

**Ursachen und Folgen der toxischen  
Kombinationswirkungen von oxidativem  
Stress und nicht genotoxischen  
Umweltchemikalien auf menschliche  
Fibroblasten**

von der Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften  
der Carl von Ossietzky Universität Oldenburg  
zur Erlangung des Grades und Titels  
einer Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
angenommene Dissertation

von Frau Kathrin Henrichs  
geboren am 25. 10. 1975 in Rhede/Westfalen

Gutachterin: Prof. Dr. Irene Witte

Zweitgutachter: Prof. Dr. Detmar Beyersmann

Tag der Disputation: 25.08.2008

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Kombinationswirkungen.....	1
1.2 Charakterisierung der kombinierten Verbindungen.....	4
1.2.1 Pentachlorphenol.....	4
1.2.2 n-Hexanol.....	7
1.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> als Induktor von oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies ....	8
1.3.1 Chemische Eigenschaften von ROS.....	8
1.3.2 ROS-induzierte Zellschäden.....	10
1.3.3 Schutzmechanismen der Zelle .....	11
1.3.4 Medizinische Bedeutung von ROS .....	13
1.4 Thesen zum Wirkmechanismus von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> u. nicht genotoxischen Chemikalien	14
1.5 Ziel der Arbeit.....	17
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
2.1 Material.....	18
2.1.1 Geräte .....	18
2.1.2 Labormaterial.....	19
2.1.3 Chemikalien.....	20
2.1.4 Lösungen .....	23
2.1.5 Zellen und Zellkulturmedien.....	32
2.2 Methoden.....	33
2.2.1 Zellkultur .....	33
2.2.2 Schadstoffbehandlung.....	34

2.2.3 Einzelzellgelelektrophorese (comet assay).....	35
2.2.4 Bestimmung des Glutathiondisulfid (GSSG)-Gehaltes der Zelle.....	39
2.2.5 Messung der ROS-Zunahme im Zellinneren im H <sub>2</sub> DCF-Assay.....	40
2.2.6 Apoptoseinduktion.....	41
2.2.7 Koloniebildungsfähigkeit.....	42
2.2.8 Test auf Mutagenität im HPRT-Assay.....	43
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>45</b>
3.1 Untersuchungen zu den Ursachen der erhöhten Gentoxizität.....	45
3.1.1 Gentoxizität (comet assay).....	45
3.1.2 Glutathiondisulfid-Gehalt der Zelle.....	57
3.1.3 ROS-Zunahme im Zellinneren .....	59
3.2 Untersuchungen zu den Folgen der erhöhten Gentoxizität.....	62
3.2.1 Nachweis der Apoptoseinduktion durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und PCP.....	62
3.2.2 Auswirkungen auf die Mutagenität von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durch die Kombination mit PCP.....	65
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1 Einzelwirkung H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	69
4.2 Kombinationswirkung von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und PCP.....	76
4.3 Mögliche Mechanismen der Kombinationswirkung.....	85
4.4 Fazit und Ausblick.....	91
<b>5 Zusammenfassung.....</b>	<b>94</b>
<b>6 summary.....</b>	<b>97</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>99</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azinobis-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
AL	Arbeitslösung
ALS	alkalilabile Stellen
AP-Stellen	Apurinstellen
BSO	Buthioninsulfoximin
bzw.	beziehungsweise
C50	Normale humane dermale Fibroblasten
Cu	Kupfer
D-PBS	Phosphat buffered saline nach DULBECCO
d.h.	das heißt
DCF	Dichlorfluoreszein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	daily reagent
DSB	Doppelstrangbruch
DTNB	5-5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMS	Ethylmethansulfonat
ESB	Einzelstrangbruch
Fe	Eisen
FKS	Fötale Kälberserum
GOD	Glukoseoxidase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
H <sub>2</sub> DCF	Dihydrodichlorofluorescein
H <sub>2</sub> DCF-DA	Dihydrodichlorofluoresceindiacetat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

HCL	Salzsäure
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
KBF	Koloniebildungsfähigkeit
LMP-Agarose	low melting point Agarose
LPO	Lipidperoxidation
MEM	Minimum Essential Medium
MF	Mutantenfrequenz
min	Minute
MTP	Mikrotiterplatte
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxidradikal-Anion
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
OT	Objektträger
PBS	phosphat buffered saline
PCP	Pentachlorphenol
ROS	„reaktive oxigen species“ Reaktive Sauerstoffspezies
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SFM	Serumfreies Medium
SL	Stammlösung
SOD	Superoxiddismutase
SSA	Sulfosalicylsäure
TU	toxic unit
z.B.	zum Beispiel

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** digitale Auswertung einer Zelle, die im comet assay als Komet erscheint. Die Zelle stellt den Kopf des Kometen dar, dort befindet sich der Großteil der DNA. Der Schweif wird durch DNA-Fragmente gebildet, die aus der Zellregion in das Gel gewandert sind. Das Programm erkennt automatisch Kern- und Schweifregion und wertet deren Maße und Helligkeit aus. ....36
- Abbildung 2:** Durch eine 15minütige Begiftung mit  $H_2O_2$ -Konzentrationen zwischen 0  $\mu M$  und 100  $\mu M$  hervorgerufener DNA-Schaden, dargestellt als tail moment. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung. ....46
- Abbildung 3:** DNA-Schaden nach 15minütiger Begiftung mit 25  $\mu M$   $H_2O_2$  und PCP in aufsteigender Konzentration. Die Dosis-Wirkungskurve für die Kombination setzt sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen zusammen, Einzelwerte sind mit EW gekennzeichnet. Der Dosis-Wirkungskurve für PCP liegt ein Einzelversuch zugrunde.....47
- Abbildung 4:** Schadensverteilung nach der Begiftung mit 40  $\mu M$   $H_2O_2$  als Einzelnoxide und mit einer Kombination von 25  $\mu M$   $H_2O_2$  und 300  $\mu M$  PCP. Der Median beider Kurven lag bei einem tail moment von 22 (Datenpunkt markiert).....48
- Abbildung 5:** Schadensverteilung nach Begiftung mit 50  $\mu M$   $H_2O_2$  als Einzelnoxide und mit einer Kombination von 25  $\mu M$   $H_2O_2$  und 600  $\mu M$  PCP. Der Median beider Kurven lag bei einem tail moment von 56 (Datenpunkt markiert).....49
- Abbildung 6:** Reparatur von DNA-Schäden während einer 0-120minütigen Reinkubationszeit. Der Initialschaden wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf 100 % gesetzt. Gezeigt ist die Abnahme des tail moment durch DNA-Reparatur in Abhängigkeit von der Zeit. ....50
- Abbildung 7:** Effekt der Nachbehandlung mit fpg auf einen durch Begiftung mit  $H_2O_2$  hervorgerufenen DNA-Schaden. Die Werte wurden in mindestens vier unabhängigen Versuchen ermittelt.....52
- Abbildung 8:** Effekt der Nachbehandlung mit fpg auf einen durch die Einzelwirkung von  $H_2O_2$  oder durch die Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  und PCP hervorgerufenen DNA-Schaden. Die Werte wurden in mindestens vier unabhängigen Versuchen ermittelt.....52
- Abbildung 9:** Schadensverteilung bei Nachbehandlung mit fpg nach einer Begiftung mit 40  $\mu M$   $H_2O_2$  als Einzelnoxide und mit 25  $\mu M$   $H_2O_2$  und 300  $\mu M$  PCP. Das

hervorgerufene tail moment lag in beiden Fällen bei ca. 66 (Datenpunkt markiert).. **53**

**Abbildung 10:** DNA-Schaden GSH-depletierter und GSH-normaler Zellen nach 15minütiger Begiftung mit  $H_2O_2$  in ansteigenden Konzentrationen. Gezeigt ist der Median aus 100 Zellen mit dem 1. und 3. Quartil als Streuungsmaß.....**55**

**Abbildung 11:** Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  und PCP auf GSH-depletierte Zellen. Gezeigt für die GSH-normalen Zellen der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Die Versuche mit GSH-depletierten Zellen zeigen jeweils den Median aus 100 Zellen. ....**56**

**Abbildung 12:** Schadensverteilung bei GSH-depletierten Zellen nach einer Begiftung mit  $10 \mu M H_2O_2$  als Einzelnoxide und nach einer Begiftung mit einer Kombination aus  $15 \mu M H_2O_2$  und  $500 \mu M PCP$  bzw.  $12 \mu M H_2O_2$  und  $8 mM n\text{-Hexanol}$ . Zum Vergleich ist ebenfalls die Schadensverteilung von GSH-normalen Zellen nach Begiftung mit  $40 \mu M H_2O_2$  gezeigt. Das hervorgerufene tail moment lag in allen Versuchen bei ca. 16.....**56**

**Abbildung 13:** GSSG-Gehalt im Zellinneren nach Schadstoffinkubation mit  $25 \mu M H_2O_2$  und  $0 \mu M - 500 \mu M PCP$ . Gezeigt ist ein Versuch mit sechs Parallelen als Mittelwert mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.....**58**

**Abbildung 14:** GSSG-Gehalt im Zellinneren nach Schadstoffinkubation mit  $25 \mu M H_2O_2$  und  $0 mM - 8 mM n\text{-Hexanol}$ . Gezeigt ist ein Versuch mit vier Parallelen als Mittelwert mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.....**58**

**Abbildung 15:** Fluoreszenzzunahme während der Versuchsdurchführung. In Zeitabschnitt 0-100 sec wurde die Grundfluoreszenz der Zellsuspension aufgenommen. Die dann folgende Begiftung in der Küvette brachte durch die Öffnung des Photometers einen Lichteinfall mit sich, der durch eine Störung des Kurvenverlaufs sichtbar wird. Es wurde viermal pro Sekunde gemessen. Die Abbildung zeigt beispielhaft einige Kurvenverläufe.....**60**

**Abbildung 16:** ROS-Entwicklung im Zellinneren, dargestellt als Steigung (m) der Fluoreszenzzunahme.  $m=1$  beschreibt eine Fluoreszenzzunahme von 1 %/sec. Es wurden Kombinationen von  $100 \mu M H_2O_2/500 \mu M PCP$  und von  $200 \mu M H_2O_2/500 \mu M PCP$  eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die unbehandelte Kontrolle stellt einen Einzelwert dar.....**61**

**Abbildung 17:** Apoptoseinduktion durch 15minütige  $H_2O_2$ -Begiftung nach Reinkubationszeiten von 12 h bis 36 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils vier



Parallelen. Auf die Angabe der Standardabweichung wurde aus Gründen der besseren Übersicht verzichtet.....64

**Abbildung 18:** Verschiebung der Apoptoseinduktion durch  $H_2O_2$  von  $200 \mu M H_2O_2$  (blaue Kurve) zu  $100 \mu M H_2O_2$  durch gleichzeitige Gabe von  $200 \mu M PCP$  (rote Kurve). Gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils vier parallelen mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.....64

**Abbildung 19:** Mutagenität von  $H_2O_2$  und PCP als Einzelnoxen und in Kombination im HPRT-Assay. Dargestellt ist die Anzahl der Mutanten pro  $10^6$  Zellen (MF/Mutantenfrequenz). Die Positivkontrolle stellte gemäß OECD-Richtlinie eine 60minütige Inkubation mit  $10 mM EMS$  dar, zusätzlich wurde eine 15minütige Inkubation mit  $10 mM EMS$  als weitere Positivkontrolle mitgeführt (siehe Tabelle 1). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier parallelen mit der Standardabweichung, Werte, die sich signifikant von der Negativkontrolle unterschieden, sind gekennzeichnet (\*)......67

## Tabellenverzeichnis

**Tabelle 1:** physikochemische Eigenschaften von PCP.....5

**Tabelle 2:** physikochemische Eigenschaften von n-Hexanol.....8

**Tabelle 3:** Ergebnisse der HPRT-Assays nach 12tägiger Expressionsphase; gezeigt sind die Toxizität direkt nach der 15minütigen Begiftung als Koloniebildungsfähigkeit (KBF) prozentual zur unbehandelten Kontrolle, die Mutantenfrequenz (MF) mit Fehlerfortpflanzung (FF) absolut und prozentual dargestellt, sowie die Anzahl der Kolonien pro Petrischale und die Anzahl der Mutantenkolonien pro Petrischale jeweils mit Standardabweichung. Die Begiftung mit EMS wurde im HPRT 2 für 60 min durchgeführt.....68

**Tabelle 4:** Vergleich der Ergebnisse mit den in den Thesen erwarteten Auswirkungen der Kombinationseffekte auf die intrazytosolische GSSG-, ROS-,  $\cdot OH$ - und Eisenkonzentration, sowie auf die DNA-schädigenden Spezies und die Bildung von 8-Oxoguanin. Symbole:  $\uparrow$  Konzentrationszunahme und  $\downarrow$  Konzentrationsabnahme im Vergleich zur Einzelwirkung von  $H_2O_2$ , = keine Konzentrationsveränderung im Vergleich zur Einzelwirkung von  $H_2O_2$ , ? nicht geklärt, grünes Feld: Übereinstimmung zwischen erwarteter Auswirkung und Ergebnis, rotes Feld: keine Übereinstimmung zwischen erwarteter Auswirkung und Ergebnis.....86



# 1 Einleitung

## 1.1 Kombinationswirkungen

Der Mensch ist durch den ständig steigenden Eintrag von Xenobiotika in die Umwelt einer Vielzahl verschiedener, oft kaum erforschter Chemikalien ausgesetzt. Ein Großteil der in die Umwelt entlassenen Chemikalien ist der Gruppe der nicht genotoxischen Chemikalien zuzuordnen. Der Mensch kommt über Rückstände in Lebensmitteln, Grundwasser und Einrichtungsgegenständen mit ihnen in Kontakt. Dabei liegen noch heute für 96 % der jährlich in die Umwelt entlassenen Xenobiotika kaum toxikologische Daten vor, da sie aufgrund ihrer erstmaligen Vermarktung vor 1981 im Zeitraum zwischen 1981 und 2007 rechtlich unter die Altstoffverordnung fielen. Nur für Stoffe, die nach 1981 auf dem deutschen Markt zugelassen wurden, mussten bis 2007 toxikologische Unbedenklichkeitsnachweise erbracht werden (BUND 2008).

Unter der Fülle der Umweltchemikalien haben die genotoxischen bzw. erbgutschädigenden Substanzen eine gesonderte Stellung inne. Da sie ein ernsthaftes, schwer kalkulierbares Gesundheitsrisiko darstellen, unterstehen sie seit dem Inkrafttreten des Chemikalienrechtes REACH (1. Juni 2007) einer gesonderten Regelung. REACH steht für **R**egistrierung, **E**valuierung und **A**utorisierung von **C**hemikalien. Das Gesetz erfasst jedoch nur Stoffe, von denen mehr als eine Tonne pro Jahr in der EU produziert oder in die EU importiert werden (Raupach 2008). Innerhalb von REACH sind die krebserregenden, mutagenen und fortpflanzungsschädigenden Stoffe innerhalb der „besonders besorgniserregenden Stoffe“ als CMR-Stoffe klassifiziert und bedürfen einer Zulassung durch die Europäische Agentur für Chemische Stoffe (ECHA). Diese Zulassung wird für CMR-Stoffe nur erteilt, wenn die Industrie nachweisen kann, dass sie das von den Stoffen ausgehende Risiko angemessen kontrollieren kann (Umweltbundesamt 2008). Zusätzlich findet eine Exposition aufgrund von Rückständen persistenter Chemikalien der CMR-Klasse aufgrund zurückliegender Umwelteinträge vor.

## Einleitung

---

Die in REACH festgelegten Richtwerte sollen eine gesundheitliche Gefährdung aufgrund zu hoher Expositionswerte ausschließen. Keine Beachtung findet dabei, dass Mensch und Umwelt fast ausschließlich mit Mischungen verschiedener Noxen konfrontiert sind. Ungeachtet dessen dienen noch immer die Erkenntnisse über die Wirkung von Einzelsubstanzen als Grundlage für deren toxikologische Bewertung. Dabei ist seit Anfang des 20. Jahrhunderts bekannt, dass Noxen im Gemisch Kombinationswirkungen entfalten können, die von den Einzelwirkungen deutlich abweichen können (Loewe 1927 und Bliss 1939). Im pharmazeutischen Kontext spielen diese Erkenntnisse eine bedeutende Rolle und werden zur Wirkstoffoptimierung eingesetzt. Nicht genotoxische Umweltchemikalien können die Wirkung von genotoxischen Chemikalien nachgewiesenermaßen verstärken: Diese Kombinationswirkungen sind als synergistisch zu bezeichnen, da nur Stoff „A“ eine Eigenschaft besitzt, die durch Stoff „B“, der diese Eigenschaft gar nicht besitzt, dennoch erhöht werden kann. Diese Kombinationswirkungen lassen sich nicht durch die gängigen Modelle zur Berechnung von Kombinationswirkungen modellieren, da sie auf einer Interaktion der Stoffe beruhen. Dies können nach PLACKETT und HEWLET (1952) durch eine Veränderung der Aufnahme von „B“ durch eine von „A“ hervorgerufene Membranstörung oder durch eine direkte Reaktion von „A“ mit „B“ sein. Weitere Beispiele wären eine Hemmung des enzymatischen Umsatzes von „B“ durch „A“ oder die Hemmung der Reparatur von durch „B“ hervorgerufenen Schäden durch „A“. Besonders in der Kanzerogenese spielen Kombinationseffekte durch Interaktionen eine große Rolle (Williams *et al.* 1991, Bolt *et al.* 1993). Eine Sonderstellung unter den genotoxischen Noxen hat  $H_2O_2$  inne, da es von der Zelle selbst generiert wird. Die DNA-schädigende Wirkung von  $H_2O_2$  ist vielfach bestätigt worden (Halliwell & Gutteridge 1999, Henle & Linn 1997, Luo *et al.* 1994). Es liegen ebenfalls Hinweise für eine Apoptose-induzierende Wirkung (Formichi *et al.* 2006, Ogawa *et al.* 2003, Barbouti *et al.* 2002) und für eine kanzerogene und mutagene Wirkung vor (Bartsch & Nair 2006, Diaz-Llera *et al.* 2000, Wiseman & Halliwell 1996, Wiseman *et al.* 1995).

## Einleitung

---

Um Kombinationswirkungen zu beschreiben, wurden im Laufe der Jahre eine häufig redundante und verwirrende Vielzahl von Begriffen verwendet (Berenbaum 1985, Greco *et al.* 1992). Die „toxic unit“ (TU) wird als Einheit der Effektkonzentration verwendet, um das Verhältnis zwischen Effekt und eingesetzter Stoffkonzentration zu beschreiben. Zur Beschreibung einer toxic unit ( $TU > 1$ ) werden die Ausdrücke Antagonismus und Subadditivität gleichermaßen verwendet. Der Begriff Antagonismus ist dabei irreführend, da auch eine  $TU > 1$  Effektverstärkungen gegenüber den Einzeleffekten beschreiben kann. Eine  $TU = 1$  wird unter Verwendung des Modells der Konzentrationsadditivität (CA) als Additivität bezeichnet, eine  $TU < 1$  als Synergismus oder Überadditivität. Zu beachten ist, dass die Aussagekraft eines Begriffes wie Synergismus und Antagonismus nur bei Transparenz in Bezug auf das Beurteilungsmodell gegeben ist (Grimme *et al.* 1998).

Für die meisten Kombinationswirkungen sind Wirkort und Wirkmechanismus der Gemischkomponenten unbekannt. Dies gilt in besonderem Maße bei komplexen Gemischen, die 100 oder sogar über 1000 Einzelkomponenten beinhalten können. Als komplexe Gemische werden solche mit mehr als 10 Komponenten bezeichnet (Groten *et al.* 2001). In Verbrennungsabgasen oder Industrieabwässern finden sich aber in der Regel über 100 Schadstoffe, häufig in unbekannter Zusammensetzung.

Neben Kombinationswirkungen zwischen verschiedenen Xenobiotika treten Kombinationswirkungen auch zwischen chemischen und physikalischen Noxen und mit vom Organismus produzierten inneren Noxen auf. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Erforschung von Kombinationseffekten zwischen endogenen und exogenen Noxen.

Mit dem Ziel, das Wissen über die Rolle von toxischen Kombinationswirkungen zu bündeln und auf verschiedenen Ebenen vernetzt zu bearbeiten, wurde im November 2002 das Promotionskolleg „Toxische Kombinationswirkungen“ an den Universitäten Bremen und Oldenburg ins Leben gerufen. In neun Projekten wurden Aspekte toxischer Kombinationswirkungen vom molekularen Wirkmechanismus über toxische Effekte auf Zell-, Organ- und Organismenebene bis zu Auswirkungen auf Lebensgemeinschaften

## **Einleitung**

---

hin erforscht (Witte *et al.* 2007). Diese Arbeit stellt dabei die Möglichkeit von synergistischen gentoxischen Kombinationswirkungen aufgrund von Interaktionen zwischen endogenen und exogenen Noxen heraus.

### **1.2 Charakterisierung der kombinierten Verbindungen**

Zur Untersuchung der Kombinationswirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und nicht gentoxischen Chemikalien kamen Pentachlorphenol (PCP) und *n*-Hexanol zum Einsatz.

#### **1.2.1 Pentachlorphenol**

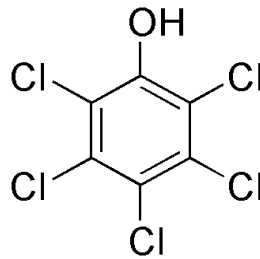
Pentachlorphenol (PCP) fand im letzten Jahrhundert innerhalb der gesamten industriellen Welt Einsatz als Breitbandbiozid, seine jährliche Produktion wurde in den 80er Jahren auf 25000 t bis 90000 t geschätzt. In den USA war PCP zwischenzeitlich das Pesticid mit dem zweithöchsten Verbrauch (Cline *et al.* 1989). PCP gilt heute als ubiquitär verbreitet und lässt sich in jeglichen Umwelträumen wie Boden, Wasser, Luft und im Gewebe unexponierter Personen nachweisen (Schulz & Butte 2007 und Seiler 1991). Seit 1986 ist die PCP-Produktion in Deutschland ausgesetzt, 1989 trat die PCP-Verbotsverordnung der Bundesregierung in Kraft. PCP wurde in die MAK-Werteliste in die Kategorie 2 „krebserregend“ eingeordnet (bayrisches Umweltamt). DEMERS *et al.* (2006) konnten die Korrelation von PCP-Exposition und „non-Hodgkin`s lymphoma, multiple myeloma und Nierenkrebs in einer Kohortenstudie nachweisen. Seit dem PCP-Verbot sinkt die Belastung (Schulz & Butte 2007), der Import von belastetem Holz, Papier, Leder oder Gemüse birgt aber weiterhin Risiken. Eine weitere Expositionsquelle sind vor 1989 mit PCP behandelte Innenräume, häufig Holzvertäfelungen, aus denen PCP aufgrund seines hohen Dampfdrucks bei Raumtemperatur kontinuierlich abgegeben wird und zu einer Belastung der Innenraumluft und des Hausstaubs führt (Janssen & Schepens 1984). Kleinkinder sind durch PCP in Innenräumen stärker belastet als Erwachsene (Cline *et al.* 1989). In Tabelle 1 sind wesentliche physikochemische Eigenschaften von PCP dargestellt.

## Einleitung

---

Liegt eine Innenraumbelastung durch PCP vor, wird dieses über die Atemluft und oral über Hausstaub aufgenommen, was ein relevanter Aufnahmepfad für Kleinkinder sein kann. Ein weiterer relevanter Expositionspfad für in Hausstaub angereicherte Pestizide verläuft über die Haut (Ertl 2006). Die Akkumulationstendenz von PCP in Gewebe ist nur gering (Geyer *et al.* 1986). Nach ARRHENIUS *et al.* (1977) reichert sich PCP auf Zellebene in erster Linie im Zytosol, in den Mitochondrien und in den Mikrosomen an, in geringerem Umfang ist es auch in den Lysosomen nachzuweisen. EINSPOHN & KOEHLER (2007) weisen für lipophile Chemikalien, darunter polychlorierte Biphenyle (PCBs), eine hohe Akkumulationstendenz in den Lysosomen und Mitochondrien nach. PCP besitzt mit einem  $\log P_{O/W}$  von 4,89 in undissoziiertem Zustand eine hohe Lipophilität.

Strukturformel PCP:



Summenformel	$C_6Cl_5OH$
Log $P_{O/W}$	4,89
pK <sub>a</sub> -Wert	4,96
Molmasse	$266,35 \text{ g mol}^{-1}$
Dampfdruck	0,008 Pa (20 °C)

Tabelle 1: physikochemische Eigenschaften von PCP

Quelle: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

## Einleitung

---

Während PCP vielfältige Anwendung als Molluskizid, Fungizid, Algizid, Herbizid, Konservierungsmittel sowie in der Holz- und Papierindustrie fand (Weinbach 1957), ist es heute in vielen Bereichen durch speziellere Biozide obsolet geworden, hat aber außerhalb der EU weiterhin als Holzschutzmittel und Fungizid einen gewissen Stellenwert (IARC 1986).

Seine biozide Wirkung entfaltet PCP über die Entkopplung der aeroben, energiespeichernden Phosphorylierung von der mitochondrialen Atmungskette. Während die Phosphataufnahme schon bei geringen PCP-Konzentrationen vollständig blockiert wird, sind Oxidationsvorgänge vorerst unbeeinträchtigt. Es folgt ein schneller Zusammenbruch der ATP-Konzentration im Zellinneren (Weinbach 1954 und Weinbach 1957). Weiter gilt PCP als effizienter Sulfotransferaseblocker und ATPaseblocker (Seiler 1991 und Weinbach 1957). Obgleich die Entkopplerwirkung von PCP unbestritten eine wichtige Rolle für seine Toxizität spielt, sind weitere toxische Endpunkte von PCP in der Diskussion (Witte & Jacobi 1993, Moorthy & Randerath 1996, Zhu & Chevion 2000, Levy *et al.* 2007). WEINBACH (1954 & 1957) weist auf Mitochondrienschwellungen und eine Erhöhung der Membranpermeabilität bei Mitochondrien durch PCP-Einwirkung hin. Auch andere Autoren diskutieren die Zellmembran als toxischen Endpunkt für PCP, wobei Transportfunktionen für Metalle (Levy *et al.* 2007, Zhu & Chevion 2000) bzw. eine Erhöhung der Membranpermeabilität für andere Stoffe erörtert werden (Jacobi *et al.* 1996). CHEN *et al.* (2004) weisen auf die Korrelation von Lipophilität und Toxizität bei verschiedenen Chlorphenolen einschließlich PCP hin. Die Tendenz, sich in Doppellipidschichten einzulagern und diese dadurch in ihren physikalischen Eigenschaften zu beeinflussen, wurde für PCP auch an künstlichen Membranen nachgewiesen (Mukhopadhyay *et al.* 2004).

Der Abbau von PCP in metabolisch kompetenten Zellen verläuft über mehrere Schritte. Dabei entsteht der gentoxische PCP-Metabolit Tetrachlorhydroquinon (TCHQ), der DNA-Strangbrüche in menschlichen Fibroblasten induziert (Witte *et al.* 1995). TCHQ entfaltet seine gentoxische Wirkung durch Autoxidation zum Tetrachlorsemi-quinon (TCSQ)-Radikal (Carstens *et al.* 1990, Witte *et al.* 1995, Witte *et al.* 2000, Naito *et al.* 1994), wobei es nach NAITO *et al.* (1994) durch die Bildung von Superoxid DNA-



## **Einleitung**

---

Strangbrüche hervorruft, da Superoxid zusammen mit  $O_2$  von der Superoxiddismutase zu  $H_2O_2$  umgewandelt wird, welches wiederum in Anwesenheit von redoxaktivem Eisen oder Kupfer Hydroxylradikale bildet, die stark DNA-schädigend wirken. Verschiedene Forschungsergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass  $\cdot OH$ -Radikale nur einen Teil der durch TCHQ induzierten DNA-Schäden darstellen und das Semiquinonradikal selbst DNA-schädigend wirkt (Witte *et al.* 2000, Carstensen *et al.* 1990).

Zur Oxidation von PCP und damit zur Generation des gentoxischen TCSQ-Radikals sind nur Zellen befähigt, die mit dem Cytochrom P450 Enzymsystem ausgestattet sind. Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Fibroblasten sind nicht mit dem Cytochrom P450 Enzymsystem ausgestattet und können folglich PCP nicht metabolisieren. Es wird jedoch auch eine Möglichkeit der Radikalgeneration durch PCP in metabolisch nicht kompetenten Zellen vermutet. So postulierte PURSCHKE (1999) eine radikalische Kettenreaktion von PCP mit  $H_2O_2$ .

Ein Augenmerk dieser Arbeit liegt auf den gentoxischen Kombinationswirkungen, die PCP als lipophile, nicht gentoxische Umweltchemikalie mit  $H_2O_2$  entwickelt.


### **1.2.2 *n*-Hexanol**

*n*-Hexanol ist ein aliphatischer Alkohol und wurde aufgrund seiner strukturellen Unähnlichkeit zu PCP dann eingesetzt, wenn die Versuchsergebnisse Grund zu der Annahme gaben, dass der durch PCP und  $H_2O_2$  hervorgerufene Kombinationseffekt durch spezifische Wirkeigenschaften von PCP hervorgerufen wurde. *n*-Hexanol ist den nicht gentoxisch wirkenden Umweltchemikalien zuzuordnen. Die physikochemischen Eigenschaften von *n*-Hexanol sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

## Einleitung

---

Tabelle 2: physikochemische Eigenschaften von *n*-Hexanol

Strukturformel <i>n</i> -Hexanol:	
Summenformel	$C_6H_{14}O$
Log $P_{O/W}$	1, 83
Molmasse	$102,18 \text{ g/mol}^{-1}$
Dampfdruck	93 Pa (20 °C)

Quelle: [www.wikipedia.org](http://www.wikipedia.org)

### 1.3 $H_2O_2$ als Induktor von oxidativem Stress durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

#### 1.3.1 Chemische Eigenschaften von ROS

$H_2O_2$  erzeugt oxidativen Stress durch die Bildung von ROS. Unter dem Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) werden radikalische und nichtradikalische Sauerstoffspezies zusammengefasst, denen eine hohe Reaktionsbereitschaft zu eigen ist. Zur Gruppe der ROS werden die Sauerstoffradikale Superoxid ( $O_2^{\cdot-}$ ) und Hydroxylradikal ( $\cdot OH$ ) und die nichtradikalischen Sauerstoffspezies Hydrogenperoxid ( $H_2O_2$ ) und Ozon ( $O_3$ ) gezählt, obwohl weder Hydrogenperoxid noch Superoxid als hochreaktiv eingestuft werden können. Sie können jedoch Vorstufen zum hochreaktiven Hydroxylradikal bilden (Halliwell & Gutteridge 1999). Als freie Radikale sind Moleküle definiert, die ein ungepaartes Elektron besitzen (Halliwell & Gutteridge 1999).

## Einleitung

---

Relevante reaktive Sauerstoffspezies sind:

$\text{H}_2\text{O}_2$	Hydrogenperoxid
$\cdot\text{O}_2^-$	Superoxid
$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
$\text{O}_3$	Ozon

Eine Schlüsselrolle bei der Induktion von Zellschäden durch ROS kommt Übergangsmetallen, vor allem  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}^{3+}$  sowie  $\text{Cu}^+$  und  $\text{Cu}^{2+}$  zu. Sie katalysieren die Bildung von Hydroxylradikalen in der Fentonreaktion:



Goldstein *et al.* (1993)

Weiter ist in der Metall-katalysierten Haber-Weiss-Reaktion die Bildung von  $\cdot\text{O}_2^-$  möglich:



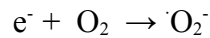
Goldstein *et al.* (1993)

$\text{H}_2\text{O}_2$  ist ein relativ träges Molekül und bewirkt selbst kaum Oxidationen an DNA, Proteinen und Membranen, ist aber fähig, einige Enzyme zu inaktivieren. Da es beim Vorhandensein von Eisen innerhalb der Fentonreaktion Hydroxylradikale generiert, gilt es dennoch als Hauptursache für oxidativen Stress und wird experimentell verwendet, um diesen zu induzieren.  $\text{H}_2\text{O}_2$  wirkt bei einer Langzeitinkubation in der Größenordnung von 10  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  toxisch auf die meisten Zelltypen. Endogen wird  $\text{H}_2\text{O}_2$  enzymatisch gebildet, so generiert Superoxiddismutase  $\text{H}_2\text{O}_2$  zur Entgiftung der Zelle von Superoxid (Halliwell & Gutteridge 1999).

