

**Die Rolle von 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin und Kaliumdiazooacetat
in der chemisch induzierten
Dickdarmkrebsentstehung**

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
Dr. rer. nat.

genehmigte Dissertation
von

Diplom Ernährungswissenschaftlerin
Urte Blume
geboren am 22.12.1977 in Königs Wusterhausen

Januar 2011

Referent: Prof. Dr. Pablo Steinberg

Korreferent: Prof. Dr. Ralf Stahlmann

Tag der Promotion: 28.01.2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
1 Zusammenfassung	6
2 Abstract	7
3 Einleitung	8
3.1 Aufbau und Funktion des Darms	11
3.2 Grundlagen der Kanzerogenese	12
3.3 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin	14
3.4 Kaliumdiazooacetat	17
3.5 Aufgabenstellung	19
4 Material und Methoden	21
4.1 Geräte	21
4.2 Verbrauchsmaterialien	21
4.3 Biochemikalien und Reagenzien	22
4.4 Puffer und Lösungen	23
4.5 Tierversuch	24
4.5.1 Haltungsbedingungen	24
4.5.2 Futterzubereitung	24
4.5.3 Versuchsschema und Verlauf	25
4.5.4 Sektion	26
4.5.5 Erhebung biometrischer Daten	26
4.6 Zellbiologische Arbeiten	28
4.6.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen	28
4.6.2 Kryokonservierung	28
4.6.3 Test der kultivierten Zellen auf Mycoplasmen	29

4.6.4	Bestimmung des Wachstumsverhaltens der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen	29
4.6.5	Herstellung der verwendeten Biochemikalien	29
4.6.6	Sulforhodamin B – Viabilitätstest mit Kaliumdiazacetat	30
4.6.7	Prüfung des kanzerogenen Potenzials von Chemikalien mit dem BALB/c-3T3-Zelltransformationstest	32
4.7	Statistische Auswertung	35
5	Ergebnisse	37
5.1	Biometrische Daten der PhIP-exponierten Ratten	37
5.1.1	Die Körpermasse	37
5.1.2	Futteraufnahme	39
5.1.3	Makroskopische Beobachtungen	41
5.1.4	Histologische Untersuchungen	41
5.2	Untersuchungen der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen	45
5.2.1	Zellkultur	45
5.2.2	Erstellung einer Wachstumskurve und Ermittlung der Verdopplungszeit	45
5.2.3	Bestimmung der Behandlungskonzentrationen von Kaliumdiazacetat	47
5.2.4	Bewertung von KDA hinsichtlich seines kanzerogenen Potenzials	49
6	Diskussion	59
6.1	Der In-vivo-Versuch – Einsatz von PhIP im Fütterungsversuch mit F344-Ratten	60
6.2	Der In-vitro-Versuch – Kaliumdiazacetat im BALB/c-3T3-Zelltransformationstest	70
7	Literaturverzeichnis	76
	Eidesstaatliche Erklärung	95
	Danksagung	96
	Lebenslauf	97

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACF	<i>Aberrant Crypt Foci</i>
APNG	<i>N-(N'-acetyl-L-propyl)-N-nitrosoglycin</i>
bzw.	Beziehungsweise
CYP450	Cytochrom P450
F344-Ratte	Fischer 344-Ratte
DIMelQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]chinoxalin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
HAA	Heterozyklische aromatische Amine
HNOH-PhIP	<i>N</i> -hydroxy-PhIP
KDA	Kaliumdiazacetat
KG	Körpergewicht
LCFA	<i>Long chain fatty acids</i>
ml	Milliliter
MCA	3-Methylcholanthren
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5- <i>f</i>]quinoxalin
Min	Minute
NAT	<i>N</i> -Acetyltransferase
O ⁶ CMdG	O ⁶ -Carboxymethylguanin-2'-deoxyguanosin
O ⁶ MdG	O ⁶ -Methylguanin-2'-deoxyguanosin
NOC	<i>N</i> -Nitrosoverbindungen
PAPS	3'Phosphoadenosin-5-phosphosulfat
PAP	3'Phosphoadenosin-5-phosphat
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin
RKI	Robert-Koch-Institut
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
SRB	Sulforhodamin B
SPF	spezifiziert pathogenfrei
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TGF-β	<i>Transforming growth factor – beta</i>
TPA	12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat

1 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Dickdarmkrebs, ausgelöst durch exogene Ereignisse, stellt eine Aneinanderreihung von Mutationen an der DNA, in Folge von karzinogen wirksamen Substanzen, dar. Zwei mögliche auslösende Substanzen stehen in enger Verbindung mit dem Verzehr von rotem Fleisch. Während 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) bei Zubereitungsprozessen entsteht, wird Kaliumdiazooacetat (KDA) erst im Gastrointestinaltrakt gebildet.

Die Verfütterung von 0,01 und 100 ppm PhIP über 18 Wochen und in Kombination mit einer Standard- und Westerndiät löste bei männlichen F344-Ratten eine unterschiedliche Anzahl von aberranten Kryptenherden (ACF) im Dickdarm aus. Die Futteraufnahme war mit steigender PhIP-Konzentration vermindert, äußerte sich aber nur bei der Standarddiät auch mit einer verminderten Körpermassenzunahme. Die gewonnenen Gewebeproben des Dickdarms wurden mikroskopisch bezüglich der Ausbildung von dysplastischen Krypten, in Form von ACF, ausgewertet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Exposition einer humanrelevanten PhIP-Konzentration in beiden Fütterungsgruppen zur erhöhten, aber nicht signifikanten Ausbildung von ACF führte. Jedoch zeigte die Verfütterung der Westerndiät innerhalb des Fütterungszeitraums tendenziell mehr ausgebildete ACF, ACF mit mehr betroffenen Krypten und vergrößertem Durchmesser.

Das KDA wurde im BALB/c-3T3-Zelltransformationstest zur Testung seines kanzerogenen Potentials ebenfalls in einer humanrelevanten Konzentration eingesetzt. Mit Hilfe dieser Methode konnte dem KDA weder ein initiiertes noch ein promovierendes Potential nachgewiesen werden. Das Testprotokoll zur Bestimmung des transformierenden Potentials zeigte in keinen der getesteten Phasen eine Zunahme ausgebildeter Zellherde. Auch nach Klassifizierung der Zellherdtypen konnte kein Unterschied zwischen den experimentellen Gruppen hinsichtlich des Transformationsgeschehens festgestellt werden.

Schlagwörter: Krebs, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP), Kaliumdiazooacetat (KDA), Aberranten Kryptenherden (ACF)

2 Summary

Colon cancer can be described as a genetic disease. Various mutations have to be induced and an invasive cancer only develops when several genes are defective. Mainly responsible for this disease are exogenous substances. High intake of red meat, which contains various mutagenic substances, is associated with increased risk of colon cancer, among others 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), the most abundant heterocyclic amine in cooked meat, and potassium diazoacetate (KDA), a gastric nitrosated glycine derivative.

F344 male rats were fed a high fat diet or basal diet, containing 0,01 or 100 ppm PhIP, respectively. After 18 weeks of continuous administration the rats developed aberrant crypt foci (ACF). As previously reported a high PhIP concentration induces most ACF. Even so the low concentration of PhIP was capable of inducing lesions, but there was no significant enhancement with respect to controls. Structural abnormalities of crypts were clearly different after basal and high fat feeding. High fat induces higher frequencies of ACF, ACF with more involved crypts and crypt with a considerably larger diameter. Furthermore, the body weight of the rats which were fed a high fat diet was in general higher than that of the rats, which were fed a basal diet. In both diet groups animals took a smaller amount of food, when PhIP was supplemented. Just the combination of a basal diet with 100 ppm PhIP shows a correlation between reduced total food intake and decreased body weight.

The cancer potential of KDA was tested in the BALB/c-3T3 cell transformation assay. The application of 0,03 to 30 μ M KDA did not show any effect, neither in the initiation or in the promotion phase. In addition, KDA in both stages of the protocol did not demonstrate any effect. All in all, the used low concentration KDA could not achieve cell transformation in the cell culture. Only a few of the produced foci developed malignant characteristics after KDA treatment. It seems as if KDA had no influence on cell transformation under the in vitro conditions tested.

Keywords: Cancer, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), potassium diazoacetate (KDA), aberrant crypt foci (ACF)

3 Einleitung

Die Anzahl pro Jahr neu auftretender Krebserkrankungen hat nach Einschätzungen des Robert-Koch-Instituts (RKI) seit 1990 um 90 % bei den Männern und 40 % bei den Frauen zugenommen (Pressemitteilung des RKI vom 23.02.2010). Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass der Altersdurchschnitt der Bevölkerung steigt und Krebserkrankungen vorrangig im höheren Lebensalter auftreten. Außerdem greifen zum einen die verstärkten und verbesserten Früherkennungsmaßnahmen und zum anderen steigen die Überlebenschancen auf Grund der hohen Qualität der medizinischen Versorgung. Unter diesen Gesichtspunkten ist die altersstandardisierte Krebssterblichkeit aktuell rückläufig (RKI 2010). Obwohl bei einzelnen Krebsarten inzwischen gute Heilungserfolge erzielt werden, gibt es für die meisten derzeit nur unbefriedigende Therapieergebnisse. Folglich ist den Maßnahmen zur Früherkennung und Krebsprävention eine große Bedeutung beizumessen. Ein umfassendes Verständnis der Ursachen und Mechanismen, die zur Entstehung maligner Tumoren führen, ist für den Einsatz effektiver Präventivmaßnahmen notwendig. Da die Entstehung von Tumorerkrankungen auf der Kombination zahlreicher auf den Menschen einwirkender Umweltfaktoren und genetischer Prädispositionen beruht und darüber hinaus eine mehrjährige Latenzzeit bis zur Manifestation eines Tumors besteht, ist die Suche nach den Entstehungsmechanismen sehr komplex und noch lange nicht vollständig aufgeklärt. Von den 426.800 Personen, die im Jahr 2006 in Deutschland an Krebs erkrankten (RKI 2010), stellen die Darmkrebserkrankungen mit insgesamt 68.740 Fällen bei beiden Geschlechtern die zweithäufigsten Krebsneuerkrankungen dar. Damit spiegelt sich auch die Situation im internationalen Vergleich wider (RKI und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. 2005/2006). Den größten Anteil unter den Darmkrebserkrankungen nimmt das Kolonkarzinom ein, welches eine der am häufigsten auftretenden Erkrankungen in den westlichen Industrienationen ist. Die Entwicklung von Kolonkarzinomen ist auf angeborene Risikofaktoren und/oder exogene Einflüsse zurückzuführen. Zur Gruppe der erblich bedingten Erkrankungen gehören die Familiäre adenomatöse Polyposis (*familial adenomatous polyposis*, FAP), das erbliche nicht polypöse Kolonkarzinom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*, HNPCC) und andere seltene Syndrome. Zwar ist die Mehrheit aller entwickelten Kolonkarzinome auf exogene Einflüsse zurückzuführen

(Le Marchand et al. 1997), jedoch verdoppeln hereditäre Prädispositionen das Risiko an Darmkrebs zu erkranken. Eine weitere Erhöhung der Darmkrebsinzidenz wird in Verlauf von anderen Krebserkrankungen oder Entzündungsprozessen wie zum Beispiel *Colitis ulcerosa* oder *Morbus Crohn* im hohen Lebensalter beobachtet. In den vergangenen Jahren rückten die Zusammenhänge zwischen der Ernährung und dem Risiko verschiedener Erkrankungen zunehmend in den Fokus wissenschaftlichen Interesses. Insbesondere Herz-Kreislauf- und Krebserkrankungen korrelieren häufig mit lokalen Ernährungsgewohnheiten (Key et al. 2004, Hu et al. 2002). Bei der Entstehung von Dickdarmkrebs (kolorektale Karzinome) scheint der Einfluss der Ernährung und des Lebensstils eine besondere Rolle zu spielen (Ahmed 2004). Eine enge Korrelation zwischen der Entstehung dieser Erkrankung und dem übermäßigen Genuss von Alkohol und Zigarettenrauch stützt diese Annahme (Botteric et al. 2008, Benedetti et al. 2009). Übergewicht und Adipositas in Folge einer dauerhaft übermäßigen und kalorienreichen Ernährung erhöhen das Risiko an Dickdarmkrebs zu erkranken (Slattery et al. 1997, Thygesen et al. 2008). Stammt der aufgenommene Energieanteil vorrangig aus Fetten, führen diese, im Vergleich zu einer vegetarischen Kost und geringem Fettanteil, zur erhöhten Anzahl von DNA-Strangbrüchen im Kolongewebe (Rieger et al. 1999). Da eine hochkalorische Nahrungsaufnahme oft mit Bewegungsmangel (Martinez et al. 1997, Halle und Schoenberg 2009, Wolin et al. 2009) und einer geringen Aufnahme an Ballaststoffen gekoppelt ist, verlängert sich die Passagezeit des Nahrungsbreis und erhöht die Kontaktzeit mit dem Darmgewebe (Rieger et al. 1999). Die daraus resultierende anhaltende Ausschüttung von Gallensäure führt durch die Reaktion mit den im Nahrungsbrei enthaltenen Xenobiotika zur vermehrten Bildung von Karzinogenen. Die fehlenden Ballaststoffe wären zudem in der Lage, unerwünschte Substanzen und überschüssige Gallensäuren zu binden (Biesalski et al. 2004). Weiterhin können die antioxidativen Eigenschaften von Vitamin C und Karotinen, aus Früchten oder Gemüse, zur Prävention von Zellschäden durch freie Radikale oder/und Singulett-Sauerstoff beitragen (Frei 1994, Hennekens 1994, Lee 1999).

Seit mehreren Jahren wird rotes, prozessiertes Fleisch als besonderer Risikofaktor für die Dickdarmkrebsentstehung betrachtet (Willett 1995, Bingham et al. 1996). Zunächst haben epidemiologische Beobachtungen den Zusammenhang zwischen der Aufnahme von rotem, prozessiertem Fleisch und einem gehäuften Auftreten von Dickdarmkrebs aufgedeckt (Willett et al. 1990, Giovannucci et al. 1994, Goldbohm et

al. 1994, Sandhu et al. 2001, Norat et al. 2002, 2005). Die Suche nach den molekularen Zusammenhängen ist vielschichtig und die Mechanismen sind noch lange nicht verstanden. Fleisch ist aufgrund seines hohen Eiweißanteils und durch die enthaltenen Vitamine (A, B1, B6 und B12) und Mineralstoffe (Eisen, Zink und Selen) ernährungsphysiologisch sehr wertvoll. Darüber hinaus wird tierisches Eisen vom humanen Organismus besser verwertet als pflanzliches Eisen (Layrisse et al. 1969). Neben der durch Fleisch bedingten erhöhten Gallensäuresekretion (Bruce 1987) können Inhaltsstoffe des Fleisches, wie das Häm-Eisen oder Xenobiotika, schädlich sein. Das im roten Muskelfarbstoff Myoglobin enthaltene Häm-Eisen steht im Verdacht für den promovierenden Effekt des roten Fleisches bei der Dickdarmkrebsentstehung verantwortlich zu sein (Pierre et al. 2003). Es wird vermutet, dass das Häm-Eisen als Katalysator die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies hervorruft (Graf und Eaton 1985, Babbs 1990). Darüber hinaus führt das ebenfalls im Fleisch enthaltene Fett in Reaktion mit dem Häm-Eisen zur Entstehung von Lipidperoxyradikalen, die wiederum DNA-Strangbrüchen hervorrufen können (Sawa et al. 1998). Ein weiterer ungeklärter zytotoxischer Faktor des Häm-Eisens schädigt das Darmepithel so stark, dass apoptotische Signalkaskaden aktiviert oder Nekrosen ausgelöst werden (Bird et al. 1985, Stadler et al. 1988, van der Meer et al. 1997). Kompensiert werden solche Vorgänge durch eine einsetzende Hyperproliferation, somit erhöht sich das Risiko der Induktion von Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen (Van der Meer et al. 1997, Sesink et al. 1999). Zusammen mit dem im roten Fleisch enthaltenen Häm-Eisen wird eine möglicherweise darmkrebsauslösende Rolle der *N*-Nitrosoverbindungen (NOC) diskutiert. Dabei sind die im Gastrointestinaltrakt gebildeten, endogenen *N*-Nitrosoverbindungen in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses gerückt (Hughes et al. 2001, Bingham et al. 2002, Cross und Sinha 2004, Kuhnle et al. 2007). Zum einen kann das Häm-Eisen selbst zum nitrosierten Agens umgesetzt werden und zum anderen als Katalysator mit den im Fleisch enthaltenen Proteinen zu NOC umgesetzt werden (Silvester und Cummings 1995, Bingham et al. 1996, Cross et al. 2003). Nicht nur die Transit- und somit die Kontaktzeit der NOC mit der Darmwand beeinflussen den Grad der ausgelösten Schädigungen, sondern auch die Konzentration der NOC, welche von den zugeführten Ausgangsstoffen abhängig ist. Den exogen aufgenommenen NOC kommt in diesem Zusammenhang eine untergeordnete Rolle zu (Bingham et al. 1996, 2002, Hughes et al. 2001).

Des Weiteren werden Substanzen, die durch die Prozessierung des roten Fleisches entstehen können, dem Organismus zugeführt. Bedingt durch lang anhaltendes Braten bzw. durch hohe Temperaturen entstehen hochgiftige und zum Teil kanzerogene Verbindungen wie heterozyklische aromatische Amine (Pyrolyseprodukte aus Proteinen) oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK). Ein wichtiger Vertreter aus der Gruppe der heterozyklischen aromatischen Amine (HAA), ist das 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP), welches prozentual am Häufigsten in seiner Substanzklasse entsteht (Felton et al. 1984, 1986, Gross et al. 1993, Sinha et al. 1994, Augustsson et al. 1997, Rohrmann und Becker 2005).

3.1 Aufbau und Funktion des Darms

Die Hauptaufgaben des Dickdarms bestehen in der Verdauung und der Resorption von Wasser und Nahrungsbestandteilen sowie in der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes. Außerdem nimmt der Darm eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Nahrungsantigenen und Krankheitserregern ein. Für die effiziente Ausübung dieser Funktionen ist die Vergrößerung der Oberfläche ein wesentlicher Vorteil. Neben den Aus- und Einstülpungen der *Lamina Propria* (Zotten und Krypten) charakterisieren Falten (*Plicae Circulares*) den Darm. Zusätzlich tragen die Epithelzellen durch apikale Ausbildungen von Mikrovilli zur Oberflächenvergrößerung bei. Die Differenzierung der intestinalen Epithelzellen erfolgt aus den Stammzellen, die an der Basis einer Krypte lokalisiert liegen. Diese wandern entlang der Kryptenachse in Richtung Darmlumen und unterliegen einer ständigen Erneuerung. Das Ablösen und Abstoßen der Epithelzellen findet in Folge apoptotischer Prozesse, Verlust der Zellverankerung oder Abschilferungen statt (Potten und Allen 1977, Potten et al. 1997, Renehan et al. 2001). Gastrointestinale Stammzellen sind pluripotent und Vorläufer aller Zellen des Epithels, aus denen Kolonozyten, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Panethzellen hervorgehen (Wong und Wright 1999). Das sich ständig regenerierende Darmgewebe unterliegt einem gut ausbalancierten Gleichgewicht von Proliferation und Zelltod, wobei sich die Lebensdauer einer Epithelzelle im Dickdarm auf drei bis acht Tage beläuft (Shanmugathan und Jothy 2000). Reguliert wird der Erneuerungsprozess von zahlreichen Faktoren. Eine wichtige Rolle spielen unter anderem Cadherin-

vermittelte Zell-Zell-Kontakte und Integrin-vermittelte Zell-Matrix-Kontakte, ebenso die Konfiguration der Basalmembran und die TGF β -Expression (Basora et al. 1998, Perreault et al. 1995, Dodge et al. 1990). Eine Dysregulation des Gleichgewichts von Proliferation und Absterben kann zu einer klonalen Expansion von Zellen führen. Der programmierte Zelltod ist neben der Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichts auch für die Eliminierung von Kolonozyten mit DNA-Schäden verantwortlich. Bei einer Störung können die Proliferationsrate erhöht und zugleich Apoptosemechanismen defekt, inaktiviert oder abgeschaltet sein. Auf diese Weise können sich DNA-Schäden manifestieren und zur Erhöhung des Kolonkarzinomrisikos beitragen (Potten et al. 1997, Hao et al. 2001).

3.2 Grundlagen der Kanzerogenese

Krebs ist eine komplexe Erkrankung des Erbguts, die in Folge von Mutationen zum unkontrollierten Wachstum der Zellen führt (Mareel und Leroy 2003, Vogelstein und Kinzler 2004). Das Modell des Mehrstufen-Prozesses der Tumorentstehung wird verbreitet zur Klärung der Wirkungsweise von chemischen Kanzerogenen in der Wissenschaft herangezogen (Berenblum und Shubik 1947, Armitage und Doll 1954, Appel et al. 1990). In einem ersten Schritt erzeugt ein Karzinogen einen irreversiblen Schaden an der DNA (Weinstein 1988). Die bis dahin phänotypisch unauffällige Zelle gibt ihren genetischen Fehler, falls dieser nicht durch Reparaturmechanismen erkannt und behoben wird, nach Ablauf der DNA-Synthese und Teilung an nachfolgende Zellgenerationen weiter (Cohen und Ellwin 1991). Werden zufälligerweise Onkogene und/oder Tumorsuppressor-Gene mutiert, kann diese Zelle einen Wachstumsvorteil gegenüber den Umliegenden annehmen. Akkumulieren die Mutationen innerhalb spezifischer Gene, kann das genetische Kontrollsystem aus seinem Wachstumstakt geraten, und über das unkontrollierte Wachstum entwickelt sich ein Tumor (Coleman und Tsongalis 1995, Hanahan und Weinberg 2000, Nunney 2003). Obwohl das phänotypische Erscheinungsbild vieler Tumore gleichen Gewebetyps vergleichbar ist, treten nur selten die gleichen Mutationen auf. Ebenso ist die Reihenfolge der auftretenden genetischen Veränderungen zwischen den Tumoren nicht identisch (Hanahan und Weinberg 2000). Die Entstehung von Krebserkrankungen ist ein dynamischer Prozess von Mutation und Selektion, einhergehend mit dem Erwerb von vorteilhaften Eigenschaften (Nowell 1976,

Tomlinson et al. 1996). Die biologische Konsequenz besteht z.B. in weitgehender Unabhängigkeit von externen Wachstumssignalen (Hannon und Beach 1994, Datto et al. 1997, Polakis 2000, Mendelsohn und Baselga 2003, 2006, Winder und Lenz 2010). Dadurch wird eine Dysregulierung im Ablauf des Zellzykluses und in den nachfolgenden Signalwegen erzielt (Weinberg 1995, Landgraf et al. 2008). Wird zusätzlich die Apoptose verwehrt, weisen die Zellen ein unbegrenztes Replikationspotenzial auf (Di Cristofano und Pandolfi 2000, Pathak et al. 2002, Feldser et al. 2003, Gollin 2005). Im weiteren Verlauf der Karzinogenese wird eine eigene Blutversorgung aus den bestehenden Kapillaren des umliegenden Gewebes aufgebaut (Ellis 2001, Jain 2002, Bergers und Benjamin 2003), und die Tumorzellen können invasiv in das umliegende Gewebe einwachsen oder in andere Gewebsverbände metastasieren (Hanahan und Weinberg 2000, Carins et al. 2003, Mareel und Leroy 2003, Harlozinska 2005). Bevor sich ein Tumor im Dickdarm manifestiert, durchläuft dieser zahlreiche Vorstufen. Die Ausbildung von aberranten Kryptenherden ist der erste Indikator einer malignen Entartung. Dabei handelt es sich um histologische Veränderungen in einer normal erscheinenden Mukosa (Shamsuddin et al. 1981). Zur Identifizierung und Quantifizierung früher neoplastischer Läsionen wurden Mäuse mit Azoxymethan behandelt (Bird 1987) und erstmals mikroskopisch auffällige Krypten identifiziert. Die dafür mit Methylenblau gefärbte Mukosaoberfläche erschien an geschädigten Stellen größer, dicker und dunkler. Die luminale Öffnung von aberranten Krypten ist vergleichsweise größer und unförmiger gestaltet (Paulsen et al. 1994, Di Gregorio et al. 1997). Mehrere zusammenhängende aberrante Krypten werden als ACF bezeichnet (Tudek et al. 1989) und heben sich deutlich von der Mukosaoberfläche ab (Di Gregorio et al. 1997). Kennzeichnend für ACF ist hyperproliferierendes Epithelgewebe, das durch ein erhöhtes Expressionsmuster von Proliferationsmarkern, wie dem *carcinoembryonic antigen* (CEA) und *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA; Roncucci et al. 1991, Pretlow et al. 1994, Shpitz et al. 1997, 1998) nachgewiesen werden kann. ACF mit vier und mehr betroffenen Krypten gelten als mögliche Vorstufen eines Kolonkarzinoms (Pretlow et al. 1992, Kristiansen 1996).

