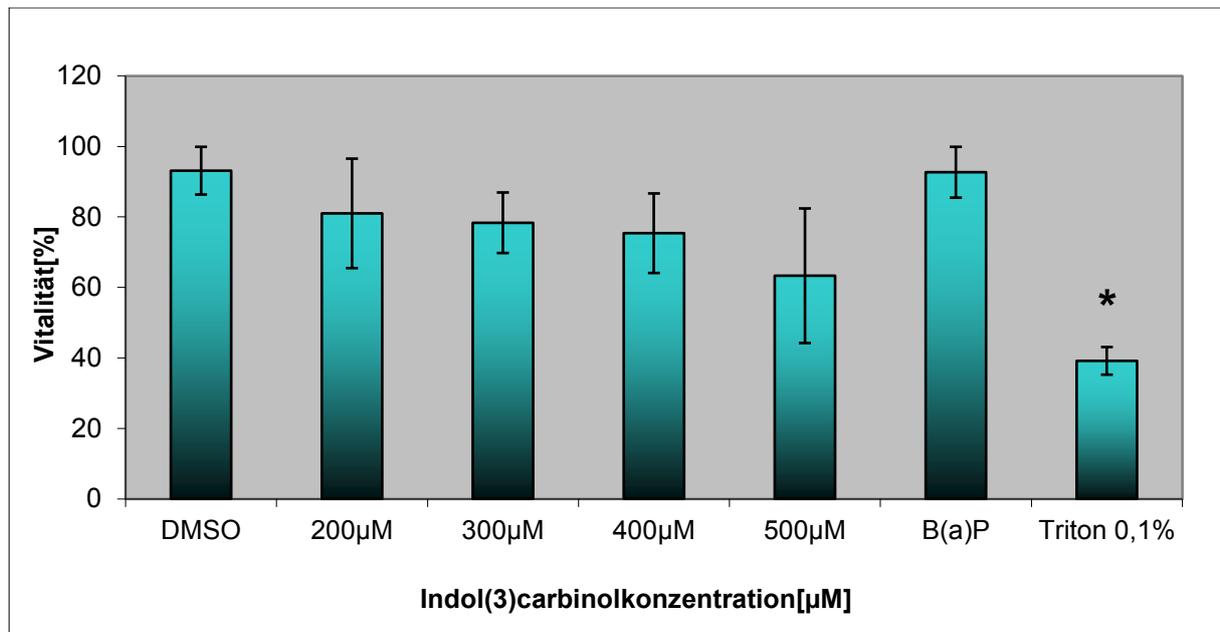


Abb. 23:

Effekt von Indol(3)carbinol auf die Vitalität von HepG2-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 200 µM – 500 µM für 24 h exponiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit WST-1-Reagenz inkubiert und im ELISA-Reader analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Zellvitalität ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n=3, * p≤0,05, ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle Triton X-100 0,1% verwendet.

Analog zu den bisherigen Versuchsreihen erfolgte auch hier in einem zweiten Versuchsansatz zunächst die 24-stündige Exposition gegenüber Erysolin bzw. I3C. Nach Waschen und Mediumwechsel (vgl. Kapitel 2.2.1.2) erfolgte danach die Exposition gegenüber B(a)P für weitere 24 h. Anschließend Exposition mit WST-1-Reagenz (s.o.) und Auswertung im Tecan-Reader. In Abb. 21 zeigt sich bereits bei einer Erysolinkonzentration von 10 µM eine signifikante Abnahme der Vitalität von 21,74% im Vergleich zu DMSO.

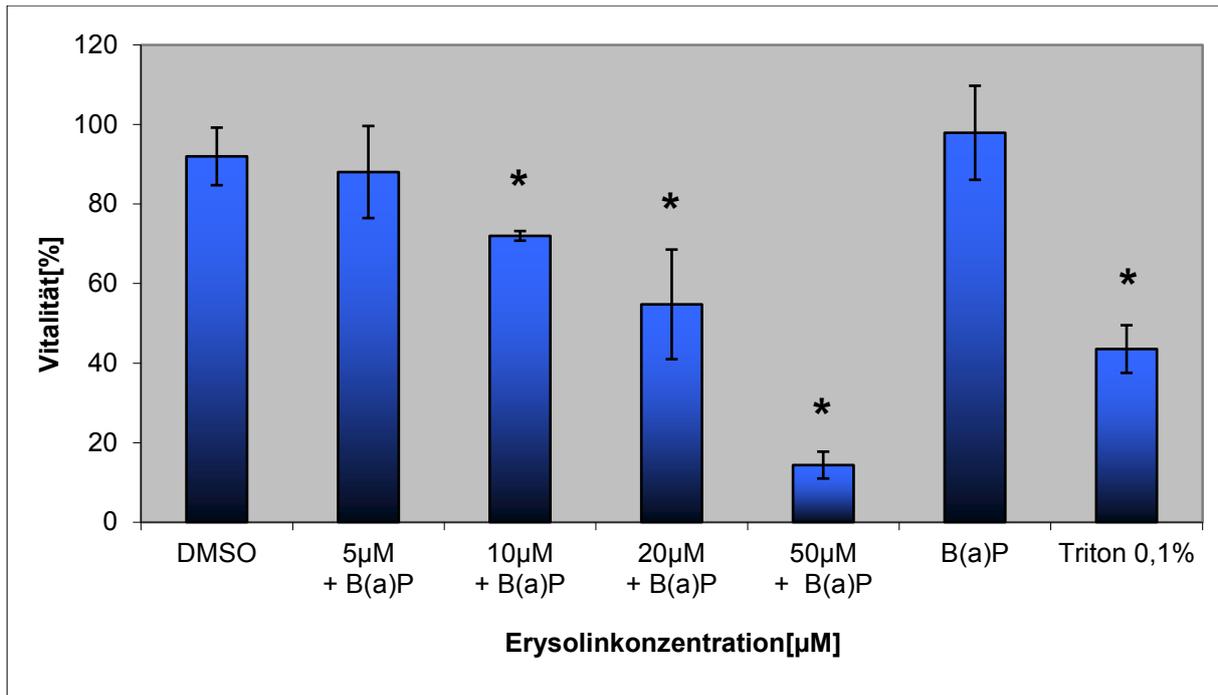


Abb. 24:

Effekt von kombinierter Erysolin- und B(a)P-Exposition auf die Vitalität von HepG2-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Erysolin in einem Konzentrationsbereich von 5 µM – 50 µM für 24 h und danach für weitere 24 h gegenüber B(a)P 50 µM exponiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit WST-1-Reagenz inkubiert und im ELISA-Reader analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Zellvitalität ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n=3, * p<0,05, ** p<0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle Triton X-100 0,1% verwendet.

Mit 14,35% betrug die Vitalität der HepG2-Zellen nach Co-Exposition gegenüber Erysolin und B(a)P nur noch ein Drittel der Vitalität der Positivkontrolle Triton-X-100. Das entspricht einer Vitalitätsreduktion von 84% im Vergleich zur Referenzsubstanz DMSO. Zellen die nur mit B(a)P 50 µM behandelt wurden zeigten dagegen eine normale Zellvitalität welche mit im Mittel 97,89 sogar minimal über DMSO-Niveau lag.

Bei den Testungen mit I3C und B(a)P zeigte sich ein ähnliches Bild wie in der zuvor durchgeführten Erysolintestreihe. Hier war der Effekt noch deutlicher. Bereits ab einer Konzentration von 200 µM zeigte sich eine signifikante Reduktion der Zellvitalität auf mehr als die Hälfte des DMSO-Referenzwertes. Mit steigender I3C-konzentration nah dieser Effekt zu und erreichte schließlich bei einer Konzentration von 500 µM sein Maximum.

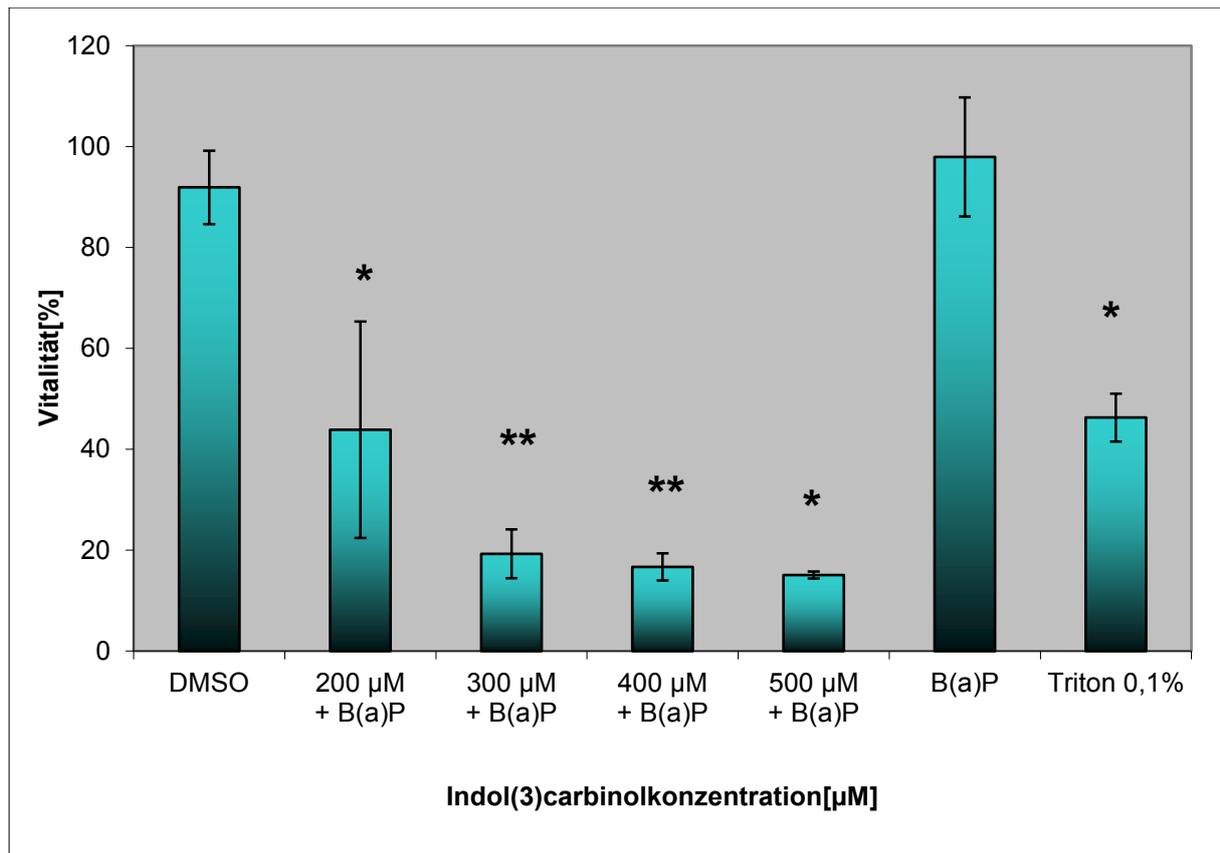


Abb. 25:

Effekt von kombinierter Indol(3)carbinol- und B(a)P-Exposition auf die Vitalität von HepG2-Zellen. Die Zellen wurden gegenüber Indol(3)carbinol in einem Konzentrationsbereich von 200 µM – 500 µM für 24 h und danach für weitere 24 h gegenüber B(a)P exponiert. Anschließend wurden die Zellen für 1 h mit WST-1-Reagenz inkubiert und im ELISA-Reader analysiert. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der Zellvitalität ± die Standardabweichung gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (n=3, * p≤0,05, ** p≤0,01). Als Lösungsmittelkontrolle wurde DMSO als Positivkontrolle Triton X-100 0,1% verwendet.