## Einleitung

---

Superoxid entsteht während der zellulären Atmung in der mitochondrialen Elektronentransportkette durch die direkte Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff:



Weiter wird  $\cdot O_2^-$  durch Peroxidasen gebildet.  $\cdot O_2^-$  ist nicht sehr reaktiv und ruft selbst kaum Schäden an DNA, Proteinen und Membranen hervor. Toxisch relevant wird es durch die Reaktion mit anderen Radikalen, in Verbindung mit Eisen und durch die Entstehung von  $H_2O_2$  bei der Entgiftung von  $\cdot O_2^-$ .

Die reaktivste Sauerstoffspezies ist das Hydroxylradikal. Es reagiert mit sämtlichen biologischen Molekülen. Aufgrund seiner extrem kurzen Halbwertszeit ist es nicht in der Lage, durch Diffusion oder Transport Zellkompartimente abseits seines Entstehungsortes zu erreichen (Goldstein *et al.* 1993). Hydroxylradikalschäden entstehen daher vornehmlich dort, wo Übergangsmetalle seine Entstehung katalysieren (Halliwell & Gutteridge 1999).

### 1.3.2 ROS-induzierte Zellschäden

ROS rufen vielfältige Schäden an Zellbestandteilen hervor, darunter an der DNA, den Membranen, Proteinen und Lipiden.  $\cdot OH$  ruft an DNA-Basen und -Zuckern eine große Anzahl von Modifikationen hervor. Die Schäden lassen sich in fünf Gruppen zusammenfassen:  $\cdot OH$  induziert Basenmodifikationen, AP-Stellen, Einzel- und Doppelstrangbrüche und DNA-Protein-Crosslinks (Potts *et al.* 2001). So reagiert es mit Guanin sowie Adenin an der C-Position 4, 5 oder 8. Bei der Oxidation an der C8-Position des gegen  $\cdot OH$  besonders labilen Guanin entsteht das  $\cdot OH$ -Produkt 8-Oxoguanin mit mutagenen Konsequenzen (Potts *et al.* 2001). Auch an Thymin und Cytosin ruft  $\cdot OH$  vielfältige Basenmodifikationen hervor. Weiter ist  $\cdot OH$  fähig, das Zucker-Phosphat-Gerüst der DNA durch die Induktion von Einzelstrangbrüchen (SSB) zu fragmentieren.

Im Inneren der Zellmembran, an den Fettsäureketten der Doppellipidschicht kommt es durch  $\cdot OH$  zu Lipidperoxidationen (LPO). Über eine radikalische Kettenreaktion kann sich der Schaden über die gesamte Membran ausweiten. Es werden ungesättigte Fettsäuren oxidiert. Auch an die Membran assoziierte und in die Membran integrierte

## **Einleitung**

---

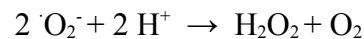
Proteine sind betroffen und können ihre Funktion einbüßen. Zusätzlich entstehen hochtoxische Endprodukte der LPO, wie 8-Hydroxynonenal und Malondialdehyd, die ebenfalls DNA-Schäden hervorrufen (Nair *et al.* 2007, Bartsch & Nair 2006).

Grundsätzlich sind alle Proteine durch ROS gefährdet, das weniger reaktive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> oxidieren jedoch nur SH-Gruppen, während ·OH-Radikale Transportproteine, Rezeptoren und Enzyme durch ihren Angriff funktionslos machen können (Halliwell & Gutteridge 1999). Da Proteine Metallionen an ihrer Oberfläche binden, entstehen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Fentonreaktion in direkter Nähe der Proteine ·OH-Radikale. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hat weiter die Fähigkeit, funktionale Metallionen aus einigen Proteinen herauszulösen (Halliwell & Gutteridge 1999). Oxidativer Stress führt mit zunehmender Intensität zu einem zeitlich begrenzten Wachstumsstop, der bei anhaltendem oxidativen Stress in einen permanenten Wachstumsstop übergehen kann. Ist die Zelle nicht zu einer ausreichenden Adaption fähig, leitet sie den apoptotischen Zelltod ein. Nur bei sehr hoher Belastung mit oxidativem Stress (> 5 mM) kommt es unverzüglich zur Nekrose (Davies 1999).

### **1.3.3 Schutzmechanismen der Zelle**

Die Zelle hat ein weites Spektrum von Schutzmechanismen gegen ROS-induzierte Schäden entwickelt, darunter Enzyme, nicht enzymatische, zelleigene und zellfremde Antioxidanzien sowie Metallchelatoren.

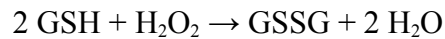
Die wichtigste Rolle bei der Sauerstoffdetoxifikation und Eliminierung von ROS spielen die intrazellulären Enzyme Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase. Die SOD entgiftet die Zelle von ·O<sub>2</sub><sup>-</sup> unter Produktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach folgender Gleichung:



Die SOD ist in Form der Kupfer-Zink-SOD (CuZnSOD) im Zytosol und in Form der Mangan-SOD (MnSOD) in den Mitochondrien lokalisiert (Halliwell & Gutteridge 1999). Sie ist intrazellulär eine Hauptquelle für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Im Zytosol entgiftet die Glutathionperoxidase (GPx) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Verwendung ihres Substrates Glutathion (GSH):

## Einleitung

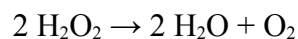
---



Glutathiondisulfid (GSSG) wird unter NADPH-Verbrauch durch Glutathionreduktase wieder zu GSH reduziert. GPx entgiftet  $\text{H}_2\text{O}_2$  in niedrigen Konzentrationen sehr effektiv, ist aber bei oxidativem Stress schnell ausgelastet (Makino *et al.* 1994).

Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist das Thiol mit der höchsten intrazellulären Abundanz (0,2 -10 mM) (Anderson 1998). Glutathion ist zusammen mit den Enzymen Glutathionperoxidase und Katalase entscheidend für die Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die Elimination von ROS. Weiter vermag GSH organische reaktive Verbindungen durch Konjugatbildung zu binden. Durch eine direkte Reaktion mit  $\cdot\text{OH}$  unter Bildung von  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{GS}^\cdot$  fungiert es als Radikalfänger (Marquardt & Schäfer 1997).

Sehr effektiv bei der Eliminierung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in höheren Konzentrationen ist die in Peroxisomen lokalisierte Katalase mit folgender Reaktion:



Bei extrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bis 100  $\mu\text{M}$  arbeitet GPx an der Auslastungsgrenze und eliminiert zwischen 80 % und 90 % des intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Katalase übernimmt bei höherer Belastung den Großteil des  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbaus (Makino *et al.* 2004).

Eine indirekte Rolle beim Schutz vor ROS-induzierten Zellschäden spielen die Reparaturenzyme. Besonders ROS-induzierte DNA-Schäden werden sehr effektiv und schnell repariert (Barbouti *et al.* 2002).

Mit der Nahrung aufgenommene Antioxidantien sind Ascorbinsäure, Tocopherole, Carotinoide und Flavonoide (Halliwell & Gutteridge 1999). Flavonoide schützen indirekt durch die Bindung von Metallionen vor oxidativem Stress (Melidou *et al.* 2005). Auch der Organismus selbst schützt sich durch die Komplexierung von Metallen vor oxidativem Stress. Dabei wird Eisen durch Transferrin transportiert, intrazellulär wird es im Speicherprotein Ferritin gelagert. Kupfer wird an Coeruloplasmin und Metallothioneine gebunden. Schwermetalle werden an Metallothioneine gebunden (Halliwell & Gutteridge 1999).

## Einleitung

---

Auf oxidativen Stress können Zellen innerhalb von wenigen Stunden mit enormen Adaptionsleistungen reagieren. Dabei kann unter anderem die Katalaseaktivität auf ein Vielfaches gesteigert werden (Davies 2000).

### **1.3.4 Medizinische Bedeutung von ROS**

Reaktiven Sauerstoffspezies kommt eine komplexe medizinische Bedeutung zu. Die Erforschung ihrer Rolle bei der Entstehung von chronischen Erkrankungen, Krebs, Entzündungsprozessen und bei Alterungsprozessen ist ein dynamisches Forschungsfeld (Nair *et al.* 2007, Voss & Siems 2006).

Herzinfarkt und Schlaganfall sind in der westlichen Welt weitverbreitete Erkrankungen, in denen ROS eine entscheidende Rolle spielen. Es kommt durch die Verstopfung von Arterien zu Sauerstoffmangel in angrenzendem Gewebe, wobei eine Degradierung von AMP über Adenosin bis zu einer Akkumulation von Hypoxanthin führt. Nach der Beseitigung der Embolie und der Reoxidierung des Gewebes wird Hypoxanthin durch die Xanthinoxidase zu Xanthin oxidiert. Während dieser Reaktion werden ROS in großer Zahl freigesetzt und führen zu schweren Zell- und Gewebeschäden (Halliwell & Gutteridge 1999). Weitere akute Erkrankungen, die ROS-induzierte Schäden mit sich bringen, sind Thrombosen, Sonnenbrand und Entzündungen, sowie bakterielle und virale Infektionen.

Chronische entzündliche Erkrankungen, während deren Verlauf ROS generiert werden und die symptomatisch relevant sind, sind u.a. Arteriosklerose, rheumatische Arthritis, multiple Sklerose, Alzheimer, Parkinson, zystische Fibrose, Morbus Crohn, Colcitis ulcerosa, Neurodermitis und Psoriasis (Halliwell & Gutteridge 1999, Dröge 2002). Zwischen einigen entzündlichen Erkrankungen und der Entstehung von Tumoren ist ein eindeutiger Zusammenhang belegt (Bartsch & Nair 2006), etwa für Hepatitis und Lebertumore, für Magengeschwüre und -tumore und für Morbus Crohn und Darmkrebs (Wiseman & Halliwell 1996, Halliwell & Gutteridge 1999). Neben diesen Zusammenhängen liegen vielfältige experimentelle Hinweise darauf vor, dass ROS und besonders  $\cdot\text{OH}$  durch die Induktion von DNA-Schäden (Wiseman *et al.* 1995), durch die Schädigung von Proteinen, darunter Botenstoffe und DNA-Reparaturenzyme sowie durch Li-

## Einleitung

---

lipidperoxidation zur Krebsentstehung beitragen (Wiseman & Halliwell 1996). Sie fungieren gleichzeitig selbst als Messenger und beeinflussen so die Zellproliferation (Dröge 2002). Eine bedeutende Funktion während Alterungsprozessen werden ROS in der „free radical theorie of ageing“ eingeräumt (Voss & Siems 2006, Dröge 2002). Dabei ist eine Unterscheidung zwischen der oben beschriebenen Relevanz von ROS in alterungsassoziierten Erkrankungen wie Krebs, Arteriosklerose und Alzheimer einerseits und der Rolle von ROS beim Alterungsprozess des gesunden Körpers andererseits notwendig (Halliwell & Gutteridge 1999).

Im Kontext der großen Bedeutung von ROS bei der Entstehung und dem Verlauf von Erkrankungen muss auch die Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  und nicht genotoxischen Umweltchemikalien betrachtet werden. Möglicherweise verstärken bzw. begünstigen nicht genotoxische Umweltchemikalien die Entstehung vieler entzündlicher Prozesse. Daher ist eine Erforschung der Ursachen und Folgen der Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  und nicht genotoxischer Chemikalien notwendig.

### **1.4 Thesen zum Wirkmechanismus von $H_2O_2$ und nicht genotoxischen Chemikalien**

Es wurden zuvor bereits synergistische genotoxische Kombinationswirkungen von  $H_2O_2$  mit einer Reihe von nicht genotoxischen Verbindungen unterschiedlicher chemischer Struktur nachgewiesen (Lueken *et al.* 2004). Folgende fünf Thesen können zur Erklärung der auftretenden Effekte herangezogen werden und waren zu überprüfen:

**These 1:** PCP wirkt spezifisch und verstärkt den oxidativen Stress in der Zelle, indem es Enzyme oder Antioxidantien, die in die ROS-Entgiftung eingebunden sind, hemmt. Dieses würde zu einer erhöhten  $H_2O_2$ -Konzentration im Zellinneren aufgrund eines verlangsamten  $H_2O_2$ -Abbaus führen. Der gesamte genotoxische Effekt würde in diesem Fall durch  $H_2O_2$  hervorgerufen.



## Einleitung

---

**These 2:** PCP generiert, wie von PURSCHKE (1999) vermutet, über eine Kettenreaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  radikalische Verbindungen. Dabei entsteht aus dem nicht gentoxischen PCP ein gentoxisches Produkt, das ebenso wie  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu DNA-Schäden führt. Auf molekularer Ebene unterscheiden sich die Schäden jedoch.

**These 3:** Die Kombinationswirkung beruht auf den lipophilen Eigenschaften von PCP, durch die es sich in Membranen einlagert und dort zu Funktionsstörungen führt. Diese unspezifische Wirkung von Chemikalien, die als Basistoxizität bezeichnet wird (Escher *et al.* 2002), korreliert linear mit dem  $\log P_{O/W}$  (Ok-  
tanol/Wasser-Verteilungskoeffizient) als Maß für die Lipophilie der Verbindung (Antkowiak 2001). 60 % der in die Umwelt eingetragenen Chemikalien können der Gruppe der unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien zugeordnet werden, da sie dieser Korrelation folgen (Nendza *et al.* 1995). Strukturell ist die Gruppe der unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien sehr heterogen (Antkowiak 2001).

Die Basistoxizität unspezifisch wirkender Chemikalien beruht auf ihrer Tendenz, sich in Membranen einzulagern und dadurch Membranfunktionsstörungen hervorzurufen (Cascorbi & Foret 1991). Dadurch bedingen sie Funktionsstörungen membranassoziierter Enzyme (Witte & Jacobi 1993, Cascorbi & Foret 1991, Ahlers *et al.* 1988 und Ahlers *et al.* 1991). EKWALL (1980) postulierte eine erhöhte Membranpermeabilität für Xenobiotika aufgrund von Membraneinlagerungen durch unspezifisch wirkende Chemikalien.

Diese Basistoxizität ist nicht zu verwechseln mit der Toxizität von Anästhetika, die ebenfalls mit der Lipophilie der Verbindung korreliert, jedoch, wie seit kurzem nachgewiesen ist, auf einer spezifischen Hemmung funktioneller Proteine wie dem GABA-Rezeptor beruht (Franks 2006).

**These 3a:** Die Kombinationswirkung beruht auf einer unspezifischen Schädigung der Zellmembran durch PCP. Die daraus resultierende Erhöhung der Aufnahme für  $\text{H}_2\text{O}_2$  führt zu einer erhöhten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Zellinneren. Die DNA-Schäden beruhen wie bei These 1 auf  $\cdot\text{OH}$ -Einwirkung.

**These 3b:** Neben der Zellmembran können durch PCP auch Membranen von Zellorganellen wie Mitochondrien- und Lysosomenmembranen gestört werden. Die Inkubation mit  $H_2O_2$  kann bei Lysosomen zur punktuellen oder vollständigen Ruptur führen, wobei Proteindehydrogenasen und Übergangsmetalle, vornehmlich Eisen, ins Zytosol freigesetzt werden (Tenopoulou *et al.* 2005 und Kurz *et al.* 2004). Durch die erhöhte intrazytosolische Eisenkonzentration kommt es in der Fentonreaktion zu einer verstärkten  $\cdot OH$ -Bildung. Der Kombinationseffekt würde in diesem Fall darin liegen, dass die Lysosomenmembran aufgrund der Membranstörung durch PCP schon durch geringere  $H_2O_2$ -Konzentrationen geschädigt wird. Es ist ebenso denkbar, dass PCP die Aufnahme von  $H_2O_2$  in die Lysosomen, wie in These 3a beschrieben, erhöht, wodurch eine Ruptur der Lysosomen erleichtert würde.

**These 4:** PCP kann Komplexe mit Eisen bilden, die eine sehr hohe Membrangängigkeit zeigen. Dieser Toxizitätsmechanismus wurde an Bakterienzellen bereits nachgewiesen (Levy *et al.* 2007). Dadurch könnte PCP Eisen aus dem Medium oder aus den zelleigenen Lysosomen ins Zytosol einschleusen. Es käme zu einem erhöhten Eisengehalt im Zytosol und durch die Fentonreaktion zur vermehrten Bildung von  $\cdot OH$ . Dieser Effekt wurde nur für PCP nachgewiesen und ist bei anderen Chemikalien nicht zu erwarten.

**These 5:**  $H_2O_2$  induziert Lipidperoxidationsprozesse an der Zellmembran. Dieser Prozess kann durch die Einlagerung von membranaktiven Substanzen verstärkt werden, da diese Desorientierungen in der Doppellipidschicht hervorrufen (Ginsburg *et al.* 1989). Die Zugänglichkeit der Doppelbindungen der gesättigten Fettsäuren für  $H_2O_2$  kann dabei erhöht werden. Dadurch kommt es zu einer Verstärkung der Lipidperoxidation (LPO), deren Endprodukte hochtoxisch sind und nachgewiesenermaßen DNA-Schäden hervorrufen (Ji *et al.* 2001) und kanzerogen wirken (Nair *et al.* 2007).

### 1.5 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit sind Erkenntnisse über den Wirkmechanismus, der den beobachteten toxischen Kombinationswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP, bzw. *n*-Hexanol als nicht gentoxische Verbindung zugrunde liegt, sowie die Abschätzung der Folgen für die Zelle. Hierzu wurden die aufgeführten Thesen zu den Ursachen der Kombinationswirkung auf ihre Stimmigkeit geprüft. Insbesondere wurde untersucht, ob sich der zelluläre Gehalt an  $\cdot\text{OH}$ -Radikalen durch die Kombinationswirkung erhöht und ob die DNA-Schädigungen ausschließlich auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  beruhen.

Der Einfluss von PCP auf das Maß der hervorgerufenen DNA-Schäden und auf das Schadensmuster wurde ebenso wie die Beschaffenheit der DNA-Schäden, ihre Persistenz und der 8-Oxoguaningehalt der DNA untersucht. Weiter wurde die Auswirkung einer vorherigen Depletion des GSH-Spielgels der Zellen betrachtet. Über den Redoxstatus der Zellen sollte das zeitliche Auftreten von ROS im Zytosol und der intrazytosolische GSSG-Gehalt Auskunft geben.

Bei der Abschätzung der Folgen der Kombinationswirkung lag das Augenmerk auf der Apoptose-induzierenden und auf der mutagenen Wirkung der Kombination von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nicht gentoxischen Chemikalien. Apoptose ist unerlässlich zum Schutz vor Entzündungen durch Reste nekrotischer Zellen und vor Mutationen infolge schwerer DNA-Schäden. Es sind vielzählige Apoptosestimulatoren bekannt, darunter ROS und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Eine durch nicht gentoxische Chemikalien verstärkte Mutagenität muss aufmerksam werden lassen, da dabei erste Hinweise auf eine Förderung der durch ROS induzierten Kanzerogenese durch nicht gentoxische Umweltchemikalien vorlägen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

- Analysen Waage: Sartorius, Typ 1002 MP 9, Göttingen
- Lucia comet assay:
  - Microscope Eclipse E 600 W, Nikon, Tokio, Japan
  - Mercury Lamp – C – SHG 1, Nikon, Tokio, Japan
  - Mercury Short Arc Photo Optic Lamp HBO 103 W/2, Osram
  - Auswertungssoftware: Lucia comet assay Single Stain, System for Image Processing and Analysis
- Kamera: Nikon, COHU High Performance CCD Camera, Japan
- SigmaStat®: Version 3
- Brutschrank: Heraeus BBD 6220, Hanau
- Brutschrank: Heraeus B5060 EK-CO<sub>2</sub>, Hanau
- Cleanbench: Heraeus Lamin Air HLBC 2472 GS, Hanau
- Elektrophorese: DNA Sub Cell™, Biorad, Hercules, USA
- Tischzentrifuge: Eppendorf 5414, Hamburg
- Feinwaage: Kern & Sohn, Albstadt
- Fluoreszenzspektrophotometer: Perkin Elmer, LS 50 B, Waltham, USA
- Gefrierschrank: Sanyo, VIP series -86 °C, München
- Heizplatte: IKAMAG REO, IKA® Werk, Staufen
- Kolonienzählgerät: BZG 28, Wiss.-Techn. Werkstätten (WTW), Weilheim
- Kryo-Einfrierhilfe: Nalgen, Cryo 1 °C freezing container, Rochester, USA
- Lysekammern: DNA-sub cell, Biorad, Hercules, USA
- Fluorescencemicroplate Reader: BMG, FLUOstar optima, Offenbach
- Mikrowelle: Bauknecht, MWD 4920

## Material und Methoden

---

- Millipore-Bereiter: Milli-Q<sup>®</sup>, Water Purification System, Millipore S.A. Molsheim, Frankreich
- Netzgerät: CONSORT E 835, Fröbel Labortechnik, Kempten
- pH-Meter: inoLab, WTW, Weilheim
- Sterilfilter: Sartorius, Membranfilter, Göttingen
- Umkehrmikroskop: Olympus CK2, Hamburg
- Zentrifuge: Centrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg

### 2.1.2 Labormaterial

- Apoptose-Assay: Cell Death Detection ELISA<sup>+</sup>, Roche, Basel, Schweiz
- Gewebekulturflaschen, klein: Nunclon<sup>®</sup>, 50 ml, 25 cm<sup>2</sup>, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Gewebekulturflaschen, mittel: Falcon<sup>®</sup>, 250 ml, 75 cm<sup>2</sup>, Becton Dickinson, Heidelberg
- Gewebekulturflaschen, groß: Nunclon<sup>®</sup>, 50 ml, 25 cm<sup>2</sup>, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Kryoröhrchen: 2 ml, steril, Brand, Gießen
- Multipipetten:
  - 200 µl Transferpette, Gilson, Middleton, USA
  - 300 µl Research, Eppendorf, Hamburg
- Multititerplatten:
  - 96well klar, Greiner bio-one, Frickenhausen
  - 12well klar, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Objektträger: 76x26 mm, Omnilab, Bremen
- Petrischalen, unbeschichtet:
  - normal: 94/16, Greiner bio-one, Frickenhausen
  - klein: 58/15, Falcon, Heidelberg
- Pipetten:
  - 5000 µl Research, Eppendorf, Hamburg
  - 1000 µl Referenz, Eppendorf, Hamburg

## Material und Methoden

---

- 100 µl Referenz, Eppendorf, Hamburg
- 10 µl Referenz, Eppendorf, Hamburg
- Pipettenspitzen: ep T.I.P.S., Eppendorf, Hamburg
- Quarz-Küvette: Hellma, Müllheim
- Reaktionscaps: safe lock tubes, 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg
- Reaktionsgefäße: PS-Röhrchen, TC, 14 ml, steril, Cellstar, Greiner bio-one, Frickenhausen
- Sterilfiltereinsätze: Cellulose Acetat Filter, 0,2 µm Porengröße, Sartorius, Göttingen
- Zellkultur-Petrischalen:
  - klein: 58/15, Nunclon™ surface, Nunc, Roskilde, Dänemark
  - mittel: 94/16, Greiner bio-one, Frickenhausen
  - groß: 150/18, Nunclon™, surface, Nunc, Roskilde, Dänemark
- Zellkulturplatten: 96er well, schwarz, µ-clear, Greiner bio-one, Frickenhausen

### 2.1.3 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden im höchst möglichen Reinheitsgrad (p. a.) verwendet, wenn nicht anders vermerkt.

- Accutase, PAA, Pasching, Österreich
- Agarose, SeaKem<sup>â</sup> LE Agarose, FMC Bio Products, Rockland, Maine USA
- Agarose, Sea Plaque, low melting point agarose, FMC Bio Products, Rockland, Maine USA
- Aminosäuren für MEM, Seromed<sup>®</sup>, Biochrom, Berlin
- Ampuwa Wasser, Fresenius, Bad Homburg
- L-Buthioninsulfoximin (BSO), sigma-aldrich, Steinheim
- Calciumchlorid, Merck, Darmstadt

## Material und Methoden

---

- Cremophor EL, Sigma, Deisenhofen
- 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetat (DCF-DA), >97 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Dimethylsulfoxid (DMSO), F.E.R.O.S.A., Barcelona, Spanien
- Dinatriumhydrogenphosphat  $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$ , Merck, Darmstadt
- 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure, sigma-aldrich, Steinheim
- Essigsäure, 80 %, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Ethanol, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- Ethidiumbromid, sigma-aldrich, Steinheim
- Ethylendiamintetraacetat, Dinatriumsalz (EDTA), Serva, Heidelberg
- Ethylmethansulfonat (EMS), > 98 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Formamidopyrimidine Glycosylase (Fpg) (*Escherichia coli*)  $\geq 90\%$ , >20,000U/mg Protein, sigma-aldrich, Steinheim
- fötales Kälberserum (FCS), PAN BIOTECH GmbH, Aidenbach
- Formaldehyd, J T Baker, Deventer, Niederlande
- Glucose, > 99,5 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Glukose-1-hydrat, sigma-aldrich, Steinheim
- Glutathion, reduziert, > 99 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Glutathion, oxidiert, > 98 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Glutathionreduktase, 187 U/mg Protein, sigma-aldrich, Steinheim
- Glycerol, 99 %, sigma-aldrich, Steinheim
- Hepes,  $\geq 99,5 \%$ , Carl Roth, Karlsruhe
- Hepes-Kaliumsalz, sigma-aldrich, Steinheim
- 1-Hexanol, 99,5 %, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Kaliumchlorid, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt
- Kaliumhydroxid, Carl Roth, Karlsruhe
- Kristallviolett, Merck, Darmstadt
- low melting point (LMP)-Agarose, Sea Plaque<sup>®</sup> GTG Agarose, Biozym Diagnostik, Hess. Oldendorf

## **Material und Methoden**

---

- Magnesiumchlorid, J.T. Baker, Deventer, Niederlande
- Methanol,  $\geq 99,6$  %, Scharlau, Barcelona, Spanien
- Methansulfonsäuremethylester (MMS),  $> 98,0$  %, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Minimum Essential Medium (MEM) nach Earle, Seromed<sup>®</sup>, Biochrom, Berlin
- Natriumchlorid, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Natriumdodecylsulfat (SDS), SERVA, Heidelberg
- Natriumhydrogencarbonat, Riedel-de Haën AG, Seelze Hannover
- Natriumhydroxid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Natriumlaurylsarkosinat, sigma-aldrich, Steinheim
- Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH), Natriumsalz, sigma-aldrich, Steinheim
- Pentachlorphenol (PCP), Natriumsalz, umkristallisiert aus Witophen N (mit EtoAc, iso-Prop.), freundlich überlassen von Prof. Dr. Butte, Carl von Ossietzky Universität, Oldenburg
- Penicillin/Streptomycin, Seromed<sup>®</sup>, Biochrom, Berlin
- Rinderserum Albumin, serva, Heidelberg
- Salzsäure, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- Sulfosalicylsäure-dihydrat, sigma-aldrich, Steinheim
- 6-Thioguanin (TG),  $> 98$  %, Sigma, Deisenhofen
- Titriplex III (EDTA), Merck, Darmstadt
- Tris, Appli Chem, Darmstadt
- Triton X-100, Serva, Heidelberg
- Trypsin 0,5 %/EDTA 0,2 %-Lösung (10 ×), Biochrom, Berlin
- Vitamine für MEM, Seromed<sup>®</sup>, Biochrom, Berlin
- 2-Vinylpyridin-monomer,  $> 97$  %, Fluca, Steinheim
- Wasserstoffperoxid, 30 %, Rotipuran stabilisiert, Roth, Karlsruhe



## **Material und Methoden**

---

### **2.1.4 Lösungen**

#### **2.1.4.1 Zellkultur**

Trypsinlösung:

Trypsin/EDTA-Lösung 1 : 10 mit sterilem Ampuwa verdünnt

D-PBS (phosphate buffered saline nach Dulbecco) pH 7,5:

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCl
- 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O
- 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBS (phosphate buffered saline) pH 7,5:

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCl
- 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 H<sub>2</sub>O
- 0,2 g/l MgCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O
- 0,125 g/l CaCl<sub>2</sub>, 6 H<sub>2</sub>O

#### **2.1.4.2 Schadstofflösungen**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stammlösung I (200 mM):

- 204 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %)
  - 9796 µl PBS (eiskalt)
- kurz geschüttelt

## Material und Methoden

---

Stammlösung II (2 mM):

- 100  $\mu$ l SL I
- 9900  $\mu$ l PBS (eiskalt)  
kurz geschüttelt

die Stammlösungen wurden vor jedem Versuch frisch angesetzt und nach maximal sieben Minuten verwendet

PCP Stammlösung I (10 mM):

- 0,0578 g NaPCP
- 20 ml SFM (Raumtemperatur)  
für 5 min mit Magnetprüher bis zur Lösung des NaPCP gerührt  
die PCP-Stammlösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt

*n*-Hexanol Stammlösung (500 mM):

- 0,312 ml *n*-Hexanol
- 2,344 ml DMSO
- 2,344 ml Cremophor  
heftig schütteln  
die *n*-Hexanol-Stammlösung wurde für jeden Versuch frisch angesetzt

Arbeitslösungen:

Sämtliche Arbeitslösungen wurden direkt vor der Schadstoffinkubation in SFM (37 °C) angesetzt und sofort verwendet. Bei der Inkubation mit einer Kombination aus zwei Schadstofflösungen wurden beide in doppelter Endkonzentration eingesetzt und direkt vor Versuchsbeginn mit gleichen Volumina ineinander gemischt.

## **Material und Methoden**

---

### **2.1.4.3 comet assay**

PBS-Puffer (phosphate buffered saline), Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C, pH 7,4:

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCl
- 1,44 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O
- 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Lyse-Stammlösung pH 10 (Lagerung bei RT):

- 146,1 g NaCl
- 37,2 g EDTA (Titrplex III)
- 1,2 g Tris

in dieser Reihenfolge zu 800 ml aqua bidest. geben, nach Zugabe von 8 g NaOH gehen die Salze in Lösung, pH-Wert mit NaOH auf 10 einstellen, 10 g Natriumlaurylsarkosinat zugeben (löst sich nach ca. einer Stunde), mit aqua bidest. auf 890 ml auffüllen.