3.3 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin

Während des Erhitzens proteinreicher Nahrungsmittel bildet sich aus den enthaltenen Aminosäuren, Zuckern und dem Kreatin ein Gemisch von HAAs. Die Konzentration entstehender heterozyklischer Amine korreliert z.B. mit der Höhe der einwirkenden Gartemperatur und der Zubereitungsdauer (Knize et al. 2002, Layton et al. 1995). Ein wichtiger Vertreter der HAAs ist PhIP, welches beim Erhitzen von proteinreichen Nahrungsmitteln entsteht (Felton et al. 1986, Shioya et al. 1987). Die gewonnenen Erkenntnisse zur Entstehung von PhIP und seiner karzinogenen Wirkung basieren auf Untersuchungsergebnisse mit rotem Fleisch (Felton et al. 1986). Zwar werden in gebratenem Hühnchenfleisch teilweise höhere PhIP-Konzentrationen als im roten Fleisch bestimmt (Knize et al. 1988, Sinha et al. 1995, Wakabayashi et al. 1993), jedoch ist unklar, warum der Anteil der HAA des weißen Fleisches keine potente dickdarmkrebserregende Wirkung entfaltet (Layton et al. 1995).

Das durch die Nahrung aufgenommene PhIP wird im Dünndarm resorbiert und hauptsächlich in der Leber metabolisiert (Abb. 2). Zunächst wird PhIP durch eine Cytochrom P450 1A2 (CYP450 1A2) vermittelte Oxidation in ein N-Hydroxyderivat (N-OH-PhIP) umgewandelt. Mittels Phase-II-Enzymen, wie der N-Acetyltransferase (NAT) oder der Sulfotransferase (SULT), entstehen im weiteren Verlauf Acetyloxy- bzw. Sulfonyloxy-Ester (Turesky et al. 1991, Hein et al. 1994). Diese zerfallen spontan zu reaktiven Nitreniumionen, welche unter anderem eine hohe Affinität zu nucleophilen Zentren in der DNA besitzen (Kadlubar et al. 1992, Zhao et al. 1994, Crofts et al. 1998). PhIP wirkt somit erst nach seiner metabolischen Aktivierung genotoxisch und ist auf diese Weise in der Lage, kovalent an die Basen der DNA zu binden (Takayama et al. 1989; Turesky et al. 1991). Bevorzugt entstehen PhIP-induzierte Addukte an der C8-Position des Guanins (Frandsen et al. 1992, Lin et al. 1992). Das aktivierte PhIP hat zwei Möglichkeiten an seinen Wirkort, den Dickdarm, zu gelangen. Einerseits kann das in der Leber entstandene N-acetoxy-PhIP im Organismus zirkulieren, um am Zielorgan angelangt PhIP-DNA-Addukte auszubilden, andererseits besteht die Möglichkeit, dass N-OH-PhIP mit dem Blut an seinen Wirkort transportiert und erst dort weiter zu N-acetoxy-PhIP bioaktiviert wird (Kaderlik et al. 1994). PhIP wirkt in seiner metabolisch aktivierten Form im bakteriellen Mutagenitätstest (Ames-Test) gering mutagen (Holme et al. 1987), seine Wirksamkeit im Säugerzellmutagenitätstest ist jedoch höher als die der anderen Vertreter der

HAA's (Thompson et al. 1987). In extrahepatischen Geweben findet vorrangig die Kooxidation von PhIP und ungesättigten Fettsäuren durch Cyclooxygenase-katalysierte Signalwege statt. Die Cyclooxygenase und seine Isoformen treten konstitutiv in allen Geweben auf und spielen bei metabolischen Prozessen im Dickdarm eine wesentliche Rolle. Insbesondere die COX-2 ist an der Bildung von Kolonkarzinomen beteiligt (Eberhart et al. 1994, Oshima et al. 1996, Tusjii et al. 1998, Sinicrope und Gill 2004, Wang et al. 2005, Kaidi et al. 2006, Greenhough et al. 2009). Der prozentuale Anteil der Kooxidation am Gesamtumsatz und der Adduktbildung im Fall von PhIP ist jedoch nicht genau bekannt (Moonen et al. 2004).

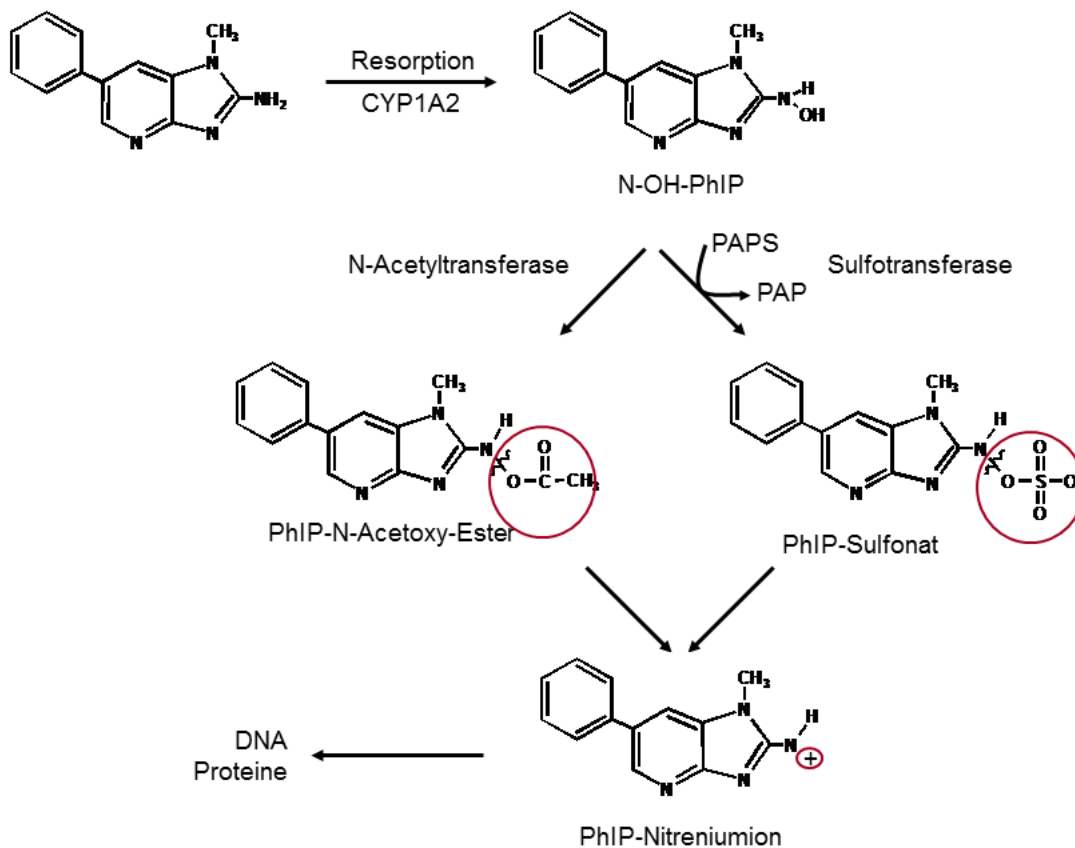


Abb. 1: Nach Aufnahme von PhIP enthaltender Nahrung wird PhIP im Dünndarm resorbiert und in der Leber mit Hilfe von CYP450 1A2 hydroxyliert (N-OH-PhIP). Im zweiten Schritt der Bioaktivierung führen die N-Acetyltransferase oder Sulfotransferase eine funktionelle Gruppe ein. Die beiden polaren und wasserlöslichen Moleküle sind instabil und unter Verlust der Abgangsgruppe entsteht das hoch reaktive Nitreniumion, welches an die DNA oder an Proteine binden kann.

Eine Einschätzung des kanzerogenen Potenzials von PhIP beim Menschen ist aufgrund fehlender Humanstudien schwierig, jedoch lassen zahlreiche In-vivo-Studien an der Ratte und Maus vermuten, dass es an der Entwicklung von

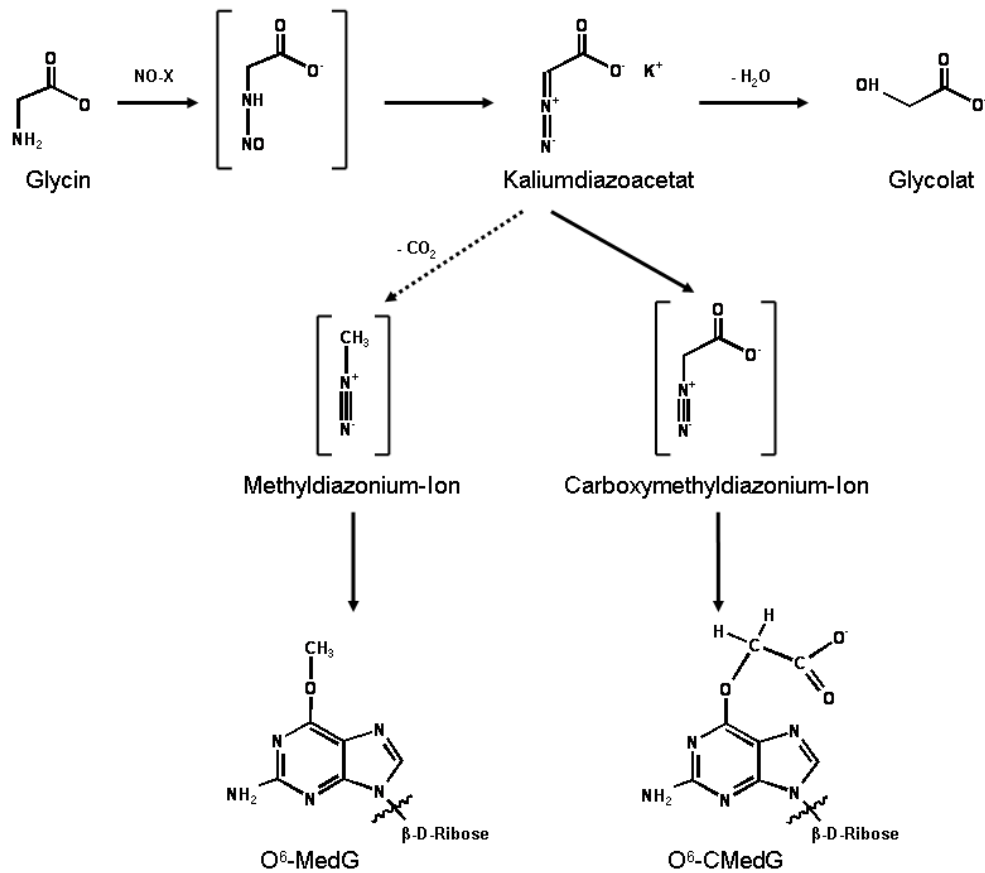
Dickdarmkrebs im Menschen beteiligt ist (Ito et al. 1991, Hasegawa et al. 1993, Ochiai et al. 1996a, 2003, Shirai et al. 1997, Nakagama et al. 2002, Thompson 1987, Thornton und MacDonald 1997, Kim et al. 1998). Es wird daher von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als „möglicherweise kanzerogen“ (2B) eingestuft (IARC 1993). Epidemiologische Studien betrachten zumeist die gesamte Substanzklasse der HAAs und liefern zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. In einer schwedischen Studie ist zwischen der HAA-Aufnahme und der Kolonkrebsinzidenz kein Zusammenhang gefunden worden (Augustsson et al. 1999). Eine US-amerikanische Studie hingegen zeigt eine Verbindung zwischen der Aufnahme von HAA und der Entstehung von kolorektalen Adenomen (Sinha et al. 2001). Als gesichert gilt, dass sich Dickdarmkrebserkrankungen in Ländern mit hohem Fleischkonsum häufen und das Risiko mit zunehmendem Verzehr von lange und stark erhitztem rotem Fleisch steigt (Sinha et al. 2001, Rohrmann et al. 2007). PhIP ist 1986 erstmals isoliert und seine karzinogene Potenz identifiziert worden (Felton et al. 1986). Der Einsatz hoher PhIP-Konzentrationen zeigt im Tierversuch eine konzentrationsabhängige Zunahme hyperplastischer und dysplastischer Läsionen im Kolon und die Entstehung von Kolon-, Brust- und Prostatakrebs ab Konzentrationen von 50 ppm PhIP im Futter (Ito et al. 1991, Hasegawa et al. 1993, Ochiai et al. 1996, 2003, Shirai et al. 1997, Nakagama et al. 2002). Die durchschnittliche tägliche Aufnahmemenge von PhIP im europäischen Raum beträgt 48 ng/d (Rohrmann et al. 2007). PhIP-Konzentrationen unter 25 ppm induzieren im Tierversuch keine präneoplastischen Läsion (Fukushima et al. 2004, Doi et al. 2005, Kühnel et al. 2009). Inwieweit die humanrelevante PhIP-Aufnahmemenge einen Einfluss auf die Entstehung von Dickdarmkrebs hat und welche weiteren Faktoren mitursächlich sein könnten, ist bisher ungeklärt. Der Dickdarmkrebserkrankung geht ein multifaktorieller Entstehungsprozess voraus, so dass weitere Risikofaktoren wie hochkalorische Nahrungsaufnahme und Bewegungsmangel, gekoppelt mit einer geringen Aufnahme an Ballaststoffen (Martinez et al. 1997, Halle und Schoenberg 2009, Wolin et al. 2009), die krebserregende Wirkung des PhIPs verstärken könnten. Insbesondere die Kombination des mutagenen PhIP (Thompson 1987) als Initiator mit einer tumorpromovierend wirkenden Hochfett-diät (Thornton und MacDonald 1997, Kim et al. 1998) scheint geeignet, ein solches Zusammenspiel zu zeigen. In zwei Tierversuchsstudien wurde die Kombination einer fettreichen Diät mit der temporären Gabe von 400 ppm PhIP auf das Dickdarmgewebe untersucht. Die Fütterung einer

Hochfettdiät mit PhIP induzierte mehr ACF, als die Gabe einer Niedrigfettdiät mit PhIP (Ochiai et al. 1996a).

3.4 Kaliumdiazooacetat

N-Nitrosoverbindungen können durch die aufgenommene Nahrung in den Darm gelangen oder im Organismus selbst gebildet werden (NOC). Zu Letzteren gehört Kaliumdiazooacetat (KDA), welches unter anderem mit Hilfe von Bakterien einer gesunden Darmflora gebildet wird (Massey et al. 1988, Calmels et al. 1985, 1988, 1996). Mit Hilfe von humanen Verzehrsstudien und durch Bestimmung der fäkalen NOC-Konzentration konnte gezeigt werden, dass der Verzehr von rotem Fleisch, im Gegensatz zu weißem Fleisch, zu einer deutlich erhöhten NOC-Konzentration in den Fäzes führt (Huhges et al. 2001, Bingham et al. 1996, 2002). Es ist davon auszugehen, dass der überwiegende Anteil der NOC im Körper selbst gebildet wird. Nach einer proteinreichen, vegetarischen Kost ist dieser Effekt nicht zu beobachten (Silvester et al. 1997, Schwartz und Ellefson 1985). Bei der Entstehung der NOC spielt die in der Nahrung am häufigsten auftretende α -Aminosäure Glycin eine wesentliche Rolle. Ihre Reaktion mit nitrosierenden Agenzien, meist Stickstoffmonoxid, führt zur Ausbildung von *N*-Nitrosoglycin-Derivaten (Abb. 2, Challis 1989, Cupid et al. 2004), welche weiter zu Diazoverbindungen metabolisiert werden. Die Bildung von Diazooacetat erfolgt linear zur Konzentration von Glycin und nitrosierenden Agenzien (Cupid et al. 2004). Diazooacetat ist ein kurzlebiges Intermediat, das über eine weitere Zwischenstufe zu reaktiven Carboxy- und Methylazoniumionen umgesetzt wird. Ausgehend von der Reaktion des Glycinderivats mit der DNA entstehen konkurrierend O^6 -Carboxymethylguanin-2'-deoxyguanosin (O^6 CMdG) und O^6 -Methylguanin-2'-deoxyguanosin (O^6 MdG; Harrison et al. 1999). Da O^6 CMdG nicht von der O^6 -alkylguanin-DNA-alkyltransferase repariert wird (Shuker und Margison 1997), reichert sich das Addukt im Gastrointestinaltrakt an und führt wahrscheinlich zu promotagenen Läsionen (Gottschalg et al. 2007). Carboxymethylierte Basen können zwar durch die *Nukleotid-Exzisions-Reparatur*-Proteine repariert werden, tragen dennoch erheblich zur Einleitung der Apoptose in humanen Zellen bei (O'Driscoll et al. 1999). Die genotoxische Wirkung von Kaliumdiazooacetat kann mit Hilfe der alkalischen Einzel-Zell-Gel-Elektrophorese (*Comet Assay*, Ostling und Johanson 1984) in CaCo2-Zellen

(humane Adenokarzinom Zellen des Kolons), in humanen peripheren Lymphozyten und in frisch isolierten Kolonzellen der Ratte in Form von DNA-Strangbrüchen nachgewiesen werden (Anderson et al. 1986, 1999).



Modifiziert nach Gottschalg et al. 2007

Abb. 2: KDA wird bei der Reaktion von mit der Nahrung zugeführtem Glycin und nitrosierenden Agenzien erzeugt. Weiterführend entstehen hoch reaktive alkylierende Intermediate, die mit der DNA reagieren können.

KDA wurde erstmals 1908 isoliert (Müller 1908). Einige Anhaltspunkte zu den Eigenschaften des KDA lassen sich von Untersuchungen an *N*-(*N'*-acetyl-*L*-propyl)-*N*-nitrosoglycins (APNG) ableiten, da beide Verbindungen der gleichen Substanzgruppe angehören. APNG ist im bakteriellen Ames-Test mit und ohne metabolische Aktivierung mutagen (Challis et al. 1985), ebenso führt es in den *Chinese hamster ovary* (CHO) Zellen zu Schäden an der DNA (Anderson et al. 1986). Genotoxische Schäden konnten ebenfalls bei In-vivo-Tests an Ratten und Mäusen gezeigt werden (Blowers und Anderson 1988). Die endogene Ausbildung von KDA ist wahrscheinlicher als die von APNG und aus beiden können Carboxymethyldiazoniumionen hervorgehen (Challis 1989), die um die

Carboxymethylierung der DNA konkurrieren. Anteilsmäßig erzeugt das KDA mehr O⁶CMdG und O⁶MdG. Das O⁶CMdG-Addukt wird von der O⁶-Alkylguanin-Transferase nicht repariert, akkumuliert daher in den Zellen und führt wahrscheinlich zu promutagenen Läsionen (Harrison et al. 1997, Shuker und Margison 1997). Ferner sind beide Substanzen in der Lage, die DNA zu methylieren, ein Vorgang der höchstwahrscheinlich für die Ätiologie der Krebsentstehung im Gastrointestinaltrakt mitverantwortlich ist (Shuker und Margison 1997, Grady und Carethers 2008, Kim et al. 2010). In-vitro-Studien zeigen, dass KDA-Konzentrationen von 0 bis 4 µM in humanen peripheren Lymphozyten, in Caco2-Zellen, einer humanen Adenomkarzinomzelllinie des Kolons, und in frisch isolierten Primärzellen des Kolons der Ratte dosisabhängig DNA-Strangbrüche erzeugen (Anderson et al. 1999). In einer weiteren In-vitro-Studie wurden auf der Grundlage eines hefebasierten Mutationstests mit integrierter humaner *p53*-cDNA-Sequenz nach KDA-Inkubation erhöhte O⁶CMdG- und O⁶MdG-Adduktzahlen festgestellt. Die Sequenzierung der DNA zeigt eine gesteigerte Anzahl induzierter Mutationen des *p53*-Gens auf (Gottschalg et al. 2007). Nach dem Verzehr von Fleisch wurde im Blut der Probanden eine erhöhte Zahl von O⁶CMdG-Addukten detektiert (Cupid et al. 2004). Die Bildung von NOC ist von der aufgenommenen Nahrung abhängig. Im Durchschnitt beträgt der physiologische Nitritlevel, in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Nahrungszusammensetzung, zwischen 1,45 – 3,57 µmol/l (Xu und Reed 1993b). Demzufolge ist die Entstehung der NOC konzentrationsabhängig. Insbesondere der Verzehr von rotem Fleisch führt zu einer Verschiebung in den oberen Konzentrationsbereich (Hughes et al. 2001, Sinha et al. 2001). Auf diese Weise scheint auch die Bildung von NOC und dadurch von KDA in direktem Maß vom individuellen Lebensstil abhängig zu sein.

3.5 Aufgabenstellung

Ziel des Forschungsprojektes war es, die bestehende Hypothese, dass die fleischhaltige und fettreiche Ernährung eine wesentliche Ursache von Dickdarmkrebserkrankungen ist, unter humanrelevanten Bedingungen zu überprüfen. Es handelt sich bei dieser Erkrankung um das Zusammenspiel zahlreicher Faktoren, so dass bei der vorliegenden Arbeit zwei Substanzen, deren kanzerogenes Potenzial in engem Zusammenhang mit dem Verzehr von rotem

Fleisch steht, näher untersucht wurden. PhIP, welches bei der Fleischzubereitung entsteht, und KDA, welches in Folge der Fleischaufnahme im Gastrointestinaltrakt gebildet wird.

Die Untersuchungen mit PhIP fanden in einem In-vivo-Versuch mit F344-Ratten in Kombination mit einer Standard- und Westerndiät statt. Mit der Westerndiät wird der hohe Nahrungsfettanteil bei den Menschen der industrialisierten Länder simuliert. Das PhIP wird in einer sehr niedrigen Konzentration verabreicht, um humanrelevante Aussagen treffen zu können. Mit der Kombination der Westerndiät und dem PhIP soll geklärt werden, ob das Fett einen zusätzlichen Einfluss auf die Anzahl oder Größe ausgebildeter ACF hat.

Das bisher unzureichend untersuchte KDA wurde mittels einer In-vitro-Methode, dem BALB/c-3T3-Zelltransformationstest, geprüft. Mit diesem Test kann das transformierende Potenzial von Substanzen ohne den Einsatz von Versuchstieren geprüft werden. Die Methode dient so der ersten Analyse von Biochemikalien hinsichtlich ihres kanzerogenen Potenzials (Meyer 1983, IARC 1985, Tsuchiya und Umeda 1995, Sakai 2007, Mascolo et al. 2010). Wie schon beim PhIP ist auch hier der Einsatz von humanrelevanten Konzentrationen für die Beurteilung des kanzerogenen Potenzials wichtig. Geprüft wurde in der vorliegenden Arbeit, ob das KDA Einfluss auf das Transformationsgeschehen nimmt.

4 Material und Methoden

4.1 Geräte

Plattenphotometer	Tecan infiniti 200, Tecan, Grödig/Salzburg (A)
Brutschrank	HeraCell 150, Thermo Scientific, Karlsruhe (D)
Zellzählgerät	ViCell-XR, Beckman Coulter GmbH, Krefeld (D)
Mikroskop mit DS camera control unit DS-U1	Ti-S, Nikon, Düsseldorf (D)
Rotationsverdampfer	Büchi, Flawil (Ch)
Stereomikroskope	Stemi 2000-C, Zeiss, Oberkochen (D) und SZ-STU2, Olympus, Tokyo (Japan)

4.2 Verbrauchsmaterialien

Die benötigten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, CH), Greiner Bio-one (Frickenhausen, D), Eppendorf (Hamburg, D), Coring B.V. (Amsterdam, NL), Roth (Karlsruhe, D) und Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D) bezogen.

4.3 Biochemikalien und Reagenzien

Dimethylsulfoxid	Roth, Karlsruhe (D)
Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12	Biochrom AG, Berlin (D)
Ethanol, reinst	Roth, Karlsruhe (D)
Ethanol, vergällt	CG Chemikalien, Laatzen (D)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe (D)
Ethyl-Diazoacetat	Sigma Aldrich, Steinheim (D)
Fötale Bovines Serum	Biochrom AG, Berlin (D)
Giemsa	Roth, Karlsruhe (D)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Applichem, Darmstadt (D)
Kaliumhydroxid	J.T. Baker, Veenter (NL)
Maiskeimöl (Mazola)	Unilever, Hamburg (D)
3-Methylcholanthren	Sigma Aldrich, Steinheim (D)
Methanol	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumhydrogencarbonat	Riedel-de Haën, Seelze (D)
Penicillin/Streptomycin	Roth, Karlsruhe (D)
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridin (PhIP)	Biochemisches Institut für Umweltcarcinogenen, Großhansdorf, (D)
Standarddiät (1324)	Altomin, Lage (D)
Sulforhodamin B	Sigma Aldrich, Steinheim (D)
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe (D)
Trichlormethan (Chloroform)	Riedel-de Haën, Seelze (D)
Tris	Roth, Karlsruhe (D)
Trypsin/EDTA-Lösung (10x, 0,5%/0,2%(w/v))	Biochrom AG, Berlin (D)
12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat	Sigma Aldrich, Steinheim (D)
tert-Butyl-Diazoacetat	Sigma Aldrich, Steinheim (D)
Westerndiät (C1100)	Altomin, Lage (D)

4.4 Puffer und Lösungen

Gewebefixierung	4 % Paraformaldehyd
Methylenblau-Färbelösung	0,1 % Methylenblau in PBS
DMEM/F12	12,12 g DMEM/F12 Pulver mit L-Glutamin 4,77 g HEPES 1,5 g NaHCO ₃ 11 g Na-Pyruvat Ad 1 Liter dH ₂ O, pH = 7,4 Sterilfiltriert, bei 4 °C gelagert
Kulturmedium	94 % DMEM/F12 5 % FBS 1 % P/S
Einfriermedium	70 % DMEM/F12 20 % FBS 10 % DMSO
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₂ 1,43 g NaH ₂ PO ₂ x 2 H ₂ O Ad 1 Liter dH ₂ O, pH = 7,5 Bei Raumtemperatur gelagert
10 mM Tris-Puffer	1,211 g Tris Ultra in 1 Liter dH ₂ O, pH = 10,3
SRB-Lösung	0,4 g Sulforhodamin B in 100 ml 1 % Essigsäure
PBS-Methanol-Gemisch (1:1)	50 ml PBS + 50 ml Methanol

4.5 Tierversuch

Der im Folgenden beschriebene Tierversuch war vom Land Brandenburg mit dem Geschäftszeichen 32-44457+55 genehmigt und unter der Kurzbezeichnung „Übergewicht und Dickdarmkrebs“ geführt.