Mit 15,08% lag die Vitalität nur noch bei etwa einem Drittel des Wertes der Positivkontrolle Triton X-100. Durch Co-Exposition gegenüber I3C und B(a)P kam es hier zu einem Vitalitätsverlust von 76,86 % gegenüber DMSO was einer 1,7-fach stärkeren Reduktion der Zellvitalität gegenüber der Positivkontrolle entspricht. Wie bei der Erysolintestreihe war auch hier zu beobachten, dass die Vitalitätswerte der nur mit B(a)P exponierten HepG2-Zellen mit 97,95% leicht über DMSO-niveau lagen.

4.Diskussion

Indole und Isothiocyanate sind aufgrund ihres in zahlreichen Studien bewiesenen chemopräventiven d.h. antigentoxischen[3, 4, 75] sowie antikanzerogenen[2, 4, 73] Potentials seit Jahren im Focus der Wissenschaft. Die durch Hydrolyse aus den Glucosinolaten hervorgehenden ITC bzw. Indole sind vor allem in Vertretern der Brassicaceae, enthalten[56-58]. Durch den in diversen in-vitro- und in-vivo- Studien nachgewiesenen hemmenden Einfluss auf die Krebsentstehung, haben diese sekundäre Pflanzenstoffe zunehmend an Popularität gewonnen[2,56-59]. Allerdings zeigten ITC und Indole in einigen Studien auch gentoxisches[6,59], kokarzinogenes[60-62], oder sogar karzinogenes Potential[60, 63, 64]. Aufgrund dieser ambivalenten Eigenschaften, welche in Abhängigkeit von verwendetem Zelltyp oder Dosierung unterschiedlich zur Ausprägung kommen, werden Isothiocyanate und Indole auch zur Gruppe der Substanzen mit Janus-Eigenschaften gezählt[59, 65-69].

Das ehemalige Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen hat sich in der Vergangenheit in zahlreichen Studien mit dem gentoxischen bzw. antigentoxischen Eigenschaften von Indolen und ITCs vorkommend in Vertretern der Brassica-Familie beschäftigt[59, 70-73]. In einer vorangehenden Studie wurde insbesondere der Pflanzensaft von *Eruca sativa*(Rucola) untersucht. Dabei konnte auch hier eine signifikante Reduktion der DNA-Migration in der SCGE (Cometassay) nachgewiesen werden[70].

Ziel dieser Arbeit war es das in Rucolasaft vorkommende Indol(3)carbinol als Vertreter der Indole, das Isothiocyanat Erysolin, sowie Brassinin, dass Strukturmerkmale der beiden erstgenannten Substanzen in sich vereint, auf ihre gentoxischen, antigentoxischen sowie zytotoxischen Eigenschaften zu untersuchen.

Durchgeführt wurden die Testreihen an humanen HepG2-Zellen. Diese Zelllinie ist aufgrund ihrer Fähigkeit zur Expression zahlreicher Phase-I- und Phase-II-Enzyme des Fremdstoffmetabolismus als in-vitro- Testmodell besonders geeignet und hat sich in zahlreichen Studien zur Detektion von gentoxischen, zytotoxischen und antigentoxischer Effekten bewiesen[21, 35, 35, 45]. Als Testmodelle wurden Cometassay und Mikronukleustest zur Detektion der gentoxischen bzw. antigentoxischen Eigenschaften verwendet. Erythrosin-B- und WST-1-Assay dienten zur Evaluierung möglicher zytotoxischer Effekte. In der SCGE wurden die Parameter OTM und Tail-DNA[%] bestimmt. Hierbei handelt es sich um die beiden Parameter, welche am besten mit einer dosisabhängigen DNA-Schädigung korrelieren[74]. Dies spiegelte sich auch in den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wieder, wo beiden Parameter nahezu identische Ergebnisse lieferten. Obwohl der

OTM der komplexere und damit statistisch signifikantere Parameter ist, ist er stark von der verwendeten Analysesoftware und deren Berechnungsform abhängig. Die Bestimmung der Tail-DNA[%], gilt hier als objektiverer Parameter, der für eine bessere Vergleichbarkeit der erhobenen Daten verschiedener Studien sorgt[74].

4.1 Chemopräventive Eigenschaften von Erysolin

Erysolin das nach der hydrolytischen Spaltung aus Glucoerysolin entsteht, ist obwohl es sich hierbei um die am Schwefelatom 2-fach oxidierte Form des stark beforschten Sulforaphan handelt, bislang noch wenig untersucht[56, 75, 78]. Sulforaphan hat in zahlreichen Studien in unterschiedlichen Testmodellen sein chemopräventives Potential bewiesen. Daher ist es nicht unbedingt überraschend, dass auch Erysolin in den hier durchgeführten Versuchsreihen antigentoxische Eigenschaften gezeigt hat.

In der SCGE konnte die durch das Modellkanzerogen B(a)P induzierte DNA-Migration durch vorherige Inkubation mit Erysolin in einer Konzentration von 2,5 μM um 40 % reduziert werden. Bei den Mikrokernversuchsreihen, fiel der Effekt sogar noch deutlicher aus. Hier konnte eine dosisabhängige Reduktion der Mikrokernfrequenz von maximal 53 % gegenüber B(a)P erreicht werden. Erklären lassen sich diese Ergebnisse durch die verschiedenen Mechanismen über die ITC ihr chemopräventives Potential entfalten können. Ein Ansatzpunkt stellt die Inhibition von Phase I-Enzymen dar, über die Kanzerogene wie B(a)P in Ihre toxische Form überführt werden[2, 60, 75, 78]. Zu erwähnen ist in diesem Zusammenhang vor allem das Isoenzym CYP1A aus der Familie der Cytochrom-P450-Enzyme. In einer parallel durchgeführten Versuchsreihe des Instituts für Innenraum- und Umwelttoxikologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, wurden mittels Westerblot die Expression von CYP1A1 sowie mittels EROD-Assay die CYP1A-Aktivität untersucht. Hier zeigte sich eine um 23 % bzw. 50% reduzierte CYP1A Aktivität der mit 0,3 μM bzw. 5 μM Erysolin präexponierten HepG2-Zellen gegen über B(a)P vorbehandelten Zellen[76] Das dem Erysolin strukturverwandte und ebenfalls in Rucolasaft vorkommende Erucin konnte hier lediglich eine Reduktion der CYP1A-Aktivität von 25% erwirken, was insofern erstaunlich ist, da sich hiervon Aussagen über die Beziehung von Molekülstruktur und der Intensität der chemopräventiven Eigenschaften ableiten lassen. Dabei unterscheidet sich Erysolin von Erucin durch ein zweifach oxidiertes Schwefelatom, welches für den signifikanten Unterschied zwischen beiden ITCs in Bezug auf die Reduktion der CYP1A-Aktivität als ursächlich betrachtet werden kann. Diese Theorie spiegelt sich auch in den Untersuchungen von Zhang et al. 1992 wieder, der die antikarzinogenen Eigenschaften von Erucin, Erysolin

und Sulforaphan an Hepa1c1c7-Zellen sowie an weiblichen CD-1-Mäusen getestet hatte. Hier zeigten sich mit zunehmender Oxidationsstufe des Schwefelatoms ein Anstieg der Glutathion-S-transferasen- und Quinon-Reduktasen-Aktivität sowohl in den Hepa1c1c7-Zellen als auch in den Verschiedenen Organen der CD-1 Mäusen[57]. Beide Enzyme sind Vertreter der Phase-II-Enzyme, welchen eine Schlüsselrolle in der Detoxifikation prokarzinogener Substanzen wie B(a)P[4, 57, 60, 77] zugeschrieben wird. Demnach ist es nicht verwunderlich, dass in den Versuchen an HepG2-Zellen nach Exposition mit 2,5 μM MTBITC ein signifikanter Anstieg der GST-Aktivität nachgewiesen wurde[81].

Diese gesteigerte Expression von Phase II –Enzymen wie in diesem Falle GST, kommt über das Antioxidans Response Element(ARE) vermittelt[79]. Durch ITC induzierte Abspaltung des Keap1-Proteins vom Nuclear-factor-E2-related-factor2(Nrf2) welcher im Zytoplasma als inaktiver Komplex vorliegt[80], ist Nrf2 in der Lage in den Zellkern einzudringen und an das ARE zu binden was zu einer gesteigerten Transkription detoxifizierender Enzyme führt[79, 81].

Was in Zhangs Untersuchungen ebenfalls auffiel war, dass bei Erysolin im Vergleich zu seinen beiden Strukturanaloga Erucin und Sulforaphan ein deutlich geringere Dosis nötig war(5 μM Erysolin im Vergleich zu 15 μM Erucin und SFN), um eine Erhöhung der spezifischen Enzymaktivität zu erreichen, was Spekulationen auf zunehmendes chemoprotektives Potential mit steigender Oxidationsstufe des Schwefelatoms zulässt. Allerdings war unter Erysolinexposition auch eine erhöhte Mortalität bei den CD1-Mäusen zu beobachten[57].

In den Vitalitätsuntersuchungen mittels WST-1 zeigten sich bei einer Exposition gegenüber 10 μM Erysolin und anschließender B(a)P-Exposition eine 22%ige Vitalitätsreduktion gegenüber DMSO exponierten Zellen, welche mit steigender Erysolinkonzentration weiter zunahm. Da gentoxische Effekte aufgrund fehlenden Gentoxizitätsnachweises von Erysolin sowohl in der SCGE als auch im Mikrokern-Assay ausgeschlossen werden konnten, sind hier zytotoxische oder apoptotische Effekte wahrscheinlich. Dies spiegelt sich auch in den Mikrokern-Testreihen wieder, wo eine dosisabhängige hochsignifikante Abnahme des NDI ab einer Konzentration von 10 μM Erysolin zu sehen war. Ursächlich erscheinen hier am ehesten Zellzyklusarrest bzw. Apoptoseinduktion. Aufgrund fehlender Studiendaten bezüglich der Apoptoseinduktion durch Erysolin, muss hier die Erklärung über die eindeutig besser untersuchten Strukturanaloga Erucin und Sulforaphan erfolgen.