Lyse-Gebrauchslösung (bei 4 °C verwenden):

- 1 ml Triton X-100
- 10 ml DMSO
- 89 ml Lyse-Stammlösung

NaOH-Stammlösung:

- 200 g NaOH
- ad 500 ml aqua bidest

## **Material und Methoden**

---

EDTA-Stammlösung:

- 14,89 g EDTA (Titrplex III)
- ad 200 ml aqua bidest

Elektrophorese-Arbeitslösung pH > 13 (bei 4 °C verwenden)

- 90 ml NaOH-Stammlösung
- 15 ml EDTA-Stammlösung
- ad 3 l aqua bidest

Neutralisationspuffer pH 7,5:

- 48,5 g/l Tris
- pH-Wert mit konzentrierter HCl einstellen

Ethidiumbromid-Stammlösung (bei 4 °C im Dunkeln aufbewahren):

- 2 mg/ml in aqua bidest

Ethidiumbromid-Arbeitslösung:

- 250 µl SL/4,75 ml aqua bidest

LMP-Agarose:

- 0,125 g LMP-Agarose (Sea Plaque GTG Agarose)
- 25 ml PBS-Puffer
- in der Mikrowelle aufkochen, in 5 Portionen teilen und einfrieren
- vor Gebrauch noch einmal kurz aufkochen

## **Material und Methoden**

---

Objektträgerbeschichtung:

- 3 g Agarose (LE)
- ad 200 ml PBS-Puffer, dreimal aufkochen, danach jeweils auf 60 °C abkühlen lassen, in 60 °C warmes Wasserbad stellen, Objektträger eintauchen und auf einer Seite trocken wischen, Beschichtung horizontal über Nacht trocknen lassen.

fpg-Aufbewahrungspuffer (nach Sigma) 100 ml:

- K-Hepes 1,382 g
- EDTA 0,0292 g
- DTT 0,0154 g
- NaCl 1,1688 g
- Glycerol 10 ml
- auf 100 ml auffüllen, pH 7,6 einstellen

fpg-Protein Stammlösung nach PLÖTTNER (2004) , in Anlehnung an COLLINS (2000):

- 8000 U/ml in fpg-Aufbewahrungspuffer
- in Aliquots von 5 µl bei -80 °C lagern

fpg-Protein Arbeitslösung nach PLÖTTNER (2004) , in Anlehnung an COLLINS (2000):

- 2,5 U/ml in Enzympuffer

Enzympuffer nach COLLINS (2000):

- 40 mM HEPES
- 0.1 M KCl
- 0.5 mM EDTA

## **Material und Methoden**

---

- 0.2 mg/ml RSA
- pH 8.0 mit KOH einstellen

Stammlösung BSO (5mM):

- 0,1112 g/100 ml SFM
- SL in Aliquots zu 5 ml einfrieren

Arbeitslösung BSO (250  $\mu$ M):

- 2,5 ml SL BSO/50 ml MEM

### **2.1.4.4 GSSG-Bestimmung**

GSH-Puffer:

- 143 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
  - 6,3 mM EDTA
- in 1000 ml bidest, mit NaOH auf pH 7,4 einstellen

DTNB-Lösung (10 mM):

- 0,04 g DTNB ad 10 ml GSH-Puffer
- max. 1 Woche bei 4 °C lagern

Salzsäure SSA (10 mM HCl, 1,3 % SSA)

- 1 ml 1 M HCl
  - 1,3 g Sulfosalicylsäure-Dihydrat
- in 100 ml bidest

## **Material und Methoden**

---

### SSA-Lösung (6,5 %ig)

- 3,25 g Sulfosalicylsäure-Dihydrat  
in 50 ml bidest

### daily reagent (DR):

- 6 mg NADPH
  - 2 ml DTNB-Lösung
  - 18 ml GSH-Puffer
- täglich frisch ansetzen und bis zum Gebrauch auf Eis lagern

### Glutathionreduktase (GR)-Lösung:

- 145 µl GR ad 7855 µl GSH-Puffer

### Glutathion (GSH)-Stammlösung 1:

- 12,5 mg GSH  
in 500 µl Salzsäure SSA

### Glutathiondisulfid (GSSG)-Stammlösung 1:

- 12,5 mg GSSG  
in 500 µl Salzsäure SSA

### GSH-Stammlösung 2:

- 10 µl GSH-SL 1  
in 1 ml Salzsäure SSA

## Material und Methoden

---

GSSG-Stammlösung 2:

- 10 µl GSSG-SL 1  
in 1 ml Salzsäure SSA

### *2.1.4.5 Dihydrogen-Dichlorofluorescein-Assay(H<sub>2</sub>DCF-Assay)*

DCF-DA Stammlösung (20 mM):

- 0,0097 g DCF-DA/ml DMSO

DCF-DA Arbeitslösung (30 µM):

- 30 µl SL/20 ml Inkubationspuffer

Inkubationspuffer:

- 50 ml Messpuffer + 0,15 g RSA (0,3 %)

Messpuffer:

- 5 mM Glucose
- 1 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,3 mM CaCl<sub>2</sub>
- 120 mM NaCl
- 5,4 mM KCl
- 25 mM Hepes  
den pH auf 7,35 einstellen



## **Material und Methoden**

---

### ***2.1.4.6 Apoptose-Assay***

Sämtliche Lösungen stammen aus dem „Cell Death Detection Plus“-Kit von ROCHE. Die Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers in Millipore angesetzt und den Empfehlungen entsprechend gelagert.

- Anti-histone-biotin: 450 µl bidest zugeben
- Anti-DNA-pod: 450 µl bidest zugeben
- Positivkontrolle: 450 µl bidest zugeben
- ABTS-Tabletten: 1 Tablette in 5 ml Substratpuffer, Menge vom Versuchsdesign abhängig
- Immunoreagenz: 18 Teile Inkubationspuffer, 1 Teil Anti-DNA-pod, 1Teil Anti-histone-biotin (frisch angesetzt)

### ***2.1.4.7 Koloniebildungsfähigkeit***

Saline A pH 7,2:

- 8 g/l NaCl
- 0,2 g/l KCL
- 1 g/l Glukose-1-hydrat
- 0,35 g/l NaHCO<sub>3</sub>

Lösung steril filtrieren (Lagerung bei 4 °C)

Fixierlösung:

- 4 %ige Formaldehydlösung

Färbelösung

- 5 g/l Kristallviolet

## **Material und Methoden**

---

### **2.1.4.8 HPRT-Assay**

Selektionsmedium

- 10 µg/ml 6-Thioguanin steril in Medium lösen (5 % FKS)  
Saline A, Fixier- und Färbelösung wie bei der Koloniebildungsfähigkeit

### **2.1.5 Zellen und Zellkulturmedien**

C-12350      Normale Humane Dermale Fibroblasten (NHDF) PromoCell®  
GmbH, Heidelberg, Deutschland, Lot-No. 1101102.2

V 79            Permanente Hamsterlungenzellen, freundlich überlassen durch  
Prof. Dr. Speit, Ulm

Serumfreies Medium (SFM), steril filtriert:

- 1 Packung Minimum Essential Medium (MEM) nach Earle,
- in 9220 ml Ampuwa gelöst
- 300 ml 7,5 %ige NaHCO<sub>3</sub>-Lösung
- 120 ml nicht essentielle Aminosäuren (100 ×)
- 240 ml essentielle Aminosäuren (50 ×)
- 120 ml Vitamine

MEM-Medium (12 % FKS) für humane Fibroblasten, steril filtriert:

- 440 ml SFM
- 60 ml FKS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin

## **Material und Methoden**

---

MEM-Medium (5 % FKS) für V79-Zellkulturen, steril filtriert:

- 475 ml SFM
- 25 ml FKS
- 5 ml Penicillin/Streptomycin

Einfriermedium:

- MEM mit 12 % FKS und 10 % (v/v) DMSO versetzt

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

Normale humane dermale Fibroblasten (C12350) sowie Hamsterlungenzellen (V79) wurden im Brutschrank bei 37 °C, in 5 %iger CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellpassage erfolgte, sobald die Zellen eine subkonfluente Dichte aufwiesen. Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden sämtliche zellkulturrelevanten Arbeiten unter sterilen Bedingungen an einer Cleanbench durchgeführt.

Das Pasagieren erfolgte durch Ablösen der Zellen nach Einwirkung von 5 ml Trypsinlösung. Zuvor wurden die Zellen zweimal mit SFM gespült. Nach einer Einwirkzeit von ca. 10 sec wurde die Trypsinlösung abgesaugt. Die Zellen hatten sich nach drei Minuten auf einer Wärmebank oder im Brutschrank von der Oberfläche der Zellkulturflasche gelöst und konnten in 10 ml MEM aufgenommen werden. Da adherente Zellen im abgelösten Zustand zur Verklumpung neigen, wurden diese vorsichtig mehrfach mit einer Glaspipette angesaugt und abgelassen, um zu einer besseren Vereinzelung und damit zu einem gleichmäßigeren Wachstum zu gelangen. Für eine reguläre Passage der Zellen wurde ein Drittel der Zellsuspension in die Zellkulturflasche zurückgegeben und mit frischem MEM versetzt.

## **Material und Methoden**

---

Die Verwahrung in flüssigem Stickstoff stellt die optimale Lagerung lebender Zellkulturen dar. Um die Zellen in Kultur zu nehmen, wurden sie dem Stickstoffaufbewahrungsbehälter entnommen, im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, steril in eine Zellkulturflasche mit MEM gegeben und behutsam vereinzelt. Die Zellen hefteten sich innerhalb von drei Stunden im Brutschrank an die Oberfläche der Zellkulturflasche an. Durch einen Medienwechsel wurden Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums und tote Zellen sowie Zellbruchstücke entfernt.

Um niedrige Zellpassagen in flüssigem Stickstoff zu lagern, wurden diese trypsiniert, in Einfriermedium aufgenommen, vereinzelt und in Kryotubes gegeben. Durch den gleichmäßigen Abkühlungsprozess von 1 °C/min in einem Einfrierbehälter bei -20 °C und nach 4 h bei -80 °C konnten die Zellen schonend eingefroren werden und am nächsten Tag in flüssigem Stickstoff deponiert werden.

Um eine gute Reproduzierbarkeit der Versuchsbedingungen zu gewährleisten, sollte immer eine identische, definierte Zellzahl ausgesät werden. Zur Aussaat wurden die Zellen wie beschrieben trypsiniert, in 10 ml SFM aufgenommen und in ein Reaktionsgefäß aufgenommen. Eine kleine Menge Zellsuspension (20 µl) wurde auf eine Bürker-Türk-Zählkammer gegeben und mikroskopisch gezählt. Das Ergebnis der Auszählung von vier Quadraten diente gemittelt zur Bestimmung der Zellzahl/ml. Die Ausgangszellsuspension wurde auf die gewünschte Zellzahl verdünnt zur Aussaat eingesetzt. Die verwendeten Fibroblasten befanden sich in der 9. - 18. Passage.

### **2.2.2 Schadstoffbehandlung**

Die Schadstofflösungen wurden für jeden Versuch frisch angesetzt. Für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde die Stammlösung in eiskaltem PBS angesetzt und in 37 °C warmem SFM in die Gebrauchslösungen verdünnt. Die Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fand immer mit Gebrauchslösungen statt, die aus einer Stammlösung hergestellt waren, die nicht älter als 7 min war. PCP wurde als Natriumsalz des PCP bei Raumtemperatur in SFM gelöst. Die Gebrauchslösung wurde in 37 °C warmem SFM angesetzt und direkt verwendet. *n*-Hexanol wurde in einer Mischung aus DMSO und Cremophor angesetzt und in SFM für die Gebrauchslösung verdünnt.

## **Material und Methoden**

---

Vor der Inkubation mit den Schadstofflösungen wurden die Zellen zweimal mit 37 °C warmem SFM gespült, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Die Schadstoffinkubation erfolgte im Brutschrank bei 37 °C. Die Menge der Schadstofflösung variierte mit dem Versuchsdesign. Im Anschluss an die Begiftung wurde die Schadstofflösung gründlich abgesaugt und die Zellen nach einem Spülschritt mit SFM nach Angaben des jeweiligen Versuchsprotokolls weiterbehandelt.

### **2.2.3 Einzelzellgelelektrophorese (comet assay)**

Der alkalische comet assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, dient dem Nachweis von DNA-Schäden auf Einzelzellebene. Durch die Methode können Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, AP-Stellen (Apurinstellen und Apyrimidinstellen) und enzymatisch durch Endonukleaseaktivität entstandene Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden (Tice *et al.* 2000, Fairbairn *et al.* 1995). Der comet assay gilt als sehr sensitiv und ist auch für einen geringen Probenumfang geeignet. Durch Modifikationen der Methode gibt der comet assay zusätzlich Informationen zur Persistenz von DNA-Schäden und zum Auftreten spezieller Basenmodifikationen, wie z.B. 8-Oxoguanin (Collins *et al.* 1993). Die Durchführung des modifizierten comet assays ist weiter unten im Text erläutert.

Der comet assay wurde in Anlehnung an SINGH *et al.* (1988) nach den Empfehlungen von TICE *et al.* (2000) durchgeführt. Die Zellen wurden in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm ausgesät und 48 Stunden bis zur Subkonfluenz belassen. Vor der Schadstoffinkubation wurden sämtliche Petrischalen auf ein gleichmäßiges, subkonfluentes Zellwachstum kontrolliert.

Der Schadstoffinkubation gingen zwei Waschschriffe mit SFM voraus, dann wurde die frische, maximal 7 min alte Schadstofflösung aufpipettiert und die Zellen für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Entfernen der Schadstofflösung sorgten zwei Spülschritte mit eiskaltem D-PBS für eine Minimierung der DNA-Reparatur. Nach dem Trypsinieren wurden die Zellen in 0,5 ml eiskaltem D-PBS aufgenommen und schonend vereinzelt.

## Material und Methoden

---

Die Einbettung der Zellen in das Elektrophoresegel erfolgte durch die Vermischung von 10 µl Zellsuspension mit 90 µl 0,5 %iger low melting poit-(LMP)-Agarose bei 37 °C. Diese Mischung wurde auf mit Agarose beschichtete Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas versehen und bei 4 °C ausgehärtet. Die anschließende Lyse von 60 -180 min Dauer sorgte für eine vollständige Zersetzung der Zell- und der Zellkernmembran, so dass die DNA-Fragmente während der Elektrophorese in das Gel austreten konnten. Im darauf folgenden „alkaline unwinding“ entwinden sich die DNA-Stränge; ein Schritt, der neben der Detektion von Doppelstrangbrüchen auch die Detektion von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und Apurin-Stellen ermöglicht.

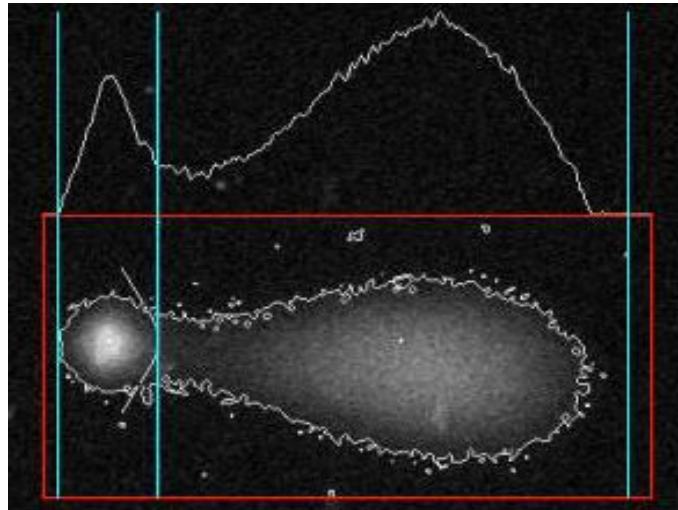


Abbildung 1: digitale Auswertung einer Zelle, die im comet assay als Komet erscheint. Die Zelle stellt den Kopf des Kometen dar, dort befindet sich der Großteil der DNA. Der Schweif wird durch DNA-Fragmente gebildet, die aus der Zellregion in das Gel gewandert sind. Das Programm erkennt automatisch Kern- und Schweifregion und wertet deren Maße und Helligkeit aus.

Die Elektrophorese wurde für 20 min bei 300 mA, 25 V im Eisbad durchgeführt. Die Objektträger (OT) lagerten in der Elektrophoresekammer lückenlos aneinander, so dass ein gleichmäßiger Spannungsaufbau gewährleistet war. Vor der anschließenden Trock-

## **Material und Methoden**

---

nung der OTs wurden diese drei Mal für jeweils fünf Minuten neutralisiert, um störende Hintergrundfluoreszenz während der Auswertung zu minimieren (Tice *et al.* 2000).

Zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die OTs mit Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml) angefärbt. Das fluoreszierende Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und macht sie dadurch im UV-Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda$  515 – 560 nm sichtbar. Für eine statistisch gute Datenlage wurden auf jedem OT 50 Zellen vermessen und verschiedene Daten, wie die DNA-Menge in der Kernregion, dem „Kopf“ der Zelle, die ausgetretene DNA-Menge im „Schweif“ des Kometen, Schweiflänge, tail moment und das Olivemoment berechnet. Das tail moment stellt das Produkt aus der Länge des Schweifes und seiner Fluoreszenzintensität im Verhältnis zur Kernregion (Kometenkopf) dar. Es wurde in dieser Arbeit zur Beschreibung des beobachteten DNA-Schadens verwendet. Je Probe wurden zwei OTs ausgewertet, so dass jedes tail moment, soweit nicht anders vermerkt, den Median von 100 Zellen darstellt.

### ***2.2.3.1 Persistenz***

Verschiede Noxen rufen unterschiedliche, für sie charakteristische DNA-Schäden hervor. Die Persistenz dieser Schäden unterscheidet sich teilweise drastisch, da sie von verschiedenen DNA-Reparaturenzymen in unterschiedlicher Geschwindigkeit repariert werden.

Reinkubiert man die Proben nach der Begiftung in MEM, kann man den Fortschritt in der Reparatur anhand eines sinkenden tail moments beobachten. Die Reinkubation erfolgt nach Abnahme der Schadstofflösung und Spülen der Zellen mit SFM für 15 – 120 min im Brutschrank bei 37 °C. Die Weiterbehandlung wurde wie oben beschrieben durchgeführt.

### ***2.2.3.2 Bestimmung von enzymsensitiven Stellen (ESS) im comet assay durch Einsatz von Formamidopyrimidin Glykosylase (fpg)***

DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, die im comet assay sichtbar werden, können durch OH-Radikale hervorgerufen sein. Neben Einzel- und Doppelstrangbrüchen rufen

## **Material und Methoden**

---

OH-Radikale an der DNA verschiedene Basenmodifikationen hervor. Das Enzym Formamidopyrimidin Glykosylase (fpg) erkennt verschiedene, durch OH-Radikale hervorgerufene Basenmodifikationen und beseitigt diese. Eine besonders hohe Bildungsrate besteht für die Basenmodifikation 8-Oxoguanin, welche im comet assay mit besonders hoher Sensitivität nachgewiesen werden kann (Collins 2005). 8-Oxoguanin entsteht in der Zelle ca. 180 mal/d, u.a. durch OH-Radikale, die durch normale Stoffwechselprozesse induziert sind, gilt aber auch als Marker für erhöhten oxidativen Stress (Shigenaga *et al.* 1989). Fpg schneidet die N-glykosidische Bindung und entfernt dadurch die fehlerhafte Base. Es ist zusätzlich als AP-Lyase aktiv und schneidet in einem zweiten Schritt die DNA in unmittelbarer Nähe der entstandenen AP-Stelle, so dass ein sekundärer Einzelstrangbruch entsteht. Dieser ist im alkalischen comet assay detektierbar (Collins 2000).

Die Nachbehandlung mit fpg wurde wie von COLLINS *et al.* (1993) für Endonucleasebehandlung beschrieben, modifiziert nach PURSCHKE (2004) nach der Lyse der Zellen durchgeführt. Auf eine sorgfältige Äquilibration für drei mal fünf Minuten in Enzym-puffer folgte die Inkubation mit 200 µl fpg-Lösung für 30 min im Brutschrank. Die weiteren Schritte verliefen wie zuvor für den comet assay beschrieben.

### **2.2.3.3 Depletion des GSH-Spiegels**

Wird die Neusynthese von Glutathion inhibiert, sinkt der Glutathiongehalt der Zelle auf einen Bruchteil der ursprünglichen Konzentration ab. Die Depletion des intrazellulären GSH kann zuverlässig durch eine Inkubation mit Buthioninsulfoximin (BSO) vorgenommen werden (Anderson 1998). BSO hemmt die Glutaryl-Cysteinsynthetase und unterbindet dadurch die Neubildung von GSH. In diesem Versuch wurden die Zellen einer 18stündigen Inkubation in mit 250 µM BSO versetztem MEM unterzogen. Die Behandlung erzeugte in vorangegangenen Versuchen unter vergleichbaren Bedingungen keine Einschränkung der Vitalität der Zellen (Klocke 2007). Der weitere Versuchsablauf entspricht der unter Punkt 2.2.3 beschriebenen Durchführung des comet assays.



## Material und Methoden

---

### 2.2.4 Bestimmung des Glutathiondisulfid (GSSG)-Gehaltes der Zelle

Glutathion liegt im Zytosol zu 98 % in Form von GSH vor. Nur ca. 2 % entfallen auf die Disulfid-Form GSSG (Anderson 1998). Unter oxidativem Stress verschiebt sich dieses Verhältnis kurzfristig, so dass sich der Nachweis von Verschiebungen in der intrazytosolischen GSSG-Konzentration zur Detektion von ROS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zytosol eignet.

Da Glutathion unter Versuchsbedingungen sehr leicht oxidiert wird und schon die artifizielle Oxidation von nur einem geringen Prozentsatz des intrazytosolischen Glutathions zu einer deutlichen Erhöhung des GSSG-Gehaltes führt, bedarf der GSSG-Nachweis einer sehr sorgfältigen Durchführung.

Die Bestimmung des Gesamtglutathion-Gehaltes wurde photometrisch bei 412 nm in Anlehnung an VANDEPUTTE *et al.* (1994) über die Reduktion von 5-5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) durch GSH zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB<sup>-</sup>), einem photometrisch messbaren Produkt, durchgeführt. Dabei reduziert die Glutathionreduktase unter NADPH-Verbrauch beständig GSSG zu GSH, so dass der Gesamtglutathiongehalt erfasst wird. Zur Bestimmung des GSSG-Gehalt einer Probe muss diese vor der Reaktion mit DTNB mit Vinylpyridin versetzt werden. Vinylpyridin maskiert die Thiofunktion des GSHs und entzieht es dadurch dem Glutathionpool, so dass nur GSSG nachgewiesen wird (Vandeputte *et al.* 1994).

Die Bestimmung des Gesamtglutathion- und des Glutathiondisulfidgehaltes erfolgte in drei Schritten in Anlehnung an SIERTS-HERRMANN (2003): Zunächst wurde die Schadstoffinkubation und die Aufarbeitung der Proben durchgeführt. Im Anschluss wurde der GSSG-Gehalt bestimmt, im letzten Schritt erfolgte die Proteinbestimmung nach LOWRY *et al.* (1951), um den GSSG-Gehalt in Relation zur Zellmasse setzen zu können (Sierts-Herrmann 2003).

Zur Begiftung wurden die humanen Fibroblasten auf subkonfluentes Wachstum überprüft und zweimal mit 37 °C warmen PBS gewaschen, bevor sie mit Accutase vom Zellkulturgefäß abgelöst wurden. Daraufhin wurden die Zellen in Reaktionsgefäßen gepoolt und in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Die Resuspension des Pellets erfolgte in

## **Material und Methoden**

---

PBS, die Zellzahl wurde auf  $10^6$  Zellen/ml eingestellt und jeweils 750  $\mu$ l Zellsuspension in Reaktionsgefäßen mit 750  $\mu$ l Schadstofflösung für 5 min im Brutschrank begiftet. Die Schadstofflösungen wurden im Unterschied zu den anderen Versuchen in PBS angesetzt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand (1500  $\mu$ l) mit 15  $\mu$ l 1 M HCl angesäuert und zur späteren GSSG-Bestimmung bei  $-80$  °C eingefroren. Das Pellet wurde in 600  $\mu$ l gekühlter HCL (10 mM) gelöst und homogenisiert. Es folgte die Abnahme von 100  $\mu$ l des Lysates zur Proteinbestimmung. Die verbleibenden Proben wurden nach Zugabe von 50  $\mu$ l 6,5 %iger SSA in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand, der nun das intrazytosolische GSSG beinhaltet, wurde bei  $-80$  °C zwischengelagert.

Zur Quantifizierung des GSSG-Gehaltes wurde aus den aufgetauten Überständen je 100  $\mu$ l abgenommen und mit 5  $\mu$ l Vinylpyridine für 2 h geschüttelt, so dass nun von jeder Probe eine unbehandelte und eine derivatisierte Probe zur Verfügung stand. In einer Multititerplatte (MTP) wurden 22,9  $\mu$ l Probe, 22,9  $\mu$ l Glutathionreduktase und 174,2  $\mu$ l daily reagent (DR) gemischt und bei 412 nm im Mikroplattenreader gemessen. Zur Berechnung des GSSG- und des Gesamtglutathiongehaltes dienten zwei mitgeführte Eichreihen. Der Proteingehalt der Proben wurde nach LOWRY *et al.* (1951) bestimmt.

### **2.2.5 Messung der ROS-Zunahme im Zellinneren im H<sub>2</sub>DCF-Assay**

Der H<sub>2</sub>DCF-Assay ermöglicht die Beobachtung von ROS-Entstehungsprozessen in Zellen *in vitro*. Er dient dem Nachweis von radikalischen Verbindungen, nicht aber von  $\cdot\text{O}_2$  und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (LeBel *et al.* 1992). Dem Assay zugrunde liegt die fluoreszierende Eigenschaft von Dichlorfluoreszein (DCF), welches erst innerhalb der Zelle aus H<sub>2</sub>DCF-Diacetat (H<sub>2</sub>DCF-DA) gebildet wird (Blackstone *et al.* 2004).

Um Zellen mit H<sub>2</sub>DCF zu beladen, werden diese mit H<sub>2</sub>DCF-DA inkubiert. H<sub>2</sub>DCF-DA wird von der Zelle leichter aufgenommen und im Zellinneren durch Esterasen in das hydrophilere H<sub>2</sub>DCF und Acetat gespalten. H<sub>2</sub>DCF wird vom  $\cdot\text{OH}$ -Radikal zum fluoreszierenden DCF oxidiert werden. Die Methode eignet sich besonders für die Beobachtung der ROS-Generation in Echtzeit am Mikroskop oder im Fluoreszenzspektrometer.

## **Material und Methoden**

---

Die Fluoreszenzmessung erfolgte in Anlehnung an SCHMIDT (2005) in einer Quarzküvette an suspendierten Zellen, die durch ständiges Rühren in der Flüssigkeitssäule gehalten wurden. Die subkonfluenten humanen Fibroblasten wurden zunächst mit Messpuffer gespült, dann trypsiniert, gepoolt und gewaschen. Die Waschschriffe erfolgten durch Aufnahme in Messpuffer und anschließende Zentrifugation. Die Zellen einer subkonfluenten 75 cm<sup>2</sup> großen Zellkulturflasche wurden für 15 min mit H<sub>2</sub>DCF-DA beladen, zweimal gewaschen, in frischem Messpuffer aufgenommen und in einer Quarzküvette ins Fluoreszenzspektrometer gegeben. Die Grundfluoreszenz der unbehandelten Zellen wurde für 100 sec aufgezeichnet, nach Zugabe der Schadstofflösungen wurde die Messung über 120 sec fortgeführt. Die Fluoreszenzzunahme wurde als Steigung  $m$  (%/sec) der Grundfluoreszenz mit vier Einzelmessungen/sec über 50 sec dargestellt.

### **2.2.6 Apoptoseinduktion**

Als Apoptose wird der von der Zelle aktiv gesteuerte Abbauprozess bezeichnet, bei dem sich die apoptotische Zelle komplett fragmentiert und ihre Bestandteile von Nachbarzellen aufgenommen werden. Apoptotische Zellen weisen über die Dauer des Apoptoseprozesses spezifische Merkmale auf, die zeitlich festgelegt sind und teilweise aufeinander aufbauen. Auf die Apoptoseinduktion folgen Chromatinkondensation, Kondensation von Zellkern u. Zytoplasma, DNA-Fragmentation in Bruchstücke von 180 Basenpaaren und deren Vielfache (Mono- und Oligonukleotide) durch spezifische Endonucleasen, Phosphatidylserin-switch von der Innenseite der Zellmembran auf deren Aussenseite, Zerfall der Zelle in apoptotische Körperchen und Phagozytose durch umliegende Zellen.

Der CDD<sup>+</sup> ELISA Assay beruht auf dem Nachweis von Mono- und Oligonukleotiden, die im Laufe des apoptotischen DNA-Abbaus entstehen. Sie treten aus dem Zellkern der apoptotischen Zelle ins Zytosol aus und können durch Zentrifugation von der im Zellkern befindlichen DNA getrennt werden. Die Durchführung erfolgte nach Anleitung des Herstellers ROCHE.

10.000 Zellen humaner Fibroblasten wurden pro well 48 Stunden vor Versuchsbeginn in eine Mikrotiterplatte (MTP) ausgesät. Nach einer mikroskopischen Kontrolle der Zellen wurden diese zweimal mit SFM gespült und direkt im Anschluss für 15 min mit der

## **Material und Methoden**

---

Schadstofflösung inkubiert. Auf das Abnehmen der Schadstofflösung folgte ein weiterer Waschschrift mit SFM, bevor den Zellen frisches MEM zugegeben wurde. Zellosterluste während der Begiftungsphase wurden durch eine zweite mikroskopische Kontrolle ausgeschlossen.

Es folgte eine 24stündige Reinkubationszeit mit anschließender mikroskopischer Kontrolle. Nach Abnahme des Mediums erfolgte die Lyse der Zellen durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer. Nach 30 min wurden die lysierten Zellen durch mehrfaches Aufziehen in einer Multipipette suspendiert und dann für 10 min bei 200 g abzentrifugiert, um die zytoplasmatische Fraktion mit der fragmentierten DNA von hochmolekularen Zellbestandteilen wie dem Zellkern zu trennen. Die Zugabe von 20 µl Überstand in die wells der mit dem Biotin-bindenden Protein Streptavidin beschichteten MTP musste daher mit großer Sorgfalt vorgenommen werden. Die Proben wurden mit 80 µl frisch angesetzter Immunoreagenz gemischt und für zwei Stunden mit 300 rpm auf einem MTP-Schüttler inkubiert, nachdem die MTP mit einer Klebefolie abgedichtet worden war. Für die Genauigkeit des Assays war es wichtig, nach dem Schütteln die Flüssigkeit mit den ungebundenen Antikörpern rückstandsfrei aus den wells zu entfernen. Auf das Absaugen der Proben folgten daher drei Waschschrift mit Inkubationspuffer. Die Farbreaktion erfolgte durch Zugabe von je 100 µl ABTS-Lösung in die trockenen wells, wobei die Proben für 15 min bei 250 rpm geschüttelt wurden. Die Extinktion wurde bei 405 nm nach Zugabe von 100 µl ABTS-Abstopplösung im Mikroplattenreader gemessen.

### **2.2.7 Koloniebildungsfähigkeit**

Die Fähigkeit einer Zelle, durch wiederholte Teilung eine Kolonie zu bilden wird als Koloniebildungsfähigkeit (KBF) in % angegeben. Da die Kolonien erst sieben Tage nach dem Schadensereignis erfasst werden, ist die KBF ein sensibles Merkmal für langfristige Effekte einer zeitlich begrenzten Belastungssituation.

Die Koloniebildungsfähigkeit von V79 wurde zur Bestimmung der Überlebensrate und der „cloning efficiency“ im Vorfeld und während des HPRT-Assays zur Bestimmung der Mutagenität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP im HPRT-Assay untersucht. Dazu wurden V79-Zellen in Rouxflaschen ausgesät und nach Erreichen der Subkonfluenz verwendet.

## **Material und Methoden**

---

Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zunächst zweimal mit SFM gewaschen und anschließend mit der Schadstofflösung für 15 min im Brutschrank inkubiert. Nach dem Absaugen der Schadstofflösung wurden die Zellen zweimal mit SFM gewaschen, trypsiniert, in 10 ml SFM aufgenommen und zweimal 1:10 in SFM verdünnt. Die unbehandelte Kontrolle wurde gezählt, danach wurde aus jeder Probe eine Zellsuspension von 250 Zellen/ml in MEM angesetzt, in 5 Petrischalen je 1 ml gegeben und verteilt. Nach ca. 7 Tagen waren die überlebenden Zellen in der unbehandelten Kontrolle zu mit dem bloßen Auge sichtbaren Kolonien herangewachsen. Alle Schalen wurden mit Saline A gewaschen, für 10 Minuten mit 4 %iger Formaldehydlösung fixiert und mit Kristallviolett-färbelösung angefärbt. Zur Bestimmung der KBF wurden die gezählten Kolonien zu den 250 ausgesäten Zellen prozentual in Verhältnis gesetzt.