4.5.1 Haltungsbedingungen

In dem Tierversuch wurden 72 männliche F344-Ratten (Charles River, Sulzfeld) in sechs Gruppen mit jeweils 12 Tieren eingesetzt. Die vorerst paarweise und spätere Einzelhaltung der Tiere erfolgte in Macrolon-Käfigen Typ II. Während des gesamten Versuchszeitraums wurden die Tiere in einem SPF-Raum unter standardisierten Bedingungen gehalten (22 ± 2 °C, 40 – 60 % Luftfeuchtigkeit, 15 m³/h Luftaustausch, 16 h/8 h Tag-Nacht-Rhythmus). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Nach einer Adaptationszeit von drei Wochen waren die Tiere zu Versuchsbeginn circa 5 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht von durchschnittlich 102 g. Einmal wöchentlich wurden die Tiere in Käfige mit frischer Einstreu umgesetzt und dabei die Körpermasse des einzelnen Tieres und die Futteraufnahme für die paarweise zusammensitzenden Tiere ermittelt.

4.5.2 Futterzubereitung

Das PhIP (Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Großhansdorf) wurde in Maiskeimöl (Mazola), wie in Tab. 1 dargestellt, gelöst und anschließend von der Firma Altromin (Gesellschaft für Tierernährung mbH, Lage) zur Futterherstellung eingesetzt. Dafür wurde das mit PhIP versetzte Pflanzenöl dem Futterpulver beigemischt und maschinell vermengt. Mit Hilfe einer Pelletiermaschine wurden die Futtermischungen in Pellets gepresst und luftgetrocknet.

Die jeweiligen PhIP-Mengen von 0,01 und 100 ppm wurden einer Standard- und einer Westerndiät beigesetzt (Tab. 2). Die Zubereitung des Kontrollfutters für die jeweilige Diät erfolgte nach derselben Prozedur und gleicher Zugabe von Pflanzenöl, jedoch ohne PhIP. Insgesamt ergaben sich je Diät drei Versuchsgruppen. Die

Lagerung der Abpackungen (1-kg-Kunststoffeimer) erfolgte bis zum Anbruch bei minus 20 °C und anschließend bei 4 °C.

	Standarddiät	Westerndiät
Rohprotein [%]	19,6	31
Rohfett [%]	3,5	21,4
Rohfaser [%]	5,75	2
Monosaccharide [%]	-	3,4
Disaccharide [%]	5,3	1,5
Polysaccharide [%]	30	20,6

Tab. 1: Die Zusammensetzung der beiden Diäten war je nach Typ unterschiedlich. In der nebenstehenden Tabelle sind die Hauptinhaltsstoffe dargestellt.

Gruppen	PhIP [mg]	Maiskeimöl [ml]	Futter [Kg]
St1	0	200	20
St2	0,16	160	16
St3	1,8	180	18
We1	0	130	13
We2	0,13	130	13
We3	1,2	120	12

Tab. 2: Der unterschiedliche PhIP-Gehalt in den einzelnen Diäten hatte keine Einfluss auf die sonstigen Bestandteile der Diät. Die Tabelle zeigt, dass der Maiskeimölanteil in allen Diäten gleich ist.

A: Standarddiät; B: Western-Typ Diät

4.5.3 Versuchsschema und Verlauf

Die Produktion des Experimentfutters erfolgte für sechs Versuchsgruppen mit je 12 Tieren. Die Versuchsgruppen St1 und We1 waren die Kontrollgruppen für die jeweilige Diät und das Futter enthielt keine weiteren Zusätze als das Maiskeimöl. Je Diätform wurde PhIP in einer humanrelevanten Dosis von 0,01 ppm (Versuchsgruppen St2 und We2) beziehungsweise in einer hohen Dosis von 100 ppm (Versuchsgruppen St3 und We3) zugesetzt.

Gruppen	Anzahl Tiere	Standarddiät	Western Typ Diät	PhIP [ppm]	
St1	12	X		0	Kontrolldiät
St2	12	X		0,01	Humanrelevante Dosis
St3	12	X		100	Hochdosis-Gruppe
We1	12		X	0	Kontrolldiät
We2	12		X	0,01	Humanrelevante Dosis
We3	12		X	100	Hochdosis-Gruppe

Tab. 3: Anhand der Gruppenbezeichnung ist der Tabelle die Zusammensetzung des Futters der einzelnen Versuchsgruppen zu entnehmen.

4.5.4 Sektion

Die Tiere wurden durch Isofluran narkotisiert und dekapitiert. Der anschließend geöffnete Bauchraum wurde einer makroskopischen Prüfung unterzogen. Der Dickdarm wurde entnommen und in den proximalen und den distalen Abschnitt eingeteilt. Für die spätere histologische Auswertung erfolgte eine Fixierung des Darms mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung.

4.5.5 Erhebung biometrischer Daten

4.5.5.1 Körpermasse

Die Bestimmung des Körpergewichts ist eine leicht durchzuführende, nicht-invasive Methode, welche sensitiv potenziell toxische Wirkungen einer Verbindung auf den Gesamtorganismus anzeigt. Die Erhebung war notwendig, um einen Vergleich zwischen den Diäten und der Auswirkung von hoher und niedriger PhIP-Dosis zu ziehen. Für die statistische Analyse wurde die Körpermasse der jeweiligen Kontrollgruppe mit der Körpermassenzunahme der PhIP-behandelten Gruppen zu Beginn und Ende des Versuches verglichen. Vorerst wurde jede Diätgruppe allein näher untersucht und anschließend einer statistische Analyse zwischen den Diäten und der jeweils gleich verfütterten PhIP-Menge unterzogen. Die Auswertung erfolgte mit dem Statistik-Programm SPSS Version 17.0. Mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests ergaben sich für die Tiergewichte je Gruppe zum jeweiligen Erhebungszeitpunkt keine signifikanten Unterschiede, das heißt sie waren normalverteilt. Varianzhomogenität lag in allen getesteten Gruppen vor. Mit dem Dunnett-Vergleichstest erfolgte die Prüfung der behandelten Tiere der jeweiligen Diät gegen die zugehörige Kontrollgruppe (St1 oder We1). Außerdem wurde für den paarweisen Vergleich aller Diätgruppen untereinander ein Tukey-Test durchgeführt.

4.5.5.2 Futteraufnahme

Bei der Protokollierung der Futteraufnahme handelt es sich ebenso um ein nicht-invasives Vorgehen, das einfach zu bestimmen ist. Außerdem gibt das Fressverhalten eines Tieres eine erste Tendenz einer toxischen Auswirkung durch

eine Substanz auf den Gesamtorganismus an. Mit dem nichtparametrischen H-Test nach Kruskal und Wallis wurde ein erster Mittelwertsvergleich der Futteraufnahme von den Tieren der Gruppen vorgenommen. Bei einem signifikanten Unterschied wurde im Anschluss mit dem Post-hoc-Verfahren überprüft, welche Gruppen sich signifikant unterscheiden. Zum einen wurde innerhalb einer Diätgruppe mit der Kontrolle verglichen und zum anderen die Diäten durch einen paarweisen Vergleich miteinander (Tukey-Test).

4.5.5.3 Histologie

Zur histologischen Auswertung wurde der jeweilige Darmabschnitt für circa eine Minute in 0,1 %ige Methylenblau-Färbelösung gelegt, leicht geschwenkt und anschließend am Stereomikroskop im Schwarzfeld untersucht. Durch die Färbung der Mukosaoberfläche sind die veränderten Strukturen dunkler gefärbt, größer und zur Umgebung etwas erhöht. Zur Auswertung wird der Dickdarm mäanderförmig betrachtet und die Beobachtungen zentimetergenau protokolliert. Kriterien für die Identifikation hinsichtlich der ACF sind auffällige Veränderungen des Kryptengewebes gegenüber der Umgebung, die Zahl der betroffenen Krypten und in welchem Darmabschnitt diese liegen.

4.6 Zellbiologische Arbeiten

4.6.1 Kultivierung und Subkultivierung der Zellen

Das regelmäßige Passagieren der Zellen wurde grundsätzlich an einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Während der gesamten Kultivierungszeit wurden die BALB/c-3T3-A31-1-1 Zellen im Kulturmedium bei 37 °C, fünfprozentiger CO₂-Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank gehalten.

Spätestens mit Erreichen der Subkonfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend durch die Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Plattengrund gelöst. Nach dreiminütiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ablösungsgrad der Zellen mikroskopisch kontrolliert und die proteolytische Wirkung des Trypsins durch Zugabe des Kulturmediums gestoppt. Die vom Plattengrund gelösten Zellen wurden mehrmals resuspendiert und im Verhältnis 1:10 beziehungsweise 1:15 in sterilen Zellkulturschalen weiter kultiviert. Die Zellkulturschalen enthielten zuvor eingebrachtes warmes Kulturmedium. Zur Gewährleistung der gleichmäßigen Verteilung der subkultivierten Zellen auf dem Plattengrund wurden die Zellkulturschalen vorsichtig geschwenkt.

4.6.2 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung dient der Lagerung von Zellen über einen langen Zeitraum. Dafür wurden die subkonfluenten Zellen zunächst trypsiniert und gezählt. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 200 x g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet im Einfriermedium (0,5 Million Zellen/ml Einfriermedium) resuspendiert. Es wurden jeweils 2 ml der eingestellten Zellsuspension in Kryoröhrchen überführt und in einer Kryobox bei -80 °C eingefroren. Zur Langzeitlagerung ist es notwendig die Zellen ein bis zwei Tage später in flüssigen Stickstoff zu überführen.

Werden konservierten Zellen wieder in Kultur genommen, wurden diese am Rand des Kryoröhrchens angetaut, in ein 15-ml-Reaktionsgefäß mit warmem Kulturmedium gefüllt und 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes, welcher Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, wurden die Zellen durch Zusetzen von

warmem Kulturmedium resuspendiert und in eine sterile 10-cm-Kulturschale überführt. Durch leichtes Schwenken wurden die Zellen auf der gesamten Kulturschale verteilt. Bevor die Zellen experimentell eingesetzt wurden, waren diese mindestens zweimal passagiert worden.

4.6.3 Test der kultivierten Zellen auf Mycoplasmen

Die Zellen wurden monatlich hinsichtlich einer möglichen Kontamination mit Mycoplasmen mit dem Detektionskit „Minerva biolabs“ nach Herstellerangaben überprüft. Die Zellkultur war zu jedem Zeitpunkt der Experimente frei von Mycoplasmen.

4.6.4 Bestimmung des Wachstumsverhaltens der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen

Zur Einschätzung des Wachstumsverhaltens der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen war die Erhebung einer Wachstumskurve notwendig. Es wurden 25.000 BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen in 6-cm große Schalen ausgesät und über sechs Tage im 24-Stunden-Rhythmus gezählt. Die Zellen von vier Schalen wurden nach zweimaligem Waschen, Zugabe von 500 µl Trypsin und anschließender Zugabe von 2 ml Kulturmedium sorgfältig resuspendiert und jeweils 500 µl der Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl mittels ViCell® verwendet. Die zu jedem Zeitpunkt bestimmten Zellzahlen wurden gemittelt und halblogarithmisch ($\log_2 x$) gegen die Zeit aufgetragen. Der lineare Teil der Wachstumskurve wurde zur Erstellung der Geradengleichung mit linearer Regression genutzt. An Hand dieser Daten wurde die Verdopplungszeit aus dem reziproken Anstieg ($1/m$) der Geradengleichung berechnet.

4.6.5 Herstellung der verwendeten Biochemikalien

Die beiden als Kontrolle verwendeten Biochemikalien Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) und 3-Methylcholanthren (MCA) lagen pulverförmig vor und wurden als 1 mM Stocklösung in DMSO gelöst und bei -20 °C gelagert. Zum jeweiligen

Behandlungszeitpunkt wurde das Behandlungsmedium frisch hergestellt und das verwendete Aliquot nach einmaliger Entnahme verworfen.

Die Herstellung von Kaliumdiazoacetat erfolgte nach Literaturangaben (Anderson et al. 1999). Jedoch stand auf Grund eines Lieferverbots in Deutschland für den ersten Versuch der Synthese kein Ethyldiazoacetat zur Verfügung, so dass ausweichend dafür tert-Butyldiazoacetat verwendet wurde. Davon wurden 1,14 g in einer 2 M Kaliumhydroxidlösung mit Wasser (11,4 ml) verrührt. Nach 24 Stunden bildete sich eine gelbliche Zwei-Phasen-Lösung, die auch nicht durch Wärmezufuhr (Wasserbad) in eine homogenen Lösung überführt werden konnte. Erst in einem zweiten Versuch war das später verfügbare Ethyldiazoacetat (1 g) in einer Kaliumhydroxidlösung (2 M) mit Wasser verrührt worden (Anderson et al. 1999). Nach circa 4 Stunden war eine homogene, gelbliche Lösung Kaliumdiazoacetat ($M = 124,14 \text{ g/mol}$) entstanden, die mit einem Rotationsverdampfer eingeeengt wurde. Die gelbe pulverförmige Biochemikalie wurde in leicht basischem PBS (pH 8) gelöst, als eine 10 mM Stocklösung aliquotiert und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Zu jedem Behandlungszeitpunkt wurde ein neues Aliquot Kaliumdiazoacetat verwendet und der Rest verworfen.

4.6.6 Sulforhodamin B – Viabilitätstest mit Kaliumdiazoacetat

Der Sulforhodamin B- (SRB-Test) oder Viabilitätstest bietet die Möglichkeit, Veränderungen in der Proteinmenge und dementsprechend Veränderungen der Zellzahl über einen definierten Zeitraum zu verfolgen. Anhand der so erhobenen Daten wurden die Behandlungskonzentrationen für weitere Experimente festgelegt. Bei dem SRB-Test handelt es sich um eine sensible, kolorimetrische Methode zur indirekten Ermittlung der Zellzahl. Der dafür verwendete Farbstoff Sulforhodamin B (SRB) bindet an das Zellprotein und verhält sich über einen großen Bereich linear zur Zellzahl auf der Kulturschale. Die Zellprotein-Menge wird bei 540 nm photometrisch gemessen (Skehan et al. 1990).

Die auf 15-cm-Schalen kultivierten BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen wurden im subkonfluenten Stadium vom Plattengrund trypsiniert und im standardisierten Kulturmedium aufgenommen. Nach sorgfältigem Resuspendieren wurde die Zellzahl mit dem Zellzählgerät ViCell® ermittelt und eine Zellsuspension von 200.000 Zellen je ml Kulturmedium hergestellt. Anschließend wurden die Zellen in einem Volumen von 2 ml je *well* einer flachen 6-*well*-Zellkulturplatte eingebracht. Dies entspricht einer

Zellzahl von 400.000 Zellen je *well* und nach einer Ruhephase von 24 Stunden kann von einer subkonfluent bewachsenen Zellkulturplatte ausgegangen werden. Zu diesem Zeitpunkt wurden die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen mit der zu testenden Substanz behandelt und die erste Platte *in situ* fixiert. Dafür wurden 500 μ l kalte 50 %ige Trichloressigsäure (TCA) in jedes *well* dazugegeben (Endkonzentration: 10 % TCA). Das dadurch erzeugte saure Milieu bildete die Grundlage zur Ermittlung des Gesamtproteingehalts. Nach 45 Minuten Inkubation im Kühlschrank wurden die Platten mit fließendem, kaltem Wasser gewaschen und im Trockenschrank bei maximal 40 °C für circa eine Stunde getrocknet.

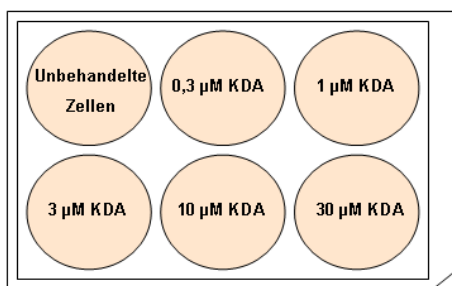


Abb. 3: Schema der Behandlung der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen beim Viabilitätstest in den einzelnen *well*s einer 6-*well*-Zellkulturplatte.

Bei den weiteren Zellkulturplatten wurde das Kulturmedium gegen ein frisch hergestelltes Behandlungsmedium ausgetauscht (Abb. 3) und nach 72 Stunden auch diese Zellkulturplatte *in situ* fixiert. Für die Messung der Proteinkonzentration wurden die am Plattengrund befindlichen Zellen durch Zugabe von 1,5 ml einer vierprozentigen SRB-Lösung in 1 %iger Essigsäure (w/v) mit Hilfe der Multipipette gefärbt. Nach 15 Minuten Inkubation wurde der ungebundene Farbstoff durch Zugabe und anschließendem Verwerfen der 1 %igen Essigsäure entfernt. Dies erfolgte solange, bis der Überstand farblos war. Im Anschluss trockneten die Platten erneut bei maximal 40 °C für eine Stunde im Trockenschrank. Für die photometrische Messung wurde der ausgebildete Protein-SRB-Komplex durch Zugabe von 2,5 ml eines basischen 10 mM Tris-Puffer in Lösung gebracht. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 15 Minuten bei 4 °C wurde die Intensität der Färbung im Plattenphotometer bei 540 nm bestimmt. Mit steigendem Proteingehalt nimmt die Absorption zu. Zum Ausschluss des Hintergrunds erfolgte eine photometrische Bestimmung bei 690 nm. Die Messung wurde mit der Tecan-i-controlTM-Software durchgeführt und gibt automatisch ein Datenblatt mit den einzelnen Messdaten und die Differenz der beiden aus. Es wurden jeweils die Werte der gleichen Behandlungskonzentrationen zur Berechnung der Mittelwerte und

Standardabweichungen genutzt. Die weitere statistische Auswertung ist in Kapitel 4.7 beschrieben.

4.6.7 Prüfung des kanzerogenen Potenzials von Chemikalien mit dem BALB/c-3T3-Zelltransformationstest

Mit Hilfe des Zelltransformationstests wird geprüft, ob eine zu testende Substanz in der Lage ist, den Zellklon der Fibroblastenzelllinie BALB/c-3T3-A31-1-1 maligne zu transformieren, und ob diese tumorinitiierende und/oder tumorpromovierende Eigenschaften besitzt. Eine initiierende Wirkung ist festzustellen, indem die Zellen zu Beginn der Prüfung mit der zu testenden Substanz und daraufhin mit dem bekannten Tumorpromotor 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) behandelt werden. Die tumorpromovierende Wirkung ist zu analysieren, indem die Zellen zuerst mit dem bekannten Tumorinitiator 3-Methylcholanthren (MCA) und anschließend mit der zu testenden Substanz inkubiert werden. Parallel dazu wird geprüft, ob es sich bei der zu testenden Substanz um ein komplettes Kanzerogen handelt. Die Zellen werden sowohl in der Initiations- als auch in der Promotionsphase mit der Testsubstanz inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Zellen fixiert und gefärbt. Die Auswertung der Zellkulturplatten erfolgt makroskopisch und mikroskopisch. Sind Zellen durch die Einwirkung einer Biochemikalie transformiert, kommt es zum Verlust der natürlich bestehenden Kontaktinhibition und die Zellen wachsen übereinander, so genannte Zellherde entstehen. Die Anzahl der gebildeten Zellherde dient als Maß für die kanzerogene Potenz der getesteten Substanz.

Zum Experimentstart wurden die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen vom Plattengrund einer subkonfluent bewachsenen 10-cm-Zellkulturplatten trypsiniert, im standardisierten Kulturmedium aufgenommen, gründlich resuspendiert und die Zellzahl mit dem Zellzählgerät ermittelt. Von der im Anschluss hergestellten Zellsuspension mit 2.500 Zellen je ml Kulturmedium wurden 2 ml je *well* in eine flache 6-*well*-Zellkulturplatte eingebracht. Dies entsprach einer Zellzahl von 5.000 Zellen je *well*. Das Protokoll für das experimentelle Vorgehen ist in Abbildung 5 dargestellt. Nach circa 24 Stunden Anheftungszeit wurden die sehr dünn bewachsenen Zellkulturschale (>10 %) mit dem Initiator MCA bzw. mit der zu testenden Substanz behandelt. Nach Ablauf der dreitägigen Inkubationszeit wurde das Behandlungsmedium abgesaugt und im Anschluss daran über 14 Tage die tumorpromovierende Wirkung getestet. Dafür

wurde das Kulturmedium wieder entfernt und im Drei- bzw. Vier-Tage-Rhythmus den Zellen das Behandlungsmedium mit dem Promotor TPA bzw. der Testsubstanz, enthalten im Kulturmedium, zugesetzt. Die Behandlungsmedien wurden zu jedem Behandlungszeitpunkt frisch angesetzt. Ebenfalls beobachtet wurde der Einfluss des Lösungsmittels auf die Zellen. Nach Ende der Behandlungszeit folgte eine dreiwöchige Inkubation, wobei zweimal in der Woche das Kulturmedium gewechselt wurde.

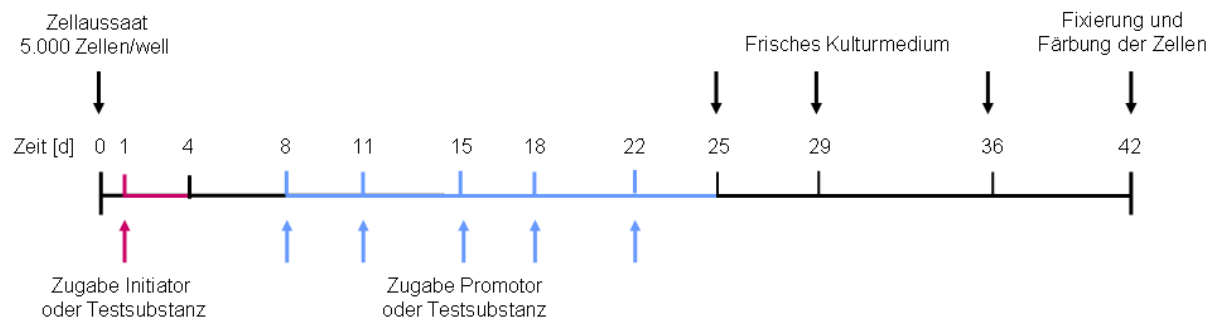


Abb. 4: Schematische Darstellung des Zeitverlaufs und der Behandlungszeitpunkte im BALB/c-3T3-Zelltransformationstest über sechs Experimentwochen.

Die Experimentzeit endet nach sechs Wochen. Für die dauerhafte Erhaltung der Zellkulturplatten wurde der Zellrasen fixiert und gefärbt. Zu diesem Zweck wurde der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und 2 ml eines kalten PBS-Methanol-Gemisch (1:1) je *well* zugegeben. Nach drei Minuten Inkubation wurde das Gemisch gegen eiskaltes, reines Methanol ausgetauscht und weitere zehn Minuten inkubiert. Anschließend wurde der Zellrasen zwei- bis dreimal mit Methanol gewaschen und im Trockenschrank bei maximal 42 °C für mindestens 30 Minuten getrocknet. Die Färbung kann direkt im Anschluss erfolgen. Erfolgte die Färbung zu einem späteren Zeitpunkt, wurde der Zellrasen noch einmal mit Methanol gewaschen und getrocknet, da der Zellrasen mit der Zeit Feuchtigkeit aufnahm und dies die Färbung störte. In jedes *well* wurden mit der Multipipette 500 µl Giemsa-Färbelösung pipettiert und die Platten gleichmäßig geschwenkt, so dass der gesamte Zellrasen bedeckt war. Nach drei Minuten Inkubation wurden 1,5 ml demineralisiertes Wasser zugegeben. Eine weitere Wartezeit von drei Minuten folgte. Nach Absaugen der Färbelösung in den gesonderten Abfall wurden die Zellkulturplatten fünfmal unter sanft fließendem, Wasser gespült. Zur vollständigen Entfernung von überschüssigem Farbstoff wurden

Hintergrund erhalten blieb. Schließlich wurden die Zellkulturplatten erneut getrocknet und anschließend ausgewertet.