Keum et al. (2004) hatten berichtet, dass es durch den Abbau von intrazellulärem GSH, welcher durch die Exposition gegenüber 50 μM Sulforaphan verursacht wird, neben der

Induktion von Phase-II-Enzymen auch zur Aktivierung der c-junktionalen N-terminalen Kinase (JNK) und Caspase-3 in HepG2-Zellen kommt[78, 81] was zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate führte. Caspase-3 führt zur Spaltung des DNA-Reparaturenzyms Poly(ADP-Ribose)polymerase, ein Kennzeichen der späten Apoptose ist[56, 82]. Desweiteren existieren Aussagen von Fimognari und Hrelia über eine durch Sulforaphan induzierte, dosisabhängige Überexpression der proapoptotischen Proteine, z. B. Bax, in BALB/cMäusen[75] und in HepG2-Zellen[75, 84]. Yeh et al. berichten zudem über eine Suppression des antiapoptotischen BCl_{xL}-Proteins durch Sulforaphan [83]. Lamy et al. haben in einer 2009 durchgeführten Studie ebenfalls eine BCl_{xL}-Suppression nach 20 µM Erucinexposition in HepG2-Zellen beobachtet[72], so dass sich hiervon durchaus Aussagen zu möglichen Apoptosemechanismen von Erysoin ableiten lassen. Ein weiteres Ergebnis der von Lamy et al. durchgeführten Studie war die Überführung von 60 % der mit 20 µM MTBITC für 24 Stunden exponierten HepG2-zellen in den G2/M-Arrest, einhergehend mit der Reduktion der metabolischen Aktivität der HepG2-zellen als Zeichen beginnender Apoptose[72]. Begleitet wurde der G2/M-Arrest der mit MTBITC behandelten Zellen mit einem Anstieg des p53- Proteins, gefolgt von einem Anstieg des p21^{WAF1}- Proteinspiegels. p21^{WAF1} ist hauptsächlich für den G1-Arrest verantwortlich. Allerdings hatten Gartel und Radhakrishnan (2005) gezeigt, dass es auch die Proliferation in der G2/M-Phase hemmt[73,84]. Eine Induktion von G2/M-Arrest wurde auch bei mit Sulforaphan exponierten PC3-Zellen[77, 86], F311-zellen [77, 87] MCF-7-Mammakarzinomzellen[77, 88], humanen T-Zell-Leukämie-zellen[77, 89, 90] und humanen Pankreaskarzinomzellen[77, 91] nachgewiesen, so dass es bei Betrachtung der Daten dieser Arbeit als sehr wahrscheinlich erscheint, dass auch Erysoin die Fähigkeit zur Induktion von G2/M-Arrest besitzt. An dieser Stelle muss außerdem diskutiert werden ob Erysoin als möglicher Histondeacetylaseinhibitor in Frage kommt. Myzak et al. (2006) hatten gezeigt, dass Sulforaphan in 15µM Konzentration in der Lage ist, die Histondeacetylase (HDAC) in BPH-1-, LnCaP- und PC-3-Prostataepithelzellen zu inhibieren, was die Überführung der acetylierten Histone in den deacetylierten und damit für die Genexpression inaktiven Zustand verhindert und so zu einer erhöhten Interaktion acetylierter H4-Histone mit der Promoterregion des p21- und des bax-Gens führte [92, 93]. Dadurch konnte eine 1,5 –bzw. 2-fache Erhöhung der p21^{Cip1/WAF1} bzw. der bax-Proteinexpression erreicht werden. Wie bereits oben beschrieben sind diese Proteine für Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion verantwortlich [72, 84, 87-91].

Zusammenfassend muss festgehalten werden, dass Erysoin in SCGE und Mikrokern-Assay sein chemopräventives Potential unter Beweis gestellt hat. Im WST-1-assay ließ sich bei

kombinierter Erysolin und B(a)P-Behandlung zytotoxisches Potential erkennen, auch wenn die exakten Wirkmechanismen noch weitgehend ungeklärt sind und größtenteils über das Verhalten der Strukturanaloga Erucin und Sulforaphan abgeleitet werden müssen. Die genauen Mechanismen von Apoptoseinduktion und Zellzyklusarrest sowie Histondeacetylaseinhibition müssen hier in weiteren Studien untersucht werden, um letztendlich zu klären, ob mit Erysolin ein weiteres potentes ITC zur effektiven Chemoprävention zur Verfügung steht. Interessant ist an dieser Stelle auch die Frage ob sich Erysolin im Organismus in Sulforaphan und Erucin überführen lässt, wie es zwischen Sulforaphan und Erucin bereits beschrieben ist[94].

4.2 Chemopräventive Eigenschaften von Indol(3)carbinol

Indol(3)carbinol welches durch Hydrolyse des Glucosinolates Glucobrassicin entsteht und vor allem in Brokkoli vorkommt (1,67 $\mu\text{mol/g}$ fr.wt)[95] und im Gastrointestinaltrakt in 3,3-Diindolylmethan(DIM) überführt werden kann[96], zählt neben Sulforaphan zur einer der meist untersuchten Glucosinolat-Komponenten.

Hier wurden neben zahlreichen Untersuchungen unter anderem an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, wo die gesteigerte Expression von CYP1A1, CYP1B1 und CYP2B1/2 in der Leber und CYP1A1 in der Brustdrüse nachgewiesen wurden[98], auch Studien am Menschen durchgeführt[98, 99]. Reed et al.(2005) untersuchten dafür 17 Frauen einer Hochrisikogruppe für Brustkrebs nach Einnahme von 400 mg bzw. 800 mg I3C/d über einen Zeitraum von 4 Wochen. Hier zeigten sich neben einer Erhöhung der GST-Aktivität in den Lymphozyten um 69%, eine erhöhte CYP1A2-Aktivität, welche mit einer 66%igen Erhöhung des Quotienten von 2-Hydroxyöstron/16 α -Hydroxyöstron (2-OHE₁/16 α -OHE₁) einherging[97,98]. 16 α -OHE₁ ist mitverantwortlich für die Proliferation von Tumorzellen besonders im Cervixbereich. 2-OHE₁ besitzt hingegen antiöstrogene und antiproliferative Eigenschaften durch Konkurrenz mit 17 β -Estradiol(E2) am Östrogenrezeptor(ER)[96]. Somit bewirkt eine Erhöhung der 2-OHE₁-Konzentration im Verhältnis zu 16 α -OHE₁ durch I3C-Therapie eine Regression intraepithelialer Zervixneoplasien beim Menschen[96-100]. Bell et al. (2000) hatten in einer ähnlichen Studie 27 Patientinnen mit zervikaler intraepithelialer Neoplasie (CIN) im Stadium II und III, für 4 Wochen jeweils mit 200 mg/d bzw. 400 mg/d I3C behandelt[99]. Auch hier wurde ein Anstieg des 2-OHE₁/16 α -OHE₁-Quotienten im Urin der Frauen verzeichnet, welcher mit steigender I3C-Konzentration zunahm.

Was die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit angeht, so konnte hier in den WST-1-Versuchen keine signifikante Vitalitätsreduktion nach alleiniger I3C-Behandlung in HepG2-Zellen

nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich wie schon bei den Ergebnissen der Erysolintestreihen, bereits bei Konzentration von 200 μM I3C und anschließender Exposition mit B(a)P eine signifikante Reduktion der Vitalität, welche bei 500 μM I3C ihr Maximum erreichten und sogar deutlich unter der Positivkontrolle (Triton 0,1%) lagen, was auch hier als Hinweis für eine Apoptoseinduktion gewertet werden kann. Allerdings sind hier auch zytotoxische und sogar genotoxische Effekte nicht auszuschließen. Im Cometassay kam es bereits bei 100 μM I3C –Behandlung zu einem signifikanten Anstieg des OTM welcher mit steigender Konzentration zunahm und erst ab einer Konzentration von 300 μM mit einer Abnahme der Vitalität im Erythrosin-B-Test einherging. Da im WST-1-Assay bis 500 μM I3C-Konzentration noch keine signifikante Verminderung der metabolischen Aktivität nachgewiesen werden konnte, können genotoxische Effekte hier nicht sicher ausgeschlossen werden. Bestätigt werden diese Hinweise durch die Ergebnisse im Mikronukleustest, wo ebenfalls bei 100 μM I3C–Exposition bereits eine hochsignifikante Erhöhung der Mikrokernfrequenz um mehr als das doppelte nachgewiesen wurde. Auffällig war hier allerdings, dass mit zunehmender I3C-Konzentration die MK-Frequenz auf der einen Seite zunahm, dies jedoch auf der anderen Seite von einer signifikanten bzw. hochsignifikanten Abnahme des NDI begleitet wurde, so dass auch hier wieder zytotoxische Effekte als mögliche Erklärung in Frage kommen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass bereits in der Vergangenheit im Tierversuch gezeigt wurde, dass I3C auch wachstumsfördernde Wirkungen auf Mamma Karzinome bei Mäusen und Endometriumtumore bei Donyru-Ratten hat [97, 103, 104]. Außerdem konnte die Promotion N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin-induzierter Adenokarzinome im Uterus von Ratten durch I3C nachgewiesen werden [105]. Als Ursache hierfür wird eine gesteigerte Estradiol-4-Hydroxylase-Aktivität und die dadurch erhöhte 4 Hydroxyöstron(4-OHE₂)-konzentration diskutiert [105]. Beim Menschen konnte dies bisher nicht nachgewiesen werden [101].

Was die antigentoxischen Eigenschaften von I3C angeht, so ließ sich im Cometassay nach kombinierter I3C und B(a)P-Behandlung keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachweisen. Im Mikronukleustest waren diese jedoch bei kombinierter Exposition mit 100 μM und 200 μM I3C und B(a)P signifikant reduziert, was für einen antigentoxischen Effekt von I3C spricht. Eine Erklärung für dieses Ergebnis könnte in der Zeit der jeweiligen Versuche liegen. Beim Cometassay erfolgt die Auswertung direkt nach 24-stündiger Exposition gegenüber B(a)P, während im Mikronukleustest nach B(a)P-Exposition die Zellen für weitere 24 Stunden mit Cytochalasin B inkubiert werden. Mechanistisch sind die antigentoxischen Effekte auf eine gesteigerte CYP1A1-Aktivität zurückzuführen, welche für die Detoxifizierung von B(a)P

verantwortlich ist. Induziert wird die gesteigerte CYP1A1-Expression durch die Bindung von I3C an den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor(AhR) welcher durch Bindung an das Xenobiotic-responsive-element(XRE), die Transkription von CYP1A1 induziert[96]. Dies wurde bereits von Cui et al. (2002) beschrieben der eine 7-fach erhöhte CYP1A1-Aktivität in H4IIE-Zellen bei einer I3C-Konzentration von 100 μ M beobachtet hatte[106]. Im Mikronukleustest hätten die HepG2-zellen im Vergleich zum Cometassay somit 24h mehr Zeit zur CYP1A1-Transkription, was somit eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse in den beiden Testsystemen sein könnte. Was in beiden Testsystemen nachgewiesen werden konnte, war eine Erhöhung von OTM und Tail-DNA bzw. Mikrokernfrequenz über B(a)P-Niveau ab einer kombinierten Exposition von 300 μ M I3C und B(a)P. Allerdings waren diese von einer Reduktion der Vitalität im Erythrosin-B-Assay unter 70%, sowie einer signifikanten Erniedrigung des NDI unter 1,4, als Zeichen möglicher Apoptoseinduktion oder Zytotoxizität. Ähnliche Ergebnisse zeigten mehrere Studien, die sich mit ambivalenten Effekten sogenannter Janus-Substanzen auseinandergesetzt haben. Hier handelt es sich um Substanzen, welche sowohl über antigentoxische als auch genotoxische Eigenschaften abhängig von Ihrer Konzentration verfügen[59,107-110]. Dabei fällt auf, dass bei niedrigen Konzentrationen in Kombinationstests mit den jeweiligen Modelkanzerogenen wie in dieser Arbeit B(a)P, eine protektive Wirkung auftritt, während mit zunehmender Konzentration apoptotische Vorgänge durch Aktivierung von Caspase 3, 8, oder 9 oder bei I3C durch z.B. Downregulation von Bcl-2 ausgelöst werden. Beim Überschreiten einer bestimmten Konzentration, werden die Zellen dann in den unkontrollierten nekrotischen Zelltod geleitet[112].