### **2.2.8 Test auf Mutagenität im HPRT-Assay**

Im HPRT-Mutagenitätstest werden Vorwärtsmutationen des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (*HGPRT*)-Gens erfasst. Unter Zugabe des Purinanalogons 6-Thioguanin zum Nährmedium wirkt die HGPR-Transferase des Wildtyps tödlich, da das Enzym das Purinanalogon zu letal wirkenden Nukleosid-5-monophosphaten metabolisiert. Mutanten mit inaktivem *HGPRT*-Gen wachsen auch in 6-Thioguanin-haltigem Nährmedium und bilden Kolonien (Glatt 1993).

Der HPRT-Assay zum Nachweis der Mutagenität der zu testenden Schadstofflösungen wurde mit V79-Zellen nach OECD Richtlinie 476 und in Anlehnung an BRADLEY *et al.* (1981) durchgeführt. Berücksichtigung fand weiterhin die OECD-Richtlinie RL 67/548/EWG Anhang V „Methoden zur Bestimmung der Toxizität“, in der unter „B. 15. Genmutation“ die empfohlene Überlebensrate bei höchster Schadstoffkonzentration mit 10-20 % angegeben ist. Als Negativkontrolle wurde SFM, als Positivkontrolle Ethylmethansulfonat (EMS) mit 15minütiger bzw. 60minütiger Begiftungszeit eingesetzt. Die Überlebensrate wurde wie oben beschrieben anhand der Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Die verbliebenen Zellen wurden weiterkultiviert. Während der Expressionsphase (12 Tage nach Schadstoffinkubation) wurden die Zellen bei Erreichen der Konfluenz geteilt, wobei jeweils  $10^7$  Zellen weiterinkubiert wurden. Im Anschluss

## **Material und Methoden**

---

an die Expressionszeit wurden die Zellen trypsiniert und zur Erfassung der absoluten Koloniebildungsfähigkeit in Petrischalen (Ø 5 cm) in 5 Parallelen ausgesät (250 Zellen/Schale). Die absolute Koloniebildungsfähigkeit war für die Ermittlung der Klonierbarkeit der Zellen (cloning efficiency) notwendig. Gleichzeitig wurden zur Selektion der Mutanten  $5 \times 10^5$  Zellen in Petrischalen (Ø 15 cm) ausgesät und in Medium mit  $10 \mu\text{g/ml}$  6-Thioguaninzusatz weiterkultiviert. Pro Konzentration wurden 4 Parallelen angelegt. Nach 12 Tagen Inkubationszeit wurden die Mutantenkolonien mit Formaldehydlösung fixiert und nach Färbung mit Kristallviolettlösung quantitativ erfasst. Die Mutantenfrequenz beschreibt die Anzahl der Mutanten pro  $10^6$  klonierbaren Zellen. Die Mutationsrate wurde anhand der KBF korrigiert.

Statistische Auswertung des HPRT-Assays:

$$\text{Koloniebildungsfähigkeit (KBF \%)} = \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{250}$$

$$\text{Anzahl der klonierbaren Zellen} = \text{KBF} * 500.000$$

$$\text{Mutantenfrequenz (MF)} = \frac{\text{Anzahl der Mutantenkolonien} * 10^6}{\text{Anzahl der klonierbaren Zellen}}$$

Formel zur Berechnung der Fehlerfortpflanzung:

$$\Delta E = \sqrt{\left( \frac{(\Delta^2 \text{KBF})}{(x \text{KBF})} + \frac{(\Delta^2 \text{Mutanten})}{(x \text{Mutanten})} \right)}$$

$\Delta$  = Standardabweichung

$\Delta E$  = Fehlerfortpflanzung

### 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit waren der Gewinn von Erkenntnissen über Ursachen und Folgen der Kombinationswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und nicht genotoxischen Umweltchemikalien. Der Schwerpunkt lag dabei auf Untersuchungen zu den Kombinationswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP.

#### 3.1 Untersuchungen zu den Ursachen der erhöhten Genotoxizität

Zur Klärung der Ursachen der Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP wurden Änderungen der ROS-Konzentration im Zytosol im  $\text{H}_2\text{DCF}$ -Assay, des Redoxstatus der Zelle durch die Messung des GSSG-Gehalts und das Auftreten von genotoxischen Effekten im comet assay untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die Ähnlichkeit bzw. auf Unterschiede zwischen den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten und den durch Kombinationswirkung induzierten Effekte gelegt.

##### 3.1.1 Genotoxizität (comet assay)

Um die genotoxischen Effekte der Einzel- und Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP zu untersuchen, wurde der comet assay eingesetzt. Zunächst erfolgte der Nachweis der synergistischen Kombinationswirkung, wie sie von LUEKEN *et al.* (2004) beschrieben wurden. Abweichend wurden die Proben nicht für eine Stunde sondern für 15 min begiftet, da in Vorversuchen für  $\text{H}_2\text{O}_2$  eine maximale DNA-schädigende Wirkung nach 15 min nachgewiesen wurde (Schewe 2002).

##### 3.1.1.1 Einzel- und Kombinationswirkungen

Die Begiftung von humanen Fibroblasten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Konzentrationen von 0-100  $\mu\text{M}$  für 15 min bewirkte eine konzentrationsabhängig ansteigende DNA-Schädigung mit einem maximalen tail moment (tm) von 90 (Abbildung 2). Dabei führten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen unter 20  $\mu\text{M}$  zu keiner nachweisbaren Schädigung. Eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  erzeugte einen geringen DNA-Schaden zwischen 2 und 9 tm. Diese Konzentration wurde für die Beobachtung von Kombinationseffekten ausgewählt, da sich

## Ergebnisse

Kombinationseffekte bei geringer Schädigung durch die Einzelsubstanzen am besten beobachten lassen.

Die Ergebnisse zu den Kombinationswirkungen sind in Abbildung 3 dargestellt. PCP zeigte in den eingesetzten Konzentrationen von 0-1000  $\mu\text{M}$  keine genotoxische Wirkung. Der durch 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  gesetzte Initialschaden wurde konzentrationsabhängig durch PCP auf bis zu 105 tm verstärkt.

Beim Einsatz von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen, die im comet assay kein erhöhtes tail moment hervorriefen, trat auch in Kombination mit PCP kein synergistischer Kombinationseffekt auf (Daten nicht gezeigt).

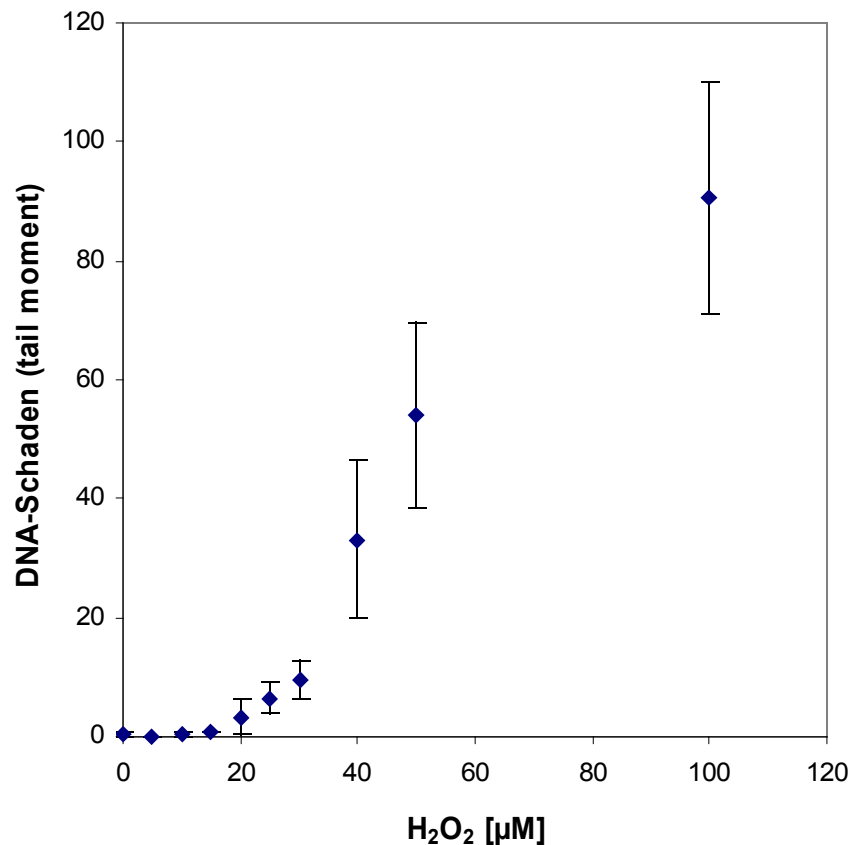


Abbildung 2: Durch eine 15minütige Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zwischen 0  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  hervorgerufener DNA-Schaden, dargestellt als tail moment. Gezeigt sind die Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Versuchen mit der Standardabweichung.



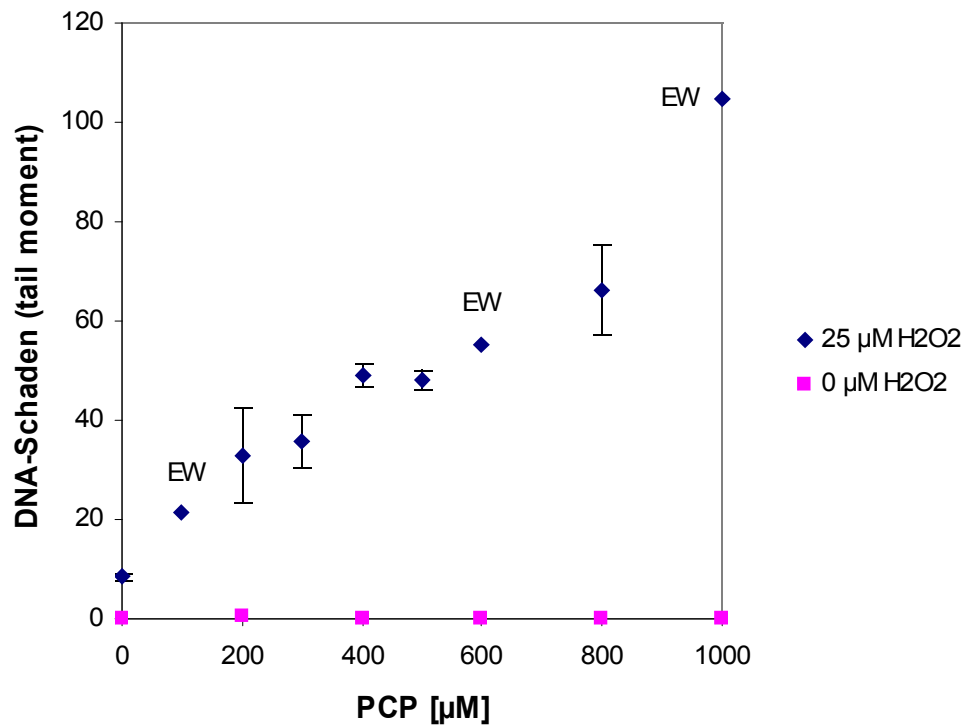


Abbildung 3: DNA-Schaden nach 15minütiger Begiftung mit 25  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP in aufsteigender Konzentration. Die Dosis-Wirkungskurve für die Kombination setzt sich aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Versuchen zusammen, Einzelwerte sind mit EW gekennzeichnet. Der Dosis-Wirkungskurve für PCP liegt ein Einzelversuch zugrunde.

Die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erzeugten DNA-Schäden zeigen in einer Zellpopulation keine Normalverteilung. Zur Ermittlung eines DNA-Schadens wird daher der Median des tail moments von 50 bzw. 100 Zellen bestimmt. Die Einzelwerte für ein bestimmtes tm weisen nach der Begiftung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine charakteristische Verteilung auf, während andere Agenzien Schäden mit anderen Verteilungsmustern hervorrufen. So wurde für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- bzw. Radikal-induzierte DNA-Schäden häufig keine Normalverteilung beobachtet (Stang 2008, Schmidt 2003, Stratis 2002) während für Schäden, die durch Methylantien hervorgerufen wurden, Normalverteilungen nachgewiesen werden konnten (Stang, 2008).

Die Ergebnisse zur Verteilung der DNA-Schäden sind in Abbildung 4 und Abbildung 5 dargestellt. Es wurde geprüft, ob die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnox, bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP in Kombination hervorgerufenen DNA-Schäden eine ähnliche Verteilung aufweisen. Zur

## Ergebnisse

besseren Vergleichbarkeit wurden Werte mit gleichem tail moment ausgewählt. Sowohl 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als Einzelsubstanz wie auch die Kombination aus 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 300  $\mu\text{M}$  PCP rufen eine breite Streuung in der Höhe der DNA-Schäden hervor. Die tail moments reichen bei beiden Kurven von 0 bis ca. 70 bzw. 80 tail moment, der Median beider Werte liegt bei einem tail moment von ca. 22. Die Kurven steigen erst linear an und zeigen zum Ende hin einen Steigungsanstieg, was darauf hindeutet, dass die Verteilung nach oben hin eine größere Varianz zeigt, d.h. dass einige wenige Zellen einen deutlich höheren Schaden erlitten haben. Beide Kurven zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf.

Durch die Begiftung mit 50  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als Einzelnoxide bzw. mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 600  $\mu\text{M}$  PCP wurde ein Schaden von ca. 55 tm initiiert. Die Verteilungen zeigen einen ähnlichen, linearen Verlauf.

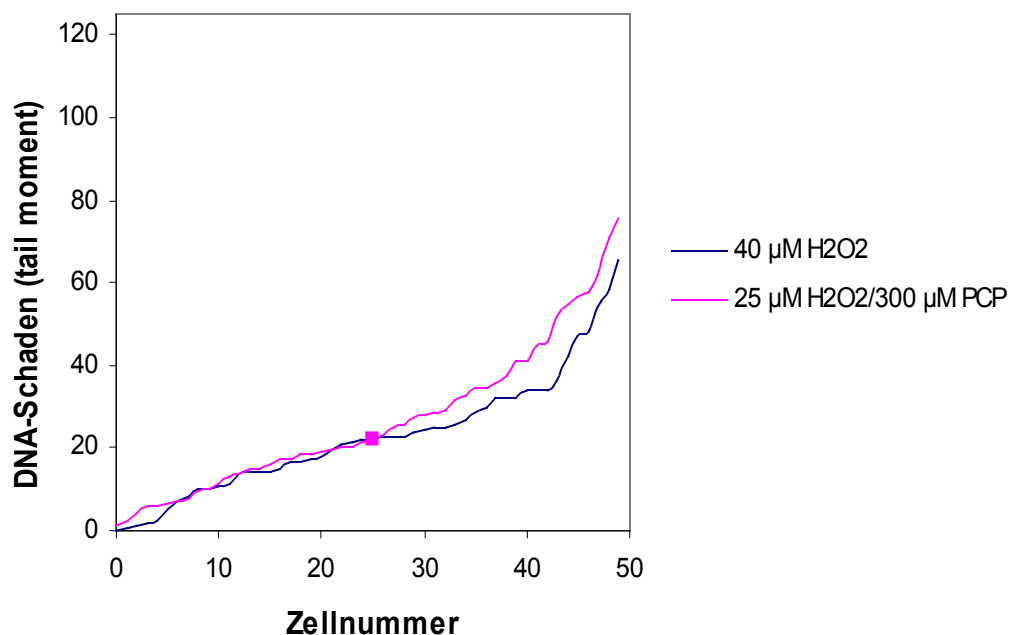


Abbildung 4: Schadensverteilung nach der Begiftung mit 40  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als Einzelnoxide und mit einer Kombination von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 300  $\mu\text{M}$  PCP. Der Median beider Kurven lag bei einem tail moment von 22 (Datenpunkt markiert).

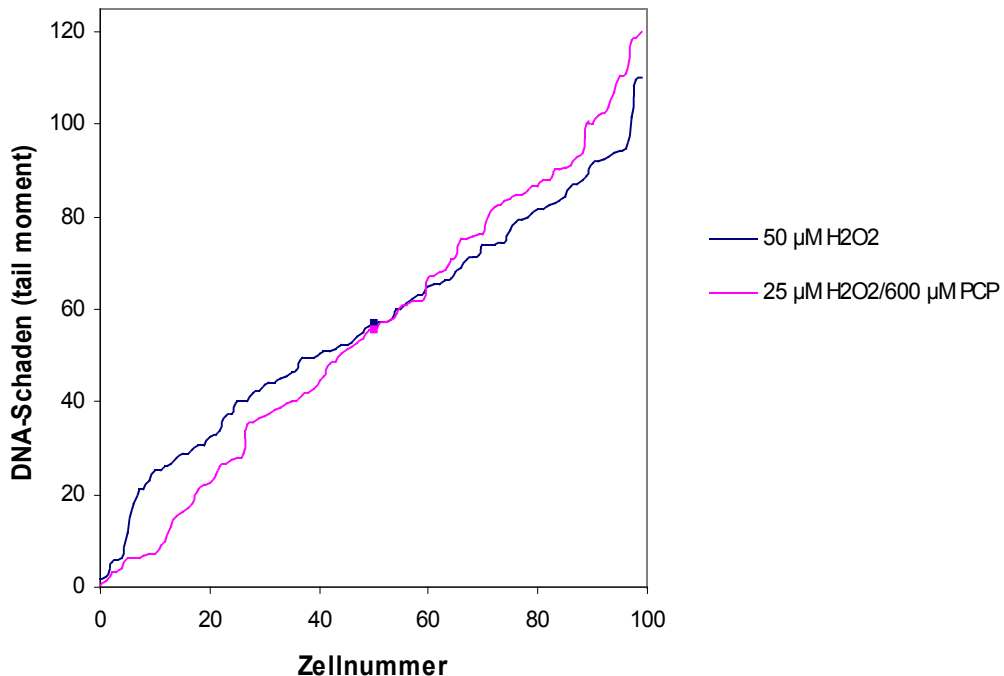


Abbildung 5: Schadensverteilung nach Begiftung mit 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnoxide und mit einer Kombination von 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 600 µM PCP. Der Median beider Kurven lag bei einem tail moment von 56 (Datenpunkt markiert).

### 3.1.1.2 Persistenz der induzierten DNA-Schäden

Einen zuverlässigen Hinweis auf die Ursache eines DNA-Schadens gibt seine Persistenz. Sie reflektiert die DNA-Reparatur über die Zeit und zeigt an, wann ein im comet assay detektierter Schaden vollständig repariert ist. Da die Zelle mit ROS-induzierte DNA-Schäden permanent konfrontiert ist, ist sie in der Lage, diese sehr effektiv und schnell zu beheben, d.h. ROS-induzierte DNA-Schäden zeichnen sich durch eine kurze Persistenzzeit aus. Unterschiede in der Reparaturkinetik von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und der Kombination von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP weisen auf unterschiedliche DNA-schädigende Spezies hin.

Die Persistenz des induzierten Schadens wurde über eine Reinkubationszeit von 0-60 bzw. 120 min untersucht. Um die Reparaturkinetik nach Einzel- und Kombinationswir-

## Ergebnisse

kung vergleichen zu können, wurde der Initialschaden gleich 100 % gesetzt und die Abnahme des tail moments (tm) prozentual gegen die Reinkubationszeit aufgetragen. Verglichen wurden die Persistenz von jeweils ähnlich hohen tail moments zwischen 65 und 95 tm. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Nach 30 min ist das tail moment aller Proben auf unter 40 % des Ausgangswertes gesunken, nach 60 min lag es unter 20 % des Ausgangswertes.

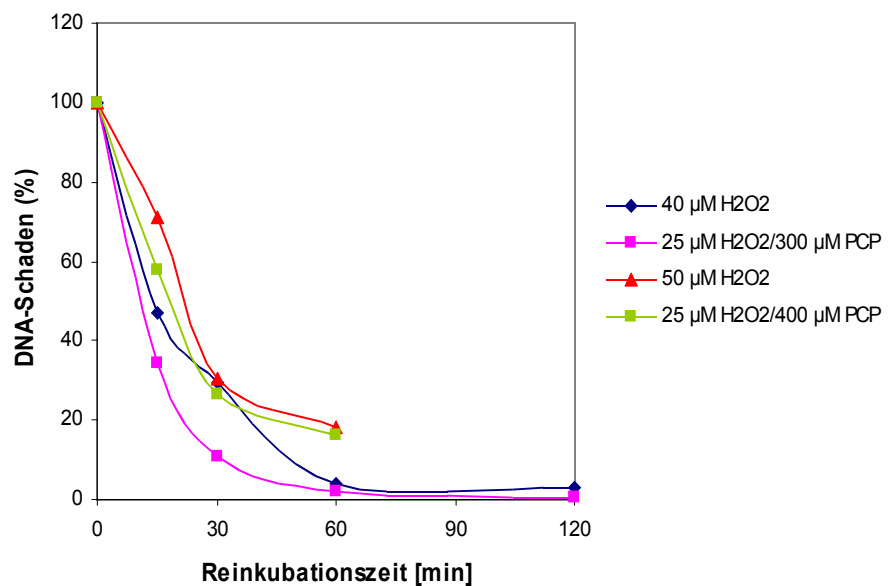


Abbildung 6: Reparatur von DNA-Schäden während einer 0-120minütigen Reinkubationszeit. Der Initialschaden wurde zur besseren Vergleichbarkeit auf 100% gesetzt. Gezeigt ist die Abnahme des tail moment durch DNA-Reparatur in Abhängigkeit von der Zeit.

### ***3.1.1.3 Auswirkung der Zugabe von Formamidopyrimidin Glykosylase (fpg) auf die DNA-Strangbruchrate***

Durch die Nachbehandlung der lysierten Zelle mit Formamidopyrimidin Glykosylase (fpg) werden im Bereich von ROS-induzierten Basenmodifikationen im Rahmen der Reparatur ESB induziert und im comet assay sichtbar gemacht. 8-Oxoguanin und andere fpg-sensitive Basenmodifikationen sind dadurch als Zunahme des tail moments (tm) erfassbar.

## Ergebnisse

---

Die Ergebnisse sind in Abbildung 7 gezeigt. Die Nachbehandlung mit fpg führte nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des tail moments, so dass sich die mit fpg behandelten Proben jeweils signifikant von den unbehandelten unterschieden. Das tail moment der unbehandelten Kontrolle erhöhte sich durch die Nachbehandlung mit fpg nicht signifikant. Bei der Begiftung mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ergab sich durch die Nachbehandlung mit fpg eine Erhöhung des tail moments um den Faktor 2 bis 4. Die prozentuale Zunahme war bei geringerem Ausgangsschaden größer.

Die Kombination von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP bewirkte eine ähnliche Strangbruchverstärkung durch fpg wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> allein (Abbildung 8). Der durch 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte DNA-Schaden lag bei 22 tm, der durch 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 300 µM PCP induzierte DNA-Schaden bei 28 tm, durch die fpg-Nachbehandlung stieg der Schaden auf jeweils 58 tm. Die Werte der Einzel- und Kombinationswirkung unterschieden sich weder vor noch nach der Behandlung mit fpg signifikant voneinander. 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 200 µM PCP riefen in Kombination ein tail moment von 20 hervor, das sich durch die Nachbehandlung mit fpg auf 45 erhöhte.

Die Verteilung der DNA-Schäden in einer Population von 50 Zellen zeigte auch nach der Behandlung mit fpg einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 9). Die 50 Zellen wiesen ein tail moment zwischen 10 und 110 auf. Es fanden sich keine ungeschädigten Zellen.

## Ergebnisse

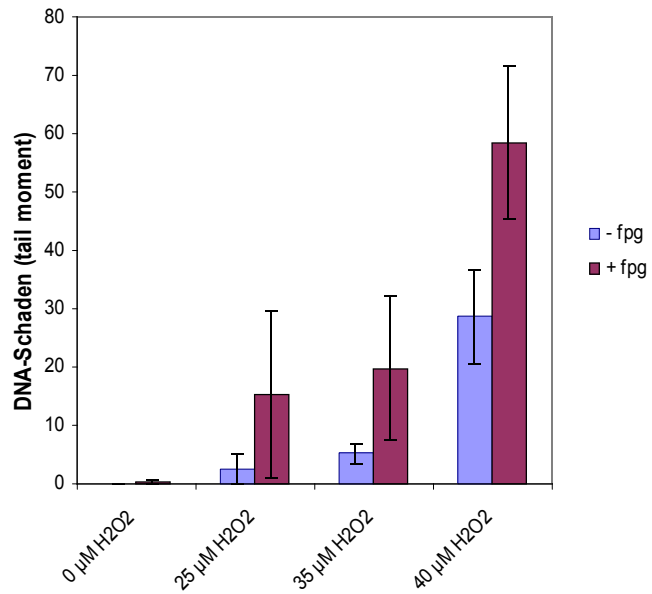


Abbildung 7: Effekt der Nachbehandlung mit fpg auf einen durch Be-  
giftung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hervorgerufenen DNA-Schaden. Die Werte wurden in  
mindestens vier unabhängigen Versuchen ermittelt.

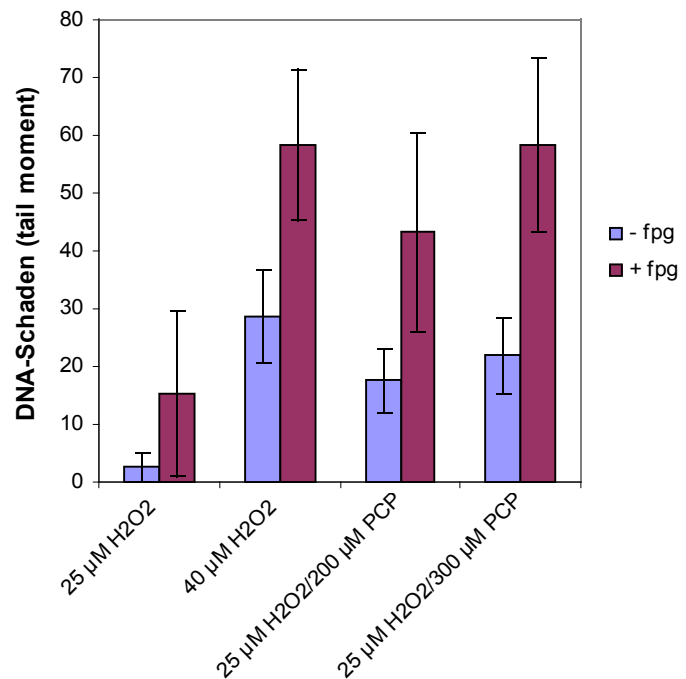


Abbildung 8: Effekt der Nachbehandlung mit fpg auf einen durch die  
Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder durch die Kombinationswirkung von  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP hervorgerufenen DNA-Schaden. Die Werte wurden  
in mindestens vier unabhängigen Versuchen ermittelt.

## Ergebnisse

---

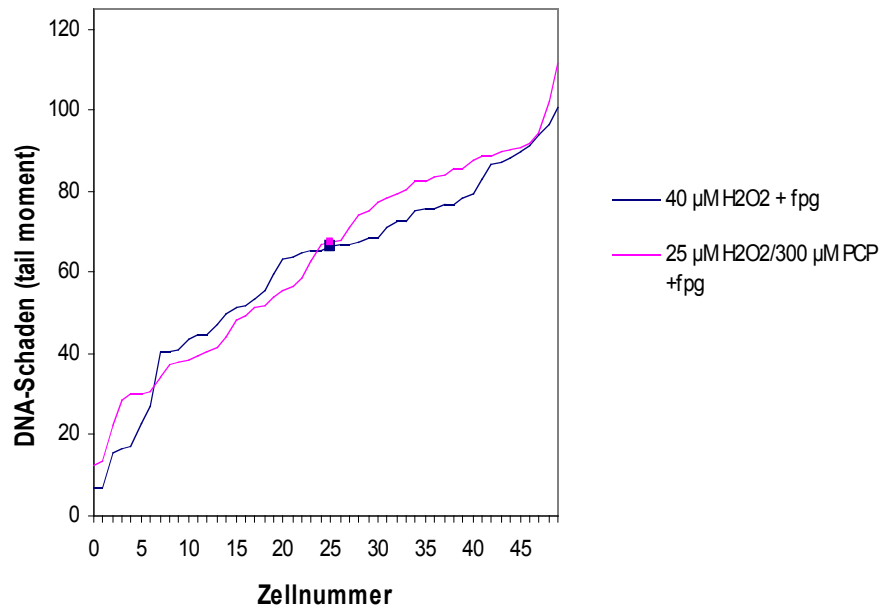


Abbildung 9: Schadensverteilung bei Nachbehandlung mit fpg nach einer Begiftung mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnoxide und mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 300 µM PCP. Das hervorgerufene tail moment lag in beiden Fällen bei ca. 66 (Datenpunkt markiert).

### *3.1.1.4 Auswirkung einer GSH-Depletion auf die DNA-Strangbruchbildung*

Die Depletion des GSH-Spiegels einer Zelle führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress. Durch den Vergleich der Empfindlichkeit von GSH-depletierten und nicht depletierten Zellen gegenüber der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bzw. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP sollte ein weiterer Hinweis auf die Rolle von ROS bei der Kombinationswirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP erfolgen.

Die Ergebnisse zeigten für GSH-depletierte Zellen deutlich erhöhte tail moments bei der Begiftung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abbildung 10). DNA-Schäden wurden schon ab einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 10 µM nachweisbar. Der Einsatz der doppelten Konzentration bewirkte ein tail moment von ca. 90 (88,1). Für nicht depletierte Zellen wurde ein DNA-Schaden ab 25 µM nachweisbar. Verdoppelte man die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, konnte auch hier ein tail moment von über 80 (82,4) beobachtet werden.

Bei der Behandlung von GSH-depletierten Zellen mit einer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration, die einen Initialschaden bewirkte (10 -15 µM) und steigenden PCP-Konzentrationen konnte keine Verstärkung des Initialschadens beobachtet werden (Abbildung 11). Die durch die Gabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100-300 µM PCP hervorgerufenen tail moments lagen unterhalb derer, die als Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hervorgerufen worden waren. In GSH-depletierten Zellen nahm die DNA-Schädigung ab und stieg erst bei PCP-Konzentrationen von 500 µM wieder an, erreichte aber nicht die Werte nicht depletierter Zellen.

Bei der Verteilung der DNA-Schäden konnten an GSH-depletierten Zellen Unterschiede festgestellt werden (Abbildung 12). Die Verteilung der durch 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Schäden an GSH-depletierten Zellen zeigt für ein Viertel der Zellen (Zellnummer 1-25) ein tail moment von 0, gefolgt von schnell ansteigenden tail moments. Die Verteilung der durch Kombinationswirkung von 15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 500 µM PCP bzw. durch die Kombinationswirkung von 12 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 8 mM *n*-Hexanol hervorgerufenen DNA-Schäden zeigen ein anderes Muster. Ungeschädigte Zellen kamen nicht vor, jedoch wiesen 50 % der Zellen ein relativ geringes tail moment von unter 18 tm auf. Insgesamt verlief die Kurve im mittleren Abschnitt deutlich flacher als die Verteilungs-



## Ergebnisse

kurve für  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Einzelnoxide. Der Vergleich mit GSH-normalen Zellen zeigte für  $\text{H}_2\text{O}_2$ -begiftete Zellen einen deutlichen Unterschied in der Schadensverteilung. Die durch Kombinationswirkung hervorgerufenen Schadensverteilungen zeigen keinen Unterschied zu GSH-normalen Zellen.