		Behandlungsgruppen						
		1	2	3	4	5	6	7
Tag	Phase							
0	Einsatz	5.000 Zellen/Well in Kulturmedium						
1	Initiation	DMSO	MCA	DMSO	Kulturmedium	MCA	KDA	KDA
4		Kulturmedium						
8	Promotion	DMSO	DMSO	TPA	Kulturmedium	KDA	TPA	KDA
11		DMSO	DMSO	TPA	Kulturmedium	KDA	TPA	KDA
15		DMSO	DMSO	TPA	Kulturmedium	KDA	TPA	KDA
18		DMSO	DMSO	TPA	Kulturmedium	KDA	TPA	KDA
22								
25	Kulturmedium							
29								
36								
42	Fixierung und Färbung							

Abb. 5: Behandlungsgruppen und Protokoll des BALB/c-3T3-Zelltransformationstest

DMSO = Dimethylsulfoxid entsprach der DMSO-Konzentration in der MCA bzw. TPA gelöst waren; MCA = 0,5 µg/ml 3-Methylcholanthren; TPA = 0,3 µg/ml 12-O-Tetra-decanoyl-phorbol-13-acetat, KDA = Kaliumdiazooacetat wird in den Konzentrationen 0,3, 3 und 30 µM zu den angegebenen Zeitpunkten zugesetzt.

Nachdem die Schalen fixiert, gefärbt und getrocknet waren, wurden die entstandenen Zellherde mit Hilfe eines Binokulars ausgezählt, vermessen und kategorisiert. Für einen Überblick wurden zuerst alle entstandenen Zellherde gezählt. In die abschließende Auswertung waren nur die Zellherde mit einem Durchmesser größer als 3 mm eingegangen. Dabei wurden drei verschiedene Zellherde unterschieden (Reznikoff et al. 1973, IARC 1985). Zellherdtyp I hob sich durch eine leichte Veränderung des Zellrasens und einer geringen Basophilie hervor. Die Zellen wuchsen in diesem Bereich nicht oder kaum übereinander („piling up“). Beim Zellherdtyp II traten dagegen stärkere Veränderungen der Ein-Zell-Schicht, mit einer mittelstarken bis starken Basophilie und einer entsprechend intensiveren Anfärbung auf. Zellherdtyp II zeigte darüber hinaus ein mittelstarkes bis starkes Übereinanderwachsen der Zellen und relativ glatte Zellherdränder. Als stärkste Veränderung der Zellschicht wurde der Zellherdtyp III bewertet. Hinsichtlich der Basophilie und des Übereinanderwachsens ähnelt es dem Zellherdtyp II, zeigte aber zusätzlich eine Invasion in den umliegenden Zellrasen. Da die Zellen am Rand des Zellherdtyp III zum Teil stark in die umliegende Ein-Zell-Schicht ausstrahlen, ergaben diese ein ausgefranstes Erscheinungsbild. Es konnte relativ gut vom Zellherdtyp II unterschieden werden. Allerdings erfolgten die Übergänge zwischen den einzelnen

Zellherdtypen fließend, weshalb für die Kategorisierung der Zellherde subjektive Ermessensentscheidungen unumgänglich waren.

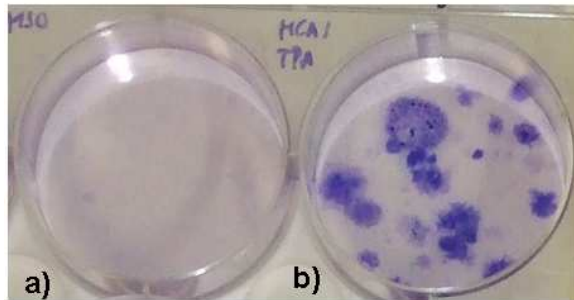


Abb. 6: Ausschnitt einer 6-cm-Kulturplatte mit fixierten und Giemsa gefärbten BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen

Beispielhaft sind hier zwei *wells* Giemsa-gefärbter Zellen dargestellt. Abb. 6a zeigt einen gleichmäßig schwach violetten Zellrasen, wohingegen sich die transformierten Zellherde deutlich durch ihre violette Färbung vom Hintergrund hervorheben (Abb. 6b).

4.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Messdaten wurde zur qualitativen Einschätzung verwendet. Die dabei verwendeten Verfahren beruhen auf Formel- und Tabellengrundlage eines Statistiklehrbuches (Zöfel 2002) und eines SPSS-Handbuches (Elsner 2009). Zur Auswertung wurden die Software Microsoft EXCEL und das Statistikprogramm SPSS, Version 17.0 für Windows, genutzt.

Mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test (K-S-Test) wurde der Datensatz auf eine hinreichende Normalverteilung untersucht. Durch die Berechnung einer Prüfgröße wurde in Abhängigkeit der Fallzahl entschieden, ob eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung vorlag. Des Weiteren konnte entschieden werden, welche Werte für die Berechnung der deskriptiven Statistik und welche analytischen Tests für weitere statistische Bewertungen geeignet waren. Die Varianzhomogenität der Gruppenmittelwerte wurde auf $p < 0,05$ getestet (Levene-Test).

Bei vorliegender Normalverteilung wurden die Stichproben der unterschiedlichen Behandlungsweisen hinsichtlich ihrer statistischen signifikanten Varianz (F-Test) untersucht. Bei bestehenden Unterschieden wurden die Daten der einzelnen Gruppen weiterhin mit Post-hoc-Tests auf signifikante Unterschiede geprüft (Dunnett-Test, Tukey-Test). Sobald ein Wert der betreffenden Versuchsreihe den Normalverteilungskriterien oder der Varianzhomogenität nicht hinreichend genügte, wurden die gesamten Daten mit dem nichtparameterischen H-Test nach Kruksal und

Wallis analysiert. Konnte dabei ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen gezeigt werden, wurde durch einen paarweisen Vergleich mittels Tukey-Test geklärt, welche Gruppen sich im Einzelnen signifikant voneinander unterscheiden.

Die sich ergebende statistische Irrtumswahrscheinlichkeit als Maß für vorliegende Unterschiede wurde mittels der Software Excel oder SPSS für den jeweiligen Test ermittelt, die Signifikanzniveaus $p < 0,05$ (*, signifikant), $p < 0,01$ (**, hoch signifikant) und $p < 0,001$ (***, höchst signifikant) festgelegt.

In den Abbildungen werden die Parameter Mittelwert und Standardabweichung (Excel) oder Median und Quartile (SPSS) dargestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Biometrische Daten der PhIP-exponierten Ratten

Im ersten Abschnitt sind die experimentell erhobenen Daten des Fütterungsversuchs zusammengefasst. Die F344-Ratten erhielten über zwanzig Versuchswochen hinweg unterschiedliche Diäten und PhIP-Zusätze. Näher betrachtet wurden die Entwicklung der Körpermasse und des Futtermittelsverbrauchs. Der Dickdarm der Ratte wurde ebenfalls untersucht. Die Ergebnisse sind im Kapitel der histologischen Untersuchungen dargestellt (Kapitel 5.1.4).

5.1.1 Die Körpermasse

Zu Versuchsbeginn betrug die durchschnittliche Körpermasse aller Tiere 102 ± 6 g. Bei der Auswahl der Tiere wurde auf eine gleichmäßige Verteilung des Ausgangsgewichtes geachtet, so dass in allen Gruppen im Mittel die Körpermasse der Tiere annähernd gleich war (balanciertes Randomisieren, Abb. 8). Während des gesamten Dokumentationszeitraums konnte bei den Tieren beider Diätgruppen eine kontinuierliche Gewichtszunahme, ohne Erreichen eines Plateaus, beobachtet werden. Am Ende des Versuches wogen die Tiere nach Aufnahme der Diäten 'Standard' ($n = 12$) 357 ± 19 g, 'Standard + 0,01 ppm PhIP' ($n = 11$) 343 ± 19 g und 'Standard + 100 ppm PhIP' ($n = 11$) 337 ± 18 g. Die Körpermasse der Tiere nach der 0,01 ppm PhIP-Aufnahme betrug 96 % und die nach der mit 100 ppm PhIP-Aufnahme 94 % gegenüber der Ratten der 'Standarddiät'. Die Verfütterung der 'Westerndiät' ($n = 12$) ohne Zusätze resultierte in einer Körpermasse von 390 ± 24 g, die 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' ($n = 12$) in 380 ± 31 g und die der 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' ($n = 10$) in 372 ± 13 g (Abb. 8). Auch hier führte das PhIP-supplementierte Futter zu einer geringeren Körpermassenzunahme der F344-Ratten: 97 % nach Aufnahme der 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' und 95 % nach 'Westerndiät + 100 ppm PhIP'.

Beim Vergleich der Körpergewichte, zwischen den beiden aufgenommenen Diäten und der jeweiligen Behandlung untereinander, wurden höchst signifikante Unterschiede festgestellt (H-Test nach Kruskal-Wallis, Tukey-Test). Für die einzelnen

Gruppen heißt das: 'Standarddiät' - 'Westerndiät' ($p = 0,005$), 'Standarddiät 0,01 ppm PhIP' und 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' ($p = 0,002$) und 'Standarddiät 100 ppm PhIP' und 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' ($p = 0,002$).

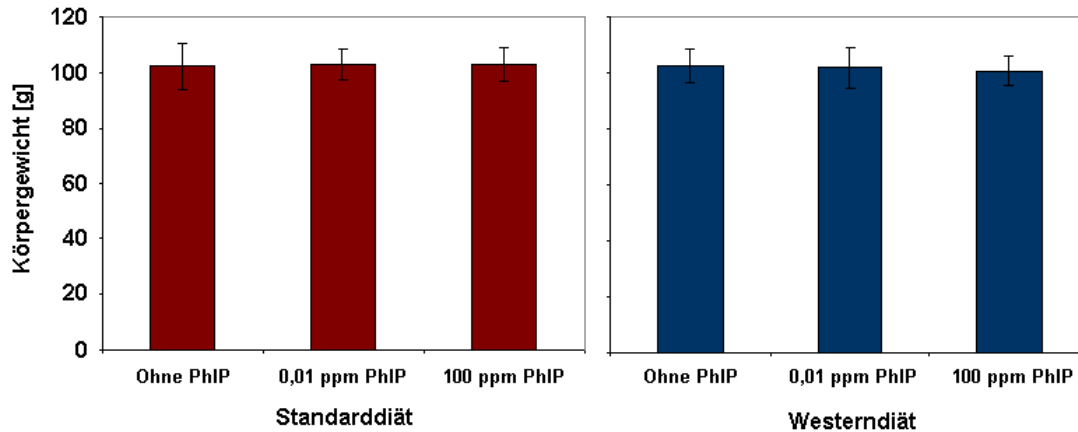


Abb. 7: Die mittlere Körpermasse der F344-Ratte zum Versuchsstart

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung der sechs Behandlungsgruppen. Die mittlere Körpermasse der Tiere der einzelnen Fütterungsgruppen ($n = 12$) unterschied sich zu Beginn des Versuches nicht (H-Test nach Kruskal-Wallis).

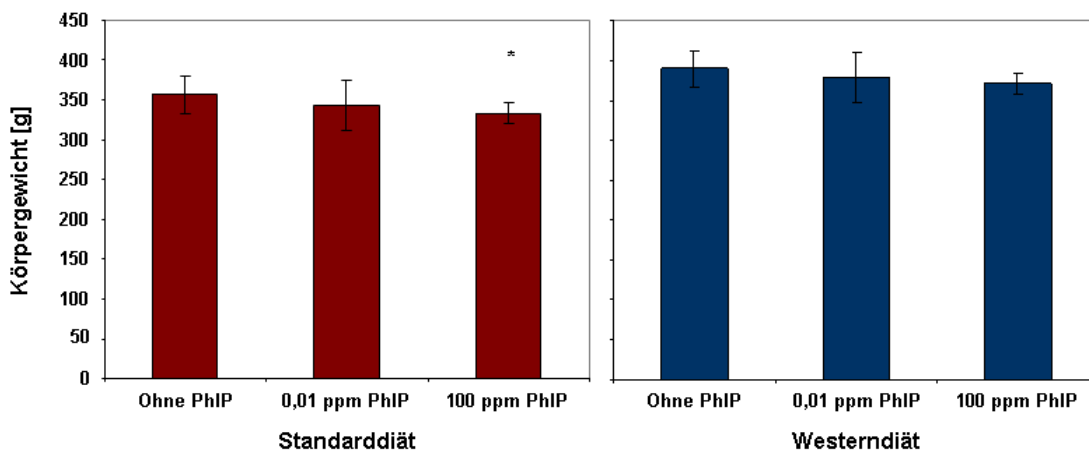


Abb. 8: Die mittlere Körpermasse der F344-Ratte zum Versuchsende

Die am Ende des Versuchs erreichte Körpermasse hing von der Diät und der PhIP-Zugabe ab. Im Diagramm sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der beiden Diätgruppen abgebildet. Bei der Gruppe der Standarddiät erwies sich die mittlere Körpermasse der Tiere 'Standarddiät + 100 ppm PhIP' ($n = 11$) zu den der Gruppe ohne PhIP-Zusatz ($n = 12$) als signifikant vermindert (H-Test nach Kruskal-Wallis, Tukey, $p = 0,016$). Der Vergleich der Körpermasse der Tiere nach Aufnahme der Westerndiät, mit und ohne PhIP-Zusätze, zeigten rechnerisch keine Ungleichheiten (H-Test nach Kruskal-Wallis). Das Signifikanzniveau ist angegeben mit * ($p < 0,05$).

5.1.2 Futteraufnahme

Bei den zunächst paarweise sitzenden Tieren war zu Beginn des Fütterungsversuchs ein stetiger Anstieg der Futteraufnahme durch die wöchentliche Futterein- und Futterrückwaage zu bestimmen. Dabei fiel die Futteraufnahme von Beginn an unterschiedlich aus (Abb. 9). Nach circa fünf Wochen pendelte sich der Futtermittelverbrauch der Tiere mit 'Standarddiät' auf 138 ± 16 g, mit 'Standarddiät + 0,01 ppm PhIP' auf 134 ± 9 g und mit 'Standarddiät + 100 ppm PhIP' auf 132 ± 14 g pro Woche ein. Damit war der Verbrauch um etwa 3 % bei der Gruppe 'Standarddiät + 0,01 ppm PhIP' und um 5 % bei der 'Standarddiät + 100 ppm PhIP' gegenüber der 'Standarddiät' vermindert. Bei der 'Westerndiät' wurden Aufnahmemengen von 104 ± 9 g, bei der 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' von 104 ± 12 g und 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' von 96 ± 10 g pro Woche ermittelt (Abb. 10). Durchschnittlich nahmen die Tiere 99,5 % in der '0,01 ppm PhIP-Gruppe' und die Tiere in der '100 ppm PhIP-Gruppe' 92 %, der Menge an Futter, die die Gruppe 'Westerndiät' allein gefressen hatte, zu sich.

Ab der sechzehnten Woche saßen die Tiere einzeln in den Käfigen, was kurzzeitig einen minimalen Abfall der Futteraufnahme bewirkte, sich aber nach einer Woche wieder in dem vorhergehenden Durchschnitt einpendelte.

Erhielten die Tiere die Standarddiät mit und ohne PhIP-Zusätze, fraßen sie im Mittel gleich viel. Beim Vergleich der drei Fütterungsgruppen der Westerndiät zeigten sich deutliche Unterschiede. Die 'Westerndiät ohne Zusätze' wurde von den Tieren eindeutig besser aufgenommen, als die 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' ($p = 0,004$). Bei einem geringeren PhIP-Zusatz (0,01 ppm) wurde das ebenfalls mehr Futter aufgenommen als im Fall der Gruppe 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' ($p = 0,028$). Die Differenz der Futteraufnahme setzte sich beim Vergleich der Western- mit der Standarddiät und seinen PhIP-Zusätzen fort: 'Westerndiät' und 'Standarddiät' ohne Zusätze ($p = 1,3 \times 10^{-12}$), 'Westerndiät-' und 'Standarddiät + 0,01 ppm PhIP' ($p = 2,6 \times 10^{-11}$), 'Westerndiät-' und 'Standarddiät + 100 ppm PhIP' ($p = 6,1 \times 10^{-13}$). Am wenigsten nahmen die Tiere der 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' zu sich.

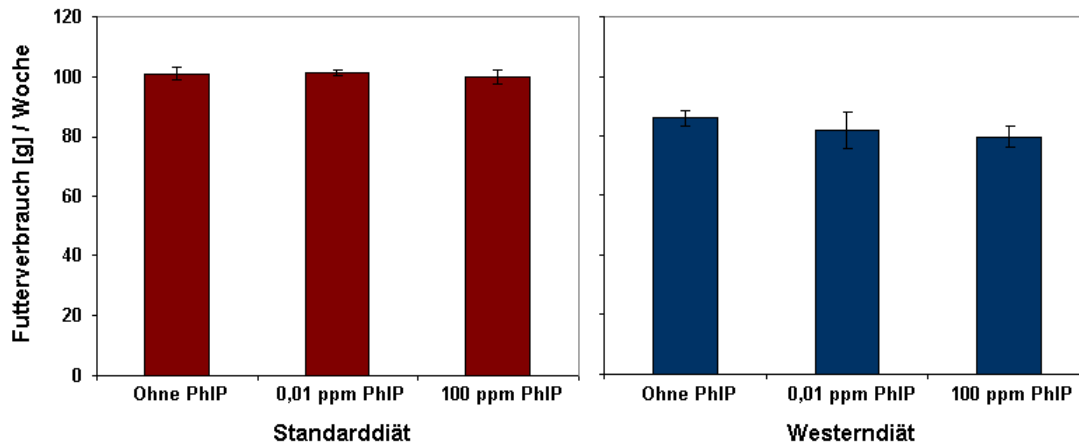


Abb. 9: Statistischer Vergleich der Futteraufnahme nach der ersten Versuchswoche

Dargestellt sind die Mittelwerte des Futterverbrauchs und deren Standardabweichungen nach der ersten Versuchswoche. Die mittlere Futteraufnahme der Standarddiät, mit oder ohne PhIP, unterschied sich nicht. Ebenso wurden keine Differenzen bei der Futteraufnahme der Tiere, die die Westerndiät mit und ohne Zusätze erhielten, ermittelt. Beim Vergleich der beiden Diätengruppen untereinander, war der Futterverbrauch bei der Westerndiät im Gegensatz zur Standarddiät deutlich geringer (H-Test nach Kruskal-Wallis und Tukey-Test; im Diagramm nicht angegeben).

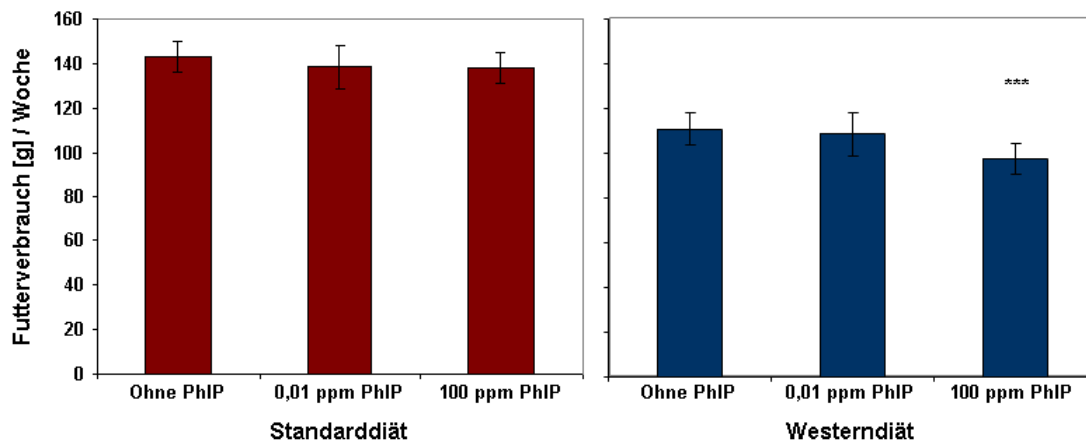


Abb.10: Vergleich des Futterverbrauchs ab der fünften Versuchswoche

Es sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen des Futterverbrauchs ab der fünften Versuchswoche, unterteilt für die beiden Diäten und dem jeweiligen PhIP-Zusatz, dargestellt. Tiere, die die Standarddiät (\pm PhIP-Zusätze) erhielten, nahmen im Durchschnitt dieselbe Menge Futter auf. Tiere, die die Westerndiät mit 100 ppm PhIP angereichert bekamen, fraßen weniger, als Tiere der Gruppe 'Westerndiät' ($p = 0,001$).

Beim Vergleich aller Tiere die eine Standarddiät bekommen hatten, mit denen die eine Westerndiät erhielten, war festzustellen, dass erstere deutlich mehr Futter aufnahmen als die Tiere mit der Westerndiät (Tukey-Test, $p < 0,001$). Außerdem nahmen die Tiere der Fütterungsgruppe 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' im Vergleich zu allen anderen Gruppen am wenigsten Futter zu sich (Tukey-Test, $p < 0,05$ bis $p < 0,001$, nicht dargestellt).

5.1.3 Makroskopische Beobachtungen

Der Fütterungsversuch wurde in der zwanzigsten Woche vorzeitig beendet, vorgesehen waren sechs Monate. Grund für die Beendigung war das Versterben von fünf Tieren innerhalb von vier Wochen ohne ersichtlichen Grund. Betroffen waren Tiere aller PhIP-Diätgruppen. Es verstarb jeweils ein Tier je Gruppe, in der Gruppe 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' sogar zwei Tiere. Außerdem war bei den Tieren, die die 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' aufnahmen, eine minimale Abnahme der Körpermasse zu beobachten. Eine Ursache war nicht ersichtlich. Die Untersuchungen der Ratten wiesen keine verantwortlichen Pathogene oder andere Auffälligkeiten aus (Untersuchungsprotokoll liegt vor). Es wurde bei keinem der Tiere auffällige Entzündungsprozesse oder pathologische Veränderungen der inneren Organe diagnostiziert.

5.1.4 Histologische Untersuchungen

Der als Dauerpräparat zur Verfügung stehende Rattendarm wurde zur histologischen Auswertung mit Hilfe der Methylenblau-Färbung hinsichtlich veränderter Krypten, in Form von auftretenden ACF, untersucht (Beispiel in Abb. 11). Im Durchschnitt fand die Beurteilung einer Darmfläche von $16,4 \pm 1,5 \text{ cm}^2$ je Tier statt. Entartete Krypten waren innerhalb aller Behandlungsgruppen, aber nicht in jedem Tier, zu entdecken. Es befanden sich 11 % der gebildeten ACF im proximalen und 89 % im distalen Darmabschnitt.

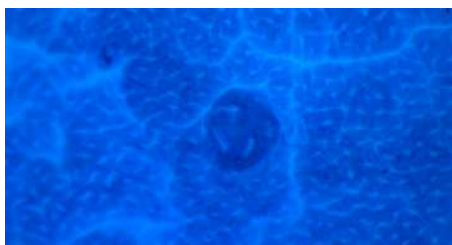


Abb.11: Ein ausgebildeter ACF im Rattendarm nach PhIP-Exposition

Der Ratte wurde zwanzig Wochen 0,01 ppm PhIP im Futter verabreicht. Die Abbildung zeigt beispielhaft einen ACF im distalen Kolonabschnitt, der sich über 5 Krypten und einem Durchmesser von 272 μm erstreckt.

Je nach Behandlungsgruppe wurden zehn bis zwölf Tiere in der Auswertung erfasst. Mit dem Ergebnis, dass bei der Standard- und Westerndiät ohne PhIP-Exposition

jeweils zwei Tiere mit ACF ermittelt werden konnten, die sich in der Anzahl betroffener Krypten und in ihrem Durchmesser unterschieden. Bei der Standarddiät waren fünf und bei der Westerndiät insgesamt elf betroffene Krypten zu bestimmen. Einen ersten Einfluss auf die vermehrte Entstehung von ACF bewirkte die 0,01 ppm PhIP-Exposition bei beiden Diäten. Es konnten vier ACF-tragende Tiere der Gruppe 'Standarddiät + 0,01 ppm PhIP', mit fünf ausgebildeten ACF über 14 Krypten reichend, ermittelt werden. Ebenso fand eine Zunahme auf sechs ACF tragende Tiere bei der Gruppe 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' statt. Die acht ACF erstreckten sich über 28 Krypten. Die Aufnahme der hohen Dosis PhIP (100 ppm) wirkte sich in beiden Diäten steigernd auf die ACF-Bildung im Vergleich zur Kontrollgruppe aus. Bei Tieren der Gruppe 'Standarddiät mit 100 ppm PhIP' wurden bei neun von elf Tieren, insgesamt dreizehn ACF diagnostiziert. Betroffen waren insgesamt 34 Krypten. Die Fütterung der Standarddiät mit der hohen PhIP-Konzentration führte zu einer signifikant erhöhten Entwicklung von ACF ($p = 0,002$). Solch eine Steigerung konnte bei den Tieren der Gruppe 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' nicht festgestellt werden. Es waren vier ACF-tragende Tiere mit sechs entwickelten ACF und dreizehn betroffene Krypten festzustellen, etwas weniger als bei der Gruppe 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' (Tab. 4).