Auffällig war in den Kombinationstestungen mit I3C und B(a)P sowohl in den Mikronukleus-Test als auch im Cometassay eine wesentlich höhere DNA-schädigung im Vergleich zur Positivkontrolle B(a)P im Hochkonzentrationsbereich. In den vorangegangenen Testreihen mit alleiniger I3C – Exposition war die DNA-Schädigung nie über B(a)P-Niveau gelegen. Diskutiert werden hier eine Imbalance zwischen aktivierenden Reaktionen von Phase I-Enzymen, welche mehr toxische Zwischenmetabolite generieren und Detoxifizierungsreaktionen der Phase-II Enzyme welche diese toxischen Zwischenprodukte nicht ausreichend neutralisieren können. Dadurch wird die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies begünstigt, die zu einer zusätzlichen DNA-Schädigung führen können[109].

Abschließend muss letztendlich die Sicherheit von Indol(3)carbinol im therapeutischen Einsatz zur Krebsprävention und/oder als Chemotherapeutikum in weiteren Studien geprüft werden, da trotz der vielen chemopräventiven Eigenschaften, die in zahlreichen Studien

nachgewiesen werden konnten, auch die Erhöhung von 4-OHE₁ und 4-OHE₂ nachgewiesen wurde, welche zu einer gesteigerten der Promotionsrate der Kanzerogenese führen kann[111]. Das ist vor allem deshalb bedenklich, da erhöhte 4-Hydroxyöstron-Spiegel mit der Entstehung von Brustkrebs in Verbindung gebracht werden[112-114].

4.3 Chemopräventive Eigenschaften von Brassinin

Brassinin [3-(S-Methyldithiocarbamoyl)aminomethylindol], das überwiegend in Weißkohl vorkommt ist eine noch eher unbekannt Substanz aus der Gruppe der Indole. Auch wenn bereits 1995 von Mehta et al. eine dosisabhängige Inhibition von DMBA-induzierten Hauttumoren an Mäusen durch Exposition mit Brassinin nachgewiesen wurde[115], konnte am HepG2-Modell in dieser Arbeit keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden. Um eventuelle Fehler bei der Verdünnung der verschiedenen Brassininkonzentrationen auszuschließen, wurde die Verdünnungsreihe mehrfach wiederholt. Allerdings zeigte sich in der SCGE stets die gleiche Kurvenform, welche den typischen u-förmigen Kurvenverlauf, wie er auch in den Untersuchungen zu Erysolin und I3C zu sehen war, vermissen ließ. Festzuhalten bleibt, dass in den getesteten Konzentrationen kein gentoxisches Potential nachgewiesen wurde. Auch wenn in den Kombinationstestungen vereinzelt signifikante bzw. hochsignifikante Reduktionen der DNA-Schädung im Vergleich zur Positivkontrolle B(a)P zu sehen waren, zeigte sich hier keine dosisabhängige Verminderung der DNA-Migration gegenüber B(a)P.

Eine Erklärung dafür könnte eine neuere Studie von Gaspari und Banerjee et al. liefern. Diese hatten sich intensiv mit der Inhibitoren der Inolamin2, 3-Dioxygenase(IDO) beschäftigt. IDO ist eine 45 kDa große Häm-beinhaltende Oxydase, die den initialen und geschwindigkeitsabhängigen Schritt im Tryptophanabbau über der Kynureninweg katalysiert, was zur NAD⁺-Biosynthese führt und dadurch wiederum eine wirkungsvolle Immunantwort gegen Tumorwachstum unterdrückt[117]. Bei der Suche nach potenten IDO-Inhibitoren[118], diese enthalten erstaunlicherweise fast alle den Indolring, hatte sich schließlich Brassinin, als kompetitiver Inhibitor der IDO bewiesen. Da es sich bei der IDO jedoch um ein extrahepatisches Enzym handelt, ist das eine mögliche Erklärung für die fehlende Dosis-Wirkungsbeziehung bei den Versuchen am HepG2-Modell dieser Arbeit. Die genauen Mechanismen über die in der Literatur beschriebenen chemopräventiven Eigenschaften von Brassinin sind jedoch weitgehend unklar und müssen in zukünftigen Studien weiter erforscht werden.

5. Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Indole und Isothiocyanate gehen aus den Glucosinolaten durch enzymatische Aufspaltung hervor. In der Natur kommen sie vor allem in Vertretern der *Brassicaceae*-Familie vor. Schon seit mehreren Jahren haben ITCs und Indole immer wieder chemopräventives Potential in verschiedenen Studien unter Beweis gestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zwei Indole Brassinin und Indol(3)carbinol sowie das ITC Erysolin hinsichtlich ihres gentoxischen, antigentoxischen sowie zytotoxischen Potentials in humanen Hepatomzellen (HepG2) mittels Cometassay, Mikronukleustest, WST-1- und Erythrosin- B-Assay untersucht.

Dabei zeigte Erysolin in Cometassay und Mikrokerntest in einem Konzentrationsbereich von 1,25 -5 μ M antigentoxisches Potential gegenüber B(a)P demonstriert durch eine signifikante Reduktion von Mikrokernfrequenz und DNA-Migration. Bei höheren Konzentrationen kam es in den Vitalitätsuntersuchungen bei kombinierter ITC/B(a)P-Exposition zu einer deutlichen Reduktion der Vitalität, so dass hier Aussagen zu zytotoxischen Effekten oder Apoptoseinduktion in weiteren Studien untersucht werden müssen.

Indol(3)carbinol zeigte im HepG2-Modell lediglich in den Mikrokernuntersuchungen ein leicht antigentoxisches Potential. Auffällig war dagegen eine erhöhte DNA-Migration im Vergleich zur Positivkontrolle bei kombinierter I3C/B(a)P-exposition im Cometassay welche mit erhöhter Zytotoxizität in Erythrosin-B und WST-1 Assay korrelierte. Hier sind weitere Untersuchungen insbesondere zur Sicherheit von I3C in der chemopräventiven Pharmakotherapie notwendig, da letztendlich mutagene und tumorpromovierende Eigenschaften von Indol(3)carbinol bereits in anderen Zell- und Tiermodellen nachgewiesen wurden.

In der SCGE mit Brassinin konnte keine Dosis-Wirkungsbeziehung nachgewiesen werden, so dass auf einen Mikronukleustest verzichtet wurde. Die Tatsache das Brassinin seine chemopräventive Wirkung unter anderem durch Inhibition des extrahepatischen Enzyms Indolamin2, 3-Dioxygenase entfaltet, ist hier nur eine mögliche Erklärung für den fehlenden Effekt im HepG2-modell des noch weitgehend unerforschten Indols. Es bedarf deshalb noch weiterer Untersuchungen über die genauen Wirkungsmechanismen von Brassinin und seiner möglichen Effekte.

5.2 Englisch

Indoles and isothiocyanates arise from the glucosinolates by enzymatic lysis. Their natural sources are members of the Brassica plant family. During the past years, ITCs and Indoles demonstrated their chemopreventive potency in many different studies.

In the present study genotoxic, antigenotoxic or cytotoxic effects of two indoles, brassinin and indole(3)carbinol and the ITC erysolin in human hepatomacells (HepG2) were investigated in the cometassay, mikronucleusassay, WST-1- and erythrosine-B-assay.

Erysolin demonstrated its antigenotoxic potency versus B(a)P, showing a significant reduction of the DNA-migration and also a reduction of the micronucleus frequency at a concentration from 1, 25 μM up to 5 μM when cells were treated with erysolin and B(a)P. A distinct loss of viability was observed in the investigations of cell viability with combined ITC/B(a)P-treatment at higher concentrations. In this context predictions about cytotoxic effects or the induction of apoptosis have to be observed in further studies.

Only in the micronucleustest indole(3)carbinol demonstrated al light antigenotoxic potency in HepG2-modell. Strikingly we investigated here an increased DNA-migration compared with the positivecontrol in the cometassay which was associated with an increased cytotoxicity in the erythrosine-B- and WST-1-assay when cells where treated with I3C and B(a)P. Further investigations have to be made particularly about the safety of I3C in chemopreventive pharmacological therapy, because mutagenic and tumor promoting effects have already been proved in other cell- or animal models.

In the SCGE, brassinin did not show any dose-dependent relationship, so we passed the micronucleus test. A mistake in the dilution series was excluded. The fact that brassinin unfolds its chemopreventive effects e.g. by inhibiting the extrahepatic enzyme IDO is only one possibility why no effect of the widely unexplored indole brassinin could be observed in the HepG2-modell. Therefore further studies should be conducted to examine the exact mechanisms of action and possible effects of brassinin more closely.

6. Publikation

Lamy, E., Schröder, J., Paulus, S., Brenk, P., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., Antigenotoxic properties of *Eruca sativa*(rocket plant), Erucin and Erysoin in human hepatoma (HepG2) cells towards Benzo(a)pyrene and their mode of action, Food and Chemical Toxicology, **2008**, 46, 2415-2421

7. Literaturverzeichnis

1. World Cancer Research Fund and American Institute for Cancer Research, *Food Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*, American Institute for Cancer Research, Washington, DC, **1997**, 506-507.
2. Hecht, S. S., *Inhibition of Carcinogenesis by Isothiocyanates*, Drug metabolism Reviews, **2000**, 32(3&4), 395-411
3. Bennett, R. N., Mellon, F. A., Kroon, P. A., *Screening Crucifer Seeds as Sources of Specific Intact Glucosinolates Using Ion-Pair High-Performance Liquid Chromatography Negative Ion Electrospray Mass Spectrometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry **2004**, 52, 428-438
4. Conaway, C. C., Yang, Y-M., Chung, F. L., *Isothiocyanates as Cancer Chemopreventive Agents: Their Biological Activities and Metabolism in Rodents and Humans*, Current Drug Metabolism, **2002**, 3, 233-255
5. Kassie, F., Pool-Zobel, B., Parzefall, W., Knasmüller, S., *Genotoxic effects of benzyl isothiocyanate, a natural chemopreventive agent*, Mutagenesis, **1999**, 14(6), 595-604
6. Kassie, F., Knasmüller, S., *Genotoxic effects of allyl isothiocyanate(AITC) and phenethyl isothiocyanate(PEITC)*. Chem. Biol. Interact., **2000**, 127(2), 163-1800,
7. Murillo, G., Mehta, R. G., *Cruciferous Vegetables and Cancer Prevention*, Nutrition and Cancer, **2001**, 41(1&2), 17-28
8. Musk, S. R., Astley, S. B., Edwards, S. M., Stephenson, P., Hubert, R. B., Johnson, I. T., *Cytotoxic and clastogenic effects of benzyl isothiocyanate towards cultured mammalian cells*, Food. Chem. Toxicol., **1995**, 33(1), 31-37
9. Musk, S. R., Smith, T. K., Johnson, I. T., *On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates singrin and gluconasturtiin*, Mutat. Res. **1995**, 348(1), 19-23
10. Lamy, E., Schröder, J. F., Völkel, Y., Mersch Sundermann, V., *Studies on the chemopreventive effect of *Eruca sativa* (Rucola) and its isothiocyanates in human cell cultures*, Erlangen , Germany **2005**
11. Pitot, H. C., Dragan, Y. P., *Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis*, FASEB J, **1991**, 5, 2280-2286
12. Phillips, D. H., Venitt, S. eds., *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific, Publishers, **1995**, 14