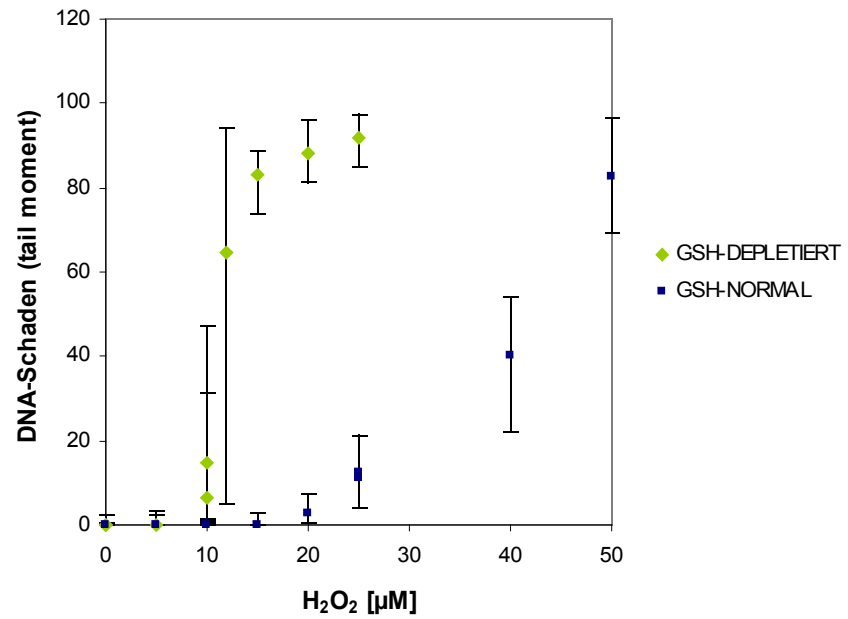


Abbildung 10: DNA-Schaden GSH-depletierter und GSH-normaler Zellen nach 15minütiger Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ansteigenden Konzentrationen. Gezeigt ist der Median aus 100 Zellen mit dem 1. und 3. Quartil als Streuungsmaß.

## Ergebnisse

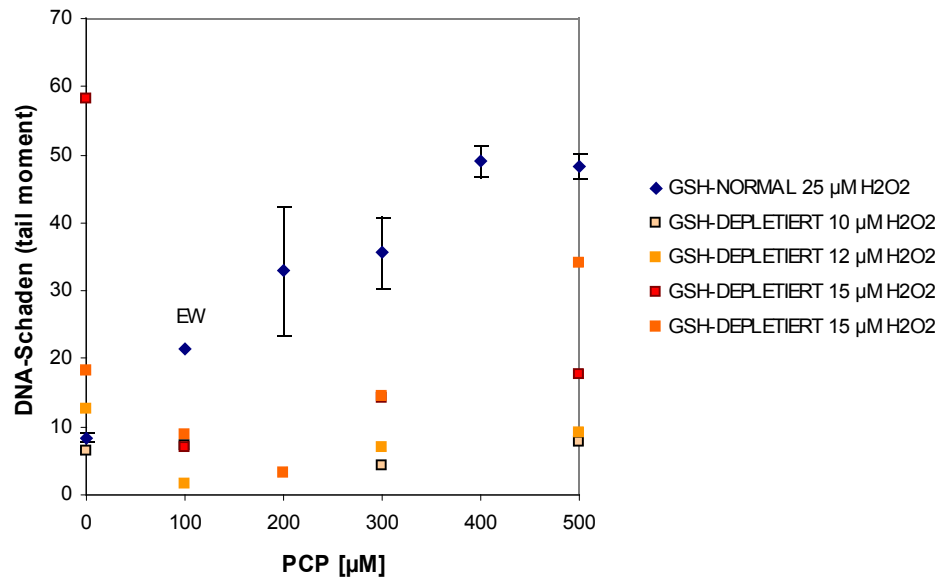


Abbildung 11: Kombinationswirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP auf GSH-depletierte Zellen. Gezeigt für die GSH-normalen Zellen der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen mit Standardabweichung. Die Versuche mit GSH-depletierten Zellen zeigen jeweils den Median aus 100 Zellen.

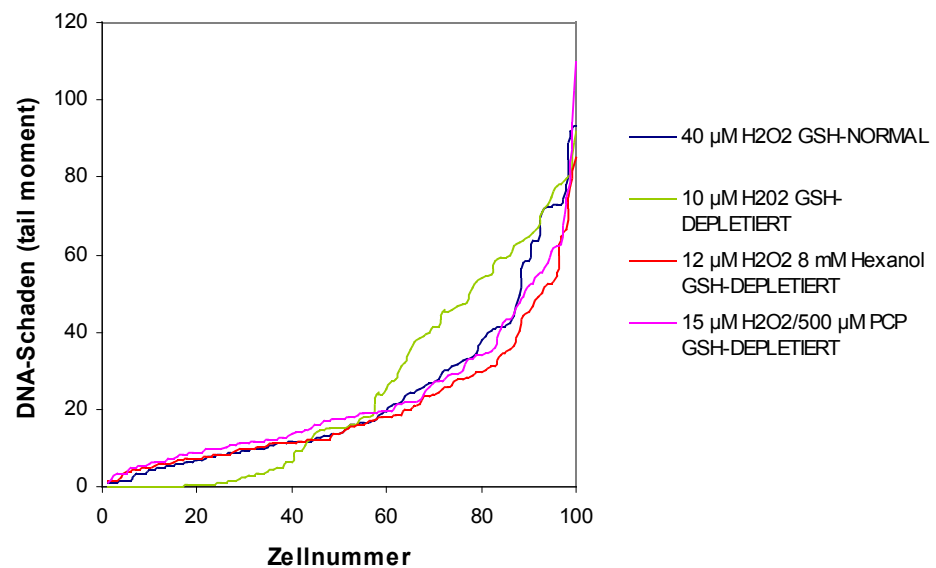


Abbildung 12: Schadensverteilung bei GSH-depletierten Zellen nach einer Begiftung mit 10 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnoxide und nach einer Begiftung mit einer Kombination aus 15 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 500 µM PCP bzw. 12 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 8 mM *n*-Hexanol. Zum Vergleich ist ebenfalls die Schadensverteilung von GSH-normalen Zellen nach Begiftung mit 40 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gezeigt. Das hervorgerufene tail moment lag in allen Versuchen bei ca. 16.

### 3.1.2 Glutathiondisulfid-Gehalt der Zelle

Untersucht wurde die Beeinflussung des Redox-Status der Zelle durch die Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und mit der Kombination von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP bzw. *n*-Hexanol. Eine Erhöhung des zellinternen Glutathiondisulfid (GSSG)-Gehalts weist dabei auf eine erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ - bzw. ROS-Konzentration im Zytosol hin (Vandeputte *et al.* 1994).

In vier unabhängigen Messungen zeigte der GSSG-Gehalt der unbehandelten Kontrolle Schwankungen zwischen 0,0010 und 0,0018  $\mu\text{g}$  GSSG/mg Protein. Durch die Behandlung mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min kam es zu einer signifikanten Erhöhung des GSSG-Gehaltes auf 0,003 bis 0,0035  $\mu\text{g}$  GSSG/mg Protein (Abbildung 13 und Abbildung 14). Die Behandlung mit 500  $\mu\text{M}$  PCP zeigte keinen Effekt auf den GSSG-Gehalt der Zellen. Bei der Begiftung mit einer Kombination aus 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und steigenden PCP-Konzentrationen sank der GSSG-Gehalt mit steigender PCP-Konzentration ab (Abbildung 13).

Der Versuch zu den Kombinationseffekten von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und *n*-Hexanol auf den GSSG-Gehalt im Zytosol wies die gleiche Tendenz auf (Abbildung 14). Der Einsatz von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkte einen Anstieg des GSSG-Gehaltes. Der Einsatz von 8 mM *n*-Hexanol, bzw. des Lösungsvermittlers (DMSO/Cremophor) führte zu einem leicht verminderten GSSG-Gehalt. Beim Einsatz von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit steigenden *n*-Hexanolkonzentrationen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des GSSG-Gehalts. Dieser erreichte beim Einsatz von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 8 mM *n*-Hexanol mit 0,0014  $\mu\text{g}$  GSSG/mg Protein das Niveau der unbehandelten Kontrolle.

## Ergebnisse

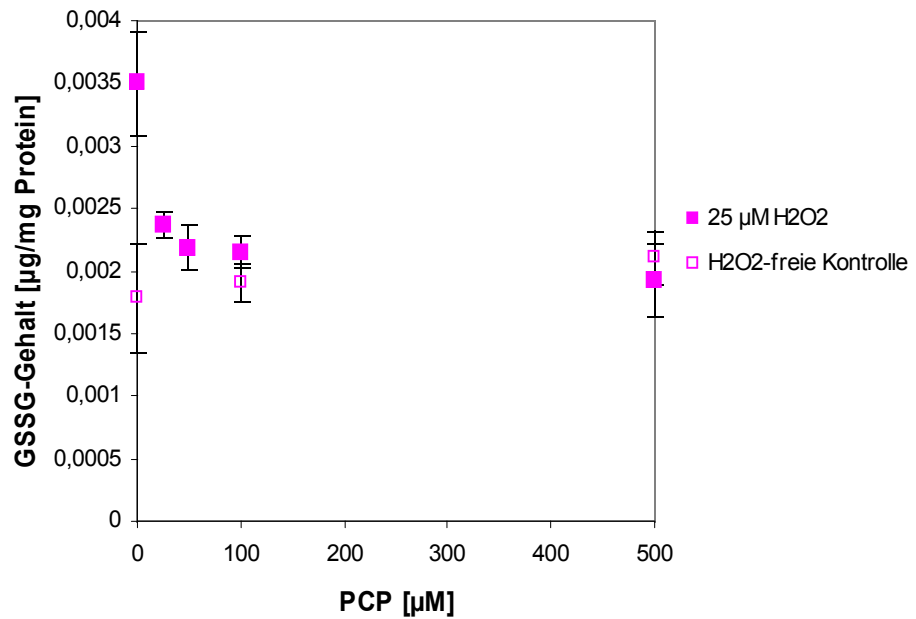


Abbildung 13: GSSG-Gehalt im Zellinneren nach Schadstoffinkubation mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0 µM - 500 µM PCP. Gezeigt ist ein Versuch mit sechs Parallelen als Mittelwert mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

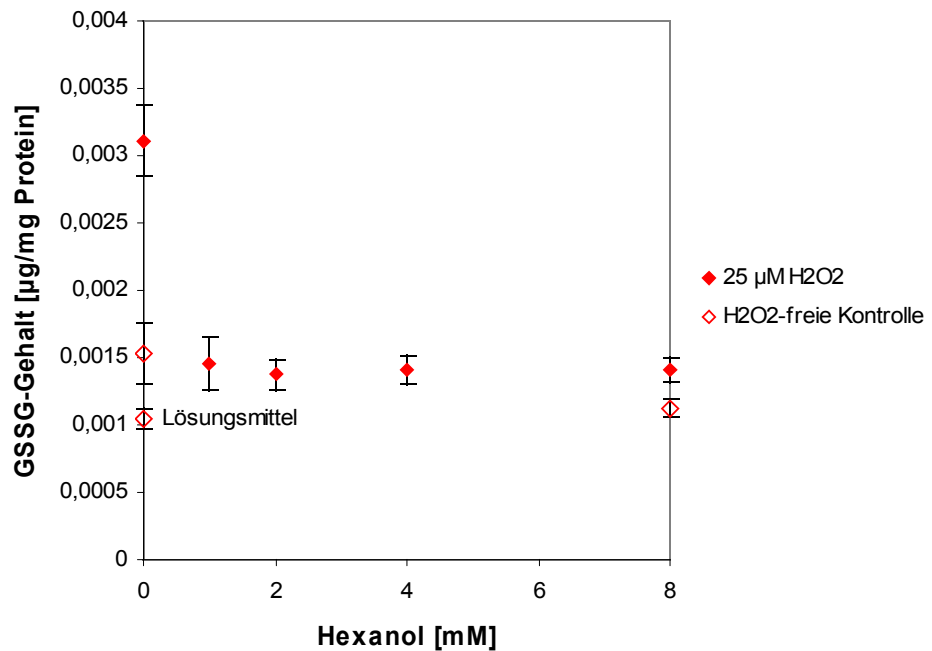


Abbildung 14: GSSG-Gehalt im Zellinneren nach Schadstoffinkubation mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0 mM - 8 mM *n*-Hexanol. Gezeigt ist ein Versuch mit vier Parallelen als Mittelwert mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt.

### 3.1.3 ROS-Zunahme im Zellinneren

Die Messung der ROS-Konzentration im Zytosol unter Verwendung des H<sub>2</sub>DCF-Assays diente der Klärung der Frage, ob die gen- und zytotoxische Kombinationswirkung durch erhöhten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Einstrom und damit einhergehende erhöhte ROS-Bildung hervorgerufen wird. Weiterhin gibt der Assay Aufschluss über die Größenordnung der ROS-Bildung, bzw. des ROS-Einstroms und über deren zeitliche Begrenzung.

Die Versuchsreihen wurden an humanen Fibroblasten in Zellsuspension im Fluoreszenzphotometer durchgeführt, von jeder Probe wurde vor Zugabe der Schadstofflösung über 100 sec die Grundfluoreszenz ermittelt. Die Begiftung mit 100 bzw. 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnoxen und in Kombination mit 500 µM PCP erfolgte direkt in der Küvette. Als Maß für die ROS-Bildung bzw. den ROS-Einstrom diente die Steigung der Fluoreszenz (%/sec) im Verhältnis zur Grundfluoreszenz der Proben über 50 sec.

Abbildung 15 zeigt beispielhaft einige typische Kurvenverläufe. Durch die Zugabe von PCP veränderte sich der Kurvenverlauf nicht nennenswert. Eine Zugabe von 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führt zu einem linearen Anstieg, der nach ca. 30 sec abflacht und sich einer Sättigung annähert. Die Fluoreszenz stieg innerhalb des linearen Abschnittes auf ca. 150 % des Ausgangswertes an. Eine Begiftung mit einer Kombination aus 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 500 µM PCP führte ebenfalls zu einem linearen Anstieg, der jedoch erst nach 60 sec begann abzufachen. Innerhalb dieser Zeitspanne stieg die Fluoreszenz auf 240 % des Ausgangswertes an.

Abbildung 16 fasst die Ergebnisse zur ROS-Bildung im Zytosol zusammen. Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine Steigung von 0,08 %/sec. Die mit PCP behandelten Proben weisen eine mittlere Steigung von 0,1 %/sec auf.

Wie erwartet, konnte bei Begiftung mit 100 µM und mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Fluoreszenzzunahme beobachtet werden. Die Begiftung mit 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Steigung von 0,25 %/sec, gemittelt aus drei unabhängigen Messungen. Die Begiftung mit 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu einer Steigung von 0,48 %/sec, gemittelt aus zwei unabhängigen Messungen.

## Ergebnisse

Durch die kombinierte Begiftung mit PCP stieg die Fluoreszenz deutlich an. Beim Einsatz von  $100 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  und  $500 \mu\text{M PCP}$  betrug die gemittelte Steigung der Fluoreszenzintensität  $1,23 \text{ \%}/\text{sec}$ . In der Kombination mit  $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$  betrug die gemittelte Steigung  $1,82 \text{ \%}/\text{sec}$ . Den Mittelwerten lagen drei bzw. vier unabhängige Messungen zugrunde.

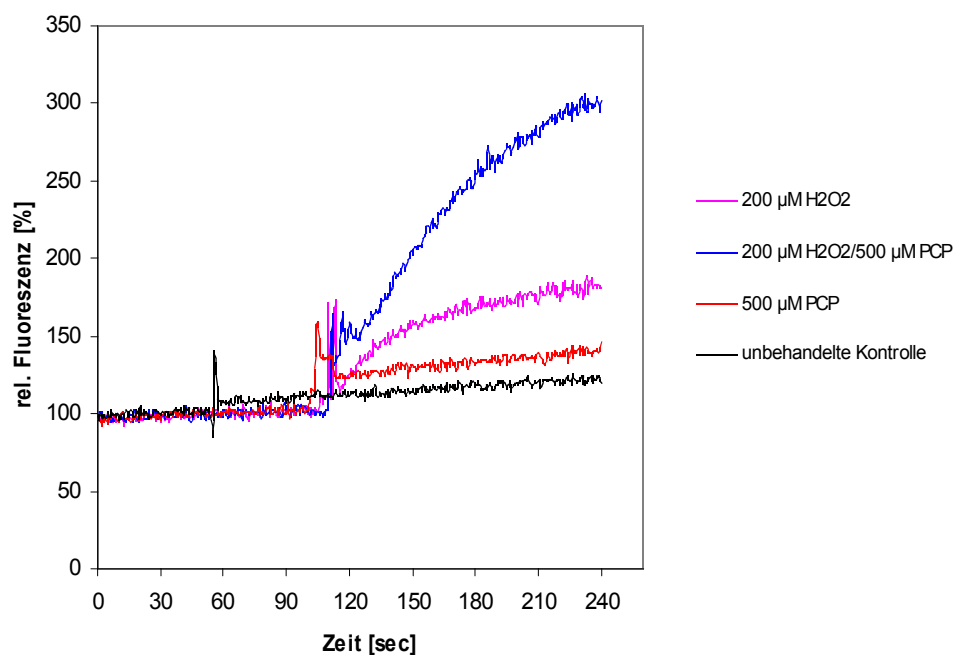


Abbildung 15: Fluoreszenzzunahme während der Versuchsdurchführung. In Zeitabschnitt 0-100 sec wurde die Grundfluoreszenz der Zellsuspension aufgenommen. Die dann folgende Begiftung in der Küvette brachte durch die Öffnung des Photometers einen Lichteinfall mit sich, der durch eine Störung des Kurvenverlaufs sichtbar wird. Es wurde viermal pro Sekunde gemessen. Die Abbildung zeigt beispielhaft einige Kurvenverläufe.

## Ergebnisse

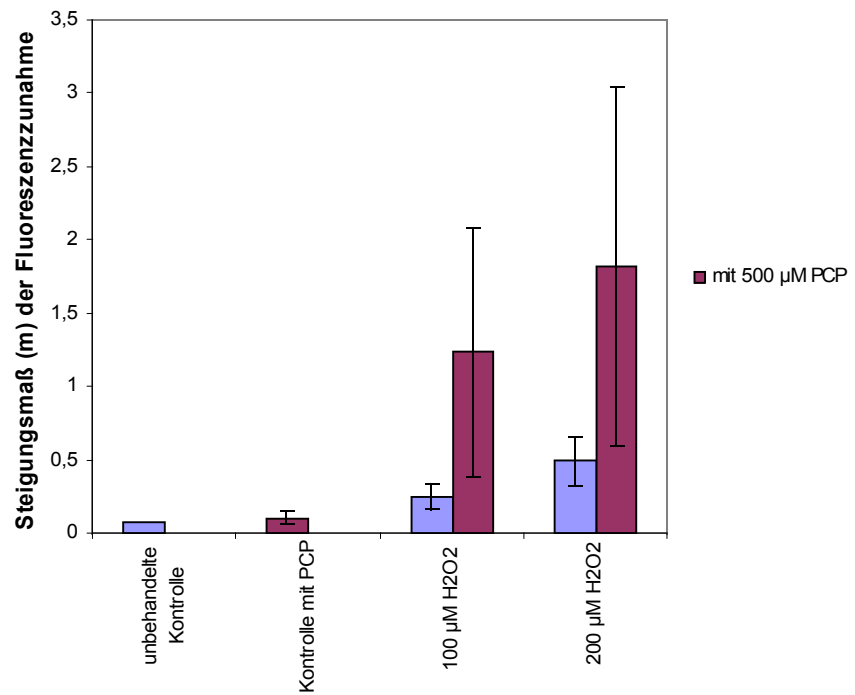


Abbildung 16: ROS-Entwicklung im Zellinneren, dargestellt als Steigung (m) der Fluoreszenzzunahme.  $m=1$  beschreibt eine Fluoreszenzzunahme von 1 %/sec. Es wurden Kombinationen von  $100\mu\text{M H}_2\text{O}_2/500\mu\text{M PCP}$  und von  $200\mu\text{M H}_2\text{O}_2/500\mu\text{M PCP}$  eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von mindestens drei unabhängigen Messungen. Die unbehandelte Kontrolle stellt einen Einzelwert dar.

### 3.2 Untersuchungen zu den Folgen der erhöhten Gentoxizität

Wird das antioxidative Potenzial einer Zelle durch auftretenden oxidativen Stress überschritten, drohen neben dem nekrotischen Zelltod das Auftreten von Mutationen oder, als letztes Mittel diese abzuwenden, die Apoptose als kontrollierter Zelltod. Als mögliche Folgen der toxischen Kombinationswirkung von ROS und unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien werden in dieser Arbeit die Mutagenität der gentoxischen Effekte und Änderungen in der Apoptoserate untersucht.

#### 3.2.1 Nachweis der Apoptoseinduktion durch $H_2O_2$ und durch die Kombination von $H_2O_2$ und PCP

Als Nachweismethode für die Apoptoseinduktion wurde ein photometrischer Immunoassay für histonassoziierte Mono- und Oligonukleotide verwendet. Die Apoptoseinduktion durch  $H_2O_2$  wurde nach 15minütiger Begiftung und einer Reinkubationszeit von 12 h, 24 h und 36 h gemessen. Es kamen  $H_2O_2$ -Konzentrationen von 0-1000  $\mu M$  zum Einsatz. Die Proben wiesen weder nach 12 h Reinkubationszeit noch nach 36 h Reinkubationszeit eine erhöhte Apoptoserate auf. Sie erreichten maximal Absorptionswerte von 0,1 (Abbildung 17). Nach einer Reinkubationszeit von 24 h konnten in zwei unabhängigen Versuchen eine erhöhte Absorption von max. 0,23 und 0,31 verzeichnet werden. Das Maximum lag bei 200  $\mu M$   $H_2O_2$ , auch für 350 und 500  $\mu M$   $H_2O_2$  wurden erhöhte Absorptionswerte gemessen.

Im Folgenden wurde der Effekt von einer gleichzeitigen Gabe von 200  $\mu M$  PCP auf die Apoptose-induzierende Wirkung von  $H_2O_2$  nach einer Reinkubationszeit von 24 h untersucht. Das Augenmerk lag auf einer möglichen Verstärkung der Apoptose-induzierenden Wirkung sowie auf einer Verschiebung des Konzentrationsbereiches. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt. Eine signifikante Erhöhung der Apoptoserate durch die zusätzliche PCP-Gabe konnte für eine  $H_2O_2$ -Konzentration von 200  $\mu M$   $H_2O_2$  nicht beobachtet werden; die Absorption lag für die Kombinationswirkung unter der für  $H_2O_2$  oder auf der gleichen Höhe. Eine deutliche Erhöhung der Absorption konnte je-



## **Ergebnisse**

---

doch für eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 100 µM bzw. 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beobachtet werden. Dies stellt sich als eine Verschiebung des Apoptose-induzierenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationsbereiches durch die gleichzeitige Gabe von 200 µM PCP dar.

## Ergebnisse

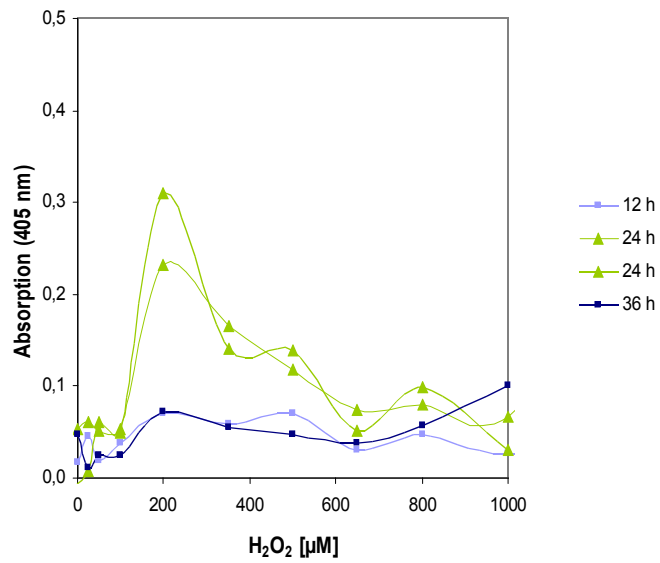


Abbildung 17: Apoptoseinduktion durch 15minütige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Befügung nach Reinkubationszeiten von 12 h bis 36 h. Gezeigt sind die Mittelwerte aus jeweils vier Parallelen. Auf die Angabe der Standardabweichung wurde aus Gründen der besseren Übersicht verzichtet.

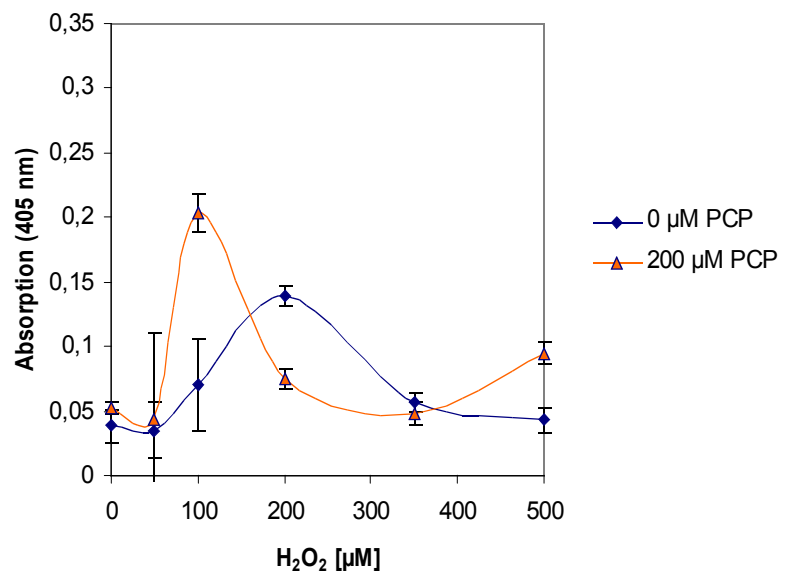


Abbildung 18: Verschiebung der Apoptoseinduktion durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (blaue Kurve) zu 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch gleichzeitige Gabe von 200 µM PCP (rote Kurve). Gezeigt ist der Mittelwert aus jeweils vier Parallelen mit der Standardabweichung. Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

## **Ergebnisse**

---

### **3.2.2 Auswirkungen auf die Mutagenität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch die Kombination mit PCP**

Der Nachweis der mutagenen Wirkung erfolgte für verschiedene Wirkstoffkombinationen über den HPRT-Assay nach OECD-Richtlinie 476. Maß für die Mutagenität war die MF (Mutantenfrequenz) nach 12tägiger Expressionsphase. Nach OECD-Richtlinie 476 gilt ein Wert als positiv, wenn die MF mindestens 300 % der unbehandelte Kontrolle beträgt.

Der HPRT-Assay wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt, wobei im zweiten Versuch nur die Konzentrationen wiederholt wurden, die im ersten Versuch auffällig waren. Als Positivkontrolle wurde eine Probe wie alle anderen Proben für 15 min mit Ethylmethylsulfonat (EMS) inkubiert, im Wiederholungsversuch erfolgte die Inkubation mit EMS in Anlehnung an OECD-Richtlinie 476 für 60 min. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 und Tabelle 3 dargestellt. Im ersten Versuch zeigte die Negativkontrolle eine MF von 19,4 als Spontanmutationsrate, die Positivkontrolle war mit einer MF von 45,4, bzw. einer prozentualen Erhöhung auf 237 % signifikant erhöht, erreichte jedoch nicht den in der OECD-Richtlinie geforderten dreifachen Wert der Negativkontrolle, was in der Kürze der Inkubationszeit von nur 15 min begründet war. Die Inkubation mit PCP in den Konzentrationen 300 µM und 700 µM erbrachte leicht erhöhte MFs von 126 %, bzw. 163 %, die sich von der unbehandelten Kontrolle jedoch nicht signifikant unterschieden ( $p < 0,05$ ). Die Behandlung mit 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte mit einer MF von 105 % ebenso wenig zu einer MF-Erhöhung wie die Inkubation mit einer Kombination aus 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 300 µM PCP mit einer MF von 84 %. Dagegen erzeugte die Inkubation mit einer Kombination aus 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 500 µM PCP eine MF von 295 %. Dieser Wert hatte nahezu die dreifache Höhe der Negativkontrolle und unterschied sich signifikant von dieser ( $p < 0,05$ ).

Der zweite HPRT-Assay stellt eine vom ersten Versuch unabhängige Wiederholung der wichtigsten Werte dar. Die unbehandelte Kontrolle zeigte eine Spontanmutationsrate von  $9/10^6$  Zellen, die MF der Positivkontrolle lag bei 121, das entsprach 1344 % der un-

## **Ergebnisse**

---

behandelten Kontrolle und lag im Bereich des in OECD-Richtlinie 476 angegebenen Richtwertes. Die Inkubation mit einer Kombination von 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 500  $\mu\text{M}$  PCP induzierte eine MF von 444 % über der unbehandelten Kontrolle.

Die Toxizität der eingesetzten Noxen wird an der Koloniebildungsfähigkeit (KBF) deutlich. Sie liegt mit 56-44 % der unbehandelten Kontrolle im Rahmen der in OECD-Richtlinie 476 angegebenen maximalen Toxizität von 10–20 % KBF. Es hätten demnach noch höhere Konzentrationen verwendet werden können.

## Ergebnisse

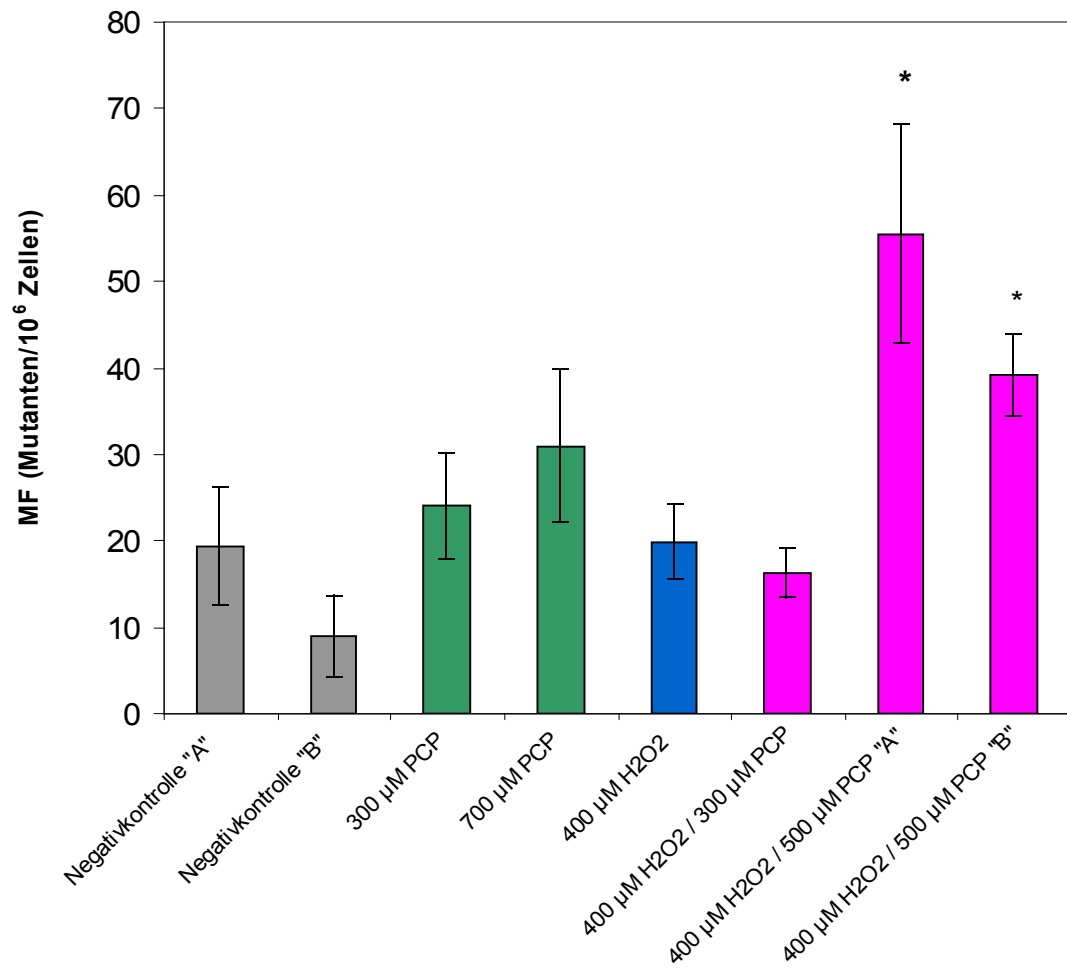


Abbildung 19: Mutagenität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP als Einzelnoxe und in Kombination im HPRT-Assay. Dargestellt ist die Anzahl der Mutanten pro 10<sup>6</sup> Zellen (MF/Mutantenfrequenz). Die Positivkontrolle stellte gemäß OECD-Richtlinie eine 60minütige Inkubation mit 10 mM EMS dar, zusätzlich wurde eine 15minütige Inkubation mit 10 mM EMS als weitere Positivkontrolle mitgeführt (siehe Tabelle 1). Dargestellt ist der Mittelwert aus vier Parallelen mit der Standardabweichung, Werte, die sich signifikant von der Negativkontrolle unterschieden, sind gekennzeichnet (\*).