Bezogen auf die zur Verfügung stehende Darmfläche bewirkte die Gabe von PhIP bei den Tieren, die die Standarddiät erhielten, konzentrationsabhängig eine Zunahme der ACF und der betroffenen Krypten. Die niedrige Dosis PhIP verdoppelte die Menge ausgebildeter ACF von 0,12 auf 0,24 ACF/cm² und die hohe Dosis PhIP bewirkte eine Vervierfachung (0,52 ACF/cm²). Verdreifacht hatte sich ebenso die ACF-Bildung, ausgehend von der 'Westerndiät' (0,13 ACF/cm²) zur Gruppe 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' auf 0,39 ACF/cm² der Darmfläche. Diese deutliche Steigerung konnte durch eine erhöhte Gabe von PhIP (100 ppm) nicht weiter gefördert werden. Es bildeten sich durchschnittlich 0,3 ACF/cm², das heißt ungefähr das 2,5fache der ACF-Anzahl nach Aufnahme einer Westerndiät ohne Zusätze.

Zwischen den Diätgruppen war die unterschiedliche Größe der ACF/Focus auffällig. Dabei war der Durchmesser nicht zwingend an die Anzahl betroffener Krypten gekoppelt. Gerade ACF, die vier oder mehr Krypten umfassen, stellen bezüglich einer späteren Tumorausbildung die potenziell gefährlicheren dar. Sie waren innerhalb aller Fütterungsgruppen zu finden und fließen in die weitere Auswertung ein (Tab. 5). Diese großen ACF waren im distalen Darmabschnitt, mit Ausnahme

eines über fünf Krypten reichenden ACF, der sich im proximalen Abschnitt befand ('Standard + 100 ppm PhIP'), lokalisiert. Nach Verfütterung der Standarddiät mit und ohne PhIP-Zusätze entstanden insgesamt fünf ACF mit vier bis fünf Krypten. Im Durchschnitt waren diese $272 \pm 17,0 \mu\text{m}$ groß. Wurde von den Tieren die Westerndiät mit und ohne PhIP aufgenommen, bildeten sich sechs solcher ACF, die vier bis sieben Krypten umfassten. Diese waren im Durchschnitt $370 \pm 38,6 \mu\text{m}$ groß. Damit ergab sich hinsichtlich des Durchmessers der ausgebildeten ACF mit mehr als vier betroffenen Krypten ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Diäten ($p = 0,016$, T-Test; Abb. 12).

	Standarddiät	Standarddiät + 0,01 ppm PhIP	Standarddiät + 100 ppm PhIP	Westerndiät	Westerndiät + 0,01 ppm PhIP	Westerndiät + 100 ppm PhIP
Tiere/Gruppe	12	11	11	12	11	10
ACF-tragende Tiere	2	4	9	2	6	4
Anzahl ACF/Gruppe	2	5	13	2	8	6
Anzahl betroffener Krypten	5	14	34	11	28	13
ACF/Tier	0,17	0,45	1,18**	0,17	0,73	0,60
ACF/cm ²	0,12	0,24	0,52	0,13	0,39	0,30

Tab. 4: Zusammenfassung und Charakterisierung der ausgebildeten ACF

Die Tabelle fasst alle Ergebnisse der durch PhIP induzierten ACF im Dickdarm der F344-Ratten nach zwanzig Wochen einer Fütterungsstudie zusammen. Es waren je nach PhIP-Zusatz unterschiedlich viele entartete Läsionen entstanden. Während die Fütterung mit 0,01 ppm PhIP in der Standard- und in der Westerndiät sowie die Gabe von '100 ppm PhIP + Westerndiät' nicht zu einer signifikanten Veränderung gebildeter ACF, im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe, führte, konnte die Fütterung '100 ppm PhIP + Standarddiät', die Anzahl der ACF signifikant erhöhen ($p = 0,002$).

Behandlung (Anzahl ACF)	Betroffene Krypten	ACF-Größe [μm]
Standard (1)	4	255
Standard + 0,01 ppm PhIP (1)	5	272
Standard + 100 ppm PhIP (3)	4	272
	5	425
	4	170
Western (2)	4	306
	7	408
Western + 0,01 ppm PhIP (3)	7	510
	5	374
	5	357
Western + 100 ppm PhIP (1)	5	340

Tab. 5: Zusammenfassung aller ACF mit vier oder mehr betroffenen Krypten

Die Tabelle gibt an welche Behandlung zur Ausbildung von ACF mit vier oder mehr betroffenen Krypten geführt hatte.

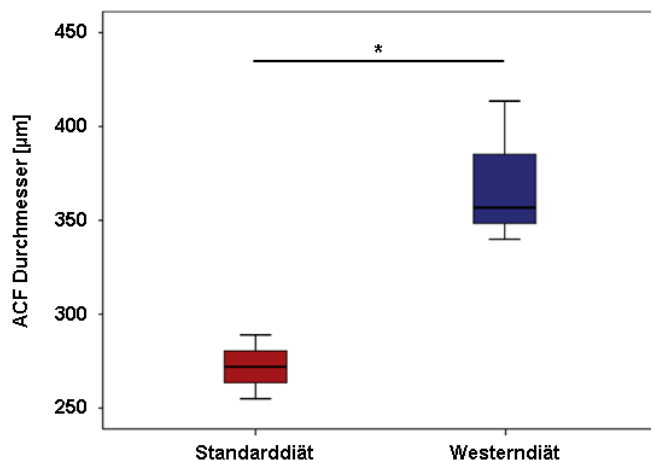


Abb.12: Darstellung der Durchmesser der ACF mit mehr als vier betroffenen Krypten in den einzelnen Diätgruppen

Dargestellt sind die Mediane und dazugehörige erste und dritte Quartile des Durchmessers ausgebildeter ACF für die jeweilige Diät. Die ausgebildeten ACF im Dickdarm der F344-Ratten entstanden nach PhIP-Exposition. Die Verfütterung mit der Westerndiät mit/ohne PhIP führte zu durchschnittlich größeren ACF, als die Gabe der Standarddiät mit/ohne PhIP. Der Durchmesser unterscheidet sich signifikant ($p = 0,016$).

5.2 Untersuchungen der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen

5.2.1 Zellkultur

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse der In-vitro-Experimente der Zelllinie BALB/c-3T3-A31-1-1 zusammengefasst. Als Grundlage für die Arbeit mit den Zellen wurde eine Wachstumskurve, aus der sich die Verdopplungszeit ableiten lässt, erstellt. Des Weiteren wurde mit Hilfe des Sulforhodamin B-Tests die Viabilität der Zellen nach einer Behandlung mit verschiedenen Kaliumdiazooacetat-Konzentrationen geprüft. An Hand dieser Ergebnisse konnte die Behandlungskonzentration für den BALB/c-3T3-Zelltransformationstest abgeleitet werden. Anschließend zeigte die Inkubation mit KDA, ob diese Substanz in der Lage war, die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen maligne zu transformieren.

5.2.2 Erstellung einer Wachstumskurve und Ermittlung der Verdopplungszeit

Die Einschätzung des Wachstumsverhaltens der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen konnte durch Erstellen einer Wachstumskurve ermittelt werden (Abb. 13). Ausgehend vom Zeitpunkt der Zellaussaat mit 25.000 Zellen wurde die Zellzahl täglich im 24-Stunden-Rhythmus in vier 4-cm-Kulturschalen bestimmt. Die gemittelten Zellzahlen wurden in Abhängigkeit der Zeit graphisch dargestellt. Der charakteristische Kurvenverlauf einer in Zellkultur befindlichen BALB/c-3T3-Zellpopulation ist in Abbildung 13 veranschaulicht. Nach Aussaat der Zellen in frische Zellkulturschalen benötigten diese eine gewisse Eingewöhnungszeit, d.h. die Zellen proliferierten nur langsam. Diese Phase wird auch lag-Phase genannt. Im Anschluss daran gingen die Zellen in den exponentiellen Wachstumsabschnitt über. Während dieser Zeit konnten sich die Zellen in Abhängigkeit ihrer Verdopplungszeit uneingeschränkt teilen. Diese Phase stoppte mit dem Erreichen einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale. Es wurden nur noch geringe Veränderungen der Zellzahlen bestimmt und ein Plateau bildete sich aus. Der Abfall in der Anzahl ermittelter Zellen resultierte aus sich ablösenden Zellen.

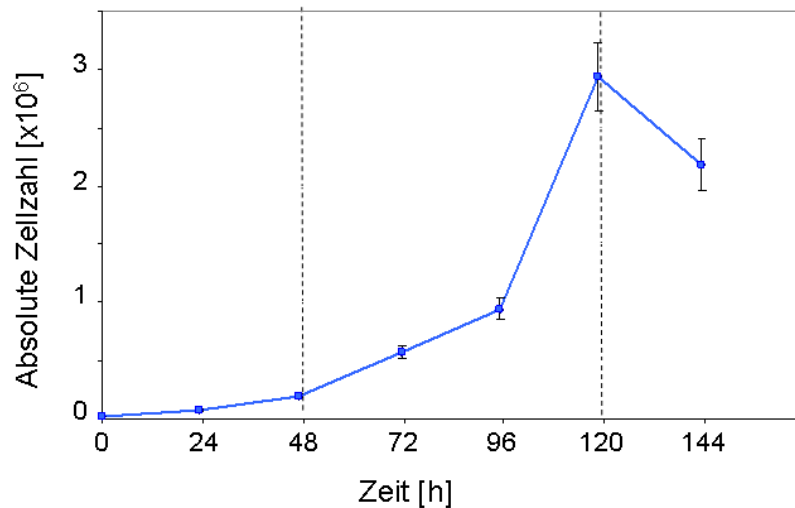


Abb. 13: Wachstumskurve der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen

In der Abbildung ist als Punktdiagramm der Mittelwert der ermittelten Zellzahlen (absolut) mit Standardabweichung im Zeitverlauf (h) dargestellt. Es beschreibt das Wachstumsverhalten der BALB/c-3T3-A31-1-1-Kulturzellen innerhalb von sieben Tagen.

Der Zeitraum des exponentiellen Wachstums wurde zur Berechnung der Verdopplungszeit herangezogen. Die Zellzahlen der Zeitpunkte von 48 bis 120 Stunden sind halblogarithmisch ($\log_2 x$) gegen den Beobachtungszeitraum (h) in der Abbildung 14 abgebildet. Daraus ergab sich ein linearer Abschnitt mit der Geradengleichung:

$$y = 0,0522x + 15,179$$

Aus dem Kehrwert des Anstiegs m konnte die Verdopplungszeit (V_Z) berechnet werden:

$$V_Z = 1 / 0,0522 = 19,16 \text{ Stunden}$$

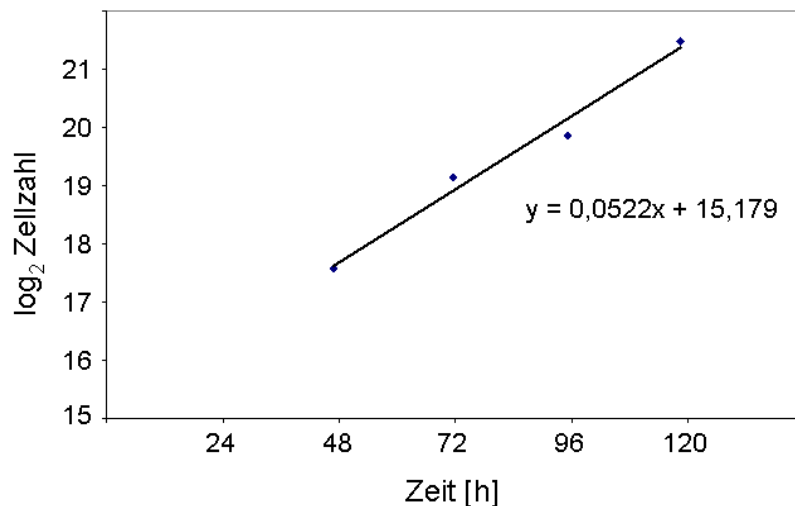


Abb. 14: Geradengleichung des exponentiellen Wachstumsabschnittes

Im Diagramm ist der Bereich des exponentiellen Zellwachstums halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Geradengleichung des linearen Abschnittes wurde zur Berechnung der Verdopplungszeit genutzt.

5.2.3 Bestimmung der Behandlungskonzentrationen von Kaliumdiazooacetat

Das synthetisch hergestellte KDA ist ein Intermediat, welches über Zwischenstufen zu reaktiven Methyl- und Carboxymethyldiazonium-Ionen umgesetzt wird und damit Ausgangssubstanz für Methylierungen und Carboxymethylierungen an der DNA ist. Mittels des SRB-Tests wurden die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen hinsichtlich der toxischen Auswirkungen von KDA untersucht. Ziel war es, die adäquate Behandlungskonzentration für den BALB/c-3T3-Zelltransformationstest zu finden. Diese sollte weder das Wachstum der Zellen stoppen, noch zytotoxische Auswirkungen haben. Dabei verhält sich die Menge des gebundenen Farbstoffs Sulforhodamin B an das Zellprotein proportional zur Zellzahl. Zur Bestimmung des Effekts von 0,3 bis 30 μM KDA wurden die in 6-well-Kulturplatten eingebrachten BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen für drei Tage behandelt, fixiert und die Absorption des gebundenen Farbstoffs gemessen. Die in Abbildung 15 dargestellten Kontrollen ($t = 1$; $t = 0$) stellten sicher, dass die unbehandelten Zellen innerhalb von drei Tagen proliferierten. Um die Auswirkungen des KDA unter vergleichbaren Bedingungen zu denen im später eingesetzten Zelltransformationstest zu untersuchen, wurde von einer subkonfluent bewachsenen Zellkulturschale ausgegangen. Die Beurteilung des Wachstumsverhaltens erfolgte durch Vergleichen der Absorptionen der Kontrollen und der behandelten Zellen. Ebenfalls, in Orientierung an den sechs Wochen

andauernden Zelltransformationstest, wurden die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen drei Tage mit der Biochemikalie behandelt. Während des Zelltransformationstests wurde das Behandlungsmedium alle drei Tage gewechselt. Innerhalb dieser Zeitspanne war davon auszugehen, dass die Zellkulturschalen nahezu konfluent bewachsen waren, sich die Zellen aber noch nicht wegen Platzmangels ablösen und damit das Ergebnis verfälschen würden.

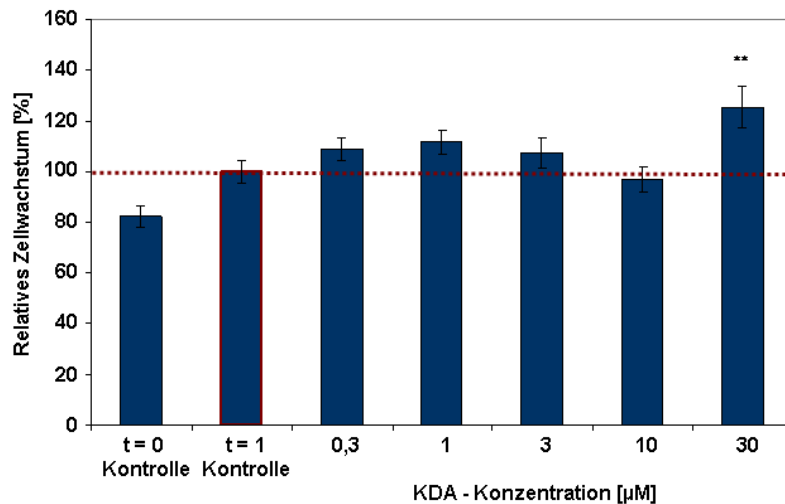


Abb. 15: Wachstumsverhalten der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen nach drei Tagen Behandlung mit KDA

Die ausgesäten BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen wurden nach 24 Stunden und nach Austausch des Kulturmediums gegen das Behandlungsmedium mit KDA drei Tage im Brutschrank inkubiert. Ihre Empfindlichkeit gegenüber KDA wurde mittels des SRB-Tests untersucht. In dem Säulendiagramm ist die gemessene Absorption prozentual als das relative Zellwachstum gegen die Behandlungskonzentration KDA mit Standardabweichung ($n = 3$) dargestellt. Die Kontrolle $t = 0$ stellt den Proteingehalt der Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung, die Kontrolle $t = 1$ das relative Zellwachstum nach drei Tagen Behandlungszeit dar. Die Behandlung der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen mit $30 \mu\text{M}$ KDA führte zur einem erhöhten Proteingehalt (**, $p = 0,005$).

Die Behandlungen der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen mit $0,3$ bis $30 \mu\text{M}$ KDA führten zu keiner Einschränkung ihres Wachstumsverhaltens. Ähnlich zur Drei-Tage-Kontrolle ($t = 1$) stieg die Absorption der behandelten Zellen im Vergleich zum Behandlungsstart ($t = 0$) an, das heißt sie waren durch das KDA nicht in ihrem Wachstum inhibiert. Sie zeigen tendenziell ein etwas höheres Wachstum, das sich aber nicht signifikant von der Drei-Tage-Kontrolle unterscheidet. Das etwas geringere relative Zellwachstum nach der Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ KDA ließ vermuten, dass es sich um die erste zytotoxische Konzentrationsstufe handelt. Da aber nach der Behandlung mit $30 \mu\text{M}$ KDA eine statistisch signifikante Zunahme im Vergleich zur Drei-Tage-Kontrolle beobachtet wurde ($p = 0,005$), war davon auszugehen, dass das

KDA durch die verwendeten Konzentrationen keine Wachstumseinschränkungen bewirkte. Die mikroskopische Beurteilung der Zellen der mit 30 μM KDA behandelten Zellen, ergab keine Zellveränderungen, wie z.B. die Bildung von Zellherden oder mehrschichtiges Wachstum. Warum innerhalb von drei Tagen nach der Behandlung mit 30 μM KDA eine Zunahme des Zellwachstums in mehreren Experimenten gemessen wurde, konnte nicht abschließend geklärt werden.

Diese Ergebnisse schlossen keine der getesteten Konzentration für den Einsatz nachfolgender Experimente aus. Deshalb wurden für den Balb/c-3T3-Zelltransformationstest drei KDA-Konzentrationen (0,3 μM , 3 μM und 30 μM) ausgewählt.

5.2.4 Bewertung von KDA hinsichtlich seines kanzerogenen Potenzials

Zur Einschätzung des kanzerogenen Potenzials von KDA wurde der BALB/c-3T3-Zelltransformationstest eingesetzt. Bei dieser Methode sind die Initiation und die Promotion durch Zugabe einer Biochemikalie induzierbar. Die kanzerogene Wirkung einer Biochemikalie äußert sich im Verlust der Kontaktinhibition, so dass die entarteten Zellen nach Erreichen der Konfluenz das Wachstum nicht einstellen. Sie wachsen unabhängig vom Untergrund übereinander und es entstehen Zelltransformationsherde, die nach Typen zu klassifizieren sind. Typ und Anzahl sind ein Maß für die Zelltransformation. Das in der Arbeit verwendete MCA dient als initiiertes Agens und das TPA als Tumorpromotor.

Die Bewertung des BALB/c-3T3-Zelltransformationstest erfolgte auf der Grundlage der ausgebildeten Zellherde jeder Behandlungsgruppe. In die statistische Auswertung wurden alle ausgebildeten Zellherde der vier Experimente (Dreifachbestimmung) mit einem Durchmesser größer als drei Millimeter einbezogen.

Als erstes wurden die beiden mitgeführten Lösungsmittelkontrollen, DMSO und Zellkulturmedium, näher betrachtet. Wie in der Abb. 16 a und b dargestellt, waren nach DMSO- oder Medium-Zugabe vereinzelt Zellherde entstanden. Um einen Vergleich der Ergebnisse mit den beiden Lösungsmittelkontrollen vorzunehmen, wurde mit Hilfe des parameterfreien U-Tests nach Mann und Whitney ihre Signifikanz geprüft. Die Analyse ergab, dass sich die beiden Lösungsmittelkontrollen nicht

signifikant voneinander unterschieden ($p = 0,486$) und im Folgenden als Negativ-Kontrolle angegeben werden.

Für eine Aussage einer Initiator und/oder Promotoraktivität des KDA wurden die Auswirkungen der bekannten Biochemikalien MCA, TPA und in der Kombination MCA + TPA bewertet. In der Abbildung 17 a sind die Effekte des Initiators MCA und in 17 b die des Promotors TPA allein und 17 c zeigt das Resultat nach Behandlung mit den beiden Substanzen (siehe Protokoll Kapitel 4.6.7). Eine Behandlung der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen mit 'MCA + TPA' führte, wie zu erwarten, zu den meisten Zellherden. Die Auswirkung der Behandlung ist als Positiv-Kontrolle in den Diagrammen dargestellt. Um den Effekt von KDA in der jeweiligen Phase der Kanzerogenese bewerten zu können, wurden für die Auswertung die Ergebnisse der mit MCA, TPA oder Lösungsmittel behandelten Zellen als Bezugsgrößen gewählt.

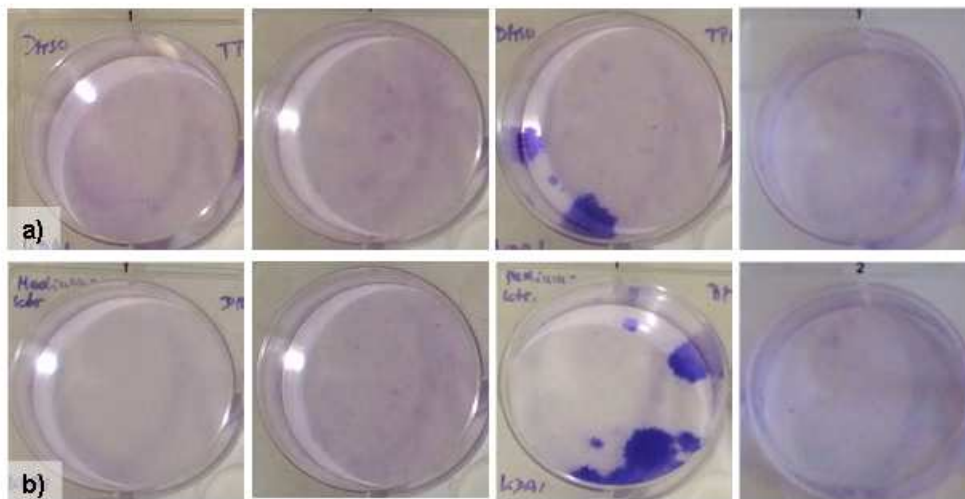


Abb. 16: Chemisch-induzierte Zelltransformation von BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen – Lösungsmittelkontrollen

Die Zellen wurden nur mit a) DMSO oder b) Zellkulturmedium behandelt. Dargestellt sind repräsentative Schalen aus allen Experimenten für die beiden Lösungsmittelkontrollen. Die entstandenen Zellherde heben sich deutlich vom umgebenden Zellrasen ab. Bei beiden Kontrollen waren vereinzelt spontane Zellherde ausgebildet worden.

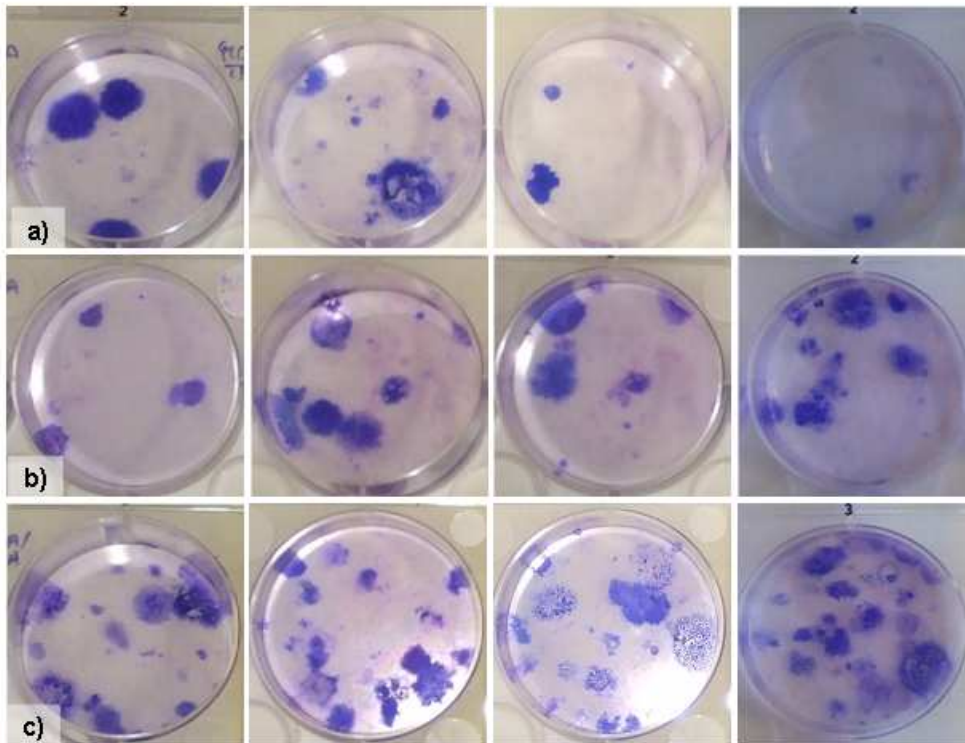


Abb. 17: Chemisch-induzierte Zelltransformation von BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen – Initiator und Promotor-Kontrollen

Die Zellen wurden mit a) MCA, b) TPA oder c) MCA und TPA behandelt und dienten zur Kontrolle für eine mögliche Initiator- und/oder Promotorwirkung der eingesetzten Biochemikalie KDA. Die Ausschnitte der dargestellten 6-well-Zellkulturplatten stammen exemplarisch aus vier unabhängigen Experimenten und zeigen entstandene Zellherde, die sich deutlich vom Zellrasen abheben.