13. Ames, B. N., *Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases*, Science, **1983**, 221, 1256-1264
14. Sporn, M. B., Dunlop, N. M., Newton, D. L., Smith, J. M., *Prevention of chemical carcinogenesis by vitamin A and its synthetic analogs (retinoids)*, Fed. Proc, **1976**, 35, 1332-1338
15. Lampe, J. W., *Health effects of vegetables and fruit assessing mechanisms of action in human experimental studies*, Am. J. Clin. Nutr. **1999**, 70, 475-490
16. Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N., *Dietary cancer and prevention using antimutagens*, Toxicology, **2004**, 198, 147-159
17. Sonoda, J., Rosenfeld, J. M., Xu, L., Evans, R. M., Xie, W., *A nuclear receptor-mediated xenobiotic response and its implication in drug metabolism and host protection*, Current Drug Metabolism, **2003**, 4, 59-72
18. Lamy, E., Scholtes, C., Herz, C., Mersch-Sundermann, V., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of isothiocyanates*, Drug Metabolism Reviews, **2011**, 1-21
19. Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A., Baird, W. M., *Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites*, Carcinogenesis, **1999**, 20(10), 1885-1891
20. Liu, T. Y., Chao, T. W., Chiang, S. H., Chi, C. W., *Differential sensitivity of human hepatoma cell line and primary rat hepatocyte culture to benzo (a) pyrene-induced unscheduled DNA synthesis and adduct formation*, Cell. Biol. Int., **1993**, 17(4), 441-447
21. Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X-J., Darroudi, F., Kassie, F., *Use of human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents*, Toxicology, **2004**, 198, 329-340
22. Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., Talalay, P., *The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants*, Phytochem., **2001**, 56, 5-51
23. Mithen, R. F., Dekker, M., Verkerk, R., Rabot, S., Johnson, I.T., *The nutritional significance, biosynthesis and bioavailability, of glucosinolates in human foods*, J. Sci. Food Agr., **2000**, 80, 967-984
24. Kushad, M. M., Brown, A. F., Kurilich, A.C., Juvik, J. A., Klein, B. P., Wallig, M. A., Jeffery, E. H., *Variation of glucosinolates in vegetable crops of brassica oleracea*, J. Agric. Food Chem., **1999**, 47, 1541-1548

25. Rosa, E. A. S., Heaney, R. K., Rego, F. C., Fenwick, G. R., *The variation of glucosinolate concentration during a single day in young plants of Brassica oleracea var acephala and capitata*, J. Sci. Food Agric., **1994**, 66, 457-463
26. Rodrigues, A. S., Rosa, E. A. S., *Effect of post-harvest treatments on the level of glucosinolates in broccoli*, J. Sci. Food Agric., **1999**, 79, 1028-1032
27. Rouzaud, G., Young, S. A., Duncan, A. J., *Hydrolysis of glucosinolates to isothiocyanates after ingestion of raw or microwaved cabbage by human volunteers*, Cancer Epid., Biom. & Prev., **2004**, 13, 125-131
28. Keck, A.S., Finley, J.W., *Cruciferous vegetables, Cancer protective mechanisms of glucosinolate hydrolysis products and selenium*, Integrative Cancer Th., **2004**, 3, 5-12
29. Rask, L., Andréasson, e., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J., *Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in brassicaceae*, Plant., Mol. Biol., **2000**, 42, 93-113
30. Shapiro, T. A., Fahey, J. W., Wade K. L., Stephenson, K. K., Talalay, P., *Human metabolism and excretion of cancer chemopreventive glucosinolates and isothiocyanates of cruciferous vegetables*, Cancer Epid., Biom. & Prevention, **1998**, 7, 1091-1100
31. Zhang, Y., *Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and mechanism of action*, Mut. Res., **2004**, 555, 173-190
32. Keum, Y-S., Jeong W-S., Kong A. N. T., *Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms*, Mut. Res., **2004**, 555, 191-202
33. Natarajan, A. T., Darroudi, F., *Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens*, Mutagenesis, **1991**, 6, 399-403
34. Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A. T., *Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens*, Mutat. Res., **1998**, 402, 185-202

35. Brandon, E., F., A., Bosch, T., M., Deenen, M., J., Levink, R., van der Wal, E., van Meerveld, J., B., M., Bijl, M., Beijnen, J., H., Schellens, J., H., M., Meijerman, I., *Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma(IGROV-1) and colon carcinoma(CaCo-2, LS180) cell lines*, Toxicol. Appl. Pharmacol, **2006**, 211, 1-10
36. Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D., P., *Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen*, Science, **1980**, 209, 497-499
37. Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W. W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B. J., *Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants, current state of knowledge*, Toxicology, **2004**, 198, 315-328
38. Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., *A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells*, Exp. Cell Res., **1988**, 175-184
39. Tice, P. R., Andrews, P. W., Singh, N. P., *The single cell gel assay, a sensitive technique for evaluating intercellular differences in DNA damage and repair*, Basic Life Sci., **1990**, 53, 291-301
40. Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bourner, C., Windebank, S., *The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and Cytotoxins*, Mutagenesis, **1998**, 13(1), 89-94
41. Östling, O., Johanson, K. J., *Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **1984**, 123(1), 291-298
42. Klaude, M., Eriksson, S., Nygen, J., Ahnstrom, G., *The Comet assay: mechanisms, and technical considerations*, Mutat. Res., 1996, 363(2), 89-96
43. Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R. H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V., *The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies*, Mutat. Res., **2004**, 566, 209-229
44. Laky, B., Knasmüller, S., Gminski, R., Mersch-Sundermann, V., Scharf, G., Verkerk, R., Freywald, C., Uhl, M., Kassie, F., *Protective effects of brussel sprouts towards B(a)P-induced DNA damage; a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay*, Food Chem. Toxicol., **2002**, 40, 1077-1083

45. Rojas, E., Lopez, M.C., Valverde, M., *Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications*, J Chromat B, **1999**, 722, 225-254
46. Collins, A.R., Dobson, V. L., Dusinka, M., Kennedy, G., Stetina, R., *The comet assay: what can it really tell us?* Mutat. Res., **1997**, 375, 183-193
47. Elia, M. C., Storer, R. D, McKelvey, T. W., Kraynak, A. R., Barnum, J. E., Harmon L. S., DeLuca, J. G., Nichols, W. W., *Rapid DNA degradation in primary rat hepatocytes treated with diverse cytotoxic chemicals: analysis by pulsed field gel electrophoresis and implications for alkaline elution assays*, Environ. Mol. Mutagen., **1994**, 24(3), 181-91
48. Savage, J. R. K., *Update on the Target theory as applied to chromosomal aberrations*, Env. Mol. Mutagen. **1993**, 22, 198-207
49. Fenech, M., *The in vitro micronucleus technique*, Mutat. Res., **2000**, 455(1-2), 81-95
50. Fenech, M., *The advantages and disadvantages of cytokinesis-block micronucleus method*, Mutat. Res., **1997**, 392, 11-18
51. Fenech, M., *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*, Mutat. Res., **1993**, 285, 35-44
52. Fenech, M., Morley, A., *Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay*, Cytobios, **1985**, 43, 233-246
53. Von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, HG., Honavar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H., Madle, S., *In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells- results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances*, Mutat. Res., **2000**, 10, 468(2), 137-163
54. Ukeda, H., Shimamura, T., Tsubouchi, M., Harada, Y., Nakai, Y., Sawamura, M., *Spectrophotometric assay of superoxide anion formed in maillard reaction based on highly water-soluble tetrazolium salt*, Analytical Sciences, **2002**, 18, 1151-1154
55. Pappa, G., Lichtenberg, M., Iori, R., Barillari, J., Bartsch, H., Gerhäuser, C., *Comparison of Growth inhibition profiles and mechanisms of apoptosis induction in human colon cancer cell lines by isothiocyanates and indoles from Brassicaceae*, Mutat. Res., **2006**, 599, 76-87

56. Zhang, Y., Talalay, P., *Anticarcinogenic activities of organic isothiocyanates: chemistry and mechanisms*, *Cancer Res.*, **1994**, 54, 1976-1981
57. Verhoeven, D. T., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., van den Brandt, P. A., van Poppel, G., *A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by brassica vegetables*, *Chem. Biol. Interact.*, **1997**, 103, 79-129
58. Hecht, S. S., Kenney, P.M., Wang, M., Upadhyaya, P., *Benzyl isothiocyanate: An effective inhibitor of polycyclic aromatic hydrocarbon tumorigenesis in A/J mouse lung*, *Cancer Lett*, **2002**, 187, 87-94
59. Lamy, E., Crößmann, C., Saeed, A., Schreiner, P. R., Kotke, M., Mersch-Sundermann, V., *Three structurally homologous Isothiocyanates exert „Janus“ Characteristics in Human HepG2 cells*, *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **2009**, 50, 164-170
60. Stoner, G., Casto, B., Ralston, S., Roebuck, B., Pereira, C., Bailey, G., *Development of a multi-organ rat model for evaluating chemopreventive agents: efficacy of indole-3-carbinol*, *Carcinogenesis*, **2002**, 23 (2), 265-272
61. Okazaki, K., Umemura, T., Imazawa, T., Nishikawa, A., Masegi, T., Hirose, M., *Enhancement of urinary bladder carcinogenesis by combined treatment with benzyl isothiocyanate and N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine in rats after initiation*, *Cancer Sci.*, **2003**, 94, 948-952
62. Dunnick, J. K., Prejean, J. D., Haseman, J., Thompson, R. B., Giles, H. D., McConnell, E. F., *Carcinogenesis bioassay of allyl isothiocyanate*, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1982**, 2, 114-120
63. Sugiura S., Ogawa, K., Hirose, M., Takeshita, F., Asamoto, M., Shirai, T., *Reversibility of proliferative lesions and induction of non-papillary tumors in rat urinary bladder treated with phenylethylisothiocyanate*, *Carcinogenesis*, **2003**, 24, 547-553
64. Gamet-Payraastre, L., Li, P., Lumeau, S., Cassar, G., Dupont, M. A., Chevvolleau, S., Gasc, N., Tulliez, J., Terce, F., *Sulforaphane, a naturally occurring isothiocyanate, induce cell cycle arrest and apoptosis in HT29 human colon cancer cells*, *Cancer Res.*, **2000**, 60 (5), 1426-1433
65. Von Borstel, R. C., Higgins, J. A., *Janus carcinogens and mutagens*, *Mutat. Res.*, **1998**, 402 (1-2), 321-329
66. Weinberg, A. M., Storer, J. B., *Ambiguous carcinogens and their regulation*, *Risk. Anal.*, **1985**, 5 (2), 151-156

67. Zhang, Y., Li, J., Tang, L., *Cancer-preventive isothiocyanates, dichotomous modulators of oxidative stress*, Free Radic. Biol. Med., **2005**, 38(1), 70-77
68. Paolini, M., bdel-Rahman, S. Z., Sapone, A., Pedulli, G. F., Perocco, P., Cantelli-Forti, G., Legator, M. S., *Beta-carotene: a cancer chemopreventive agent or a co carcinogen?* Mutat., Res. **2003**, 543 (3), 195-200.
69. Lamy, E., Schröder, J. F., Völkel, Y., Mersch-Sundermann, V., *Studies on the chemopreventive effect of Eruca sativa(Rucola), and ist isothiocyanates in human cell cultures*, Erlangen, Deutschland, **2005**
70. Lamy, E., *MTBITC-induced apoptosis and cell cycle arrest of human hepatoma(HepG2) cells: A link between p53 and human telomerase?*, Institut für Innenraum- und Umwelttoxikologie des Fachbereichs Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen, **2007**
71. Höfer, N., *Untersuchungen zur genetischen Toxizität und Chemoprevention von Brassica-Pflanzensäften in humanen Hepatomzellen(HepG2)*, Institut für Ernährungswissenschaft der Justus-Liebig-Universität, Gießen, **2005**
72. Lamy, E., Mersch-Sundermann, V., *MTBITC mediates cell cycle arrest and apoptosis induction in human HepG2 cells despite its rapid degradation kinetics in the in vitro model*, Environmental and molecular Mutagenesis, **2009**, 50, 190-200
73. Zhang, Y., Talalay, P., Cho, C-G., Posner, G. H., *A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: isolation and elucidation of structure*, Proc. Natl. Acad.Sci., **1992**, 89, 2399-2403
74. Kumaravel, T.S., Awadhesh, N. Jha, *Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals*, Mutation Research, **2006**, 605,7-16
75. Fimognari, C., Hrelia, P., *Sulphoraphane as a promising molecule for fighting cancer*, Mutation Research, **2007**, 635, 90-104
76. Lamy, E., Schröder, J., Paulus, S., Brenk, P., Stahl, T., Mersch-Sundermann, V., *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 and chemical Toxicology **2008**, 46, 2415-2421
77. IARC (International Agency for Research on Cancer), *Polynuclear aromatic compounds. General remarks on the substances considered*, IARC, **1983**, 32,33-91