	HPRT 1					HPRT 2				
	Toxizität [KBF (%) nach der Begiftung]	MF (Mutanten/1 0 <sup>6</sup> Zellen) + FF	MF (%) + FF (%)	KBF (Anzahl Kolonien/ Petrischale)	Mutanten/ Petrischale	Toxizität [KBF (%) nach der Begiftung]	MF (Mutanten/ 10 <sup>6</sup> Zellen) + FF	MF (%) + FF (%)	KBF (Anzahl Kolonien/ Petrischale)	Mutanten/ Petrischale
Negativkontrolle	100	19±7	100±35	219±7	9±3	100	9±5	100±54	252±23	4,5±2
10 mM EMS	96	45±3	237±6	215±8	20±1	102	121± 20	1344±16	236±19	57±8
0 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /300 µM PCP	113	24±6	126±25	218±15	10±2					
0 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /700 µM PCP	112	31±9	163±28	258±16	14±4					
400 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /0 µM PCP	81	20±4	105±22	208±15	8±2					
400 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /300 µM PCP	83	16±3	84±17	201±9	7±1					
400 µM H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /500 µM PCP	56	56±13	295±23	269±17	23±5	44	40±5	444±12	289±21	23±2

Tabelle 3: Ergebnisse der HPRT-Assays nach 12tägiger Expressionsphase; gezeigt sind die Toxizität direkt nach der 15minütigen Begiftung als Koloniebildungsfähigkeit (KBF) prozentual zur unbehandelten Kontrolle, die Mutantenfrequenz (MF) mit Fehlerfortpflanzung (FF) absolut und prozentual dargestellt, sowie die Anzahl der Kolonien pro Petrischale und die Anzahl der Mutantenkolonien pro Petrischale jeweils mit Standardabweichung. Die Begiftung mit EMS wurde im HPRT 2 für 60 min durchgeführt.

### 4 Diskussion

Nicht gentoxisch wirkende Umweltchemikalien und ROS können synergistische Kombinationswirkungen verursachen (Witte 2001). Ziel dieser Arbeit waren Erkenntnisse über die Ursachen dieser Kombinationswirkungen und über ihre Folgen in Bezug auf die Mutationsrate und die Apoptoserate am Beispiel von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP. Die zu Beginn der Arbeit aufgestellten Thesen zur Ursache des auftretenden Synergismus werden anhand der Ergebnisse zu den Einzel- und Kombinationswirkungen im folgenden diskutiert. Im Zentrum der Diskussion steht die Frage, ob der Kombinationswirkung ausschließlich  $\cdot\text{OH}$ -Radikale zugrunde liegen, wie es bei der Einzelwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  der Fall ist. Es wird zunächst die Einzelwirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  betrachtet.

#### 4.1 Einzelwirkung $\text{H}_2\text{O}_2$

Die gentoxische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wurde auf Einzelzellebene im comet assay untersucht. Der alkalische comet assay beinhaltet eine Einzelzellgelelektrophorese, anhand derer DNA-Einzelstrangbrüche (ESB), alkalilabile Stellen, AP-Stellen und DNA-Doppelstrangbrüche (DSB), die in der intakten Zelle *in vitro* entstanden sind, betrachtet werden können.  $\text{H}_2\text{O}_2$  bewirkte bei 15minütiger Begiftung eine konzentrationsabhängige Zunahme des DNA-Schadens. Der gentoxische Effekt von  $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte im Konzentrationsbereich zwischen 20  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nachgewiesen werden, nach Begiftung mit höheren  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen waren die Schäden zunehmend nicht mehr auswertbar. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit der Literatur, in der die gentoxische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  vielfach beschrieben ist (Purschke et al. 2002, Stratis 2002, Hohlen 2001, Halliwell & Gutteridge 1999).

Trägt man die tail moments einer Probe der Größe nach geordnet auf, so ergibt sich ein für  $\text{H}_2\text{O}_2$  typisches Schadensverteilungsmuster (Abbildung 4), das auch schon von SCHEWE (2002) beschrieben wurde. Typisch für die Verteilung  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierter Schäden ist ein steiler Kurvenanstieg zum Ende der Kurve, da durch die Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unabhängig von der Konzentration immer einige Zellen stark geschädigt werden; so auch

## Diskussion

---

beobachtet von SCHMIDT (2003). Die Streuung der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierten DNA-Schäden ist sehr hoch, so findet man neben intakten Zellen völlig zerstörte. Diese Beobachtung machten auch schon SCHMIDT (2003) und WEHRY (2003).

Hinweise auf die Ursache der Genotoxizität gibt neben der Höhe und Verteilung der Schäden ihre Persistenz. ROS-induzierte Schäden treten an der DNA aufgrund des während der Zellatmung generierten Superoxids häufig auf. Die Reparaturmechanismen sind daher besonders effektiv, was wiederum zu einer schnellen Abnahme der DNA-Schäden führt (Barbouti *et al.* 2002).

Die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten DNA-Schäden waren innerhalb einer Stunde nahezu vollständig repariert (Abbildung 6). Ähnliche Persistenzzeiten wurden für  $\text{H}_2\text{O}_2$  schon von STRATIS (2002) und HOHLEN (2001) beobachtet. Aufgrund der permanenten  $\cdot\text{OH}$ -Bildung haben Zellen im Laufe des evolutionären Anpassungsprozesses eine schnelle und effektive DNA-Reparatur für  $\cdot\text{OH}$ -induzierte Schäden entwickelt. Verglichen mit DNA-Schäden, die durch andere DNA-schädigende Verbindungen hervorgerufen werden, ist dies eine kurze Persistenzzeit. PAULIK (2007) und PURSCHKE *et al.* (2002) zeigten für MMS eine deutlich längere Persistenz. Auf für 4-NQO-induzierte DNA-Schäden wurden längere Persistenzzeiten nachgewiesen (Paulik 2007). Durch DNA-Strangvernetzende Verbindungen (Cis- und Carboplatin) induzierte DNA-Schäden zeigten Persistenzzeiten von über 48 h (Kühnemuth 2008).

$\cdot\text{OH}$ -Radikale rufen an der DNA typische Schäden, darunter Einzelstrangbrüche und vielfältige Basenmodifikationen hervor, wobei Guanin die gegenüber  $\cdot\text{OH}$ -Radikalen empfindlichste Base ist (Halliwell & Gutteridge 1999, Fairbairn *et al.* 1995). Die Basenmodifikation 8-Oxoguanin wird durch Formamidopyrimidin Glykosylase (fpg) erkannt und durch Basenexzisionsreparatur herausgeschnitten. Ein durch Endonuklease- oder Glykosylaseaktivität entstandener Einzelstrangbruch kann im comet assay erfasst werden (Collins *et al.* 1993), die Methode gilt als besonders sensitiv im Nachweis von 8-Oxoguanin (Collins 2005).



## Diskussion

---

Der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte DNA-Schaden konnte durch fpg-Nachbehandlung erwartungsgemäß konzentrationsabhängig verstärkt werden (Abbildung 7). Das tail moment fpg-behandelter Proben war gegenüber ohne fpg nachbehandelten Proben signifikant erhöht. Dieses Ergebnis bestätigt die Induktion von zusätzlichem 8-Oxoguanin durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Befügung. Die Anzahl der sekundären, reparaturbedingten Strangbrüche scheint die Anzahl der primären ESB und DSB zu übersteigen. Da das tail moment (tm) kein lineares Maß ist, sind Aussagen zur Anzahl der Strangbrüche nur begrenzt möglich. Fpg-sensitive Stellen sind nach  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Behandlung für Zellen *in vitro* bereits nachgewiesen, auch *in vivo* erhöht sich die 8-Oxoguanin-Konzentration in durch Radikalbildung belasteten Zellen, z.B. bei Rauchern (Fracasso *et al.* 2006).

$\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte DNA-Schäden können theoretisch durch Radikale oder durch Lipidperoxidationsprodukte aus der Zellmembran entstehen. Um die Beteiligung von nichtradikalischen DNA-schädigenden Verbindungen zu überprüfen, wurde der GSH-Pool der Zellen durch Inkubation mit BSO depletiert. GSH-depletierte Zellen sollten gegenüber  $\cdot\text{OH}$ -Radikalen sehr empfindlich sein. Die GSH-Depletion führte erwartungsgemäß zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Abbildung 10). Schon eine 15minütige Befügung mit  $10\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  bedingte ein erhöhtes tail moment. Die minimale Effektkonzentration wurde durch die GSH-Depletion halbiert. Weiter ist ein sehr steiler Kurvenverlauf erkennbar, die Verdopplung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration führte zu einem Anstieg des tail moments von ca. 10 auf 80 bis 90. Die drastisch erhöhte Steilheit der Kurve bei GSH-depletierten Zellen weist auf eine verringerte Entgiftungseffizienz dieser Zellen gegenüber ROS hin. Dieses Ergebnis deckt sich mit Angaben aus der Literatur, die verdeutlichen, dass Glutathionperoxidase (GPx) im Konzentrationsbereich bis  $100\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ca. 80-90 % der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftung bewerkstelligt, während die in den Peroxisomen lokalisierte Katalase erst bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zwischen  $100$ - $1000\ \mu\text{M}$  effizient ist (Makino *et al.* 1994, Makino *et al.* 2004). Eine erhöhte Empfindlichkeit von GSH-depletierten Zellen gegenüber oxidativem Stress durch Bolus- oder steady-state-Gaben von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder durch Strahlung wurde ebenfalls u.a. von KLOCKE (2007) nachgewiesen. KLOCKE (2007) konnte unter ähnlichen Bedingungen keine Vitalitätshemmung durch die Inkubation mit BSO beobachten. *In vivo* konnte ein Zusammenhang zwischen einer er-

## Diskussion

---

höhten Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und eines angeborenen GSH-Synthetase-Defizits nicht nachgewiesen werden (Nygren *et al.* 2005). Bekannt ist jedoch der Zusammenhang zwischen angeborenen Defiziten im Glutathionstoffwechsels (zu geringe Expression von Glutathionsynthetase, -peroxidase, bzw. -reduktase) und neurologischen Defekten (Halliwell & Gutteridge 1999).

Indirekt lässt sich ein Anstieg der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration im Zytosol über den Anstieg des intrazellulären GSSG-Spiegels nachweisen. Die Begiftung mit  $25 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  für 5 min führte zu einer Verdoppelung des GSSG-Gehaltes (Abbildung 13 und Abbildung 14). Der GSH- bzw. GSSG-Gehalt ist vom Zelltyp abhängig. HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) geben für menschliche Fibroblasten einen durchschnittlichen intrazytosolischen GSH-Gehalt von 0.5-2 mM GSH an, VANDEPUTTE *et al.* (1994) nennen 20-30 nmol Gesamtglutathiongehalt/mg Protein und einen GSSG-Anteil von 1,5-3 %. Der GSSG-Gehalt ist neben der zytosolischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von weiteren Faktoren wie der  $\cdot\text{OH}$ -Konzentration, der Glutathionreduktase-Aktivität und der Verfügbarkeit von NADPH abhängig (Halliwell & Gutteridge 1999, Anderson 1998). Neben der GSSG-Bildung durch die Glutathionperoxidase (GPx) ist eine enzymunabhängige Reaktion von GSH mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  möglich, spielt aber bei physiologischem pH eine untergeordnete Rolle (Makino *et al.* 1994). Relevanter ist die direkte Reaktion von GSH mit  $\cdot\text{OH}$  und  $\cdot\text{O}_2^-$ , wobei ein Thiylradikal entsteht. Zwei Thiylradikale können wiederum unter Bildung von GSSG miteinander reagieren (Marquardt & Schäfer 1997). Besonders für die Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in zytosolischen Konzentrationen bis zu  $10 \mu\text{M}$  ist die GPx von entscheidender Bedeutung (Makino *et al.* 1994, Makino *et al.* 2004, Halliwell & Gutteridge 1999), auch wenn in der Literatur vereinzelt Katalase für die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Entgiftung in niedrigen Konzentrationsbereichen genannt wird (Masaki *et al.* 1998).

Methodisch ist der Nachweis von oxidativem Stress über einen erhöhten GSSG-Gehalt störanfällig, da es bei der Probenaufarbeitung leicht zu einer Oxidation von Teilen des Glutathions kommen kann. In einer unbelasteten Zelle liegen nur 2 % des Glutathions als Glutathiondisulfid vor, eine methodisch bedingte Oxidation von weiteren 2 % des Glutathions würde bereits zu einer Verdoppelung des GSSG-Anteils führen.

## Diskussion

---

Unter Verwendung des H<sub>2</sub>DCF-Assays wurde die Entwicklung der intrazytosolischen Radikalkonzentration nach Begiftung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untersucht. Der Assay eignet sich zum Nachweis von diversen radikalischen Verbindungen, jedoch nicht zum direkten Nachweis von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Um den Effekt von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelsubstanz auf die zytosolische ROS-Konzentration zu ermitteln, wurde den Proben 100 µM, bzw. 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Bolus zugegeben. Es konnte eine ROS-induzierende Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für beide Konzentrationen erwartungsgemäß nachgewiesen werden (Abbildung 16).

Der Kurvenanstieg der ROS-Konzentration flachte nach ca. 30 sec ab und näherte sich einer Sättigung (Abbildung 15). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die ·OH-Bildung abgeschlossen war. Die Steilheit der Fluoreszenzsteigerung sowie das Fluoreszenzmaximum waren konzentrationsabhängig, zeigten jedoch eine hohe Schwankungsbreite. Diese ist methodisch durch eine unregelmäßige Dichte der Zellsuspension im Messfeld aufgrund von unregelmäßiger Magnetrührertätigkeit erklärbar; das Phänomen ist bekannt.

Die Radikalbildung durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Zytosol setzte ohne zeitliche Verzögerung ein. Der sofortige Beginn der Radikalgeneration lässt erkennen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Zellmembran problemlos passierte und schnell in die Zelle einströmte. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Literatur (Antunes & Cadenas 2000, Makino *et al.* 1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann als kleines Molekül leicht durch die Membran diffundieren, obwohl der schnellen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufnahme in die Zelle der hydrophile Charakter des Moleküls mit seiner polaren Ladung und einem log P<sub>o/w</sub> von -1,36 entgegen steht (Luecken 2000). Es wird vermutet, dass die Aufnahme durch Aquaporine ebenfalls für die gute Membrangängigkeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verantwortlich ist (Halliwell & Gutteridge 1999). Der genaue Diffusionskoeffizient von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ist unbekannt (Makino *et al.* 1994), die Berechnung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationsgradienten ist jedoch möglich (Antunes & Cadenas 2000). Die schnelle Aufnahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die Zelle wird angetrieben durch den schnellen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abbau, durch die Glutathionperoxidase (GPx) im Zytosol und die Katalase in den Peroxisomen. Dadurch bleibt ein Diffusionsgefälle erhalten (Antunes & Cadenas 2000). Die Zellmembran gilt für die Aufnahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als limitierender Faktor (Makino *et al.* 1994). Diese Erkenntnis stützt die Annahme, dass die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufnahme durch membranschädigende Agenzien erhöht werden kann.

## Diskussion

---

Die  $\cdot\text{OH}$ -Bildung im Zytosol ist jedoch nicht nur durch die zytosolische  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bestimmt. Weitere wichtige Faktoren sind die zytosolische Eisenkonzentration, die Glutathionkonzentration und die Aktivität  $\text{H}_2\text{O}_2$ -entgiftender Enzyme.

Die Apoptose-induzierende Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist in der Literatur vielfach beschrieben worden (Hohlen 2001, Antunes *et al.* 2001, Antunes & Cadenas 2001, Barbouti *et al.* 2002, Ogawa *et al.* 2003, Kurz *et al.* 2004, Tenopoulou *et al.* 2005, Formichi *et al.* 2006, Kurz *et al.* 2006). Die Aussagen über die Apoptose-induzierenden Konzentrationen, die Dauer bis zur Nachweisbarkeit bestimmter apoptotischer Ereignisse und zur Intensität des apoptotischen Signals sind sehr inhomogen, teils widersprüchlich und abhängig vom untersuchten Zelltyp. Methodische Unterschiede in der Begiftung und zwischen den Nachweisverfahren erschweren den Datenvergleich zusätzlich. So beschreiben ANTUNES & CADENAS (2001) die Apoptose-induzierende Wirkung von einer intrazellulären „steady state“-Konzentration von 0,7-3  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 12 h. Vergleichbar sind die Angaben von ANTUNES *et al.* (2001), die Apoptose durch 15minütige Begiftung mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  als „steady state“-Gabe nach 12 h nachweisen konnten. Durch eine Bolusgabe von 150  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  konnte nach 6 h Apoptose nachgewiesen werden, jedoch nicht bei Generation einer „steady-state“-Konzentration von 0,02  $\mu\text{M}$ -15  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$  durch GOD (Barbouti *et al.* 2002). Ebenfalls konnte die Apoptose-induzierende Wirkung von einer Bolusgabe von 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 6 h (Formichi *et al.* 2006) sowie einer Bolusgabe von 1-10 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  nach 48 h gezeigt werden (Ogawa *et al.* 2003). Dieses heterogene Bild erklärt sich nicht aus dem Nachweis zeitlich unterschiedlich gelagerter apoptotischer Ereignisse. So verwendeten ANTUNES & CADENAS (2001) und ANTUNES *et al.* (2001) mit dem Nachweis von Phosphatidylserinverlagerungen an die Außenmembran einen Nachweis eines frühen apoptotischen Ereignisses, während Barbouti *et al.* (2002) und Tenopoulou *et al.* (2005) mit dem Nachweis von DNA-Leitern, bzw. Zellfragmentierung ein spätes apoptotisches Ereignis betrachteten, Apoptose aber dennoch nach kürzerer Induktionszeit nachwiesen. Zelltyp und Versuchsdesign scheinen für die Induktion von Apoptose entscheidend zu sein. Verschiedene Zelltypen sind in ihrer antioxidativen Kapazität sehr unterschiedlich ausgestattet, ebenso sind Zellen befähigt, auf oxidativen Stress mit ca. 18stündiger Zeitverzögerung mit Adaptation zu reagieren. In

## Diskussion

---

Zellkultur befindliche Zellen haben sich an oxidativen Stress bereits angepasst (Davies 2000). Auch HALLIWELL & GUTTERIDGE (1999) machen auf große Spannweiten in der Sensitivität gegenüber  $H_2O_2$  und auf die hohe Adaptationsfähigkeit verschiedener Zelltypen *in vivo* und *in vitro* aufmerksam. So könne eine Adaptation an oxidativen Stress im Vorfeld des Versuches Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen nehmen.

Unklar ist, durch welchen Wirkmechanismus  $H_2O_2$  die Apoptose-induzierende Kaskade auslöst. ANTUNES und CADENAS (2001) vermuten, dass  $H_2O_2$  Apoptose durch  $\cdot OH$ -Generation induziert, da Metallchelatoren die apoptotische Wirkung von  $H_2O_2$  stark hemmen. Postuliert wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen Apoptoseinduktion und Destabilisierung der Lysosomenmembranen, die durch eine darauf folgende ansteigende intrazytosolische Eisenkonzentration als frühes Ereignis der apoptotischen Kaskade gekennzeichnet ist (Kurz *et al.* 2004, Tenopoulou *et al.* 2005 und Kurz *et al.* 2006). BARBOUTI *et al.* (2002) weisen auf eine vollständige Apoptosehemmung durch ein  $H_2O_2$ -“steady-state“-Level hin und postulieren, dass  $H_2O_2$  Apoptose nicht über DNA-Schäden induziert.

In dieser Arbeit wurden apoptotische Zellen anhand von DNA-Fragmenten mit einer Länge von 180 Basenpaaren (bp) (Mono- und Oligonukleotide) nachgewiesen. Die DNA-Fragmentierung entlang der Nukleosomen ist ein spätes und omnipräsentes apoptotisches Merkmal. Mono- und Oligonukleotide konnten nach 24 h für eine Bolusgabe von 200  $\mu M$   $H_2O_2$  im Zytosol der Zelle nachgewiesen werden (Abbildung 17). Sie traten weder nach 12 h noch nach 36 h im Zytosol auf. Auf eine maximale Apoptoseinduktion folgte durch höhere  $H_2O_2$ -Gabe keine Zunahme des apoptotischen Signals, die Apoptoseinduktion war zeitabhängig, nicht konzentrationsabhängig. DAVIES (1999) beschreibt Apoptoseinduktion durch  $H_2O_2$  innerhalb eines Konzentrationsfensters von 0,5-1 mM  $H_2O_2$ , das je nach Zelltyp und Versuchsbedingungen variiert.

Im HPRT-Assay wurde die mutagene Wirkung von  $H_2O_2$  untersucht. Die Begiftung mit  $H_2O_2$  erfolgte für 15 min in einer Konzentration von 400  $\mu M$ . Unter diesen Bedingungen trat keine signifikante Erhöhung der Mutantenfrequenz (MF) auf. Aufgrund des hohen Zeit- und Kostenaufwandes konnte die Mutagenität von  $H_2O_2$  nicht zeit- und

## Diskussion

---

konzentrationsabhängig untersucht werden, so dass das Ergebnis nicht auf grundsätzlich negative Effekte hinweist. PURSCHKE *et al.* (2002) weisen auf eine erhöhte, jedoch nicht signifikant erhöhte MF nach Begiftung mit 70  $\mu\text{M}$  und 110  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  hin. Für deutlich höhere  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen von 1,35 mM konnten DIAZ-LLERA *et al.* (2000) die mutagen Wirkung an humanen T-Lymphozyten nachweisen. Die mutagene Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ -generierten DNA-Schäden wie z.B. 8-Oxoguanin ist ausführlich beschrieben (Floyd, 1990) ebenso die kanzerogene Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Bartsch & Nair 2006).

### 4.2 Kombinationswirkung von $\text{H}_2\text{O}_2$ und PCP

Bei der Betrachtung der Kombinationseffekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP sollte vorrangig geklärt werden, ob die gentoxische Kombinationswirkung durch eine erhöhte  $\cdot\text{OH}$ -Konzentration an der DNA verursacht war oder ob andere gentoxische Agenzien eine Rolle spielten.

PCP verstärkte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierte gentoxische Schäden im comet assay in einem Konzentrationsbereich zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  PCP (Abbildung 3). Beim Einsatz höherer PCP-Konzentrationen waren die DNA-Schäden methodisch zunehmend nicht mehr auswertbar.

PCP zeigte im comet assay als Einzelsubstanz keine gentoxische Wirkung. Ebenso wenig konnten WEHRY (2003) und LUEKEN (2000) für PCP eine gentoxische Wirkung nachweisen. Auch bei anderen unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien, die die gentoxische Wirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  erhöhen, wurde kein eigenes gentoxisches Potential beobachtet (Lueken *et al.* 2004, Sommer 2006, Luecken 2000). Diese Ergebnisse legen nahe, dass sowohl PCP wie auch andere unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien weder  $\cdot\text{OH}$ -Radikale noch sonstige DNA-schädigenden Verbindungen generieren.

Die beobachtete Kombinationswirkung von 25  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  mit steigenden PCP-Konzentrationen steht im Einklang mit Beschreibungen über gentoxische Effekte von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP (Purschke 1999, Wehry 2003), die Verstärkung von gentoxischen Effekten durch PCP wurde auch für MMS-induzierte DNA-Schäden beschrieben (Sommer 2006). Die

## Diskussion

---

Verstärkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten DNA-Schäden wurde nicht nur für PCP sondern auch für PCP-haltige Gemische (Stratis 2002), *n*-Hexanol (Lueken *et al.* 2004) und andere unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien nachgewiesen (Luecken 2000).

Die Vielzahl der Daten zur synergistischen Verstärkung von gentoxischen Substanzen durch unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien spricht für einen allgemeingültigen Mechanismus. Das Auftreten eines antagonistischen Effektes von PCP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an isolierter PM2 DNA spricht gegen eine Reaktion von PCP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an der DNA (Luecken 2000). Auch eine chemische Reaktion von PCP mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter Bildung eines gentoxischen Produktes ist damit ausgeschlossen.

Die Verteilung der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP induzierten DNA-Schäden folgt keiner Normalverteilung und ist vergleichbar mit der Verteilung der durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten DNA-Schäden. Die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelsubstanz und die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP in Kombination hervorgerufenen DNA-Schäden unterschieden sich in ihrer Verteilung nicht signifikant voneinander (Abbildung 4). Dies ist ein Hinweis darauf, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte OH-Radikale auch die Verursacher der synergistischen DNA-Schäden sind.

Größere Unterschiede in den Persistenzzeiten zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten und durch eine Kombination von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP induzierten DNA-Schäden konnten nicht festgestellt werden (Abbildung 6). Die Reparatur schritt in beiden Fällen schnell voran und zeigte keine deutlich unterschiedliche Reparaturkinetik. Dieses Ergebnis spricht für einen ausschließlich durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten DNA-Schaden.

Die Nachbehandlung der Proben mit fpg führte zu einer Umwandlung der Basenmodifikation 8-Oxoguanin in sekundäre Einzelstrangbrüche und dadurch zu einer Erhöhung des tail moments. Beim Vergleich von tail moments mit und ohne fpg-Nachbehandlung konnte der Einfluss von PCP auf die Bildung von 8-Oxoguanin betrachtet werden. Die DNA der mit einer Kombination von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP begifteten Zellen beinhaltete 8-Oxoguanin in vergleichbarer Größenordnung wie die DNA der mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelnoxen begifteten Zellen (Abbildung 8). Die Verteilung der durch fpg-Nachbehandlung erhöhten DNA-Schäden ist in Abbildung 9 dargestellt. Die beiden Kurven nehmen tendenziell einen identischen Verlauf. Dieses Ergebnis weist wiederum auf die Gleichartig-

## Diskussion

---

keit der DNA-Schäden hin, was in diesem Fall die Bildung von 8-Oxoguanin einschließt. Die Nachbehandlung von mit PCP als Einzelnoxen inkubierten Proben mit fpg ergab kein erhöhtes tail moment, was dafür spricht, dass PCP selbst keine  $\cdot\text{OH}$ -Radikale bildet. Das Ergebnis zur Erhöhung des 8-Oxoguaningehaltes durch die Kombinationswirkung gibt auch Hinweise auf mögliche Folgen, da 8-Oxoguanin als mutagen und kanzerogen gilt (Floyd 1990).

Die Ergebnisse zur Verteilung der DNA-Schäden, zu ihrer Persistenz und zum 8-Oxoguaningehalt der DNA weisen auf eine ähnlich hohe Belastung mit  $\cdot\text{OH}$  durch Einzel- und Kombinationswirkung hin. Auch in der Literatur finden sich Hinweise, dass Einzel- und Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nicht genotoxischen Chemikalien auf  $\cdot\text{OH}$ -Radikale beruhen.

Identische Verteilungen für  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Kombinationen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP konnte Wehry (2003) an Hepatozyten zeigen. Ähnliche Verteilungen für  $\text{H}_2\text{O}_2$  und unspezifisch wirkende Umweltchemikalien haben bereits STRATIS (2002) und HOHLEN (2001) beschrieben.

Vergleichbare Persistenzzeiten für  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die Kombination aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP zeigte zuvor schon WEHRY (2003) an Hepatozyten. Verglichen mit den Persistenzzeiten, die für andere genotoxische Substanzen gelten, erfolgte hier eine sehr schnelle Reparatur der DNA-Schäden. Die Persistenzzeit anders verursachter DNA-Schäden unterscheidet sich deutlich von dem hier gezeigten Muster. So fand PURSCHKE *et al.* (2002) deutliche Unterschiede zwischen den Persistenzzeiten für  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten und TCHQ-induzierten DNA-Schäden, weitere Vergleiche zu Persistenzzeiten sind auf Seite 65 aufgeführt.

Die Ergebnisse weisen auf eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration durch PCP aufgrund von Membranschäden nach dem „Türöffner“-Prinzip bzw. auf eine verstärkte Fentonreaktion aufgrund einer erhöhten Eisenkonzentration im Zytosol hin. Unter einem „Türöffner“ versteht man ein Agens, das durch seine membranschädigende Wirkung anderen Verbindungen die Passage der Membran erleichtert. Für eine Wirkung auf Basis der „Türöffner-Theorie“ sprechen ebenfalls die Ergebnisse von SOMMER (2006), die synergistische genotoxische Wirkungen auch für unspezifisch wirkende Um-



## Diskussion

---

weltchemikalien und MMS nachwies, welches in seiner Genotoxizität von Übergangsmetallen unabhängig ist. Der Kombinationseffekt, den SOMMER (2006) beobachtet hat, kann daher nicht auf einer Schädigung von Lysosomenmembranen beruhen kann.

Es gibt jedoch auch Argumente gegen eine erhöhte Aufnahme von  $H_2O_2$  als einzige Ursache für die beobachtete Kombinationswirkung: Die Kombinationswirkung trat nur mit  $H_2O_2$ -Konzentrationen auf, in denen  $H_2O_2$  bereits als Einzelsubstanz genotoxisch wirkte (Daten nicht gezeigt). Bei einem erhöhten  $H_2O_2$ -Einstrom aufgrund von gleichzeitiger PCP-Gabe wäre für  $H_2O_2$  eine geringere minimale Effektkonzentration zu erwarten. Auch durch Glukoseoxidase (GOD) permanent in geringen Konzentrationen generiertes  $H_2O_2$  rief im Gegensatz zu einer  $H_2O_2$ -Bolusgabe keine Kombinationswirkungen mit PCP oder *n*-Hexanol hervor (Klocke 2007). Der Kombinationseffekt konnte von KLOCKE (2007) auch an GSH-depletierten Zellen für PCP und GOD-induziertes  $H_2O_2$  nicht gezeigt werden.

Im  $H_2DCF$ -Assay bewirkte der gleichzeitige Einsatz von  $H_2O_2$  und PCP eine deutlich erhöhte ROS-Entwicklung im Zytosol (Abbildung 15 und Abbildung 16). Durch beide eingesetzten Kombinationen von  $H_2O_2$  und PCP übersteigt die Fluoreszenzzunahme die durch  $H_2O_2$  als Einzelnoxide hervorgerufene Fluoreszenzzunahme um mindestens das Dreifache. PCP bewirkte als Einzelsubstanz keine signifikant von der Kontrolle abweichenden Fluoreszenzwerte, wenn auch ein leichter Fluoreszenzanstieg zu beobachten war. Es konnte für PCP als Einzelsubstanz nur ein minimaler Fluoreszenzanstieg beobachtet werden. Das Ergebnis gibt daher keinen Hinweis auf eine direkte Radikalgeneration durch PCP.

Es tritt eine synergistische Kombinationswirkung auf. Für  $H_2O_2$  und PCP sind Synergismen nur durch eine Interaktion der Einzelsubstanzen auf Zellebene erklärbar. Eine Reaktion der beiden Chemikalien kann als Ursache der erhöhten Genotoxizität unter den gegebenen Bedingungen ausgeschlossen werden. Diese müsste zu einem Produkt führen, das genotoxisch wirksamer als  $H_2O_2$  ist, was in Versuchen an PM2-DNA ausgeschlossen wurde (Luecken 2000).