5.2.4.1 KDA als Initiator

Die erste Stufe der Kanzerogenese stellt die Initiation dar. Inwieweit das KDA als solches wirksam war, ist in Abbildung 18 und im Diagramm (Abb. 19) dargestellt. Das allein eingesetzte TPA stellt den Hintergrund der Zellherdbildung dar und wurde auf 100 % gesetzt. So konnten entstandene Zelltransformationsherde entsprechend der Behandlung zugeordnet werden. Zwischen der Negativ-Kontrolle und den transformierten Zellen nach TPA-Behandlung besteht ein signifikanter Unterschied ($p = 0,006$, Dunnett-Test). TPA allein erzeugt deutlich mehr Zellherde. Wurden die Zellen mit den Biochemikalien 'MCA + TPA' exponiert (Positiv-Kontrolle), entstanden im Vergleich zu den TPA-behandelten Zellen circa 40 % mehr Zellherde. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Bei BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen, die in der Initiationsphase dem KDA und anschließend dem TPA ausgesetzt waren, ergaben sich kaum Unterschiede hinsichtlich der Zellherdentwicklung im Vergleich zu den Zellen die TPA allein behandelt wurden. Es bildeten sich nach '0,3 μM

KDA + TPA-Gabe' 18 % und nach '3 μ M KDA + TPA' 21,5 % weniger Zellherde. Ähnlich viele Zellherde, wie nach TPA-Wirkung, entwickelten sich nach der Behandlung mit '30 μ M KDA + TPA' (110 %). Eine Unterscheidung der ausgebildeten Zellherde nach Typen zeigte, dass diese quantitativ in Abhängigkeit ihrer Behandlung geringfügig variierten. Die Summe aller Zellherde ergab kaum Differenzen. Lediglich bei der Positiv-Kontrolle entstanden deutlich mehr Zellherde aller Typen. Insbesondere die Anzahl der Zellherde Typ 1 und Typ 3 erhöhte sich signifikant gegenüber der TPA-Gruppe (Tab. 6).

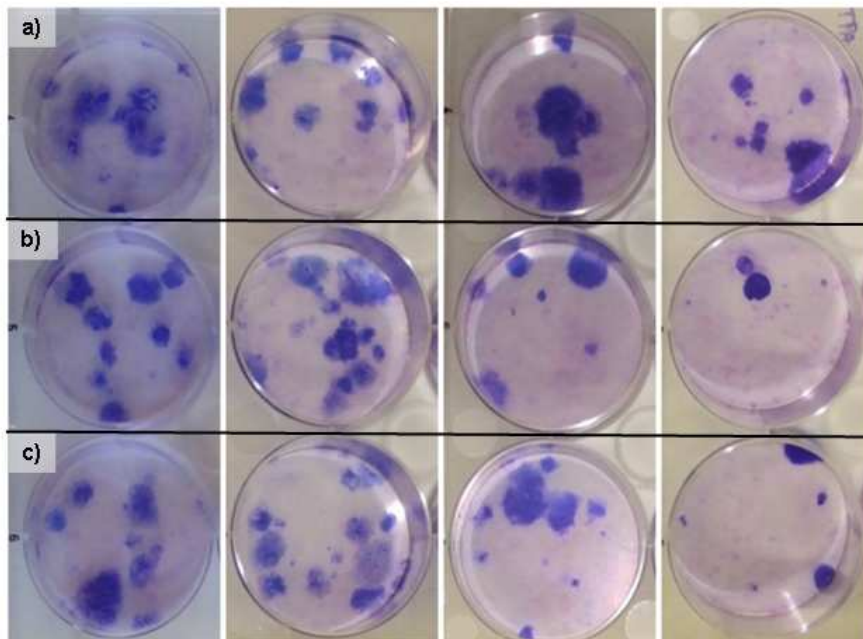


Abb. 18: Chemisch-induzierte Zelltransformation von BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen; Prüfung der potenziell initiierenden Wirkung von KDA

In Abb. 19 a bis c sind repräsentative Schalen aus allen Experimenten abgebildet. Die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen wurden während der Initiationsphase mit unterschiedlichen KDA-Konzentrationen behandelt. In a) wurde dem Behandlungsmedium 0,3 μ M KDA, in b) 3 μ M und in c) 30 μ M KDA zugesetzt. Anschließend konnte über zwei Wochen TPA wirken. Nach Beendigung des Versuchs heben sich die fixierten und gefärbten Zellherde deutlich vom umgebenden Zellrasen ab.

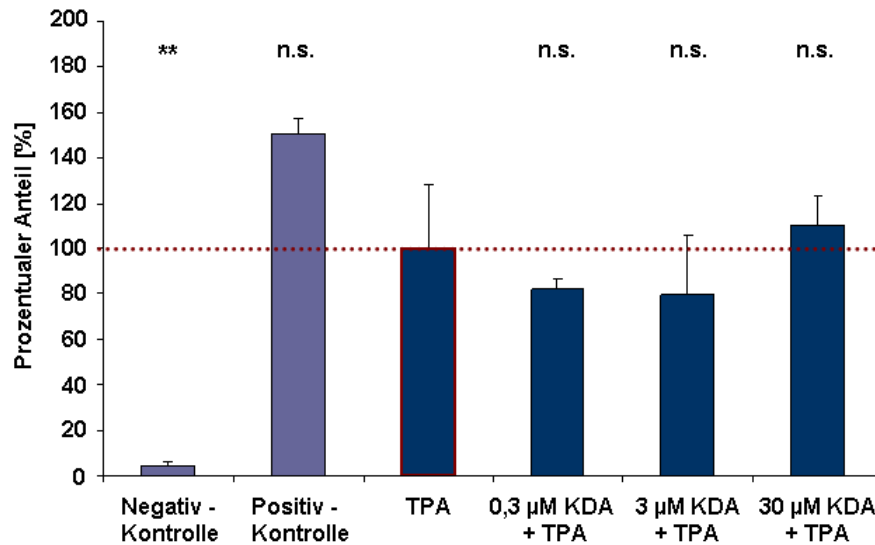


Abb. 19: Prozentualer Anteil entstandener Zellherde nach Testung der potenziellen Initiatoraktivität des KDA

Um die initiierende Wirkung von KDA auf die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen zu testen, wurden diese zu Beginn des Zelltransformationstests mit verschiedenen KDA-Konzentrationen und anschließend mit dem bekannten Promotor TPA behandelt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile entstandener Zellherde (Prozent Zellherde/well bezogen auf TPA) aus vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei wells je Behandlung. Signifikante Unterschiede zur TPA-Behandlungsgruppe wurden mit ANOVA und 2-seitigem Dunnett-Test geprüft (** = $p \leq 0,01$; n.s. = nicht signifikant).

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
TPA	1,8 ± 0,75	3,33 ± 0,92	0,5 ± 0,63
Positiv - Kontrolle	3,67 ± 0,5 (**)	3,11 ± 0,11	3,44 ± 0,38 (***)
Negativ - Kontrolle	0,28 ± 0,07	0,0 ± 0,03	0,06 ± 0,06
0,3 µM KDA + TPA	0,83 ± 0,29	2,83 ± 0,67	0,83 ± 0,25
3 µM KDA + TPA	1,50 ± 0,63	3,00 ± 1,13	0,17 ± 0,25
30 µM KDA + TPA	2,17 ± 0,96	1,83 ± 0,88	0,17 ± 0,33

Tab. 6: Anteil der Zellherde Typ 1 bis 3 pro well nach KDA + TPA - Behandlung

Während des sechswöchigen Experimentzeitraums entstanden nach unterschiedlicher Behandlung Zellherde aller drei Klassifizierungstypen. In der Tabelle sind zusammengefasst die Mittelwerte mit Standardabweichung der gebildeten Zellherde je well, die größer als drei Millimeter waren. Es sind die bestehenden signifikanten Unterschiede zwischen der Zahl der Zellherde der Behandlungsgruppen und der TPA-Gruppe dargestellt (Dunnett-Test, ** = $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

5.2.4.2 KDA als Promotor

Weiterhin wurde die Substanz auf ihre Promotoraktivität geprüft. In der Abbildung 20 und im Säulendiagramm (Abb. 21) sind die Ergebnisse zusammengefasst. Zur Bewertung der Auswirkungen des KDA wurde die Zahl der Zellherde nach Behandlung der Zellen mit MCA alleine auf 100 % gesetzt und für die statistische Analyse als Bezugsgröße herangezogen. Gegenüber MCA nahm die Anzahl der Zellherde der Positiv-Kontrolle zu ($p < 0,001$, Dunnett-Test). Im Gegensatz dazu war die Entstehung von Zellherden bei der Negativ-Kontrolle verringert ($p < 0,016$). Schwankungen in der Anzahl ausgebildeter Zellherde ergaben sich bei der MCA + KDA-Behandlung. Der Einsatz von $0,3 \mu\text{M}$ KDA während der Promotionsphase führte zu einer deutlich herabgesetzten Entstehung von Zellherden (-73 %), gemessen an der Wirkung von MCA. Insgesamt waren die zu klassifizierenden Zellherdentypen 1 bis 3 signifikant vermindert ($p < 0,034$) und stellen die geringste Zelltransformationsrate dieser Behandlungsgruppe dar. Eine Behandlung der BALB/c-A31-1-1-Zellen mit 3 und $30 \mu\text{M}$ KDA während der Promotionsphase führte ebenfalls zu einer verringerten Transformation. Dieser Effekt war zwar deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant. Es wurden nach $3 \mu\text{M}$ KDA-Zusatz Zellherde aller drei Klassifizierungen entwickelt. In der Summe waren es ~ 26 % weniger Zellherde als in Folge der alleinigen MCA-Behandlung. Ähnlich verhielt es sich nach Einwirkung von $30 \mu\text{M}$ KDA. Danach waren ~ 55 % weniger Zellherde festzustellen. Besonders auffällig war die verringerte Ausbildung von Zellherden des Typs 2 bei allen KDA-behandelten BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen während der Promotionsphase. Diese war bei allen Behandlungsgruppen höchst signifikant vermindert (Tab. 7).

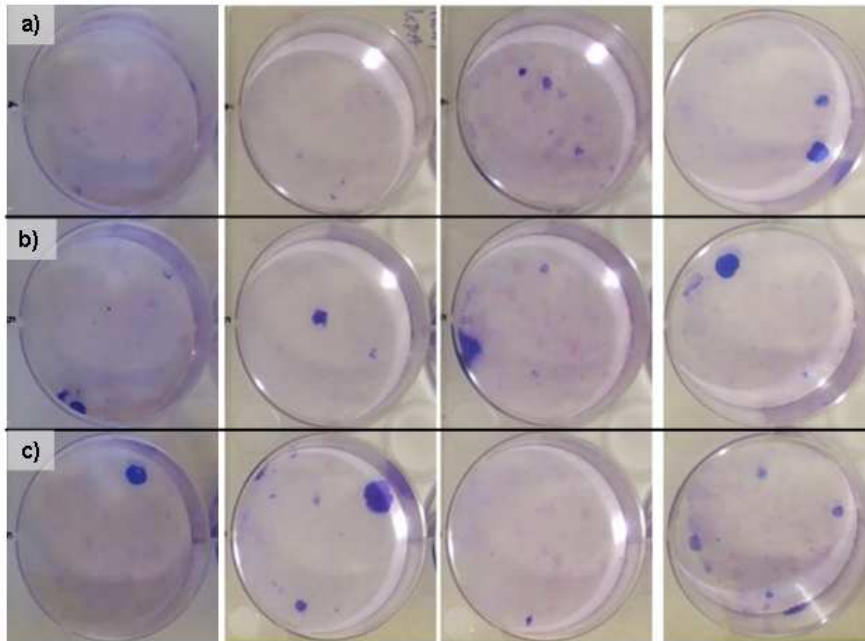


Abb. 20: Chemisch-induzierte Transformation von BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen; Prüfung der potenziell promovierenden Wirkung von KDA

Um die promovierende Wirkung von KDA auf die BALB/c-A31-1-1-Zellen zu testen, wurden diese zu Beginn des Zelltransformationstests mit dem bekannten Initiator MCA und anschließend mit den unterschiedlichen KDA-Konzentrationen behandelt. Die wenigen entstandenen Zellherde heben sich deutlich vom umgebenden Zellrasen ab.

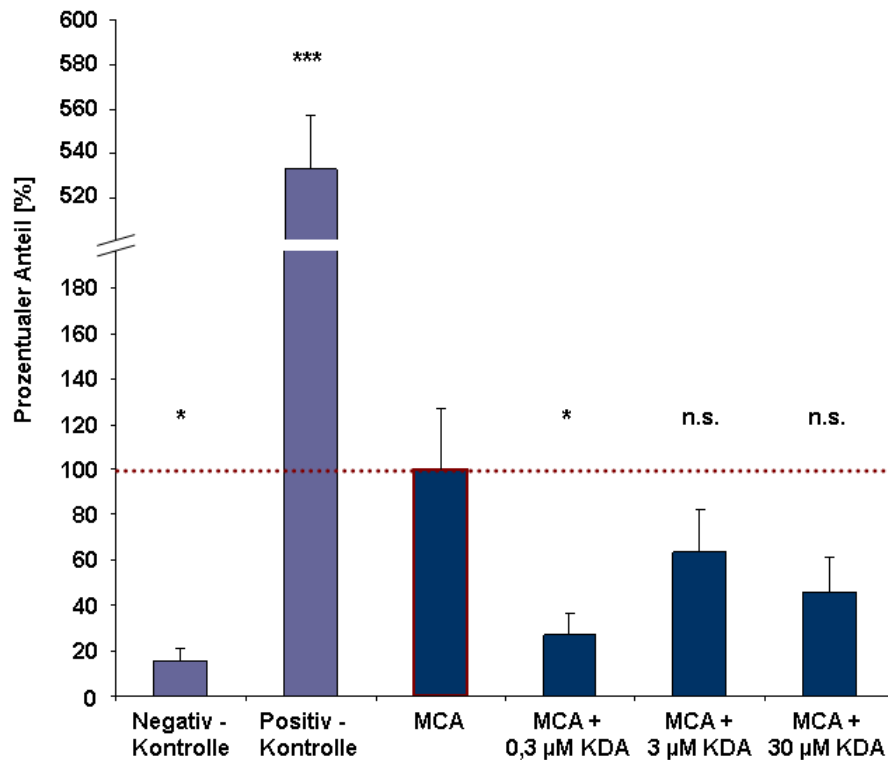


Abb. 21: Prozentualer Anteil entstandener Zellherde nach Testung der Promotoraktivität des KDA

Um die initiierende Wirkung von KDA auf die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen zu testen, wurden diese zu Beginn des Zelltransformationstests mit verschiedenen KDA-Konzentrationen und anschließend mit dem bekannten Promotor TPA behandelt. Dargestellt sind die prozentualen Anteile entstandener Zellherde (Prozent Zellherde/well bezogen auf MCA) aus vier unabhängigen Experimenten und Dreifachbestimmung. Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wurde mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis und Unterschiede zur MCA-Behandlungsgruppe mit ANOVA und 2-seitigem Dunnett-Test geprüft (* = $p \leq 0,05$; *** = $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant).

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
MCA	0,5 ± 0,38	1,33 ± 0,5	0,33 ± 0,33
Positiv - Kontrolle	3,67 ± 0,5 (**)	3,11 ± 0,11	3,44 ± 0,38 (***)
Negativ - Kontrolle	0,28 ± 0,07	0,0 ± 0,03	0,06 ± 0,06
MCA + 0,3 µM KDA	0,00 ± 0,042 (*)	0,33 ± 0,00 (***)	0,0 ± 0,042
MCA + 3 µM KDA	0,16 ± 0,29	0,83 ± 0,17 (***)	0,17 ± 0,21
MCA + 30 µM KDA	0,00 ± 0,042 (*)	0,67 ± 0,38 (***)	0,33 ± 0,33

Tab. 7: Anteil der Zellherde Typ 1 bis 3 pro well nach MCA + KDA-Behandlung

In Abhängigkeit der Behandlung entstanden während des sechswöchigen Experimentzeitraums Zellherde der Typen 1 bis 3. Zusammenfassend sind in der Tabelle die Mittelwerte mit Standardabweichung der gebildeten Zellherde je well, die größer als drei Millimeter waren, dargestellt. Es sind die bestehenden signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl der Zellherde der Behandlungsgruppen und der MCA-Gruppe dargestellt (Dunnett-Test, * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$).

5.2.4.3 KDA als komplettes Kanzerogen

Als Letztes wurde die Biochemikalie KDA hinsichtlich ihres kanzerogenen Potenzials in beiden Phasen der Kanzerogenese getestet. Es wurde während der Initiations- und Promotionsphase dem Behandlungsmedium der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen zugesetzt. Zur Beurteilung des KDA-Einflusses auf die Ausbildung von Zelltransformationsherden wurde die Negativ-Kontrolle als Bezugsgröße gewählt und auf 100 % gesetzt. Positiv- und Negativ-Kontrolle unterschieden sich deutlich bezüglich der Summe aller entstandenen Zellherde ($p < 0,001$, Dunnett-Test). Es entstanden nach der Behandlung mit MCA und TPA (Positiv-Kontrolle) um das 350fache mehr Zellherde, als ohne jeglichen Zusatz einer Biochemikalie. Wurde den BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen KDA zugesetzt, entwickelten sich während der Versuchszeit kaum Zellherde (Abb. 22 und 23). Die geringe Anzahl transformierter Zellen fiel ähnlich wie bei den Negativ-Kontrollen aus. Es waren vereinzelt Zellherde des Typs I oder II entstanden, überhaupt nicht zu identifizieren waren Zellherde des Typs III (Tab. 8).

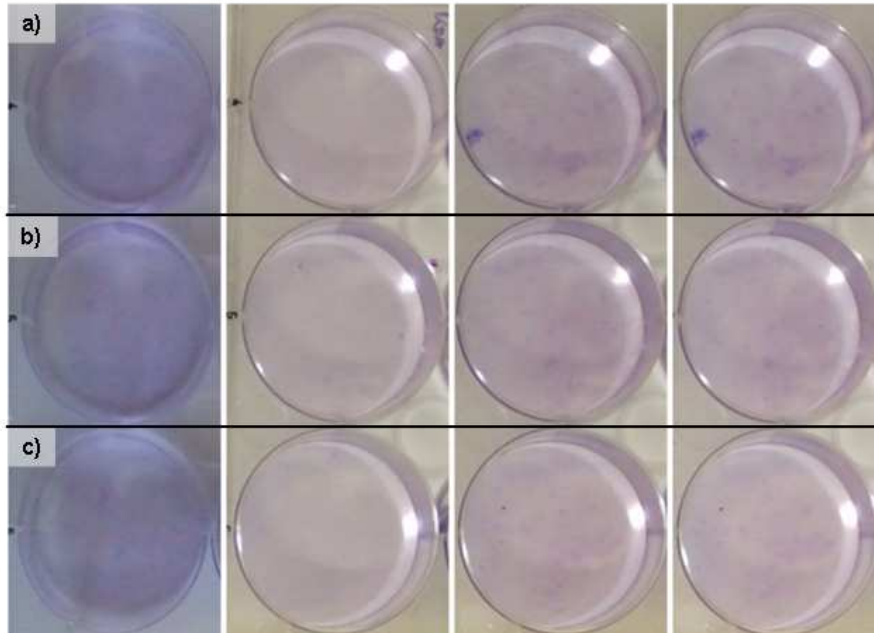


Abb. 22: Chemisch-induzierte Transformation von BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen nach KDA-Gabe während des gesamten Behandlungszeitraumes

Mit diesem Testprotokoll wurde die Wirkung von KDA in beiden Phasen des Mehrstufenmodells der Kanzerogenese getestet. Während der gesamten Behandlungsphase wurde den Zellen KDA unterschiedlicher Konzentration zugesetzt, a) 0,3 µM b) 3 µM und c) 30 µM KDA. Die Abbildung zeigt repräsentative Schalen aus allen vier Experimenten. In zwei *wells* waren schwach gefärbte Zelltransformationsherde erkennbar.

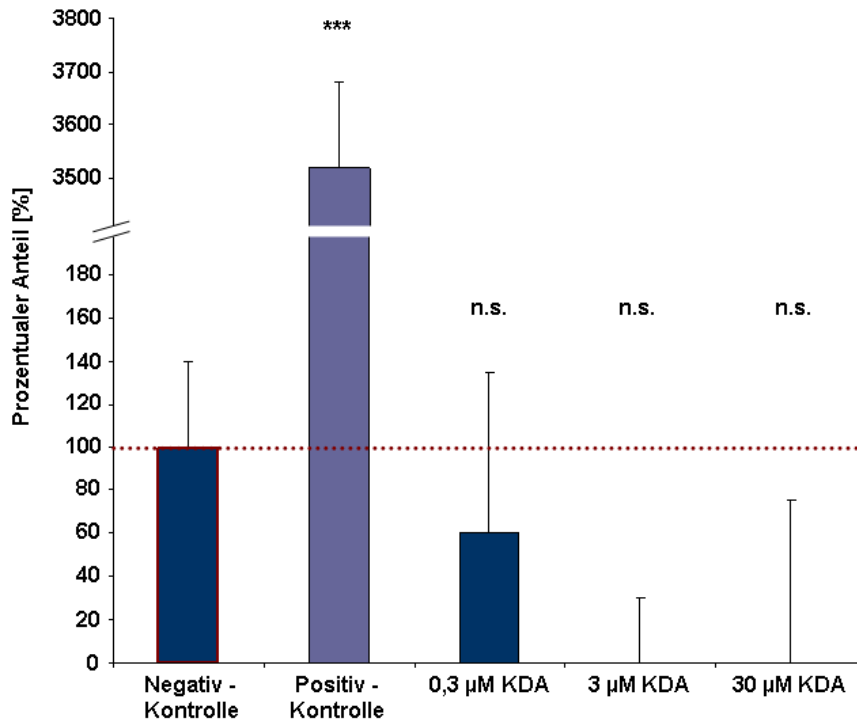


Abb. 23: Prozentualer Anteil entstandener Zellherde nach Testung von KDA in beiden Phasen der Kanzerogenese

Nach Beendigung des sechswöchigen In-vitro-Versuchs wurden die ausgebildeten Zellherde fixiert und gezählt. Im Diagramm dargestellt sind die prozentualen Anteile entstandener Zellherde aus allen vier unabhängigen Experimenten (Dreifachbestimmung). Signifikante Unterschiede der Gruppen wurden mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis und Unterschiede zur Negativ-Kontrolle mit ANOVA und 2-seitigem Dunnett-Test geprüft (** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$; n.s. = nicht signifikant).

	Typ 1	Typ 2	Typ 3
Positiv - Kontrolle	3,67 ± 0,5 (**)	3,11 ± 0,11	3,44 ± 0,38 (***)
Negativ - Kontrolle	0,28 ± 0,07	0,0 ± 0,03	0,06 ± 0,06
0,3 µM KDA + TPA	0,17 ± 0,17	0,0 ± 0,04	0
3 µM KDA + TPA	0,0 ± 0,04	0,0 ± 0,04	0
30 µM KDA + TPA	0,0 ± 0,21	0	0

Tab. 8: Anteil der Zellherde Typ 1 bis 3 pro well nach KDA - Behandlung

Bei diesem Behandlungsprotokoll waren nur wenige Zellherde der Typen 1 bis 3 bei der Negativ-Kontrolle entstanden. In Abhängigkeit der KDA-Behandlung entstanden während des sechswöchigen Experimentzeitraums nur Typ-1-Zellherde und einige wenige des Typ-II-Zellherde. Zusammenfassend sind in der Tabelle die Mittelwerte mit Standardabweichung der gebildeten Zellherde je well, die größer als drei Millimeter waren, dargestellt. Es sind die bestehenden signifikanten Unterschiede zwischen der Zahl der Zellherde der Behandlungsgruppen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle dargestellt (** = $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

6 Diskussion

Die Entwicklung bösartiger Tumoren im Dickdarm ist ein multifaktorieller, mehrstufiger Prozess, der stark von der Umwelt, insbesondere durch Nahrungsbestandteile beeinflusst wird. Der Dickdarm unterliegt einer geringen Motilität und ist für den Wasserentzug und die Resorption von Elektrolyten aus den unverdaulichen Nahrungsresten verantwortlich. Eine vollständige Darmpassage bei einem gesunden Erwachsenen benötigt, in Abhängigkeit der Nahrungszusammensetzung, 20 – 30 Stunden. Dabei wird der Darminhalt durchmischt und die Darmmukosa interagiert mit den verbliebenen, verschiedensten Inhaltsstoffen (Schmidt et al. 2000).