78. Keum, Y. S., Jeong, W. S., Kong, A. N., *Chemoprevention by isothiocyanates and their underlying molecular signaling mechanisms*, Mutation Research, **2004**, 555(1-2), 191-202
79. Itho, K., Wakabayashi, N., Katho, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J. D., Yamamoto, M., *Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain*, Genes Dev., **1999**, 13, 76-86
80. Itho, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, K., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., Yamamoto, M., Nabeshima, Y., *An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxification enzyme genes through antioxidant response elements*, Biochem: Biophys. Res. Commun., **1997**, 236, 313-322
81. Kim, B. R., Hu, R., Keum Y. S., Hebbar, V., Shen, G., Nair, S. S., Kong, A. N., *Effects of glutathione on antioxidant response element-mediated gene expression and apoptosis elicited by sulforaphane*, Cancer Res., **2003**, 63, 7520-7525
82. Soldani, C., Scovassi, A. I., *Poly(ADP-ribose)polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update*, Apoptosis, **2002**, 7, 321-328
83. Yeh, C.T., Yen, G. C., *Effect of sulphoraphane on metallothionein expression and induction of apoptosis in human hepatoma HepG2 cells*, Carcinogenesis, **2005**, 26, 2138-2148
84. Gartel, A. L., Radhakrishnan, S. K., *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms and consequence*. Cancer Res., **2005**, 65, 3980-3985
85. Singh, S. V.; Herman-Antosiewicz, A., Singh, A. V., Lew, K. L., Srivastava, S. K., Kamath, R., Brown, K. D.; Zhang, L., Baskaran, R., *Sulforaphane-induced G2/M phase cell cycle arrest involves checkpoint kinase 2-mediated phosphorylation of cell division cycle 25 C*, J. Biol.Chem., **2004**, 279, 25813-25822
86. Jackson, S. J., Singletary, K. W., *Sulforaphane: a naturally occurring mammary carcinoma mitotic inhibitor, which disrupts tubulin polymerization*, Carcinogenesis, **2004**, 25, 219-227
87. Jackson, S. J., Singletary, K. W., *Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization*, J.Nutr., **2004**, 13, 2229-2236
88. Fimognari, C., Nüsse, M., Cesari, R., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., *Growth inhibition, cellcycle arrest and apoptosis in human T-cell leukemia by the isothiocyanate sulforaphane*, Carcinogenesis, **2002**, 23, 581-586

89. Fimognari, C., Nüsse, M., Berti, F., Iori, R., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P., *Isothiocyanates as novel cytotoxic and cytostatic agents: molecular pathway on human transformed cells*, *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, 68, 1133-1138
90. Pham, N. A., Jacobberger, J. W., Schimmer, A. D., Cao, P., Gronda, M., Hedley, D. W., *The dietary isothiocyanate sulforaphane targets pathways of apoptosis, cell cycle arrest and oxidative stress in human pancreatic cancer cells and inhibits tumor growth in severe combined immunodeficient mice*, *Mol. Cancer Ther.*, **2004**, 3, 1239-1248
91. Kassahun, K., Davis, M., Hu, P., Martin, B., Baillie, T., *Biotransformation of the naturally occurring isothiocyanate sulforaphane in the rat: Identification of phase I metabolites and glutathione conjugates*, *Chem. Res. Toxicol.*, **1997**, 10, 1228-1233
92. Myzak, M. C., Karplus, P. A., Chung, F. L., Dashwood, R. H., *A novel mechanism of chemoprotection by sulforaphane: inhibitor of histone deacetylase*, *Cancer Res.*, **2004**, 64, 5767-5774
93. Myzak, M. C., Hardin, K., Wang, R., Dashwood, R. H., Ho, E., *Sulphoraphane inhibits histone deacetylase activity in BPH-1, LnCaP and PC-3 prostate epithelial cells*, *Carcinogenesis*, **2006**, 27, 811-819
94. Fahey, J. W., Zhang, Y., Talalay, P., *Broccoli sprouts: An exceptionally rich source of inducers of enzymes that protect against chemical carcinogens*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, 94, 10367-10372
95. Kim, Y. S., Milner, J. A., *Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention*, *Journal of Nutritional Biochemistry*, **2005**, 16, 65-73
96. Rogan, E. G., *The natural Chemopreventive Compound Indole-3-carbinol: State of Science*, *In Vivo*, **2006**, 20, 221-228
97. Horn, T. L., Reichert, M. A., Bliss, R. L., Malejka-Giganti, D., *Modulations of P450 mRNA in liver and mammary gland and P450 activities and metabolism of estrogen in liver by treatment of rats with indole-3-carbinol*, *Biochem. Pharmacol.*, **2002**, 64, 393-404
98. Reed, G. A., Peterson, K. S., Smith, H. J., Gray, J. C., Sullivan, D. K., Mayo, M. S., Cromwell, J. A., Hurwitz, A., *A phase I study of indole-3-carbinol in women: tolerability and effects*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, **2005**, 14, 1953-1960,
99. Bell, M. C., Crowley-Nowick, P., Bradlow, H. L., Sepkovic, D. W., Schmidt-Grimminger, D., Howel, P., et al., *Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN*, *Gynecol. Oncol.*, **2000**, 78, 123-129

100. Rahman, K. W., Li, Y., Sarkar, F. H., *Inactivation of Akt and NF-kappaB play important roles during indole-3-carbinol-induced apoptosis in breast cancer cells*, Nutr. Cancer **2004**, 48, 84-94
101. Chinni, S. R., Li, Y., Upadhyay, S., Koppolu, P. K., Sarkar, F. H., *Indole-3-carbinol(I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells*. Oncogene, **2001**, 20, 2927-2936
102. Bradlow, H. L., Michnovicz, J., Telang, N. T., Osborne, M. P., *Effects of dietary indole-3-carbinol on estradiol metabolism and spontaneous mammary tumors in mice*, Carcinogenesis, **1991**, 12, 1571-1574
103. Kojima, T., Tanaka, T., Mori, H., *Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female Donryu rats by dietary indole-3-carbinol*, Cancer Res., **1994**, 54, 1446-1449
104. Yoshida, M., Katsushima, S., Ando, J., Tanaka, T., Uematsu, F., Nakae, D., Maekawa, A., *Dietary indole-3-carbinol promotes endometrial adenocarcinoma development in rats initiated with N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, with induction of cytochrome P450s in the liver and consequent modulation of estrogen metabolism*, Carcinogenesis, **2004**, 25, 2257-2264
105. Mersch-Sundermann, V., Kassie, F., Bohmer, S., Lu, W. Q., Wohlfahrt, R., Sobel, R., Brunn, H. E., Eisohly, M. A., Ross, S. A., Stahl, T. *Extract of Toxicodendron quercifolium caused genotoxicity and antigenotoxicity in bone marrow cells of CD1 mice*, Food Chem. Toxicol., **2004**, 42(10), 1611-1617
106. Cui, X., Palamanda, J., Norton, L., Thomas, A., Lau, Y. Y., White R. E., et al., *A high-throughput cell-based reporter gene system for measurement of CYP 1A1 induction*, J Pharmacol Toxicol Methods, **2002**, 47:143-51
107. Mersch-Sundermann, V., Bahorun, T., Stahl, T., Neergheen, V. S., Soobrattee, M. A., Wohlfahrt, R., Sobel, R., Brunn, H. E., Schmeiser, T., Lamy, E., Aruoma, O. I., *Assessment of the DNA damaging potency and chemopreventive effects towards BaP-induced genotoxicity in human derived cells by Monimiastrum globosum , an endemic Mauritian plant*, Toxicol. In Vitro, **2006**, 20(8), 1427-1434
108. Holst, B., Williamson, G., *A critical review of the bioavailability of glucosinolates and related compounds*, Nat. Prod. Rep., **2004**, 21(3), 425-447
109. Von Borstel, R. C., Higgins, J. A., *Janus carcinogens and mutagens*. Mutat. Res., **1998**, 402(1-2), 321-329

110. Kong, A. N., Yu, R., Chen, C., Mandlekar, S., Primiano, T., *Signal transduction events elicited by natural products: role of MAPK and caspase pathways in homeostatic response and induction of apoptosis*, Arch. Pharm. Res., **2000**, 23(1), 1-16
111. Levine, S., *DIM, I3C, and the aryl hydrocarbon receptor*, Focus, Allergy Research Group newsletter, **2005**, 5-13
112. Castagnetta, L. A., Granata, O. M., Arcuri, F. P., Polito, L. M., Rosati, F., Cartoni, G. P., *Gas chromatography/mass spectrometry of catechol estrogens*, Steroids, **1992**, 57, 437-443
113. Liehr, J. G. and Ricci, M. J., *4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **1996**, 93, 3294-3296
114. Rogan, E. G., Badawi, A. F., Devanesan, P. D., meza, J. L., Edney, J. A., West, W. W., Higginbotham, S. M., Cavalieri, E. L., *Relative imbalances in estrogen metabolism and conjugation in breast tissue of women with carcinoma: potential biomarkers of susceptibility to cancer*, Carcinogenesis, **2003**, 24, 697-702
115. Mehta R. G., Liu, J., Constantinou, A., Thomas, C. F., Hawthorne, M., You, M., Gerhuser, C., Pezzuto, J. M., Moon, R. C., Moriarty, R. M., *Cancer chemopreventive activity of brassinin, a phytoalexin from cabbage*, Carcinogenesis, **1995**, 16(2), 399-404
116. Gaspari, P., Banerjee, T., Malachowski, W. P., Muller, A. J., Prendergast, G. C., DuHadaway, J., Bennet, S., Donovan, A. M., *Structure-activity study of brassinin derivatives as indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitors*, J. Med. Chem, **2006**, 49(2), 684-692
117. Banerjee, T., DuHadaway, J. B., Gaspari, P., Sutanto-Ward, E., Munn, D. H., Mellor, A. L., Malachowski, W. P., Prendergast, G. C., Muller, A. J., *A key in vivo antitumor mechanism of action of natural product-based brassinins is inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase*, Oncogene **2008**, 27(20), 2851-7
118. Muller, A. J., Malachowski, W. P., Prendergast G.C., *Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Cancer: Targeting Pathological Immuntolerance with Small-molecule Inhibitors*, Expert Opin Their Targets, **2005**, 9, 831-849

8. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Volker Mersch-Sundermann, der mir mit Überlassung dieses interessanten Themas die Möglichkeit zur Promotion gegeben hat, für seine fachliche Unterstützung sowie die Bereitstellung der notwendigen Räumlichkeiten und Forschungsmitteln, die mir die Durchführung der geplanten Experimente ermöglicht haben. Vielen Dank.