## Diskussion

---

Die beobachteten Effekte können im wesentlichen durch zwei Mechanismen erklärt werden:

1. Der verstärkten  $\cdot\text{OH}$ -Entwicklung liegt möglicherweise ein erhöhter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einstrom in die Zelle zugrunde. Dieser könnte durch Membranstörungen durch PCP-Einlagerungen hervorgerufen sein. Durch seinen hohen  $\log P_{\text{O/W}}$  von 4,89 zeigt PCP eine starke Akkumulationstendenz in Membranen (Cascorbi & Foret 1991, Levy *et al.* 2007). Die Einlagerung von lipophilen Chemikalien führt zu Membranstörungen und zu einer erhöhten Membranpermeabilität (Ekwall 1980, Ginsburg *et al.* 1989). Die membranschädigende Wirkung von PCP ist belegt (Jacobi & Witte 1993, Cascorbi & Foret 1991).
2. Die verstärkte ROS-Bildung ist möglicherweise auch in einer erhöhten zytosolischen Eisenkonzentration begründet. So weisen TENOPOULOU *et al.* (2005) auf erhöhte Eisenkonzentrationen im Zytosol nach Begiftung mit 2 nM  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$  (durch GOD erzeugt) aufgrund von Lysosomenmembranschädigungen hin. Eine verstärkte Schädigung der Lysosomenmembranen durch PCP mit der Folge eines Eiseneinstroms in das Zytosol ist vor diesem Hintergrund denkbar. Die erhöhte Eisenkonzentration würde bei gleichzeitiger erhöhter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zu einer verstärkten Fentonreaktion führen. Die  $\cdot\text{OH}$ -Generation aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist in hohem Maße von der zytosolischen Eisenkonzentration abhängig (Halliwell & Gutteridge 1999).

PCP konnte in Untersuchungen an *E. coli* membrangängige Komplexe mit Eisen bilden. Es verstärkte dadurch die Aufnahme von Eisen aus dem Medium deutlich und führte zu Vitalitätseinbrüchen (Levy *et al.* 2007). Ein Transport von Eisen aus den Lysosomen ins Zytosol durch PCP ist auf diese Weise denkbar, würde aber die Kombinationseffekte mit anderen nicht genotoxischen Umweltchemikalien nicht erklären.

## Diskussion

---

Durch die gleichzeitige Gabe von PCP nahm der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung erhöhte GSSG-Gehalt PCP-konzentrationsabhängig wieder ab. Dabei sank der GSSG-Gehalt bis auf das Niveau der unbehandelten Kontrolle. Ein ähnliches Bild zeigte sich durch die gleichzeitige Gabe von *n*-Hexanol und  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung erhöhte GSSG-Gehalt nahm durch *n*-Hexanol konzentrationsabhängig ab.

PCP hatte als Einzelsubstanz keine Effekte auf den GSSG-Gehalt der Zellen, durch *n*-Hexanol bzw. die Lösungsvermittler DMSO und Cremophor trat eine Abnahme des GSSG-Gehaltes ein. Da im  $\text{H}_2\text{DCF}$ -Assay keine ROS-Erhöhung für PCP nachgewiesen wurde, entsprach dieses Ergebnis den Erwartungen. Das Absinken des GSSG-Gehaltes könnte durch die Radikalfängereigenschaft von DMSO, die schon häufig beschrieben wurden, begründet sein (Lueken *et al.* 2004). Möglich ist auch eine Abnahme des GSSG-Gehaltes aufgrund einer GSH-Konjugation durch *n*-Hexanol oder die Lösungsvermittler. Die Ergebnisse der GSSG-Bestimmung liefern keinen Hinweis auf eine direkte Radikalgeneration durch PCP oder *n*-Hexanol.

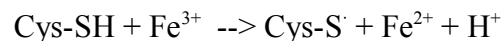
Die Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP, bzw. *n*-Hexanol auf den GSSG-Gehalt entsprach nicht den Erwartungen. Durch die im  $\text{H}_2\text{DCF}$ -Assay nachgewiesene erhöhte  $\cdot\text{OH}$ -Konzentration war ein erhöhter GSSG-Gehalt erwartet worden. Eine Abnahme des GSSG-Gehaltes kann seine Ursache auf verschiedenen Ebenen haben. Eine Hemmung der Glutathionperoxidase (GPx) führt zu einer verminderten GSSG-Bildung (Halliwell & Gutteridge 1999). Dies ist jedoch unwahrscheinlich, da die strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen PCP und *n*-Hexanol beide zu einer verminderten GSSG-Bildung führten. Eine wichtige Funktion des GSH ist die enzymunabhängige Konjugatbildung zur Entgiftung von toxischen Verbindungen (Anderson 1998). Eine starke GSH-Konjugatbildung kann zu einer verminderten GSSG-Bildung aufgrund von GSH-Verknappung führen (Sierts-Herrmann 2003), die bei den eingesetzten PCP-Konzentrationen jedoch nicht allein ursächlich sein kann und aufgrund der geringen Reaktivität von *n*-Hexanol ebenfalls nicht anzunehmen ist. Die Überprüfung einer Konjugatbildung konnte methodisch nicht durchgeführt werden. Weiter ist bekannt, dass PCP der Glutathion-S-Transferase gegenüber eine starke Hemmwirkung besitzt (Moorthy & Rande-rath 1996).

## Diskussion

---

Schwer interpretierbare Ergebnisse brachte ebenfalls die Untersuchung der Kombinationswirkungen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP an GSH-depletierten Zellen. Erwartungsgemäß wurden an GSH-depletierten Zellen schon durch eine geringere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 10 µM DNA-Schäden induziert. Diese konnten jedoch nicht durch PCP oder *n*-Hexanol verstärkt werden. Im Gegenteil, das tail moment sank bei einem Großteil der Proben in der Kombination mit PCP ab (Abbildung 11). Eine vergleichbare Wirkung zeigte *n*-Hexanol in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an depletierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Eine mögliche Erklärung liefert der Hinweis von Halliwell & Gutteridge (1999), dass mitochondriales GSH mit Hilfe von BSO kaum zu depletieren ist. Membranschädigende Wirkungen von PCP und *n*-Hexanol, wie sie aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse und diverser Literaturhinweise wahrscheinlich erscheinen, könnten zu einem Efflux von GSH aus den Mitochondrien führen. Die Empfindlichkeit der GSH-depletierten Zellen gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> würde dadurch, wie beobachtet, abnehmen.

Eine andere Erklärung könnte der Hinweis von ANTUNES *et al.* (2001) auf eine Eisenreduktion durch die Aminosäure Cystein sein:



Bei einem verstärkten Eisenausstrom aus den Lysosomen, wie durch ANTUNES *et al.* (2001) für die 15minütige Begiftung mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an T-Lymphozyten nachgewiesen, wäre diese Reaktion an GSH denkbar. Eine GSH-Depletion entzöge dieser Reaktion die Grundlage und würde die Umwandlung von Fe<sup>3+</sup> zum reaktiveren Fe<sup>2+</sup> und damit gleichzeitig die Generation von ·OH bremsen. Die Reaktion sollte jedoch im Vergleich mit der Haber-Weiss-Reaktion von untergeordneter Bedeutung sein.

Die Verteilung der DNA-Schäden weist zwischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten und durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP induzierten DNA-Schäden an GSH-depletierten Zellen deutliche Unterschiede auf (Abbildung 12). Während die Verteilung der DNA-Schäden, die durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP induziert wurden, eine flache Kurve beschreibt, zeigt sich für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Schäden eine steile Verteilungskurve, d. h. dort gibt es viele Zellen mit sehr geringem DNA-Schaden und gleichzeitig viele Zellen mit starker Schädigung. Nach Begiftung mit einer niedrigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration trat nur bei 75 % der Zellen ein erhöhtes tail

## Diskussion

---

moment (tm) auf. Die geschädigten Zellen zeigten jedoch zu einem hohen Prozentsatz deutliche DNA-Schäden. Dieses Ergebnis war für GSH-depletierte Zellen zu erwarten, da sie unter oxidativem Stress kaum Möglichkeiten zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Entgiftung haben. Ein anderes Schadensmuster zeigt sich nach der Begiftung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP. 100 % der Zellen haben einen DNA-Schaden erlitten, jedoch bleibt dieser mit einem tm < 20 bei über 50 % der Zellen relativ gering. Nur ein geringer Prozentsatz der Zellen ist schwer geschädigt. Durch welchen Mechanismus eine stärkere DNA-Schädigung verhindert wird, ist unklar.

Durch die gleichzeitige Gabe von 200 µM PCP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde Apoptose in ähnlichem Umfang und nach der gleichen Zeit wie durch 200 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Einzelsubstanz induziert (Abbildung 18). Es bedurfte jedoch geringerer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen, um Apoptose zu induzieren, wenn H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Kombination mit PCP zugegeben wurde. Dieses Ergebnis deutet auf eine Erhöhung der intrazellulären H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bzw. auf eine Erhöhung der intrazellulären ·OH-Generation durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hin.

Einen solchen Effekt könnte PCP ebenso durch seine Funktion als „Türöffner“ für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wie durch eine Schädigung der Lysosomenmembranen mit darauf folgender Erhöhung der intrazellulären Eisenkonzentration bewirken.

Berichte von HOHLEN (2001) über die Apoptose-induzierende Wirkung der stark lipophilen Umweltchemikalie Bioalletrin in Kombination mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geben einen Hinweis darauf, dass hier keine PCP-spezifische Wirkung vorliegt (Hohlen 2001). PCP hatte keine Apoptose-induzierende Einzelwirkung. In der Literatur finden sich keine Hinweise auf eine Apoptose-induzierende Wirkung von PCP (Chen *et al.* 2004), jedoch gibt es Hinweise auf Apoptosehemmung durch PCP-Konzentrationen zwischen 2-20 µM an Hepatozyten (Sai *et al.* 2001). Diese beruht jedoch auf DNA-schädigenden Metaboliten von PCP, die in metabolisch nicht kompetenten Zellen wie menschliche Fibroblasten es sind, nicht auftreten.

Die mutagene Wirkung von 400 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Kombination mit 500 µM PCP wurde im HPRT-Assay nachgewiesen (Abbildung 19). Die Mutagenität einer Substanz bzw. eines Substanzgemisches gilt nach OECD-Richtlinie 476 als nachgewiesen, wenn eine Erhö-

## Diskussion

---

hung der Mutantenfrequenz (MF) auf 300 % der unbehandelten Kontrolle eintritt. Dieser Wert wurde im ersten Versuch knapp verfehlt, im zweiten Versuch wurde er deutlich überschritten (Tabelle 3). Die Mutagenität des Gemisches von 400  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  und 500  $\mu\text{M}$  PCP kann damit als nachgewiesen angesehen werden, wobei die Einzelsubstanzen keine mutagene Wirkung zeigten.

Die Ergebnisse der beiden Versuche unterscheiden sich letztendlich auch aufgrund der Unterschiede in der MF der beiden unbehandelten Kontrollen, von denen die erste eine doppelt so hohe MF wie die zweite aufweist. Die MF der unbehandelten Kontrollen liegt im Rahmen der spontanen Mfs bei der identischen Durchführung des HPRT-Assays (Sommer 2006). Die Inkubation mit PCP als Einzelnoxide bewirkte einen leichten, jedoch nicht signifikanten Anstieg der MF. Auch PURSCHKE (1999) konnte für PCP als Einzelsubstanz keinen Effekt auf die MF zeigen. Ein Zusammenhang zwischen einer Langzeit-Exposition gegenüber PCP und diversen Krebserkrankungen, u.a. Nierenkrebs, ist belegt (Demers *et al.* 2006). Ebenfalls ist die Induktion von Leberkrebs durch PCP im Tierversuch nachgewiesen (Sai *et al.* 2001). Hier spielen aber wiederum DNA-schädigende Metabolite von PCP die entscheidende Rolle.

### 4.3 Mögliche Mechanismen der Kombinationswirkung

Nach Darstellung und Diskussion der Ergebnisse sollen nun die zu Beginn formulierten Thesen als mögliche Ursachen der Kombinationswirkungen anhand der Ergebnisse überprüft werden. Eine Zusammenfassung der Thesen und Ergebnisse ist in Tabelle 4 gezeigt.

**These 1** postuliert eine Hemmwirkung von PCP und anderen nicht gentoxischen Chemikalien auf  $H_2O_2$ -entgiftende Enzyme oder Antioxidationsmittel. Gegen eine Hemmung der  $H_2O_2$ -Entgiftung als Ursache der Kombinationswirkung spricht die Allgemeingültigkeit vieler der Beobachtungen für strukturell sehr diverse Umweltchemikalien, während eine Enzymhemmung häufig die Bindungsfähigkeit an das aktive Zentrum des Enzyms voraussetzt, wozu es einer speziellen chemischen Struktur bedarf. Jedoch weisen MOORTY & RANDEARTH (1996) auf die Hemmung der GSH-S-Transferase durch PCP hin. Verschiedene Substanzen können durch GSH-Konjugation zu einem GSH-Mangel führen (Sierts-Herrmann 2003). Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keinen direkten Hinweis auf eine Enzymhemmung durch PCP oder *n*-Hexanol.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen **These 2**, nach der der Wirkmechanismus der Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  und PCP auf einer Radikalgeneration durch PCP bzw. einem durch PCP und  $H_2O_2$  gebildeten Produkt beruhen könnte. PURSCHKE (1999) postulierte zwar eine radikalische Kettenreaktion für  $H_2O_2$  und PCP, kann dadurch die gentoxische Kombinationswirkung von  $H_2O_2$  mit anderen unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien aber nicht erklären. Die Ergebnisse des comet assays lassen eine Kombinationswirkung nach **These 2** unwahrscheinlich erscheinen, da sämtliche beobachteten DNA-Schäden in ihrer Persistenz, Verteilung und in dem Gehalt an 8-Oxoguanin  $H_2O_2$ -induzierten DNA-Schäden gleichen (Abbildung 4-6, 8-9 und Abbildung 16). Außerdem konnten keine synergistischen Schäden an nativer PM2 DNA nachgewiesen werden (Luecken 2000).

		In den Thesen erwartete Auswirkung der Kombinationswirkung auf:						
		GSSG-Konz. im Zytosol	ROS-Konz. im Zytosol	OH-Radikale im Zytosol	PCP-spezifischer Effekt	DNA-schädigende Spezies	8-Oxoguanin-Konz.	Eisenkonz. im Zytosol
These 1	Hemmung von Enzymen, die an der ROS-Entgiftung beteiligt sind	↑	↑	↑	ja	nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	=
These 2	Radikalische Kettenreaktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und PCP	=	=	=	ja	diverse	=/?	=
These 3a	Erhöhung der Permeabilität der Zellmembran für H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> durch Einlagerung von Chemikalien	↑	↑	↑	nein	nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	=
These 3b	Schäden an der Lysosomenmembran durch Chemikalieneinlagerung, erleichterte Lysosomenruptur	↑	↑	↑	nein	nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑
These 4	Bildung von PCP/Eisenkomplexen, verstärkter Eiseneinstrom ins Zytosol	↑	↑	↑	ja	nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	↑
These 5	Verstärkte Lipidperoxidation durch Einlagerung von Chemikalien in die Zellmembran	=	=	=	nein	diverse, u.a. Malondyaldehyd, 8-Hydroxynonenal	=/?	=
<b>ERGEBNISSE dieser Arbeit</b>		↓	↑	↑	nein	nur H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↑	?

Tabelle 4: Vergleich der Ergebnisse mit den in den Thesen erwarteten Auswirkungen der Kombinationseffekte auf die intrazytosolische GSSG-, ROS-, OH- und Eisenkonzentration, sowie auf die DNA-schädigenden Spezies und die Bildung von 8-Oxoguanin. **Symbole:** ↑ Konzentrationszunahme und ↓ Konzentrationsabnahme im Vergleich zur Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, = keine Konzentrationsveränderung im Vergleich zur Einzelwirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ? nicht geklärt, **grünes Feld:** Übereinstimmung zwischen erwarteter Auswirkung und Ergebnis, **rotes Feld:** keine Übereinstimmung zwischen erwarteter Auswirkung und Ergebnis.



## Diskussion

---

Die Ergebnisse stützen **These 3**, nach der PCP Membranschäden hervorruft, die zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS-Konzentration führen. Diesen Effekt könnten nicht genotoxische Chemikalien auf unterschiedliche Weise verursachen. Auch die Darstellung in Tabelle 4 macht deutlich, dass die Übereinstimmung zwischen der erwarteten Auswirkung des Kombinationseffektes und den Ergebnissen dieser Arbeit bei These 3a und 3b am höchsten ist.

**These 3 a** vermutet durch PCP verursachte Schäden an der Zellmembran, einhergehend mit einer erhöhten Membranpermeabilität für  $H_2O_2$ . Die durch PCP in der Rolle des „Türöffners“ verursachte erhöhte  $H_2O_2$ -Konzentration würde demnach die genotoxischen Effekte hervorrufen. Membranstörungen als Wirkmechanismus eines weiten Spektrums von Umweltchemikalien werden von verschiedenen Autoren gestützt (Ekwall 1980, Witte *et al.* 1995, Jacobi *et al.* 1996). Auch GINSBURG *et al.* (1989) sehen den Synergismus zwischen  $H_2O_2$  und membranaktiven Substanzen in einem erleichterten Zugang zu empfindlichen Membranregionen für  $H_2O_2$  durch Disorganisation der Membran begründet. Nachgewiesen wurde eine unspezifische Beeinträchtigung von Membranen durch Xenobiotika, die mit einer Hemmung von funktionalen membrangebundenen Proteinen, wie der  $Na^+/K^+$ -ATPase, einhergeht (Cascorbi & Foret 1991, Cascorbi & Ahlers 1989). GINSBURG *et al.* (1993) konnten synergistische Effekte für  $H_2O_2$  und membranschädigende Enzyme nachweisen, LUEKEN *et al.* (2004) wiesen auf synergistische genotoxische Effekte diverser Xenobiotika in Kombination mit  $H_2O_2$  hin und vermuteten eine verstärkte  $H_2O_2$ -Aufnahme aufgrund von Membranschäden. Gestützt wird die Theorie der Wirkung von PCP als „Türöffner“ für genotoxische Verbindungen auch durch Ergebnisse von SOMMER (2006), die für diverse unspezifisch wirkende Umweltchemikalien eine synergistische Verstärkung der genotoxischen Wirkung von MMS nachgewiesen hat.

**These 3 a** wird weiter gestützt durch Hinweise auf die membranschädigende Wirkung von PCP (Cascorbi & Foret 1991, Jacobi & Witte 1993). Die Membranpermeabilität stellt den limitierenden Faktor für die  $H_2O_2$ -Aufnahme dar (Makino *et al.* 2004). Obwohl  $H_2O_2$  schnell durch die Membran in die Zelle einströmt, bleibt aufgrund des schnellen enzymatischen Abbaus von  $H_2O_2$  ein Diffusionsgefälle bestehen, d.h. auf-

## Diskussion

---

grund des hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Umsatzes durch die Katalase ist das enzymatische Entgiftungssystem auch bei hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen nicht ausgelastet. Der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einstrom wird nicht durch eine Angleichung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration zwischen Zytosol und Medium gebremst, sondern durch die begrenzte Membranpermeabilität (Makino *et al.* 2004). Abgeschwächte Kombinationseffekte an GSH-depletierten Zellen könnten auf Mitochondrienmembranschäden beruhen, die durch nicht gentoxische Chemikalien hervorgerufen wurden. Der mitochondriale GSH-Pool lässt sich nur schwer depletieren und nicht gentoxische Chemikalien könnten den GSH-Efflux aus den Mitochondrien ins Zytosol verstärken. Auf eine weitere Erklärung für die gentoxische Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP auf der Grundlage einer Membranschädigung wird in These 3 b eingegangen.

Die Ergebnisse zum Einfluss der Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP auf den GSSG-Gehalt können anhand der „Türöffner-Theorie“ ebenso wenig erklärt werden wie die fehlende Kombinationswirkung bei subgentoxischen Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

In neuerer Zeit wurde über den Zusammenhang zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten Lysosomenschäden und Apoptoseinduktion durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  berichtet (Kurz *et al.* 2004, Tenopoulou *et al.* 2006, Kurz *et al.* 2006). Betont wird dabei nochmals die Abhängigkeit der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Toxizität von der intrazytosolischen Konzentration an Übergangsmetallen, insbesondere an Eisen (Kurz *et al.* 2006). Es gibt sogar Hinweise, dass intrazytosolisches Eisen für die Fentonreaktion nur sehr begrenzt zur Verfügung steht und die erste  $\cdot\text{OH}$ -Generation durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Eisen innerhalb der Lysosomen stattfindet (Kurz *et al.* 2004).

Da ein Einfluss von unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien auf die Stabilität der Lysosomen denkbar ist, postuliert **These 3 b** eine erhöhte zytosolische Konzentration an Übergangsmetallen aufgrund von Lysosomenschäden als Ursache für gentoxische Kombinationswirkungen zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP.

In der Literatur finden sich, wie zuvor schon erwähnt, Hinweise auf die membranschädigende Wirkung von PCP. EINSPOHN & KOEHLER (2007) wiesen für lipophile Chemikalien starke Akkumulationstendenzen für Lysosomen nach. Da Lysosomen redoxaktives Eisen in hoher Konzentration speichern (Kurz *et al.* 2006, Tenopoulou *et al.* 2005),

## Diskussion

---

führt eine Schädigung von Lysosomenmembranen zu einem Fe-Efflux ins Zytosol. Über die Fentonreaktion käme es dort zu einer Erhöhung der ROS-Konzentration (Kurz *et al.* 2004). Das in Form von  $\text{Fe}^{3+}$  vorliegende Eisen kann über SH-Gruppen zu  $\text{Fe}^{2+}$  reduziert werden (Kurz *et al.* 2006). Diese Reaktion wäre auch an Glutathion denkbar. Die Theorie wird von Untersuchungen zum Effekt von hydrophilen, also nicht membranängigen Eisenchelatoren auf die Toxizität von  $\text{H}_2\text{O}_2$  gestützt. So wird der hydrophile Eisenchelator desferrioxamin (dfo) durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und verbleibt in den Lysosomen. Bei gleichzeitiger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Begiftung bleiben die Lysosomen intakt und  $\text{H}_2\text{O}_2$  entfaltet eine deutlich abgeschwächte Toxizität (Kurz *et al.* 2006). SCHEWE (2002) beobachtete ebenfalls eine Abnahme der Gentoxizität bei Inkubation mit dem membranimpermblen Eisenchelator DTPA, führte dies jedoch auf Zellmembranschäden zurück, die einen Eintritt von DTPA in die Zelle ermöglichen sollten. Die Aufnahme von DTPA in das Zytosol wurde von SCHEWE (2002) jedoch nicht nachgewiesen, so dass eine endozytotische Aufnahme in die Lysosomen ebenfalls denkbar ist. Gegen eine ausschließliche Wirkung von unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien über die Schädigung der Lysosomenmembranen sprechen die Ergebnisse von SOMMER (2006), die, wie bereits erwähnt, eine Verstärkung der gentoxischen Wirkung von MMS durch unspezifisch wirkende Umweltchemikalien nachgewiesen hat. MMS wirkt direkt gentoxisch und ist in seiner Wirkung nicht auf Übergangsmetalle angewiesen. Weiter ist zu bedenken, dass die PCP-Konzentration an der Außenmembran deutlich höher ist und daher primär dort zu Schäden führen müsste; jedoch konnten WITTE & JACOBI (1993) schon für PCP-Konzentrationen von 5-10  $\mu\text{M}$  eine membranschädigende Wirkung nachweisen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen mit einer Erhöhung der intrazytosolischen Eisenkonzentration in Einklang. So sind alle Ergebnisse zur gentoxischen Wirkung der Kombination von PCP und  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht nur durch eine erhöhte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration, sondern zusätzlich gut durch eine verstärkte Fenton-Reaktion erklärbar. Die Hemmung des Kombinationseffektes durch GSH-Depletion ist durch die Hemmung der von KURZ *et al.* (2006) postulierten Reduktion von Eisen an SH-Gruppen verständlich. So würde  $\text{Fe}^{2+}$  aus dem freigesetzten  $\text{Fe}^{3+}$  durch die Abwesenheit von Glutathion nicht in dem Maße

## Diskussion

---

gebildet und dadurch die  $\cdot\text{OH}$ -Generation gehemmt. Ein Großteil der Untersuchungsergebnisse steht mit dieser These im Einklang. Die Ergebnisse zum GSSG-Gehalt sind mit dieser These jedoch nicht zu erklären.

**These 4** beschreibt eine weitere Möglichkeit der Erhöhung der intrazytosolischen Eisenkonzentration. LEVY *et al.* (2007) beobachteten an *E. coli* die Erhöhung der Fe-Aufnahme in Kombination mit PCP bei einer gleichzeitigen Vitalitätsabnahme. Dabei wird ein Zusammenhang zwischen der Bildung von ungeladenen Komplexen aus Eisen und PCP und der Erhöhung der Aufnahme beider Stoffe erkennbar. Die Wachstumshemmung durch die Kombination von PCP und Eisen betrug annähernd 100 %, während die Einzelsubstanzen keine nennenswerte Wachstumshemmung hervorriefen (Levy *et al.* 2007).

Eisen ist in dem verwendeten Zellkulturmedium vorhanden und nicht durch Eisenchelatoren gebunden. Auch Laborgefäße sind mit Metallen verunreinigt, was ein bekanntes Problem für die Erforschung von oxidativem Stress *in vitro* darstellt (Halliwell & Gutteridge 1999).

Doch These 4 kann nicht zur Erklärung der Kombinationseffekte dienen, da die Kombinationseffekte auch mit *n*-Hexanol auftraten, das keine Eisenkomplex-bildenden Eigenschaften besitzt. Auch die in der Literatur erwähnten gentoxischen Kombinationseffekte von unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien mit MMS (Sommer 2006) sind durch These 4 nicht erklärbar.

**These 5** stützt sich auf Vermutungen von GINSBURG *et al.* (1989), nach denen  $\text{H}_2\text{O}_2$  leichter an empfindliche Membranstrukturen gelange, wenn membranaktive Substanzen diese zuvor geschädigt haben. JACOBI & WITTE (1993) haben für PCP membranschädigende Wirkungen schon weit unterhalb des zytotoxischen NOECs nachgewiesen. STRATIS (2002) vermutet verstärkte Lipidperoxidation (LPO) durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Akkumulation von unspezifisch wirkenden Umweltchemikalien in der Zellmembran. Die erhöhte LPO-Rate würde zu einer verstärkten Bildung von gentoxischen LPO-Produkten führen. LPO-Produkte rufen DNA-Schäden hervor (Ji *et al.* 2001, Bartsch & Nair 2006). Die Ergebnisse zur Gentoxizität der Substanzkombination weisen auf  $\cdot\text{OH}$ -Radikale als

## Diskussion

---

ausschließliche Ursache der DNA-Schäden hin. Möglicherweise weist das abweichende Verteilungsmuster für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte DNA-Schäden an GSH-depletierten Zellen auf weitere DNA-schädigende Spezies hin.

### 4.4 Fazit und Ausblick

Die Ergebnisse zur Gentoxizität der Kombinationswirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PCP weisen auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als alleinigen Verursacher der DNA-Schäden durch  $\cdot$ OH-Generation hin. Die Wirkung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde durch PCP synergistisch verstärkt. Damit stützen die Ergebnisse im Großen und Ganzen These 3, wonach PCP Kombinationseffekte mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Einlagerung in die Zellmembran bewirkt. Membranstörungen durch PCP können in verschiedenen Zellkompartimenten auf unterschiedliche Weise zu synergistischen Kombinationswirkungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führen:

- Durch die Einlagerung in die Zellmembran ruft PCP wie in These 3a beschriebenen Störungen der Membranintegrität hervor, die die Permeabilität der Zellmembran für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> heraufsetzen, so dass vermehrt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die Zelle einströmt.
- Durch die Einlagerung in Lysosomenmembranen kann PCP wie in These 3b beschrieben auf zwei Arten zu synergistischen Kombinationswirkungen führen:
  - Auch hier kann die Permeabilität der Membran für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhöht werden, so dass dieses verstärkt in Lysosomen einströmen kann. Lysosomen beinhalten einen großen Teil des redoxaktiven Eisens, das in der Zelle zur Verfügung steht (Kurz *et al.* 2006). Es kommt mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> über die Fentonreaktion zu  $\cdot$ OH-Bildung, was zu einer Ruptur der Lysosomenmembranen führen kann und von einem Anstieg der intrazytosolischen Eisenkonzentration begleitet wird. Die erhöhte intrazytosolische Eisenkonzentration bedingt wiederum eine verstärkte  $\cdot$ OH-Generation.
  - Durch die Störung der lysosomalen Membranintegrität kann PCP die Ruptur der Lysosomen möglicherweise erleichtern.

## Diskussion

---

Die beschriebenen Effekte sind nicht an spezifische Eigenschaften von PCP gebunden, sondern konnten bereits für andere nicht genotoxische Umweltchemikalien nachgewiesen werden und sind eng an die Lipophilie der Substanzen gekoppelt. Der synergistisch verstärkte oxidative Stress hatte weitreichende Folgen für die Zelle. So konnten eine Apoptoseinduktion für niedrigere H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen und eine erhöhte Mutagenität nachgewiesen werden.

Umweltchemikalien sind Bestandteil des täglichen Lebens; dennoch sind Teile der Bevölkerung Umweltchemikalien überproportional ausgesetzt, vor allem über Belastungen am Arbeitsplatz, aber auch durch den Aufenthalt in belasteten Wohnräumen. Chronisch entzündliche Erkrankungen nehmen in unserer Gesellschaft seit geraumer Zeit zu, ohne dass die Ursache hierfür bekannt ist (Bickler & DeMaio 2008). Vielfach sind auch Kinder betroffen, wie z. B. bei Neurodermitis. Chronisch entzündliche Erkrankungen gehen mit einer dauerhaften Belastung der Betroffenen mit einem erhöhten Level an oxidativem Stress einher, welches in einigen Fällen zu schwerwiegenden Folgeerscheinungen, darunter Krebserkrankungen, führen kann (Nair *et al.* 2007).

Es gibt eine Schnittmenge von Personen, die von chronisch entzündlichen Erkrankungen betroffen sind und gleichzeitig dem Kontakt mit nicht genotoxischen Umweltchemikalien ausgesetzt sind.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit muss bei dieser Personengruppe eine synergistische Verstärkung des oxidativen Stresses durch die Belastung mit Umweltchemikalien in Betracht gezogen werden. Es besteht daher Forschungsbedarf zu einer ursächlichen Korrelation von Exposition gegenüber Umweltchemikalien und dem Auftreten von entzündlichen Erkrankungen sowie zu den Auswirkungen von Chemikalienexposition für Personen mit nachgewiesener erhöhter Belastung durch oxidativen Stress.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Bewertung der Genotoxizität einer Verbindung auf der Basis von Daten, die auf Einzelstoffbetrachtungen beruhen, nicht ausreicht. Dennoch sieht REACH die Betrachtung von Kombinationswirkungen zur Abschätzung des genotoxischen und kanzerogenen Potentials einer Verbindung nicht vor. Dieses Vorgehen spiegelt den heutigen Stand der Wissenschaft nicht ausreichend

## **Diskussion**

---

wider. REACH sollte dahingehend ergänzt werden, dass die Berücksichtigung von Kombinationswirkungen für die Bewertung des genotoxischen Potentials einer Substanz gewährleistet ist.