Zwei Verbindungen, die mit der Nahrung im Zusammenhang stehen sind das PhIP, ein Vertreter der HAA, das während des Bratens von Fleisch entsteht, und das KDA, ein Vertreter der NOC, das sich erst im Organismus aus den Inhaltsstoffen des Fleisches bildet. Verschiedene Arbeiten zeigen eine Korrelation zwischen der Konsummenge von stark erhitztem rotem Fleisch und dem Risiko einer Dickdarmkrebserkrankung (Layton et al. 1995, Knize et al. 2002, Sinha et al. 2001, Rohrmann et al. 2007). Bisherige Untersuchungen mit PhIP-Konzentrationen im humanrelevanten Bereich ergaben keinen Hinweis darüber, dass das PhIP allein verantwortlich für die Ausbildung von Tumoren beziehungsweise deren Vorstufen ist (Fukushima et al. 2004, Doi et al. 2005, Kühnel et al. 2009). Interessanterweise führte eine hohe Fettaufnahme zu einem additiven Effekt auf die PhIP-Wirkung im hohen Konzentrationsbereich (Ochiai et al. 1996a, Thornton und MacDonald 1997, Kim et al. 1998). Im ersten Teil dieser Arbeit wurde das Zusammenspiel einer fettreichen Ernährung in Kombination mit einer humanrelevanten PhIP-Konzentration näher betrachtet. Die Effekte wurden in einem Fütterungsversuch mit dem F344-Rattenmodell analysiert. Das bisher wenig untersuchte KDA stellt stellvertretend für im Darm entstehende Diazoacetat-Verbindungen aus Inhaltsstoffen des roten Fleisches ebenfalls einen potenziellen Risikofaktor für die Darmkrebsentstehung dar. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde daher das Potenzial von KDA, Zellen maligne zu transformieren, untersucht. Inwieweit das KDA transformierende Wirkungen hat und damit als Kanzerogen eingestuft werden kann, wurde mit Hilfe des BALB/c-3T3-Zelltransformationstests geprüft.

6.1 Der In-vivo-Versuch – Einsatz von PhIP im Fütterungsversuch mit F344-Ratten

Die zum Versuchsbeginn jungen männlichen F344-Ratten nahmen während des gesamten Beobachtungszeitraums kontinuierlich an Körpermasse zu. Mit Ende des Versuches war noch kein Plateau erreicht, dass bei männlichen Ratten in der Regel ab der 77igsten Lebenswoche erzielt wird und durchschnittlich 468 g beträgt (Solleveld et al. 1984). Auffällig waren die von der PhIP-Konzentration abhängigen, tendenziell verminderten Körpermassen der Tiere in beiden Diätgruppen. Ähnliche Beobachtungen wurden insbesondere in Versuchen, die länger als ein Jahr andauerten und in denen höhere PhIP-Dosen verabreicht wurden, beschrieben (Ito et al. 1991, Hasegawa et al. 1993). Fukushima et al. (2004) stellten in einem 16 Wochen andauernden Fütterungsversuch an F344-Ratten ebenfalls fest, dass die Körpermasse bei den Tieren der Hochdosis-Gruppe (400 ppm) vermindert war. Die im Gegensatz zum vorliegenden Ergebnis unveränderte Körpermasse bei der Gabe von 100 ppm PhIP könnte auf die inhaltlichen Unterschiede der in den verschiedenen Studien verwendeten Diät zurückzuführen sein. In der vorliegenden Studie, waren die Tiere, welche eine Westerndiät bekamen, im Vergleich zu den Tieren der Kontrolldiät deutlich schwerer. Innerhalb der Diäten war jedoch nur ein leichter Trend zur verminderten Körpermasse in Abhängigkeit der PhIP-Dosis festzustellen. Insgesamt bewirkte vermutlich die Fütterung von PhIP einen negativ Einfluss auf die Futteraufnahme der Tiere, was in einer geringeren Körpermassenzunahme resultierte. Die Westerndiät scheint diesen Einfluss aber relativieren zu können.

Es gibt nur wenige Veröffentlichungen, welche den Einfluss von PhIP-supplementierten Diäten auf die Futteraufnahme und das Wachstum der Tiere beschreiben. Ito et al. (1991) verabreichten eine Standarddiät (Oriental MF) und beobachteten von Beginn an Unterschiede bei der Futteraufnahme. Die Tiere fraßen von der ersten Versuchswoche an weniger Futter mit dem PhIP-Zusatz (400 ppm), was in einer geringeren Körpermassenzunahme resultierte. In einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe waren solche Beobachtungen nach einer Verabreichung von 0,1 und 100 ppm PhIP mit einer Standarddiät nicht festzustellen (Kühnel et al. 2009).

Die Ergebnisse der vorliegenden Fütterungsstudie sind differenziert zu betrachten. Erhielten die F344-Ratten das PhIP mit der Standarddiät, war lediglich eine Tendenz zur verminderten Futteraufnahme mit steigender PhIP-Konzentration zu ermitteln. Die festgestellte signifikant verminderte Körpermasse der Hochdosis-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe korreliert nicht mit einer erheblich reduzierten Futteraufnahme. War das PhIP der Westerndiät beigemischt, nahmen die Tiere der Hochdosis-Gruppe (100 ppm) signifikant am wenigsten Futter im Vergleich zur Kontroll- und Niedrig-Dosis-Gruppe auf. Diese Beobachtung ist in Bezug auf die Körpermassenentwicklung interessant. Die Tiere der Hochdosis-Gruppe waren nicht auffällig leichter. Im Gegensatz dazu waren keine Unterschiede zwischen der Kontroll- und der Niedrig-Dosis-Gruppe (0,01 ppm PhIP) hinsichtlich der Futteraufnahme und der Körpermassenzunahme festzustellen. Die Aufnahme von PhIP-supplementiertem Futter, in Abhängigkeit seiner Konzentration, lässt nicht auf eine verminderte Futteraufnahme, verbunden mit einer verminderten Körpermassenzunahme, schließen. Die Menge des aufgenommenen Futters ist demnach von der Art der Diät und der enthaltenen PhIP-Konzentration abhängig. Der Einfluss auf die Körpermasse hängt jedoch stärker vom Diättyp ab.

Diese Fütterungsstudie sollte ursprünglich 26 Wochen andauern. Ab der 16. Versuchswoche kam es zu unerwarteten, spontanen Todesfällen. Es waren jeweils ein Tier der PhIP-Behandlungsgruppen sowohl bei der Standard- als auch der Westerndiät und zwei Tiere bei der PhIP-Hochdosis-Gruppe der Westerndiät betroffen. Die Todesfälle lassen sich nicht mit Hilfe der Literatur klären. Bei einer Langzeitstudie von 104 Wochen traten bei den männlichen F344-Ratten erst ab der 58. Versuchswoche erste Todesfälle auf. Die Tiere erhielten 100 ppm PhIP mit dem Futter. Eine geringere verabreichte PhIP-Dosis (25 ppm) führte sogar erst in der 75. Woche zum Todesfall (Hasegawa et al. 1993). In einer weiteren, über 52 Wochen andauernden Arbeit, wurden keine Ausfälle durch den frühzeitigen Tod eines mit 400 ppm PhIP gefütterten Tieres angegeben (Ito et al. 1991). Auch eine Untersuchung hinsichtlich pathogener Erreger lieferte keine Erklärung für den frühzeitigen Tod der fünf Tiere.

In der vorliegenden Studie waren über die Todesfälle hinaus, bei der Western-Hochdosis-Gruppe erste Tendenzen einer Körpermassenabnahme auffällig. Da auch diese einen sensiblen Indikator für das Wohlbefinden der Tiere darstellt, war eine

vorzeitige Beendigung des Versuches in der 20igsten Woche angebracht. Bei der Sektion der Tiere wurden die inneren Organe einer makroskopischen Untersuchung unterzogen. Dabei waren keine Auffälligkeiten zu diagnostizieren und mit einer PhIP-induzierten-Tumorentwicklung war während des relativ kurzen Versuchszeitraums nicht zu rechnen. Diese traten in der Regel bei PhIP-Langzeitversuchen von länger als einem Jahr auf (Ito et al. 1991, Hasegawa et al. 1993, Ubagai et al. 2002). Zur weiteren Auswertung wurden die Därme präpariert und als Dauerpräparate einer histologischen Untersuchung hinsichtlich auftretender präneoplastischer Läsionen in Form von ACF unterzogen. Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass die Entstehung von ACF abhängig von der PhIP-Konzentration und der Expositionszeit ist (Tudek et al. 1989, Ochiai et al. 1996a, Nakagama et al. 2002, Fukushima et al. 2004). Gesichert gilt die Entstehung von ACF bei PhIP-Konzentrationen ab 50 ppm (Ochiai et al. 1996a, Fukushima et al. 2004). Konzentrationen von 400 ppm PhIP verursachten auch nach einer relativ kurzen Expositionszeit von zwei Wochen erste Entartungen. Weitere vier Wochen später konnte die Verfütterung einer fettreichen Diät ohne PhIP die Ausbildung von ACF deutlich steigern (Ochiai et al. 1996b). Auch die PhIP-Gabe im Intervall und in Kombination mit einer Hochfett-Diät führte zur Ausbildung von ACF nach sechs Versuchswochen. Deren Anzahl konnte nach 32 Experimentwochen deutlich erhöht werden (Nakagama et al. 2002). Bei geringeren PhIP-Mengen waren nach 16 Versuchswochen, unter Verwendung einer Standarddiät und der Gabe bis zu 10 ppm PhIP, kaum ACF zu diagnostizieren (Fukushima et al. 2004).

Es war zu erwarten, dass sich bei Tieren beider Versuchsgruppen, die 100 ppm PhIP mit dem Futter erhielten, die Mehrzahl der ACF ausbilden. Die höchste Anzahl entstandener Läsionen im Dickdarm wurde nach Verfütterung der 'Standarddiät + 100 ppm PhIP' gezählt (1,18 ACF/F344-Ratte). Diese PhIP-Wirkung unterscheidet sich deutlich von den in der Kontrollgruppe (0,17 ACF/F344-Ratte). Der Effekt der 'Westerndiät + 100 ppm PhIP' fiel dagegen unerwartet gering aus (0,6 ACF/F344-Ratte). Nach Angaben der Literatur hätte der Einfluss einer fettreichen Diät einen drastischeren Effekt auslösen sollen. Das Resultat der Niedrig-Dosis-Gruppen fiel ebenfalls unterschiedlich zwischen den Diätgruppen aus. Es entstanden 0,73 ACF/F344-Ratte nach Aufnahme der 'Westerndiät + 0,01 ppm PhIP' und deutlich weniger bei der Gruppe 'Standarddiät + 0,01 ppm PhIP' (0,45 ACF/F344-Ratte).

Nach der 0,01 ppm PhIP-Gabe, verabreicht mit der Standarddiät, wurden ähnliche Ergebnisse, wie in der Studie Fukushima et al. (2004), erzielt. Die fettreiche Nahrung in Kombination mit PhIP hingegen konnte bei den F344-Ratten die Entwicklung von ACF unterstützen, neben der tendenziell gesteigerten ACF-Anzahl war die Größe der ausgebildeten ACF auffällig. Zum einen waren mehr Krypten betroffen, zum anderen waren die präneoplastischen Läsionen voluminöser. ACF werden als intermediäre Biomarker in der frühen Entwicklungsstufe von Dickdarmkrebs sowohl bei der Untersuchung des humanen Organismus als auch in Säugtier-Modellen genutzt (Bird 1987, Pretlow et al. 1991, Roncucci et al. 1991, Kim et al. 2008). Die Entwicklung von ACF korreliert häufig mit der späteren Entstehung von Tumoren, dabei ist nicht nur die Anzahl gebildeter ACF sondern auch die Anzahl betroffener Krypten je ACF entscheidend. Besondere Beachtung erhalten deshalb ACF mit vier und mehr betroffenen Krypten. Die hier verwendete Standarddiät führte bei den F344-Ratten zu vergrößerten ACF mit circa vier bis fünf betroffenen Krypten. Im Gegensatz dazu wurde bei den Tieren, die die Westerndiät erhielten, vermehrt ACF mit vier bis sieben Krypten je ACF festgestellt. Des Weiteren waren die präkanzerogenen Läsionen unter Einwirkung der Westerndiät in ihrem Durchmesser signifikant größer. Die Westerndiät konnte zwar nur geringfügig die ACF-Anzahl steigern, jedoch zeigten sich deutliche Effekte in der ACF-Ausdehnung, welche ein weiterer Indikator für das Darmkrebsrisiko ist (Pretlow et al. 1992, Kristiansen 1996).

In der Literatur wird die Rolle des Fettes auf die Tumorpromotion im Dickdarm kontrovers diskutiert. Im Allgemeinen wird dem Fett ein promovierender Effekt in der Kanzerogenese des Dickdarms zugeschrieben (Drasar et al. 1973, Graham et al. 1988). Epidemiologische (Willett et al. 1990, Wynder 1987) und experimentelle Studien (Minoura et al. 1988, Nicholson et al. 1990) beschreiben einen differenzierten Einfluss des Fetttyps und seines Wirkortes auf die Dickdarmkrebsentstehung. Je höher der Anteil gesättigter Fettsäuren in der Nahrung ist, desto höher ist der Lipidanteil in den Fäzes. Nimmt die Lipidkonzentration im Dickdarm zu, führt dies zur Modulierung der Zellproliferation, welche in distaler Richtung steigt (Lee et al. 1993). Die Aufnahme von Fetten wie Butter, Rindertalg und einer hohen Menge an Maiskeimöl bewirken eine signifikant erhöhte Proliferation im Vergleich zu Fischöl und einer niedrigen Konzentration Maiskeimöl (Kim et al. 1998). Der nachgewiesene Proliferationsreiz wird vermutlich durch langkettige Fettsäuren (LCFA), die nicht im Dünndarm aufgenommen werden, erzeugt.

Einhergehend mit dem Wasserentzug in distaler Darmrichtung nimmt die Konzentration fettlöslicher Substanzen zu. Daraus ergibt sich ein vom proximalen zum distalen Darmbereich verlaufender Gradient von LCFA und mitogen aktiven Substanzen, die die Darmwand reizen (Wargovich et al. 1984). Insbesondere durch Butter und Rindertalg kann der Anteil von LCFA deutlich gesteigert werden. Dies stellt die Grundlage für den Anstieg der ACF-Zahl dar und unterstützt die Entwicklung von Adenokarzinomen im Dickdarm der Maus (Lee et al. 1993, Lindner 1991).

Grundsätzlich kann festgestellt werden, dass Fette nicht per se tumorpromovierend sind, sondern das der promovierende Effekt von der zugeführten Menge und Zusammensetzung der Fette abhängig ist. Inwieweit sie die Zellproliferation beeinflussen können, hängt jedoch auch von der Nahrungszusammensetzung insgesamt ab.

Nagertiermodelle spielen bei der Abschätzung des toxischen Potenzials einer Substanz für den Menschen eine wichtige Rolle. Bei der Interpretation der Daten muss dabei auf die speziesspezifischen Charakteristika und bei der Übertragung der erzielten Ergebnisse von Tier zu Mensch auf die jeweiligen genetischen Besonderheiten geachtet werden.

Bei der F344-Ratte handelt es sich um einen Albino-Ratten-Inzuchtstamm, der als Modellorganismus in der medizinischen und biologischen Forschung eingesetzt wird. Die Generierung erfolgte durch stetige Geschwisterverpaarung und erzielte einen weitgehend identischen homozygoten F344-Tierstamm. Dieser Stamm eignet sich besonders für Fütterungsversuche mit Fragestellungen, die die Kolonkanzerogenese betreffen, da eine geringe Inzidenzrate spontan ausgebildeter Tumore im Darm vorliegt (Coleman et al. 1977, Goodman et al. 1979, Lindsey 1979, Cameron et al. 1985).

Interessant sind die Beobachtungen, dass F344-Ratten unterschiedlicher Züchter auf die Gabe von 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinoline (IQ), ebenfalls ein HAA, verschieden sensitiv reagieren. Die Induktion von ACF in Folge der verabreichten Substanz fällt signifikant unterschiedlich aus (Xu et al. 1999). Somit ist ein Vergleich von Studien mit Tieren verschiedener Herkunft problematisch. Bei einem Vergleich verschiedener Kanzerogenitätsstudien ist zu beachten, welcher Tierstamm eingesetzt wurde. Neben den F344-Ratten reagieren auch die ACI-Ratten empfindsam gegenüber 400 ppm PhIP. Beide Tierstämme zeigten eine vergleichbare

und hohe Lebenserwartung nach der Behandlung. Jedoch sind die ACI-Ratten nahezu resistent gegenüber der Ausbildung von ACF im Darm. Die Sensitivität der F344-Ratte gegenüber einer PhIP-vermittelten Induktion von Tumoren liegt in der autosomal dominanten Genausprägung begründet (Nagao et al. 1998, Inaguma et al. 2003). Ein möglicher Genort könnte auf dem Chromosom 16 zwischen den Loci D16Rat17 und D16Wox3 liegen (Nakagama et al. 1999). Dickdarmkrebs ergibt sich nach Akkumulation zahlreicher genetischer und epigenetischer Ereignisse innerhalb des Genpools einer Spezies. Untersuchungen der PhIP-induzierten Karzinogenese in der F344-Ratte ergaben außerdem spezifische Mutationen im *Apc*- oder *β-catenin* Gen (Kakiuchi et al. 1995, Dashwood et al. 1998, Ubagai et al. 2002, Ochiai et al. 2003, Wang et al. 2008). Beide nehmen Schlüsselstellungen im Wnt-Signalweg ein und ihre kodierenden Gene unterliegen in der humanen Dickdarmkanzerogenese häufig Mutationen (Miyaki et al. 1994, Laken et al. 1997, Morin et al. 1997, Segditsas und Tomlinson 2006, Gavert und Ben-Ze-év 2007). Nach einer Fütterung von Ratten mit PhIP kommt es außerdem zu einer erhöhten Expression eines Regulatorgens des Zellzyklus, dem *Cyclin D2* Gen (Fujiwara et al. 2004).

Ein entscheidender Faktor bei der PhIP-induzierten Karzinogenese ist die Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme. Geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist dabei die Acetylierung von PhIP. Im Gegensatz zur Wistar Kyoto Ratte (Hein et al. 1991) gehört die F344-Ratte zu den „schnellen Acetylierern“, da sie die *N*-Acetyltransferase 2 (NAT2) exprimiert. Zwar kann die Gabe von 100 ppm PhIP keine höhere Enzymaktivität hervorrufen, dennoch zeigen F344-Ratten eine dosisabhängige Steigerung der Bildung von PhIP-*N*-Acetoxy-Ester-Verbindungen und ACF, wohingegen bei der Wistar Kyoto Ratte keine ACF-Zunahme beobachtet wird (Purewal et al. 2000a). Die Verfütterung von PhIP an Mäuse verursacht weder Kolon- noch Mammatumore. Dagegen war eine hohe Inzidenz an Lymphomen zu beobachten (Esumi et al. 1989). Die Organwirkung von PhIP unterliegt somit deutlichen Intra- und Interspeziesunterschieden. Eine Übertragung der erhaltenen Ergebnisse auf den Menschen ist daher schon auf Grund der wiederum größeren Interspeziesunterschiede zwischen Ratte und Mensch besonders schwierig. Weiterhin kommt die interindividuelle genetische Vielfalt des Menschen erschwerend hinzu, welche durch Metabolismus, DNA-Reparaturmechanismen oder Immunantwort Einfluss auf toxische Wirkungen im Organismus nehmen. Dies

spiegelt sich auch in den teilweise uneinheitlichen Ergebnissen epidemiologischer Studien wieder.

In der hier vorgestellten Fütterungsstudie konnte der Einfluss der Westerndiät auf die Dickdarmkrebsentstehung in Kombination mit der im verarbeiteten roten Fleisch enthaltenen Biochemikalie PhIP nicht geklärt werden. Um den Hinweisen nachzugehen, dass die Westerndiät einen promovierenden Effekt auf die mit humanrelevanter PhIP-Dosis initiierten Zellen haben könnte, wurde ein nachfolgender Fütterungsversuch begonnen. In diesem Versuch, der sich über einen nun längeren Zeitraum von einem Jahr erstrecken soll, wird zusätzlich der Einfluss von Folsäure näher betrachtet. Das wasserlösliche Coenzym überträgt seine Methylgruppe und ist damit an der DNA-Synthese und seinen Bausteinen beteiligt. Insbesondere die Methylierung der DNA und Remethylierung von Homocystein zu Methionin stellen wichtige Bioprozesse und sensible Funktionen innerhalb einer Zelle dar. Ein Defizit führt zu Störungen der DNA-Synthese, aber auch der DNA-Stabilität und DNA-Integrität. Weiterhin kann der Mangel an Folsäure in Folge einer Hypomethylierung die Genexpression verändern. Dadurch kann das Wachstum von Zellen gehemmt werden. Im Gegensatz dazu kann ein Überangebot von Folsäure das Risiko einer gesunden Zelle zur neoplastischen Transformation erhöhen. In Abhängigkeit der aufgenommenen Dosis besteht also die Möglichkeit, dass die Folsäure sowohl pro- als auch antikanzerogene Effekte hervorruft und damit die Effekte von PhIP und/oder einer hochkalorischen Diät moduliert.

Des Weiteren sollen alle beeinflussenden Faktoren so gering wie möglich gehalten werden. Es ist notwendig alle wesentlichen Futterkomponenten, wie die Proteine, Rohfasergehalt, Vitamine und Mineralien bei der Standard- und Westerndiät identisch zu gestalten. Dabei muss eine optimale Versorgung des Organismus unbedingt gewährleistet bleiben. Alleinige Ausnahmen gibt es im Fett- und Folsäuregehalt: Das Futter wird mit Folsäure angereichert und mit einer Hoch- und einer Niedrig-Dosis verabreicht. Zusätzlich wird das PhIP, ebenfalls in einer hohen und niedrigen Dosis, verfüttert.

Unter Anwendung von extremen, im häuslichen Bereich nicht verwendeten Zubereitungsbedingungen konnten bis zu 9,9 µg PhIP/kg (0,01 ppm PhIP) in gegrilltem Hähnchenfleisch und 0,16 µg PhIP/kg ($1,6 \times 10^{-4}$ ppm PhIP) in

gebratenem Rindfleisch gemessen werden (Turesky et al. 2005). In einem über 16 Wochen andauernden Fütterungsversuch war die Entstehung von ACF erst bei einer dauerhaften Gabe von 50 ppm PhIP detektierbar und ACF mit mindestens drei betroffenen Krypten waren sogar erst bei Konzentrationen von 100 und 400 ppm PhIP zu identifizieren. Die Entartungen traten demnach in Folge von sehr hohen, nicht humanrelevanten PhIP-Mengen auf. Jedoch waren dosisabhängig DNA-Addukte in Folge des PhIP-Metabolismus im Darm der Ratten festzustellen, die ab einer Konzentration von 0,01 ppm PhIP deutlich messbar waren (Fukushima et al. 2004). Es müssen hinlänglich viele DNA-Addukte ausgebildet werden, bevor der Genpool einer Zelle so stark verändert wird, dass die Wachstumsregulation entgleitet (Hanahan und Weinberg 2000). Umgekehrt wirken geringe Konzentrationen einer Biochemikalie durch adaptive biologische Prozesse schützend auf die Zellen ein (Hormesis) (Conolly et al. 2005). Treten genotoxische Schäden durch Kanzerogene auf, wird der Ablauf des Zellzyklus verlangsamt und es verbleibt mehr Zeit für mögliche Reparaturen (Kleczkowska und Althaus 1996, Elledge 1996). Dabei werden zahlreiche Faktoren wie die Induktion von Enzymen zur Detoxifikation, Reparaturenzyme und Hochregulation von Tumorsuppressorgenen aktiviert (Kitchin und Brown 1994, Stecca und Gerber 1998). Zahlreiche Studien zeigen, dass die Induktion von ACF von der Experimentdauer und der PhIP-Konzentration abhängig ist (Hasegawa et al. 1993, Ochiai et al. 1996a, Nakagama et al. 2002, Ubagai et al. 2002).

Der Einfluss der Hochfett-Diät auf die Kanzerogenese des Dickdarms wird kontrovers diskutiert. Die lange bestehende Annahme, dass Fett *per se* einen tumorpromovierenden Effekt auf das Gewebe des Dickdarms hat (Drasar und Irving 1973, Graham et al. 1988), kann nicht auf alle Fetttypen übertragen werden. Fette mit einem hohen Anteil ungesättigter Fettsäuren, wie zum Beispiel Fischöl oder Maiskeimöl, weisen tendenziell einen protektiven Charakter auf. Gesättigte Fettsäuren aus der Butter oder dem Rindertalg wirken stimulierend und tragen zur Hyperproliferation der Zellen eines Gewebes bei, wobei dieser Effekt vorrangig im distalen Kolon zu finden ist (Lee et al. 1993, Kim et al. 1998). Die in wissenschaftlichen Studien verwendeten Hochfett-Diäten sind oftmals mit pflanzlichen Fetten supplementiert. In einer Fütterungsstudie mit F344-Ratten wurde ein Vergleich zwischen der Wirkung von gehärtetem vegetarischem Öl und Färberdistelöl untersucht (Ochiai et al. 1996b). Nach sechs Wochen sind in der

ersten Gruppe signifikant mehr ACF entstanden. Dafür wurden zuvor zwei Wochen 400 ppm PhIP und anschließend die mit den Fetten angereicherten Diäten ohne PhIP-Zusatz verfüttert. Wird die Verfütterung der Hochfett-Diät auf insgesamt 14 Wochen verlängert, ist der vorangegangene positive Effekt des Färberdistelöls nicht mehr zu beobachten (Ochiai et al. 1996b).