Ebenso herzlich möchte ich Frau Dr. biol.hom. Evelyn Lamy für die einzigartige Betreuung danken. Vielen Dank für all die fachlichen Ratschläge und Hilfestellungen bei der Planung und Durchführung dieser Forschungsarbeit, für all die freundlichen und unterstützenden Worte während der gesamten Dissertationszeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Firouz Darroudi für die Überlassung der HepG2-Zellen, sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des ehemaligen Instituts für Innenraum- und Umwelttoxikologie der Justus-Liebig-Universität Giessen für all Ihre Unterstützung während der experimentellen Phase dieser Forschungsarbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön meiner Frau Svenja, der ich diese Doktorarbeit widmen möchte, meinen Eltern und Schweigereiern sowie meinem Bruder Nicolas und seiner Freundin Janine, für die immerwährende Unterstützung während des gesamten Studiums, die aufbauenden Worte und den festen Glauben an mich.

9. Anhang

	DMSO	60	80	100	120	140	B(a)P 50
Exp 1	0,90627451	1,099411765	1,445	1,21	1,54588235	1,34705882	3,50019608
Exp 2	1,23921569	0,946666667	1,22333333	0,90009804	1,15666667	0,97264706	3,10186275
Exp 3	0,90156863	0,905686275	1,32039216	0,94960784	0,78333333	0,84931373	3,84705882
SCGE							
MW	1,01568627	0,983921569	1,32957516	1,01990196	1,16196078	1,05633987	3,48303922
SD	0,19359645	0,102094746	0,11111829	0,16648049	0,38130208	0,2592121	0,37289418
TTEST		0,817596337	0,08780077	0,97858509	0,59566184	0,83917018	0,00201008
EryB							
MW	93,8466667	84,2166667	78,3066667	77,54	71,67	58,8466667	77,9466667
SD	2,8676355	2,170537568	3,82781051	3,72178721	6,17332973	7,85433214	6,38208691

Tab. 5: Brassinin Gentox OTM-Rohdaten

	DMSO	60	80	100	120	140	B(a)P 50
Exp 1	3,06078431	3,839509804	5,15656863	4,17705882	5,57392157	4,72803922	9,37980392
Exp 2	4,06078431	4,169313725	4,46872549	3,2627451	3,90313725	4,79568627	8,49754902
Exp 3	3,58862745	3,47	4,3322549	3,79431373	3,25303922	3,22441176	10,1053922
SCGE							
MW	3,57006536	3,82627451	4,65251634	3,74470588	4,24336601	4,24937908	9,3275817
SD	0,50025835	0,349844682	0,44182303	0,4591711	1,19726373	0,88829192	0,80519268
TTEST		0,511937206	0,04920873	0,67919248	0,44217931	0,32837545	0,00112017
EryB							
MW	93,8466667	84,2166667	78,3066667	77,54	71,67	58,8466667	77,9466667
SD	2,8676355	2,170537568	3,82781051	3,72178721	6,17332973	7,85433214	6,38208691

Tab. 6: Brassinin Gentox TD-Rohdaten

	DMSO	40+B(a)P	60+B(a)P	80+B(a)P	100+B(a)P	120+B(a)P	B(a)P 50
Exp 1	0,75166667	2,448529412	2,23068627	2,68078431	2,07382353	3,02666667	3,06401961
Exp 2	1,21117647	2,164117647	2,22911765	2,41372549	1,82745098	2,52980392	3,74156863
Exp 3	1,06715686	2,914509804	1,8422549	2,10343137	1,86656863	2,42117647	2,91794118
SCGE							
MW	1,01	2,509052288	2,10068627	2,39931373	1,92261438	2,65921569	3,24117647
SD	0,23502658	0,378839493	0,22380951	0,28894615	0,13240356	0,32282371	0,4394644
TTEST	0,00416917	0,095638659	0,02839872	0,05915057	0,0269121	0,14459514	
EryB							
MW	94,5466667	93,77333333	90,8833333	84,72	89,0466667	88,05	89,87
SD	0,78621456	3,255062723	4,38985573	8,01322033	1,98998325	3,87926539	1,4697959

Tab. 7: Brassinin Antigentox OTM-Rohdaten

	DMSO	40+B(a)P	60+B(a)P	80+B(a)P	100+B(a)P	120+B(a)P	B(a)P 50
Exp 1	2,61843137	6,894117647	7,90901961	7,25490196	6,38245098	9,88617647	10,0560784
Exp 2	4,96127451	7,897647059	7,26607843	8,15058824	6,21921569	8,17705882	10,9009804
Exp 3	3,06637255	8,128333333	6,5022549	6,59235294	6,09264706	7,46647059	9,52254902
SCGE							
MW	3,54869281	7,64003268	7,22578431	7,33261438	6,23143791	8,50990196	10,1598693
SD	1,2436652	0,656198115	0,70424743	0,782019	0,14528804	1,24371723	0,69505228
TTEST	0,00340661	0,010371952	0,00681312	0,00976131	0,00810949	0,13449967	
EryB							
MW	94,5466667	93,77333333	90,8833333	84,72	89,0466667	88,05	89,87
SD	0,78621456	3,255062723	4,38985573	8,01322033	1,98998325	3,87926539	1,4697959

Tab. 8: Brassinin Antigentox TD-Rohdaten

	DMSO	2,5	5	10	20	30	B(a)P 50
Exp 1	0,90627451	1,296568627	1,73039216	1,55284314	1,27901961	2,1027451	3,50019608
Exp 2	1,23921569	0,892352941	0,86901961	1,32676471	0,99382353	2,32764706	3,10186275
Exp 3	0,90156863	0,874215686	1,04147059	1,18235294	1,58980392	2,62098039	3,84705882
SCGE							
MW	1,01568627	1,021045752	1,21362745	1,35398693	1,28754902	2,35045752	3,48303922
SD	0,19359645	0,238782079	0,45576217	0,18673921	0,29808173	0,25986957	0,37289418
TTEST		0,977414645	0,54352799	0,095001	0,26653696	0,00273685	0,00201008
EryB							
MW	93,8466667	86,54333333	83,1533333	82,29	79,01	55,06	77,9466667
SD	2,8676355	2,919320697	5,58186647	4,59209103	6,16490876	1,51799209	6,38208691

Tab. 9: Erysolin Gentox OTM-Rohdaten

	DMSO	2,5	5	10	20	30	B(a)P 50
Exp 1	3,06078431	4,857843137	5,98166667	5,26686275	4,18068627	5,32411765	9,37980392
Exp 2	4,06078431	3,786372549	4,01802589	5,55921569	3,66343137	6,39186275	8,49754902
Exp 3	3,58862745	3,409901961	4,47519608	3,95137255	5,46372549	6,15313725	10,1053922
SCGE							
MW	3,57006536	4,018039216	4,82496288	4,92581699	4,43594771	5,95637255	9,3275817
SD	0,50025835	0,751255946	1,02748425	0,85646018	0,92689456	0,56040803	0,80519268
TTEST		0,445108212	0,15657241	0,09273104	0,24759019	0,0055213	0,00112017
EryB							
MW	93,8466667	86,54333333	83,1533333	82,29	79,01	55,06	77,9466667
SD	2,8676355	2,919320697	5,58186647	4,59209103	6,16490876	1,51799209	6,38208691

Tab. 10: Erysolin Gentox TD-Rohdaten

	DMSO	0,3125+B(a)P	0,625+B(a)P	1,25+B(a)P	2,5+B(a)P	5+B(a)P
Exp 1	0,75166667	3,617058824	1,80343137	2,32745098	2,07813725	2,88264706
Exp 2	1,06715686	2,815098039	2,97009804	2,35647059	1,66813725	2,61235294
Exp 3	0,96666667	2,703627451	2,27862745	2,58901961	1,93509804	2,46990196
SCGE						
MW	0,92849673	3,045261438	2,35071895	2,42431373	1,89379085	2,65496732
SD	0,16117141	0,498317781	0,58666487	0,14337557	0,20809784	0,20964641
TTEST	0,00016476	0,877307836	0,14782221	0,01127821	0,0019442	0,05692432
EryB						
MW	94,3566667	92,81	91,79	94,6366667	92,02	91,89
SD	0,91696965	1,332328788	4,37345401	2,1797324	3,43917141	3,90103832

	10+B(a)P	20+B(a)P	B(a)P 50
Exp 1	3,78019608	4,31343137	3,06401961
Exp 2	3,48921569	4,69372549	2,91794118
Exp 3	3,84676471	4,47303922	3,31176471
SCGE			
MW	3,70539216	4,49339869	3,0979085
SD	0,19015006	0,19096278	0,19908688
TTEST	0,01882045	0,00094275	
EryB			
MW	92,9933333	89,35	87,67
SD	5,09361692	4,50151086	4,35020689

Tab. 11: Erysolin Antigentox OTM-Rohdaten

	DMSO	0,3125+B(a)P	0,625+B(a)P	1,25+B(a)P	2,5+B(a)P	5+B(a)P
Exp 1	2,61843137	8,371078431	5,16029412	6,8154902	7,44519608	7,26
Exp 2	3,46264706	6,319215686	5,44960784	6,10460784	5,19019608	5,6077451
Exp 3	6,1104902	7,754215686	7,40235294	6,61911765	6,00764706	5,50117647
SCGE						
MW	4,06385621	7,481503268	6,00408497	6,5130719	6,21434641	6,12297386
SD	1,8220066	1,05276504	1,21954524	0,36711402	1,14162153	0,98613415
TTEST	0,02111888	0,137840044	0,0314463	0,04674549	0,03481333	0,02659527
EryB						
MW	94,3566667	92,81	91,79	94,6366667	92,02	91,89
SD	0,91696965	1,332328788	4,37345401	2,1797324	3,43917141	3,90103832

Tab12.1: Erysolin-Antigentox TD-Rohdaten

	10+B(a)P	20+B(a)P	B(a)P 50
Exp 1	8,89970588	9,25372549	10,0560784
Exp 2	6,74970588	8,77460784	7,86078431
Exp 3	6,70196078	12,2066667	9,52254902
SCGE			
MW	7,45045752	10,0783333	9,14647059
SD	1,25531292	1,85869323	1,14494773
TTEST	0,15947641	0,50842448	
EryB			
MW	92,9933333	89,35	87,67
SD	5,09361692	4,50151086	4,35020689

Tab. 12.2: Erysolin-Antigentox TD-Rohdaten

	DMSO	100	200	300	400	500	B(a)P 50
Exp 1	0,61598137	0,89306407	0,80687646	1,17480048	1,53879436	2,04654028	2,71890635
Exp 2	0,61341224	0,788017478	0,73500302	0,93903409	1,17821447	1,92938326	3,06956555
Exp 3	0,54325438	1,055136976	0,86084614	1,28970085	1,92087027	1,56011612	3,09052627
SCGE							
MW	0,59088266	0,91207284	0,80090854	1,13451181	1,5459597	1,84534656	2,95966606
SD	0,0412673	0,13457045	0,06313347	0,1787713	0,37137974	0,25386757	0,20876725
TTEST		0,04387218	0,01226891	0,02898435	0,04535032	0,01172978	0,00187559
EryB							
MW	93,85	85,75	88,69	75,77	71,2766667	70,4	75,6133333
SD	2,87292534	6,019601316	5,16721395	1,73726797	0,26558112	2,2554157	5,35640116