### 5 Zusammenfassung

Ausgangspunkt dieser Arbeit waren vorangegangene Beobachtungen synergistischer gentoxischer Kombinationswirkungen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und nicht gentoxischen Chemikalien unterschiedlicher Struktur. Die Erforschung der Ursachen dieser synergistischen Kombinationswirkungen von oxidativem Stress (induziert durch  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und nicht gentoxischen Umweltchemikalien am Beispiel von PCP stellten das Ziel dieser Arbeit dar. Die Daten wurden durch Ergebnisse zur Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und *n*-Hexanol ergänzt, um mögliche spezifische Wirkungen von PCP auszuschließen. Besonderes Interesse galt der Rolle von  $\cdot\text{OH}$ -Radikalen bei der Induktion von DNA-Schäden durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  als Einzelnoxide und in Kombination mit PCP. Hierdurch sollte geklärt werden, ob  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch in der Kombinationswirkung alleiniger Verursacher der DNA-Schäden ist.

Die Ergebnisse zur Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP deuten auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  als alleinigen Verursacher der DNA-Schäden hin:

- Die Verteilung der DNA-Schäden unterschied sich innerhalb einer Stichprobe bei gleichem mittleren Schaden zwischen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten und durch die Kombinationswirkung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP induzierten Schäden nicht
- Die Persistenz der DNA-Schäden war bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -induzierten und durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP induzierten Schäden ähnlich
- Der Anteil an 8-Oxoguanin an der gesamten DNA-Schädigung war bei mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  behandelten und mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP behandelten Proben bei gleicher Schadenshöhe gleich
- Die intrazytosolische ROS-Konzentration wurde durch die Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  und PCP im Vergleich zur Begiftung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  deutlich erhöht



## Zusammenfassung

---

Wird der Glutathionhaushalt der Zelle betrachtet, treten schwer zu interpretierende Ergebnisse auf:

- Bei GSH-depletierten Zellen konnte die synergistische Verstärkung von  $H_2O_2$ -induzierten Schäden durch PCP nicht nachgewiesen werden
- Während die Inkubation mit  $H_2O_2$  zu einem erhöhten GSSG-Gehalt führte, nahm der GSSG-Gehalt bei der zusätzlichen Inkubation mit PCP konzentrationsabhängig ab

Der Nachweis dieses Effektes über den GSSG-Gehalt ist möglicherweise durch den Eingriff von nicht genotoxischen Umweltchemikalien in den Glutathionmetabolismus erschwert.

Die Ergebnisse deuten auf  $\cdot OH$ -Radikale als Ursache der DNA-Schäden hin. Die Erhöhung der  $\cdot OH$ -Radikal-Konzentration wurde wahrscheinlich durch die Einlagerung von PCP in Membranen bewirkt. Durch Einlagerung in die Zellmembran kann PCP möglicherweise den Einstrom von  $H_2O_2$  in die Zelle erhöhen. Durch Schädigung der Lysosomenmembranen kann PCP möglicherweise den Einstrom von  $H_2O_2$  in die eisenreichen Lysosomen erhöhen oder den Ausstrom von Eisen aus den Lysosomen ins Zytosol verstärken. In jedem Fall wäre eine erhöhte intrazytosolische  $\cdot OH$ -Radikal-Konzentration die Folge.

Der Nachweis der synergistisch erhöhten  $\cdot OH$ -Radikal-Konzentration zeigte Langzeitfolgen hinsichtlich der Apoptoseinduktion und der Mutagenität.

- Bei gleichzeitiger Begiftung mit PCP halbierte sich die Apoptose-induzierende  $H_2O_2$ -Konzentration
- Während für  $H_2O_2$  keine mutagene Wirkung nachgewiesen werden konnte, wirkte eine Kombination von  $H_2O_2$  und PCP mutagen

Es besteht weiterer Forschungsbedarf, um das Risiko der genotoxischen Kombinationswirkung von oxidativem Stress und nicht genotoxischen Umweltchemikalien für die Gesundheit von Personengruppen, die Umweltchemikalien gegenüber exponiert sind und

## **Zusammenfassung**

---

solchen, die unter chronischen entzündlichen Erkrankungen leiden, abschätzen zu können. Weiter sollten die Erkenntnisse über gentoxische Kombinationswirkungen nicht gentoxischer Chemikalien bei der Regulierung des Chemikalieneintrags in die Umwelt durch REACH Berücksichtigung finden.

## **6 summary**

The genotoxicity of oxidative stress, induced by reactive oxygen species (ROS) has shown to be enhanced by nongenotoxic chemicals (Witte 2001, Lueken *et al.* 2004). The aim of this study was to shed light on the cause of the synergistic combination effects of ROS generated by hydrogen peroxide and nongenotoxic chemicals on human fibroblasts. Pentachlorophenol (PCP) and *n*-hexanol were used to study the synergistic combination effects with hydrogen peroxide. These compounds are dissimilar in structure and properties and have no DNA damaging ability in human fibroblasts. Hydrogen peroxide induces DNA damages mainly by generating hydroxyl radicals via fenton reaction.

The main interest of this study was to clarify the role of hydroxyl radicals in the induction of DNA damage by the combination of hydrogen peroxide and nongenotoxic chemicals. The results indicate that hydrogen peroxide is the sole DNA damaging species in combination experiments as well as exclusively applied.

The pattern of DNA-damage induced by combinations of PCP and hydrogen peroxide was identical with the pattern of DNA-damage induced by hydrogen peroxide solely. The results did not show any differences in 8-oxoguanin content between hydrogen peroxide treated cells and combination experiments.

PCP increased the concentration of reactive oxygen species in the cytosol of cells incubated with hydrogen peroxide. While the glutathione disulfide content of the cells increased by the incubation with hydrogen peroxide, it decreased by the additional incubation with PCP and *n*-hexanol.

Most of the results indicate that hydroxyl radicals caused the DNA damage in the combination experiments. PCP is a lipophilic compound and disturbs cell membrane structure by accumulation. It is likely that the impact of PCP increases the influx of hydrogen peroxide.

## **summary**

---

It was shown by various authors that hydrogen peroxide induces lysosomal rupture, which increases oxidative stress because lysosomes are iron-rich cell compartments (Kurz *et al.* 2006, Tenopoulou *et al.* 2006). It is likely that PCP enters lysosomal membranes. Disposed lysosomal membranes may enhance the influx of hydrogen peroxide into the iron-rich lysosomes.

The combination of hydrogen peroxide and nongenotoxic chemicals showed apoptotic effects as well as effects on the mutation rate of human fibroblasts.

Combination effects of oxidative stress and nongenotoxic chemicals are a health hazard. Further investigations should reveal the role of nongenotoxic chemicals in the pathogenesis of ROS-associated diseases.

## **7 Literaturverzeichnis**

**Ahlers J, Benzing M, Gies A, Rösick E** (1988): Yeast as an unicellular model system in ecotoxicology and xenobiochemistry. *Chemosphere*, 17, 1603-1615.

**Ahlers J, Cascorbi I, Foret M, Gies A, Kähler M, Pauli W, Rösick E** (1991): Interaction with functional membrane proteins – a common mechanism of toxicity for lipophilic environmental chemicals? *Comp. Biochem. Physiol.* 100 C, 1/2, 111-113.

**Anderson M E** (1998): Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions*, 111-112, 1-14.

**Antkowiak B** (2001): How do general anaesthetics work? *Naturwissenschaften*, 88, 201-213.

**Antunes F, Cadenas E, Brunk U T** (2001): Apoptosis induced by exposure to a low steady-state concentration of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is a consequence of lysosomal rupture. *Biochem. J.*, 356, 549-555.

**Antunes F, Cadenas E** (2000): Estimation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gradients across biomembranes. *FEBS letters*, 475, 2, 121-126.

**Antunes F, Cadenas E** (2001): Cellular titration of apoptosis with steady-state concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Submicromolar levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce apoptosis through fenton chemistry independent of the cellular thiol state. *Free Radical Biology & Medicine*, 30, 9, 1008-1019.

**Arrhenius E, Renberg L, Johanson L** (1977): Subcellular distribution, a factor in risk evaluation of pentachlorophenol. *Chem.-Biol. Interactions*, 18, 23-34.

## Literaturverzeichnis

---

**Barbouti A, Doulias P-T, Nousis L, Tenopoulou M, Galaris D** (2002): DNA damage and apoptosis in hydrogen peroxide-exposed jurkat cells: Bolus addition versus continuous generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Free Radical Biology & Medicine, 33, 5, 691-702.

**Bartsch H, Nair J** (2006): Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage and repair. Langenbecks Arch Surg, 391, 499-510.

**Berenbaum M C** (1985): The expected effect of a combination of agents: The general solution. J. theor. Biol., 114, 413-431.

**Bickler S W, DeMaio A** (2008): Western diseases: current concepts and implications for pediatric surgery research and practice. Pediatr Surg Int, 24, 251-255.

**Blackstone N W, Bivins, M J, Cherry K S, Fletcher R E, Geddes G C** (2004): Redox signaling in colonial hydroids: many pathways for peroxide. The Journal of Experimental Biology, 208, 383-390.

**Bliss C I** (1939): The toxicology of poisons applied jointly. Annuals of Applied Biology, 26, 585-615.

**Bolt H M, Westphal G, Riemer F** (1993): Studie „Kombinationswirkungen“ für die Enquete-Kommission des Deutschen Bundestages.

**Bradley M O, Bhuyan B, Francis MC, Langenbach R, Peterson A, Habermann E** (1981): Mutagenesis by chemical agents in V-79 chinese hamster cells: A review and analysis of the literature. Mutation Research, 87. 2. 81-142.

**BUND** (2008): REACH in der Praxis. [www.bund.net](http://www.bund.net).

## **Literaturverzeichnis**

---

**Carstensen C-P, Blum J K, Witte I** (1990): The role of Hydroxyl radicals in tetrachlorohydroquinone induced DNA strand break formation in PM2 DNA and human fibroblasts. *Chem.-Biol. Interactions*, 74, 305-314.

**Cascorbi I, Ahlers J** (1989): Correlation between the lipophilicity of substituted phenols and their inhibition of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of chinese hamster ovary cells. *Toxicology*, 58, 197-210.

**Cascorbi I, Foret M** (1991): Interaction of Xenobiotics on the glucose-transport system an the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of human skin fibroblasts. *Ecotoxicology and Environmental Savety*, 21, 38-46.

**Chen J, Jiang J, Zhang F, Yu H, Zhang J** (2004): Cytotoxic effects of environmentally relevant chlorophenols of L929 cells and their mechanisms. *Cell Biology and Toxicology*, 20, 183-196.

**Cline R E, Hill R H, Phillips D L, Needham L L** (1989): Pentachlorophenol measurements in body fluids of people in log homes and workplaces. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18, 475-481.

**Collins A R** (2000): THE COMET ASSAY modified for detection of oxidised bases with the use of bacterial repair endonucleases. [www.cometassay.com](http://www.cometassay.com)

**Collins A R** (2005): Assays for oxidative stress and antioxidant status: applications to research into the biological effectiveness of polyphenols. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 1, 261-267.

**Collins A R, Duthie S J, Dobson V L** (1993): Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14, 9, 1733-1735.

## Literaturverzeichnis

---

**Davies K J A** (1999): The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress. *IUBMB Life*, 48, 41-47.

**Davies K J A** (2000): Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB Life*, 50, 279-289.

**Demers P A, Davies H W, Friesen M C, Hertzmann C, Ostry A, Hershler R, Teschke K** (2006): Cancer and occupational exposure to pentachlorophenol and tetrachlorophenol. *Cancer Causes Control*, 17, 749-758.

**Diaz-Llera S, Podlutzky A, Österholm A-M, Hou S-M, Lambert B** (2006): Hydrogen peroxide induced mutations at the HPRT locus in primary human T-lymphocytes. *Mutation Research*, 469, 51-61.

**Dröge W** (2002): Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82, 1, 47-95.

**Einsporn S, Köhler A** (2007): Electronmicroscopic localization of lipophilic chemicals by an antibody-based detection system using the blue mussel *mytilus edulis* as a model system. *Environ Toxicol Chem*, 7, 1.

**Ekwall B** (1980): Screening of toxic compounds in tissue culture. *Toxicology*, 17, 127-142.

**Ertl H** (2006): *In vitro*-Resorptionsverfügbarkeit von Bioziden und PCB aus Hausstaub bei Aufnahme über den Magen-Darm-Trakt und bei Passage durch die Haut. Dissertation, Universität Oldenburg.



## Literaturverzeichnis

---

**Escher B I, Eggen, R I L, Schreiber U, Schreiber Z, Vye E, Wisner B, Schwarzenbach R** (2002): Baseline toxicity (narcosis) of organic chemicals determined by *in vitro* membrane potential measurements in energy-transducing membranes. *Environ Sci Technol*, 36, 1971-1979.

**Fairbairn D W, Olive P L, O'Neill K L** (1995): The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339, 37-59.

**Floyd R A** (1990): The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 9, 1447-1450.

**Formichi P, Radi E, Battisti C, Tarquini E, Leonini A, Di Stefano A, Federico A** (2006): Human fibroblasts undergo oxidative stress-induced apoptosis without internucleosomal DNA fragmentation. *Journal of cellular physiology*, 208, 289-297.

**Fracasso M E, Doria D, Franceschetti P, Perbellini L, Romeo L** (2006): DNA damage and repair capacity by comet assay in lymphocytes of white-collar active smokers and passive smokers (non- and ex-smokers) at workplace. *Toxicology Letters* 167, 2, 131-141.

**Franks N P** (2006): Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology*, 147, 72-81.

**Geyer H, Scheunert I, Korte F** (1986): Bioconcentration potential of organic environmental chemicals in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 6, 313-347.

**Ginsburg I, Gibbs D F, Schuger L, Johnson K J, Ryan U S, Ward P A, Varani J** (1989): Vascular endothelial cell killing by combinations of membrane-active agents and hydrogen peroxide. *Free Radical Biology & Medicine*, 7, 369-376.

## Literaturverzeichnis

---

**Ginsburg I, Mitra R S, Gibbs D F, Varani J, Kohen R** (1993): Killing of endothelial cells and release of arachidonic acid. *Inflammation*, 17, 3, 295-319.

**Glatt H** (1993): HPRT-Genmutationstest in V-79-Zellen des chinesischen Hamsters. In: **Fahrig R** (Hrsg.): *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 243 – 262.

**Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G** (1993): The fenton reagents. *Free Radical Biology & Medicine*, 15, 435-445.

**Greco W, Unkelbach H D, Pöch G, Sühnel J, Kundi M, Bödeker W** (1992): Consensus on concepts and terminology for combined-action assessment: the Saariselkä agreement. *Arch Complex Environ Studies*, 4, 65–69.

**Grimme L H, Altenburger R, Backhaus T, Bödeker W, Faust M, Scholze M** (1998): Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen - Multiple Kombinationen von unähnlich wirkenden Substanzen in niedrigen Konzentrationen. *UFZ-Bericht*, 319 ff.

**Groten J P, Feron V J, Sühnel J** (2001): Toxicology of simple and complex mixtures. *Trends in Pharmacological Sciences*, 22, 6, 316-322.

**Halliwell B, Gutteridge J M C** (1999): *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, New York.

**Henle E S, Linn S** (1997): Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide. *J Biol Chem*, 272, 19095-19098.

**Hohlen B** (2001): *Toxische Wirkung von S-Bioallethrin unter oxidativen Stressbedingungen in Fibroblasten und Gliazellen*, Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

## **Literaturverzeichnis**

---

**IARC** (1986): Occupational exposures to chlorophenols. IARC Monographs in the evaluation of the carcinogenetic risk of chemicals to humans, 41, IARC, Lyon, 319-356.

**Jacobi H, Leier G, Witte I** (1996): Correlateion of the lipophilicity of xenobiotics with their synergistic effects on DNA synthesis in human fibroblasts. *Chemosphere*, 32, 7, 1251-1259.

**Jacobi H, Leier G, Witte I** (1996): Correlation of the lipophilicity of xenobiotics with their synergistic effects on DNA synthesis in human fibroblasts. *Chemosphere*, 32, 7, 1251-1259.

**Janssen J J, Schepens P J C** (1984): Chronic pentachlorophenol intoxication as a result of the usage of wood protectants. *Meded Fac Landbouwwet. Rijksuniv Gent*, 49, 1175-1184.

**Ji B, Masucuchi Y, Horie T** (2001): A possible mechanism of naproxen-induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Pharmacology & Toxicology*, 89, 43-48.

**Klocke S** (2007): Gentoxische Effekte durch elektromagnetische Felder in menschlichen Fibroblasten und Möglichkeiten ihrer Verstärkung. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Kühnemuth B** (2008): Bedeutung der DNA-Schädigung und DNA-Reparatur für die Chemosensitivität von Zellen des Plattenepithelkarzinoms. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Kurz T, Gustafsson B, Brunk U T** (2006): Intralysosomal iron chelation protects against oxidative stress-induced cellular damage. *FEBS Journal*, 273, 3106-3117.

## **Literaturverzeichnis**

---

**Kurz T, Leake A, Zglinicki v T, Brunk U T** (2004): Relocalized redox-active lysosomal iron is an important mediator of oxidative-stress-induced DNA damage. *Biochem. J.*, 378, 1039-1045.

**LeBel C P, Ischiropoulos H, Bondy S C** (1992): Evaluation of the probe 2', 7', -Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol.* 5, 227-231.

**Levy S, Shechtman S, Zhu B-Z, Stadman E R, Stadler R, Chevion, M** (2007): Synergism between the toxicity of chlorophenols and iron complexes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26, 2, 218-224.

**Loewe S** (1927): Die Mischarznei. Versuch einer allgemeinen Pharmakologie der Arzneikombinationen. *Klinische Wochenschrift*, 6, 23, 1077-1085.

**Lowry O H, Rosenbrough N J, Farr A L, Randall R J** (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265–275.

**Lueken A** (2000): Kombinationswirkungen von oxidativem Stress und unpezifischen Umweltchemikalien auf die Genotoxizität in menschlichen Fibroblasten. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Olenburg.

**Lueken A, Juhl-Strauss U, Krieger G, Witte I** (2004): Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicology Letters*, 147, 35-43.

**Luo Y, Henle E S, Chatopadhyaya R, Jin R, Linn S** (1994): Detecting DNA damage caused by iron and hydrogen peroxide. *Methods in Enzymology*, 234, 51-59.

## Literaturverzeichnis

---

**Makino N, Mochizuki Y, Bannai S, Sugita Y** (1994): Kinetic studies on the removal of extracellular hydrogen peroxide by cultured fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry*, 269,14,1020-1025.

**Makino N, Sasaki K, Hashoda K, Sakakura Y** (2004): A metabolic model describing the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> elimination by mammalian cells including H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeation through cytoplasmic and peroxisomal membranes: comparison with experimental data. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1673, 3, 149-159.

**Marquardt H, Schäfer S G** (1997): *Lehrbuch der Toxikologie, spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.*

**Masaki H, Okano Y, Sakurai H** (1998): Differential role of catalase and glutathione peroxidase in cultured human fibroblasts under exposure of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ultraviolet B light. *Arch. Dermatol. Res.*, 290, 113-118.

**Melidou M, Riganakos K, Galaris D** (2005): Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation. *Free Radical Biology & Medicine*, 39, 1591-1600.

**Moorthy B, Randerath K** (1996): Pentachlorophenol enhances 9-hydroxybenzo [a] pyrene-induced hepatic DNA adduct formation *in vivo* and inhibits microsomal epoxide hydrolase and glutathione S-transferase activities *in vitro*: likely inhibition of epoxide detoxication by pentachlorophenol. *Arch. Toxicol.*, 70, 696-703.

**Mukhopadhyay P, Vogel H J, Tieleman D P** (2004): Distribution of pentachlorophenol in phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. *Biophysical Journal*, 86, 337-345.

## Literaturverzeichnis

---

**Nair U, Bartsch H, Nair J (2007):** Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: A review of published adduct types and levels in humans. *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 1109-1120.

**Naito S, Ono Y, Somiya I, Inoue S, Ito K, Yamamoto K, Kawanishi S (1994):** Role of active oxygen species in DNA damage by pentachlorophenol metabolites. *Mutation Research*, 310, 79-88.

**Nendza M, Wenzel A, Wienen G (1995):** SAR QSAR. *Environ. Res.*, 4, 39-50.

**Nygren, J, Ristoff, E, Carlsson, K, Möller, L, Larsson, A (2005):** Oxidative DNA damage in cultured fibroblasts from patients with hereditary glutathione synthetase deficiency. *Free Radical Research*, 39, 6, 595-601.

**Ogawa Y, Takahashi T, Kobayashi T, Kariya S, Nishioka A, Mizobuchi H, Noguchi M, Hamasato S, Tani T, Seguchi H, Yoshida S, Sonobi H (2003):** Mechanism of hydrogen peroxide-induced apoptosis of the human osteosarcoma cell line HS-Os-1. *International Journal of Molecular Medicine*, 12, 459-463.

**Paulik M (2007):** Untersuchungen zur Wachstumshemmenden, gentoxischen und reparaturinhibierenden Wirkung von Zytostatika und Zytostatikagemischen an primären und permanenten Zellen des humanen Plattenepithelkarzinoms. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Plackett R L, Hewlet P S (1952):** Quantal responses to mixtures of poisons. *Journal of the royal statistical society*, 14, 2, 141-163.

**Plöttner S (2006):** Untersuchungen zur Gentoxizität von Zigarettenrauch-Inhaltsstoffen und Induktion von Cytochrom P 450 1A1 in primären Zellkulturen aus Schweineharnblasen, Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

## Literaturverzeichnis

---

**Potts R J, Bespalov I A, Wallace S S, Melamede R J, Hart B A** (2001): Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallothionein. *Toxicology*, 161, 25-38.

**Purschke M** (1999): Vergleich der Hydroxylradikalbildner Tetrachlorhydroquinon und Wasserstoffperoxid hinsichtlich zyto- und genotoxischer Einzelwirkungen sowie ihrer Kombinationswirkung mit Pentachlorphenol. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Purschke M, Jacobi H, Witte I** (2002): Differences in genotoxicity of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and tetrachlorhydroquinone in human fibroblasts. *Mutation Research*, 513, 159-167.

**Purschke M** (2004): Erzeugung und Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden und deren Bedeutung für die Strahlenempfindlichkeit von Säugerzellen. Dissertation, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg

**Raupach M** (2008): Neues europäisches Chemikalienrecht (REACH). *Natur und Recht*, 30, 171-173.

**Sai K, Kang K-S, Hirose A, Hasegawa R, Trosko J E, Inoue T** (2001): Inhibition of apoptosis by pentachlorophenol in v-myc-transfected rat liver epithelial cells: relation to down-regulation of gap junctional intercellular communication. *Cancer Letters*, 173, 163-174.

**Schewe K** (2002): Mechanismen und Folgen der synergistischen Wirkung von oxidativem Stress und Umweltchemikalien am Beispiel von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4-Chloranilin auf menschliche Fibroblasten. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Schmidt C** (2005): Untersuchungen zur Zytotoxizität und zum Wirkmechanismus einiger neuer Lösungsmittel (Ionischer Flüssigkeiten) und ihrer möglichen

## Literaturverzeichnis

---

Kombinationswirkungen mit dem Schwermetall Cadmium. Dissertation. Universität Bremen.

**Schmidt D** (2003): Untersuchung zur Verteilung von Wasserstoffperoxid-induzierten Schäden in menschlichen Zellen. Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Schulz C, Butte W** (2007): Revised reference value for pentachlorophenol in morning urine. *Int J Hyg Environ Health*, 210, 741-744.

**Seiler J P** (1991): Pentachlorophenol. *Mutation Research*, 257, 27-47.

**Shigenaga M K, Gimeno C J, Ames B N** (1989): Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of *in vivo* oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 24, 9697-9701.

**Sierts-Herrmann A** (2003): Nachweis von oxidativem Stress in der permanenten Zelllinie *Epithelioma papulosum cyprini* (EPC) im Zuge der Biotest-dirigierten Fraktionierung mariner Sedimentextrakte. Dissertation. Universität Hamburg.

**Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L** (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191

**Sommer H** (2006): Zyto- bzw. genotoxische Wirkschwellen von Gemischen aus 2 – 8 Umweltchemikalien in Abhängigkeit von der Lipophilie der Komponenten. Dissertation. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Stang A** (2008): Charakterisierung von DNA-Schäden im comet assay. Diplomarbeit. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.



## Literaturverzeichnis

---

**Stratis A** (2002): Zyto- und genotoxische Kombinationswirkung von oxidativem Stress und komplexen Umweltchemikaliengemischen auf menschliche Fibroblasten. Diplomarbeit. Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Tenopoulou M, Doulias P-T, Barbouti A, Brunk U, Galaris D** (2005): Role of compartmentalized redox-active iron in hydrogen peroxide-induced DNA damage and apoptosis. *Biochem. J.*, 387, 703-710.

**Tice R R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J-C, Sasaki Y F** (2000): Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, 35, 206-221.

**Umweltbundesamt** (2008): [www.reach-info.de](http://www.reach-info.de)

**Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G** (1994): A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biology and Toxicology*, 10, 415-421.

**Voss P, Siems W** (2006): Clinical oxidation parameters of aging. *Free radical research*, 40, 12, 1339-1349.

**Wehry K** (2003): Genotoxische Kombinationswirkungen von oxidativem Stress (induziert durch Wasserstoffperoxid und Glukoseoxidase) mit chlorierten Phenolen in humanen Hepatozyten (HEP G2-Zellen). Diplomarbeit, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.

**Weinbach E C** (1954): The effect of pentachlorophenol on oxidative phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 545-550.

## Literaturverzeichnis

---

**Weinbach E C** (1957): Biochemical basis for the toxicity of pentachlorophenol, *Biochemistry*, 43, 393-397.

**Williams G M, Tanaka T, Maruyama H, Maeura Y, Weisburger J H, Zang E** (1991): Modulation by butylated hydroxytoluene of liver and bladder carcinogenesis induced by chronic low-level exposure to 2-acetylaminofluorene. *Cancer Research*, 51, 6224-6230.

**Wiseman H, Kaur H, Halliwell B** (1995): DNA damage and cancer, measurement and mechanism. *Cancer Letters*, 93, 113-120.

**Wiseman H, Halliwell B** (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J*, 313, 17-29.

**Witte I** (2001): Synergistische Kombinationswirkungen zwischen kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Umweltchemikalien. *Zeitschrift für Umweltmedizin*, 9, 2, 95-102.

**Witte I, Beyersmann D, Filser J, Berthe-Corti L, Butte W, Backhaus T** (Hrsg.) (2007): Toxische Kombinationswirkungen. Komplexe Wirkungen chemischer und physikalischer Stressoren auf Mensch und Umwelt. BIS-Verlag, Oldenburg.

**Witte I, Jacobi H** (1993): Entwicklung einer Prüfvorschrift zur Erkennung von synergistischen Wirkungen zwischen membranschädigenden Substanzen und anderen Schadstoffen. Umweltforschungsplan des Bundesministers des Innern, Forschungsbericht 106 04 031.

**Witte I, Jacobi H, Juhl-Strauss U** (1995): Correlation of synergistic cytotoxic effects of environmental chemicals in human fibroblasts with their lipophilicity. *Chemosphere*, 31, 9, 4041-4049.

## **Literaturverzeichnis**

---

**Witte I, Jacobi H, Juhl-Strauss U** (1996): Suitability of different cytotoxicity assays for screening combination effects of environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicology Letters*, 87, 39-45.

**Witte I, Zhu B-Z, Lueken A, Magnani D, Stossberg H, Chevion M** (2000): Protection by desferrioxamine and other hydroxamic acids against tetrachlorohydroquinone-induced cyto- and genotoxicity in human fibroblasts. *Free Radical Biology & Medicine*, 28, 5, 693-700.

**Zhu B-Z, Chevion M** (2000): Mechanism of the synergistic cytotoxicity between pentachlorophenol and copper-1,10-phenanthroline complex: the formation of a lipophilic ternary complex. *Chemico-Biological Interactions*, 129, 3, 249-261.

### **Danksagung**

Frau Prof. Dr. Irene Witte danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas, für die ständige Bereitschaft zur Diskussion und für die überaus gute und herzliche Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Detmar Beyersmann danke ich für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt der Hans Böckler Stiftung für die finanzielle und ideelle Unterstützung meines Promotionsvorhabens und im Besonderen Herrn Werner Fiedler, der mich als Referent der HBS durch Höhen und Tiefen der Promotion begleitet hat.

Allen Mitgliedern der AG Biochemie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre. Ich werde mich immer gerne an die Zeit mit Euch erinnern.

Für die intensive Einarbeitung, für die gute Zusammenarbeit und für die konkrete Hilfe bei der Durchführung von Experimenten danke ich Dr. Heike Sommer, Marita Weerts-Eden und Elke Frahmann. Hannelore Kardelke danke ich für die vielfältige Unterstützung im Laboralltag.

Liebe Heike, ich danke Dir für die Herzlichkeit und die Freude, die du in unsere Arbeitsgruppe und unser Büro gebracht hast. Und ich danke Dir für Deine Freundschaft.

Mein besonderer Dank gilt den Mitgliedern des Kollegs „Toxische Kombinationswirkungen“ für die engagierte Zusammenarbeit, die schöne gemeinsame Zeit und den regen Austausch. Besonders danke ich meinen Oldenburger KollegiatInnen Dr. Heike Sommer, Dr. Simone Geyer, Dr. Marcus Nachtkamp und Dr. Harald Ertl für die herzliche Aufnahme ins Team, die ausgesprochen kollegiale Atmosphäre und für unzählige Tipps und Hilfestellungen. Ohne Euch wäre Vieles unendlich viel schwerer gewesen!

Prof. Dr. Ralf Dringen und der Arbeitsgruppe Biochemie der Universität Bremen danke ich für die Möglichkeit, ihre Geräte und Räumlichkeiten nutzen zu dürfen. Dr. Christiane Schmidt danke ich für die Einweisung in das dortige Labor.

## **Danksagung**

---

Annette Pieper danke ich für die sorgfältige Korrektur dieser Arbeit, Dr. Marcus Nacht-kamp danke ich für die Korrektur des summary. Ebenfalls danke ich Dirk Rathjens für die Unterstützung während der ersten Phase dieser Arbeit.

Mein Interesse an der Natur verdanke ich meinem Vater Ludwig Henrichs. Mit Ihm teile ich den Wunsch, die Größe und Schönheit, die allem Leben inne ist, zu begreifen. Meiner Mutter Hildegard Henrichs danke ich für die Ermutigung in schwierigen Zeiten und für die konkrete Unterstützung. Meine Tochter Yael hat in dieser arbeitsreichen Zeit toll mitgemacht; danke Yael!

Dass ich diese Arbeit erfolgreich abschließen konnte, verdanke ich meinem Freund Ansgar. Du hilfst mir, zu tun, was ich will. Und damit ist alles gewonnen. Danke.

---

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst, keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen einer anderen wissenschaftlichen Hochschule zur Begutachtung in einem Promotionsverfahren vorliegt oder vorgelegen hat.

Oldenburg, \_\_\_\_\_

Kathrin Henrichs

## Lebenslauf

---

### **Lebenslauf**

Name	Henrichs
Vorname	Kathrin Elisabeth
Anschrift	Unterm Berg 25 26123 Oldenburg
Geburtsdatum	25.10. 1975
Geburtsort	Rhede / Westfalen
Familienstand	ledig, eine siebenjährige Tochter
September 1985 – Juni 1995	Besuch des Euregio-Gymnasiums, Bocholt
Juni 1995	Abitur, Euregio-Gymnasium, Bocholt
September 1995 – Juni 1996	Studium der Diplom Biologie, Philippsuniversität, Marburg
29.11.2000	Geburt meiner Tochter Hannah Yael
August 1996 bis Februar 1998	freiwilliger sozialer Dienst, Haifa, Israel
April 1998 – Februar 2004	Studium der Diplom Biologie, Carl von Ossietsky Universität Oldenburg

## **Lebenslauf**

---

seit April 2004	Promotion in der Arbeitsgruppe Biochemie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg
Thema	Ursachen und Folgen der toxischen Kombinationswirkungen von oxidativem Stress und nicht genotoxischen Umweltchemikalien auf menschliche Fibroblasten
Betreuung	Prof. Dr. Irene Witte