Tab. 13: I3C-Gentox OTM-Rohdaten

	DMSO	100	200	300	400	500	B(a)P 50
Exp 1	1,24441041	1,850717657	1,4790599	2,04394275	2,82338059	4,25125487	4,62397501
Exp 2	1,42072293	1,804784832	1,62282523	2,11312487	2,49770356	3,2828738	5,08678888
Exp 3	1,2484417	2,753349843	2,70188221	3,85220765	4,67294118	3,84924656	4,53429761
SCGE							
MW	1,33458231	2,279067338	2,16235372	2,98266626	3,58532237	3,56606018	4,81054325
SD	0,12182123	0,670736752	0,76300851	1,22971722	1,53812527	0,40048602	0,39067033
TTEST		0,288308297	0,36280381	0,30666781	0,28492303	0,06053751	0,03436252
EryB							
MW	93,85	85,75	88,69	75,77	71,2766667	70,4	75,6133333
SD	2,87292534	6,019601316	5,16721395	1,73726797	0,26558112	2,2554157	5,35640116

Tab. 14: I3C-Gentox-TD-Rohdaten

	DMSO	12,5+B(a)P	25+ B(a)P	50+B(a)P	100+ B(a)P	200+ B(a)P	300+B(a)P
Exp 1	1,21117647	3,193137255	3,99245098	2,52803922	2,75117647	2,76529412	5,03882353
Exp 2	1,06715686	2,702745098	3,05372549	2,38411765	2,29186275	3,48823529	4,63137255
Exp 3	0,96666667	3,638823529	3,70313725	3,08235294	2,8072549	3,46166667	5,33333333
SCGE							
MW	1,08166667	3,178235294	3,58310458	2,6648366	2,61676471	3,23839869	5,00117647
SD	0,12289899	0,468217106	0,48073617	0,36867096	0,28276697	0,40993588	0,35249143
TTEST	0,00085053	0,695264669	0,18450067	0,21432554	0,11215093	0,53093963	0,00241654
EryB							
MW	93,78	88,01666667	92,0233333	89,9	90,4266667	88,49	70,49
SD	2,49164604	4,457547906	3,91068195	1,33281657	3,04920208	0,89738509	9,11429098

	B(a)P 50
Exp 1	3,31176471
Exp 2	2,91794118
Exp 3	2,91441176
SCGE	
MW	3,04803922
SD	0,22839979
TTEST	
EryB	
MW	85,4866667
SD	2,87569702

Tab. 15: I3C Antigentox –OTM-Rohdaten

	B(a)P 50
Exp 1	8,4404902
Exp 2	9,52254902
Exp 3	7,86078431
SCGE	
MW	8,60794118
SD	0,84344256
TTEST	
EryB	
MW	85,4866667
SD	2,87569702

Tab 16: I3C Antigentox TD

	DMSO	12,5+B(a)P	25+ B(a)P	50+B(a)P	100+ B(a)P	200+ B(a)P	300+B(a)P
Exp 1	4,96127451	7,530392157	9,85529412	7,39784314	8,77352941	7,42558824	11,7580392
Exp 2	3,94872549	7,875686275	7,80833333	7,01431373	7,13186275	9,67666667	11,2323529
Exp 3	3,46264706	9,708921569	8,73647059	6,60627451	6,09019608	6,97813725	10,7576471
SCGE							
MW	4,12421569	8,371666667	8,80003268	7,00614379	7,33186275	8,02679739	11,2493464
SD	0,7645709	1,170894962	1,02495962	0,39584755	1,35280059	1,44623808	0,50041253
TTEST	0,00249902	0,792129144	0,81486471	0,062875	0,25069734	0,58740853	0,01550449
EryB							
MW	93,78	88,01666667	92,0233333	89,9	90,4266667	88,49	70,49
SD	2,49164604	4,457547906	3,91068195	1,33281657	3,04920208	0,89738509	9,11429098

Tab. 16: I3C-Antigentox TD-Rohdaten

	DMSO	2,5	5	10	20	30	B(a)P 50
NDI							
Exp 1	1,67733675	1,69181586	1,66874222	1,45038168	1,38501484	1,30548926	1,4453125
Exp 2	1,6311971	1,63591022	1,62668299	1,51754386	1,39499621	1,31352941	1,38346984
Exp 3	1,70731707	1,65824308	1,62456547	1,49725275	1,3422639	1,28880045	1,41429669
MW	1,67195	1,66199	1,639997	1,488393	1,374092	1,302606	1,4136
SD	0,038345	0,028141	0,024917	0,034447	0,028012	0,012614	0,030921
TTEST		0,736723	0,30285	0,003641	0,000645	0,001645	0,001008
MN							
Exp 1	26	36	34	35	38	36	46
Exp 2	27	38	40	34	38	36	51
Exp 3	27	18	24	35	35	33	40
MW	26,66667	30,66667	32,66667	34,66667	37	35	45,66667
SD	0,57735	11,01514	8,082904	0,57735	1,732051	1,732051	5,507571
TTEST		0,59378714	0,327141411	7,06935E-05	0,005115076	0,008536383	0,025809955

Tab. 17: Mikrokern Erysolin-Gentox-Rohdaten

	DMSO	1,25+B(a)P	2,5+B(a)P	5+B(a)P	10+B(a)P	20+B(a)P	B(a)P 50
NDI							
Exp 1	1,67519182	1,38259565	1,50097276	1,54113924	1,35988819	1,28232044	1,420278
Exp 2	1,70218228	1,50291829	1,55366631	1,55627706	1,34471218	1,28094726	1,39657854
Exp 3	1,66116751	1,44102564	1,52721774	1,49150943	1,41098039	1,33642999	1,39252336
MW	1,679514	1,44218	1,527286	1,529642	1,37186	1,299899	1,403127
SD	0,020846	0,06017	0,026347	0,03388	0,034718	0,031644	0,014991
TTEST	9,73E-05	0,378374428	0,004780871	0,012225021	0,256308844	0,016381849	
MN							
Exp 1	22	32	24	27	38	49	50
Exp 2	27	41	20	20	40	42	54
Exp 3	20	37	27	34	43	43	48
MW	23	36,66667	23,66667	27	40,33333	44,66667	50,66667
SD	3,605551	4,50925	3,511885	7	2,516611	3,785939	3,05505
TTEST	0,000608754	0,014977118	0,000606978	0,015978639	0,011564702	0,102580599	

Tab. 18: Mikrokern Erysolin-Antigentox-Rohdaten

	DMSO	100 µM	200 µM	300 µM	400 µM	B(a)P 50µM
NDI						
Exp 1	1,67534077	1,64676617	1,50698603	1,31482611	1,30039977	1,35440484
Exp 2	1,75792507	1,57235421	1,51202405	1,29384966	1,25615269	1,39816233
Exp 3	1,67733675	1,59023837	1,49516441	1,2714653	1,24783028	1,38346984
MW	1,703534	1,60312	1,504725	1,29338	1,268128	1,378679
SD	0,047114	0,038842	0,008654	0,021684	0,028257	0,022269
TTEST		0,048461	0,015721	0,00117	0,000525	0,02127
MN						
Exp 1	20	51	66	89	87	49
Exp 2	28	57	47	62	94	46
Exp 3	26	54	44	84	92	51
MW	24,66667	54	52,33333	78,33333	91	48,66667
SD	4,163332	3	11,93035	14,36431	3,605551	2,516611
TTEST		0,000927826	0,044510682	0,016882786	3,65252E-05	0,00234986

Tab. 19: Mikrokern I3C-Gentox-Rohdaten

	DMSO	50 µM+B(a)P	100µM+B(a)P	200 µM+B(a)P	300 µM+B(a)P	B(a)P 50µM
NDI						
Exp 1	1,70218228	1,49382716	1,42689076	1,43279797	1,34821429	1,42542787
Exp 2	1,66116751	1,43697479	1,47610294	1,43061396	1,31684408	1,39252336
Exp 3	1,71181939	1,44444444	1,45671378	1,43467337	1,29462738	1,41005499
MW	1,691723	1,458415	1,453236	1,432695	1,319895	1,409335
SD	0,026897	0,030894	0,02479	0,002032	0,026923	0,016464
TTEST	3,29E-04	0,09203	0,072201	0,131216	0,012788	
MN						
Exp 1	27	35	23	27	42	54
Exp 2	20	33	30	38	55	48
Exp 3	28	35	27	30	53	42
MW	25	34,33333	26,66667	31,66667	50	48
SD	4358899	1,154701	3,511885	5,686241	7	6
TTEST	0,007488	0,054015	0,010787	0,026845	0,726614	

Tab. 20: Mikrokern-I3C-Antigentox-Rohdaten

	DMSO	5	10	20	50	B(a)P 50 µM	Triton 0,1%
Exp 1	86,16	109,7	100,69	84,24	71,02	84,73	40,24
Exp 2	94,36	93,01	84,4	73,9	42,56	96,56	35,6
Exp 3	99,16	99,15	100,79	90,29	76,57	97,13	43,21
WST							
MW	93,2266667	100,62	95,29333333	82,81	63,38333333	92,8066667	39,6833333
SD	6,57368491	8,441546067	9,434035898	8,288045608	18,24579495	7,00040237	3,83541827
TTEST		0,301096425	0,772875064	0,16698632	0,091837984	0,94326673	0,00083894

Tab. 21: WST-1-Erysolin-Gentox-Rohdaten

	DMSO	5µM+B(a)P	10µM+B(a)P	20µM+B(a)P	50µM+ B(a)P	B(a)P 50µM	Triton 0,1%
Exp 1	100,05	80,45	71,59	56,85	15,7	99,66	47,32
Exp 2	86,07	101,32	73,33	40,06	10,52	108,72	36,62
Exp 3	89,78	82,28	71,02	67,36	16,84	85,29	46,66
WST							
MW	91,9666667	88,01666667	71,98	54,75666667	14,35333333	97,89	43,5333333
SD	7,24197717	11,55730217	1,203370267	13,7698596	3,368342817	11,8148593	5,99620991
TTEST		0,646972331	0,037949774	0,025093262	0,000639411	0,50802927	0,00101944

Tab. 22: WST-1 Erysolin-Antigentox-Rohdaten

	DMSO	200µM	300µM	400µM	500µM	B(a)P 50µM	Triton 0,1%
Exp 1	85,8	78,89	70,75	64,3	47,06	84,34	38,69
Exp 2	94,35	66,63	76,57	74,96	58,52	96,55	35,48
Exp 3	99,16	97,48	87,62	86,9	84,36	97,13	43,29
WST							
MW	93,1033333	81	78,31333333	75,38666667	63,31333333	92,6733333	39,1533333
SD	6,76668555	15,53285872	8,5690509	11,30603968	19,10640032	7,22270263	3,92556153
TTEST		0,311656598	0,082354806	0,095021957	0,101210056	0,94364249	0,0009089

Tab. 23: WST-1 I3C-Gentox-Rohdaten

	DMSO	200µM + B(a)P	300µM + B(a)P	400µM + B(a)P	500µM + B(a)P	B(a)P 50µM	Triton 0,1%
Exp 1	100,05	39,64	15,65	19,08	14,52	99,66	44,44
Exp 2	85,93	24,88	17,41	13,77	15,87	108,81	42,8
Exp 3	89,85	67,12	24,77	17,22	14,85	85,39	51,7
WST							
MW	91,943333	43,88	19,27666667	16,69	15,08	97,95333333	46,31333333
SD	7,289042	21,43682812	4,838071241	2,694383046	0,703775532	11,80290783	4,736510671
TTEST		0,048367076	0,000320449	0,0011496	0,002769986	0,502496243	0,001608065

Tab. 24: WST-1 I3C-Antigentox-Rohdaten