Neben der Wirkzeit und der verabreichten Konzentration einer Chemikalie spielt der genetische Hintergrund eine wesentliche Rolle bei der Tumorinzidenz. Bei den F344-Ratten ist der Genpool auf Grund der Geschwisterverpaarung homozygot. Beim Menschen dagegen liegt eine genetisch heterogene Vielfalt vor. Der sich daraus ergebende Vor- und Nachteil besteht darin, dass die Empfindlichkeit des Menschen gegenüber einer toxischen Substanz variieren kann, so dass die Vorhersage einer Substanzwirkung schwierig ist. Wegen der Speziesunterschiede ist die Übertragung der Resultate vom Tier auf den Menschen schwierig. Erschwerend kommt außerdem hinzu, dass es interindividuelle Unterschiede gibt, zum Beispiel im Metabolismus innerhalb einer Spezies. Die metabolische Kompetenz eines Organismus ist zum großen Teil abhängig von den Ernährungsgewohnheiten, aber auch von den aufgenommenen Fremdstoffen.

In zahlreichen Tierversuchsstudien wurden weitere Lebensmittelinhaltsstoffe und deren Einfluss auf die PhIP-induzierte Mutagenese und Kanzerogenese untersucht. Eine Erhöhung des Ballaststoffanteils im Futter der F344-Ratten trägt zu einer wesentlichen Verminderung der Ausbildung von ACF bei (Alabaster et al. 1997). Beim epidemiologischen Vergleich der finnischen mit der US-amerikanischen Population konnte der positive Effekt der unverdaulichen Nahrungsbestandteile bestätigt werden. Der aufgenommene Fettanteil ist in beiden Bevölkerungsgruppen vergleichbar, aber die nahezu doppelte Mehraufnahme von Ballaststoffen führte bei den Finnen zu einer verminderten Dickdarmkrebsinzidenz (Adlercreutz 1990). Neben den Ballaststoffen verfügen die von den Finnen mutmaßlich zahlreich aufgenommenen Fischöle über einen höheren Anteil ungesättigter Fettsäuren als das Rindersteak (Lee et al. 1993, Kim et al. 1998). Somit kann es wahrscheinlich einen zusätzlichen protektiven Beitrag bezüglich der Dickdarmkrebsentstehung leisten. Auch Bier führt nachweisbar zu einer Reduktion der durch HCA und PhIP, als Einzelsubstanz, induzierten DNA-Schäden und Präneoplasien im F344-Tiermodell (Nozawa et al. 2004). Ebenfalls in der F344-Ratte wurde ein antikanzeregener Effekt durch die Aufnahme von Grapefruitsaft (Miyata et al. 2002) sowie durch die

Aufnahme von natürlichen Anthocyanen der Süßkartoffel und des Rotkohls (Hagiwara et al. 2001, 2001) gezeigt. Die Auswirkungen des Kaffees sind in den durchgeführten Tierstudien nicht eindeutig, da seine Inhaltsstoffe die Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sehr stark modulieren. Insbesondere das CYP 1A2 welches an der Detoxifizierung des PhIP beteiligt ist, wird verstärkt exprimiert. Im Dickdarm war keine Zunahme PhIP-induzierter DNA-Schäden zu beobachten. Dafür nahm die Tumorinzidenz in anderen Organen zum Teil zu (Turesky et al. 2003). Eine Kombination von PhIP mit weißem Tee oder Koffein, verfüttert mit einer Hochfett-Diät, führt wiederum zu einer erhöhten Tumorinzidenz (Wang et al. 2008).

Um eine differenzierte Einschätzung der potenziellen dickdarmkrebserregenden Wirkung einer humanrelevanten PhIP-Konzentration vornehmen zu können, wurde F344-Ratten über 20 Wochen PhIP in einer niedrigen und hohen Dosis mit dem Futter verabreicht. Die Kombination mit der Westerndiät war ein Versuch, eine zum Menschen, in den industrialisierten Ländern, vergleichbare Situation abzubilden. Die Fütterung der Westerndiät hat in Kombination mit einer niedrigen PhIP-Dosis einen stimulierenden Einfluss auf die Entwicklung von ACF und betroffene Krypten. Eine Abschätzung für den Menschen ist auf Grund der individuellen und geographischen Unterschiede der Lebens- und Nahrungsgewohnheiten nicht pauschalisierbar. Die bisherigen Ergebnisse untermauern die Erkenntnisse vorheriger Studien, dass PhIP alleine verabreicht, in geringen Konzentrationen nicht zur Entwicklung von Dickdarmtumoren führt. Aufgrund der genannten Schwierigkeiten, die während des Versuches aufgetreten sind, kann jedoch keine abschließende Bewertung einer Kombination humanrelevanter PhIP-Konzentration mit einer hochkalorischen Ernährung vorgenommen werden. Aus diesem Grund wurde ein bereits umfangreicher einjähriger Fütterungsversuch begonnen.

6.2 Der In-vitro-Versuch – Kaliumdiazooacetat im BALB/c-3T3-Zelltransformationstest

Der BALB/c-3T3-Zelltransformationstest stellt ein quantitatives System zur In-vitro-Testung von maligne transformierenden Chemikalien dar. Während eines relativ kurzen Testzeitraums von sechs Wochen kann eine Aussage über das kanzerogene Potenzial der eingesetzten Substanzen getroffen werden. Näher untersucht werden die zwei Phasen der Kanzerogenese, die Initiation und die darauf folgende Promotion, welche durch eine oder verschiedene Chemikalien induziert werden können. Hat die Chemikalie transformierende Eigenschaften führt nach Erreichen des konfluenten Wachstumsstadiums der Verlust der Zell-Zell-Kontaktinhibition zum unkontrollierten Wachstum. Unabhängig vom Untergrund ist es den Zellen möglich, übereinander zu wachsen und so genannte Zellherde auszubilden. Die Anzahl und Morphologie der Zellherde gibt das Maß der Transformation an. Für die Kontrollen werden als initiierendes Agens MCA und als Promotor TPA eingesetzt. KDA wurde in beiden Phasen des Testsystems getestet, um festzustellen ob es eine tumorinitiierend und/oder tumorpromovierend wirkt.

Das in der Initiationsphase eingesetzte MCA wird durch Cytochrom P450 metabolisiert und seine Intermediate binden kovalent an die DNA. Als einer der potentesten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wirkt MCA als Initiator während des Kanzerogeneseprozesses (Kondraganti et al. 2005). Nicht nur die metabolisch aktivierte Form von MCA greift in die Genmodulation ein, sondern MCA selbst wirkt durch Bindung an den Ah-Rezeptor und führt dadurch zur erhöhten Expression von z.B. CYP450 1A1. Die metabolische Kompetenz des Systems wird also, wenn auch nur in geringem Maß, durch das MCA selbst unterstützt. Die einmalige Zugabe von MCA (siehe Protokoll Kap. 4.6.7) induzierte eine geringe, jedoch signifikante Zunahme von Zellherden im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Besonders häufig war der Zellherdtyp 2 zu identifizieren. Dass das MCA imstande war, transformierend auf die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen zu wirken, könnte mit seiner persistierenden Wirkung auf die Genexpression zusammenhängen.

Die alleinige Gabe von TPA resultierte ebenso in einer signifikanten Zunahme von Zellherden. Obwohl das TPA selbst kein Kanzerogen ist, kann es indirekt einen schädigenden Einfluss auf die DNA einer Zelle nehmen. TPA induziert eine erhöhte

Ausbildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, Roberston et al. 1990, Przybyszewski et al. 1998), die Mutationen an der DNA verursachen können, sowie zytotoxische Effekte, gefolgt von einer regenerativen Zellproliferation. Außerdem führt die erhöhte ROS-Produktion zur Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) und damit zur Aktivierung eines mehrstufigen Signaltransduktionsweges, der unter anderem an der Regulation von Zelldifferenzierung und Zellwachstum beteiligt ist (Stevenson et al. 1994).

Eine Kombination von MCA und TPA wirkte am stärksten auf die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen ein und äußerte sich in einer Vielzahl transformierter Zellen. Das während der Initiationsphase eingesetzte MCA löst Mutationen in den Zellen aus und das anschließend eingesetzte TPA stimuliert die Proliferation. Nach Verlust der Kontaktinhibition und Zellzykluskontrolle können die Zellen uneingeschränkt, unter Entwicklung zahlreicher Zellherde aller drei Klassifizierungsstufen, vermehren. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte damit eine Steigerung um das nahezu 37fache erzielt werden.

Inwieweit KDA die streng kontrollierte Zellregulation beeinflussen und die Transformation der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen induziert kann, wurde in drei verschiedenen Behandlungsprotokollen getestet. Dafür wurde KDA in der Initiations- oder Promotionsphase eingesetzt. Um zu prüfen, ob es als komplettes Kanzerogen wirksam ist, wurde es außerdem in beiden Phasen des Testsystems verwendet. Die Überprüfung von KDA als Initiator ergab keinen Hinweis auf ein initiierendes Potenzial. Die Anzahl entstandener Zellherde ist der durch TPA verursachten Herdzahlen vergleichbar. Ähnlich verhält es sich bei der Testung der KDA-Promotoraktivität. Nach Initiation der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen mit MCA und der Gabe von KDA während der Promotionszeit sind kaum transformierte Zellherde entstanden. Die Zahl der gebildeten Herde gegenüber der von MCA allein verursachten Anzahl war eher geringer. Diesen Resultaten zufolge war auch nicht damit zu rechnen, dass eine durchgängige KDA-Applikation zu einer vermehrten Bildung von Zellherden führt, was KDA als komplettes Kanzerogen identifiziert hätte. In der Tat waren lediglich vereinzelt Zellherde vom Typ I zu finden.

Es stellt sich die Frage, warum das KDA in keiner Phase des Kanzerogenitätstest auf die BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen transformierend wirken konnte, obwohl die Substanz

in der Literatur als genotoxisch beschrieben wird (Anderson et al. 1999). Erste Beobachtungen, dass endogen gebildete NOC die DNA schädigen und für die Entstehung von Darmkrebs verantwortlich sein könnten, beschrieb P. Correa (1992). Die aus dem Zerfall von KDA hervorgehenden Carboxy- und Methylidiazoniumionen bilden nachweislich DNA-Addukte aus (Harrison et al. 1999, Gottschalg et al. 2007). Die O⁶CMdG-Addukte tragen zur DNA-Methylierung bei (Shuker und Margison 1997). KDA ist in der Lage das Methylierungsmuster der DNA zu verändern und kann damit in die Regulation der Genexpression eingreifen. Findet eine Blockade der Genexpression statt, die normalerweise wachstumshemmende Funktionen ausüben, kann sich in Folge des unkontrollierten Wachstums ein Tumor ausbilden. Treten Mutationen im *p53*-Tumorsuppressorgen auf, wird der Zellzyklus in Folge einer falsch synthetisierten DNA nicht gestoppt und der Fehler an die Tochterzellen weitergegeben. Dadurch wird ein Schutzmechanismus der gesunden Zelle blockiert und ein weiterer Faktor, der die Tumorentstehung unterstützt, aktiviert. In einem Hefe-basierten Funktionstest führt die Inkubation von KDA zu Mutationen der humanen *p53*-cDNA-Sequenz, die charakteristisch für Tumore des Gastrointestinaltraktes sind. Dabei treten sowohl Transitionen (GC→AT) und Transversionen auf (GC→TA und AT→TA; Gottschalg et al. 2007).

Der BALB/c-3T3-Zelltransformationstest ist ein zuverlässiger quantitativer In-vitro Screeningtest zur Identifizierung von potenziellen Kanzerogenen (Sakai 2007). Der in der Arbeit verwendete Zellklon A31-1-1 verhält sich sensitiv gegenüber transformierenden Chemikalien und ist hinsichtlich spontaner Transformationen stabil (DiPaulo et al. 1972, Kakunaga und Crow 1980). Trotz der in der Literatur genannten Beobachtungen und der Verwendung eines sensitiven Testsystems war durch das KDA keine Transformation der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen zu beobachten. Die eingesetzten Behandlungskonzentrationen von KDA lagen im mikromolaren Bereich und damit unter den meistens eingesetzten Konzentrationen und in der Literatur beschriebenen Beobachtungen. Die Entstehung von DNA-Addukten, wie O⁶MdG und O⁶CMdG, wurden durch Konzentrationen größer als 0,5 mmol/l erzeugt (Harrison et al. 1997), ebenso die durch 4 mmol/l KDA induzierten *p53*- Mutationen (Gottschalg et al. 2007). Da auch in diesem Teil der vorliegenden Arbeit ein erklärtes Ziel war, die Experimente mit ernährungsphysiologisch sinnvollen Konzentrationen durchzuführen, stand eine Erhöhung des zu testenden Konzentrationsbereiches zunächst außer Frage.

In den weiterführenden Experimenten sollten die Auswirkungen von KDA-Konzentrationen im millimolaren Bereich im BALB/c-3T3-Zelltransformationstest getestet werden. Zum einen, um zu klären, ob bei höheren Konzentrationen eine transformierende Wirkung durch das KDA erzielt werden kann. Zum anderen, um eine eventuell bestehende Konzentrationsschwelle ausfindig zu machen. Sollte eine Mindestmenge an KDA für die Zelltransformation verantwortlich sein, sollte diese Konzentration kritisch mit der humanphysiologischen Aufnahmekonzentration verglichen werden. Für die präzisere Einschätzung der Biochemikalie KDA ist es ratsam, parallel zum BALB/c-3T3-Zelltransformationstest weitere Untersuchungen vorzunehmen. Die Alkylierung der DNA stellt eine Schlüsselposition bei der Induktion von Krebs dar (Miller 1978). Inwieweit die durch KDA induzierten O⁶CMdG in der Zelle nach Ende der Behandlung stabil erhalten bleiben und damit Einfluss auf die Genregulation nehmen könnten, kann mittels einer fluoreszenzgekoppelten Immunoaffinität/HPLC-Methode analysiert werden (Harrison et al. 1997, 1999, Cupid et al. 2004). Ziel dieser Untersuchungen wäre es herauszufinden, ob die entstandenen DNA-Addukte an die Tochterzellen weitergegeben werden. Weiterhin könnte ausgeschlossen werden, dass KDA zwar DNA-Addukte verursacht, diese aber zur Instabilität des Genoms und darauf folgend zur Apoptose der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen führen und somit keine Transformation der BALB/c-3T3-A31-1-1-Zellen induziert wird.

Eine abschließende Risikobewertung des transformierenden Potenzials von KDA anhand eines In-vitro-Versuches, kann nicht vorgenommen werden. Allerdings besteht die Möglichkeit einer ersten Einordnung des Risikos, das von einem alkylierenden Agens ausgeht. Es entsteht nicht, wie im Fall von PhIP beim Braten von Fleisch, sondern aus den Grundbausteinen des roten Fleisches. Wie viel im Organismus gebildet wird, ist neben den notwendigen Proteinen abhängig vom pH-Wert (Xu und Reed 1993a, Mirvish 1995). Außerdem kann als Koaktivator das enthaltene Häm-Eisen fungieren (Sesink et al. 1999). Eine proteinreiche aber vegetarische Kost führt nicht zum Anstieg von NOC (Cross et al. 2003). Auch weißes Fleisch, welches nur ein zehntel der Häm-Menge aufweist, führt nicht zur Zunahme von NOC in der Fäzes (Schwartz und Ellefson 1985, Kuhnle et al. 2007). Neben dem interindividuellen Verhaltensmuster bei der Nahrungsaufnahme spielt bei dieser Substanz der Einfluss der Mikroflora des Darms eine entscheidende Rolle. Es wird

zwischen einer Säure-katalysierten *N*-Nitrosierung und einer biologisch-katalysierten *N*-Nitrosierung unterschieden. Untersuchungen von frisch entnommenem Magensaft ergaben in Abhängigkeit seines pH-Werts unterschiedliche Mengen Nitrit und NOC, die allerdings stark schwankten (Xu und Reed 1993b). Entlang des Verdauungstraktes können die entstandenen NOC-Mengen ebenso variieren. Je höher der pH-Wert ist, desto höher ist die Menge ausgebildeter NOC. Der pH-Wert nimmt im Gastrointestinaltrakt nach aboral zu und erreicht im Enddarm einen Wert von circa pH = 6,8. Außerdem kommt die biologisch-katalysierte *N*-Nitrosierung verstärkt zum Tragen, die bakterielle Nitrit-Reduktase hat ihr Optimum bei pH = 6 - 8,42 (Xu und Reed 1993b). In In-vitro-Studien korreliert der pH-Wert mit den höchsten NOC-Konzentrationen und der Enzymaktivität der Mikroorganismen (Calmels et al. 1987, Leach et al. 1987). In einer In-vitro-Studie unter Einsatz eines synthetischen Diazoacetat-Anions konnten Konzentrationen, die kleiner als 14 µM waren, keine detektierbaren O⁶CMdG-Schäden an der DNA bewirken. Die Reaktionen physiologischer Mengen Glycin und Stickstoffmonoxid zu einem Diazoacetation, unter neutralen und leicht alkalischen Bedingungen, erzielten ebenso keine O⁶CMdG Addukte. Jedoch konnte im Blut von freiwilligen Probanden nach dem Verzehr einer moderaten Menge Fleisch eine Zunahme des O⁶-Carboxymethylguanin-Levels bestimmt werden (Cupid et al. 2004). Im BALB/c-3T3-Zelltransformationsassay ist es nicht gelungen, die Zellen unter Einwirkung von KDA zu transformieren. Dessen ungeachtet bleibt der Verdacht, dass NOC kanzerogen wirken können. Es ist möglich, dass die Zahl promutagener Addukte nach KDA-Inkubation nicht ausreichend für eine Entartung der Zellen in der Zellkultur sind, aber sie könnten einen Beitrag zur Veränderung des Genpools leisten. Im Gastrointestinaltrakt bildet sich eine Vielzahl von NOC und Dickdarmkrebs wird nicht durch alleinige Wirkung einer Substanz verursacht. KDA könnte letztendlich Auslöser der Erkrankung sein. Das damit verbundene Risiko für den Menschen ist abhängig von den durch Glycin und Stickstoffmonoxid gebildeten toxischen Verbindungen. Insbesondere Glycin, eine reichlich in der Nahrung zur Verfügung stehende Aminosäure, ist ausschlagend wenn es um die Menge schädigender NOC-Substanzen geht. Neben den interindividuellen Besonderheiten bezüglich der Darmmotilität, der Kontaktzeit des Darmbolus mit der Darmwand und des Fremdstoffmetabolismus, muss berücksichtigt werden, dass das im Organismus gebildete Diazoacetat eine geringe Halbwertszeit hat. Entstandene Intermediate

zerfallen in relativ kurzer Zeit, dennoch sind im Blut von Probanden nach dem Fleischverzehr Schädigungen an der DNA festgestellt worden (Cupid et al. 2004).

Mit Hilfe der angewandeten experimentellen Versuchssysteme kann keine endgültige Aussage, bezüglich der tatsächlichen Relevanz von KDA und PhIP an der Entstehung von Dickdarmkrebs beteiligt zu sein, getroffen werden. In beiden Modellen wurden im Vergleich zu vorangegangenen Studien relativ niedrige, humanrelevante Konzentrationen der Biochemikalien eingesetzt.

Beim Erhitzen von Fleisch entstehen verschiedene Substanzklassen, die für die Entwicklung von Dickdarmkrebs verantwortlich sein könnten. Dazu zählen die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, HAA, die exogen gebildete NOC und nach neueren Studien auch endogen gebildete NOC (Norat et al. 2002, Cross und Sinha 2004, Chao et al. 2005). Der Entstehung von Dickdarmkrebs liegt eine fortwährende Einwirkung verschiedener Biochemikalien und weiteren Umwelteinflüssen zugrunde, deren Effekte sich gegenseitig aufheben, aber auch potenzieren können. Die in dieser Arbeit eingesetzten Substanzen führen auch in geringen Konzentrationen zu DNA-Addukten, ein kanzerogenes Potenzial konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht festgestellt werden.

7 Literaturverzeichnis

Aaronson SA, Todaro GJ

Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40, *J Cell Physiol.* 1968 Oct; 72(2):141-8

Adlercreutz H

Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations, *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 1990; 201:3-23

Ahmed FE

Effect of diet, life style, and other environmental/chemopreventive factors on colorectal cancer development, and assessment of the risks, *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2004; 22(2):91-147.

Alabaster O, Tang Z, Shivapurkar N

Inhibition by wheat bran cereals of the development of aberrant crypt foci and colon tumours, *Food Chem Toxicol* 1997 May; 35(5): 517-22

Anderson D, Phillips BJ, Challis BC, Hopkins AR, Milligan JR, Massey RC

Mutagenic properties of N-nitrosopeptides in mammalian cell culture assays, *Food Chem Toxicol* 1986 Apr; 24(4): 289-92

Anderson D, Hambly RJ, Yu TW, Thomasoni F, Shuker DE

The effect of potassium diazoacetate on human peripheral lymphocytes, human adenocarcinoma Colon caco-2 cells, and rat primary colon cells in the comet assay, *Teratog Carcinog Mutagen* 1999; 19(2):137-46

Appel KE, Fürstenberger G, Hapke HJ, Hecker E, Hildebrandt AG, Koransky W, Marks F, Neumann HG, Ohnesorge FK, Schulte-Hermann R

Chemical cancerogenesis: definitions of frequently used terms, *J Cancer Res Clin Oncol* 1990; 116(3):232-6

Armitage P, Doll R

The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis, *Br J Cancer* 1954 Mar; 8(1):1-12.

Atchison M, Chu C, Kakunaga T, Van Duuren BL

Chemical cocarcinogenesis with the use of a subclone derived from Balb/3T3 cells with catechol as cocarcinogen, *J Natl Cancer Inst.* 1982 Aug; 69(2):503-8

Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Steineck G

Assessment of the human exposure to heterocyclic amines, *Carcinogenesis* 1997 Oct; 18(10):1931-5

Augustsson K, Skog K, Jägerstad M, Dickman PW, Steineck G

Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study, *Lancet.* 1999 Feb 27; 353(9154):703-7

Babbs CF

Free radicals and the etiology of colon cancer, *Free Radic Biol Med.* 1990;8(2):191-200

Basora N, Desloges N, Chang Q, Bouatrouss Y, Gosselin J, Poisson J, Sheppard D, Beaulieu JF

Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines, *Int J Cancer.* 1998 Mar 2;75(5):738-43

Bélangier A, Hum DW, Beaulieu M, Lévesque E, Guillemette C, Tchernof A, Bélangier G, Turgeon D, Dubois S

Characterization and regulation of UDP-glucuronosyltransferases in steroid target tissues, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1998 Apr; 65(1-6):301-10

Béliveau Prof. Dr. med. Richard, Gingras Dr. med. Denis

Krebszellen mögen keine Himbeeren, Kösel-Verlag; Auflage, 11. Auflage 2008

Berenblum I, Shubik P

A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin, *Br J Cancer* 1947 Dec; 1(4):383-91

Bergers G, Benjamin LE

Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun; 3(6):401-10.

Benedetti A, Parent ME, Siemiatycki J

Lifetime consumption of alcoholic beverages and risk of 13 types of cancer in men: results from a case-control study in Montreal, *Cancer Detect Prev.* 2009; 32(5-6):352-62

Biesalki HK., Fürst P., Kasper H., Kluthe R., Pöler W., Puchstein Ch., Stähelin HB

Ernährungsmedizin, Thieme Verlag 2004, 3te Auflage

Bingham SA

Meat, starch, and nonstarch polysaccharides and large bowel cancer, *Am J Clin Nutr.* 1988 Sep; 48(3 Suppl):762-7

Bingham SA, Pignatelli B, Pollock JR, Ellul A, Malaveille C, Gross G, Runswick S, Cummings JH, O'Neill IK

Does increased endogenous formation of N-nitroso compounds in the human colon explain the association between red meat and colon cancer?, *Carcinogenesis.* 1996 Mar; 17(3):515-23

Bingham SA, Hughes R, Cross AJ

Effect of white versus red meat on endogenous N-nitrosation in the human colon and further evidence of a dose response, *J Nutr.* 2002 Nov;132(11 Suppl):3522S-3525S

Bird RP, Medline A, Furrer R, Bruce WR

Toxicity of orally administered fat to the colonic epithelium of mice, *Carcinogenesis* 1985 Jul; 6(7):1063-6.

Bird RP

Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings, *Cancer Lett.* 1987 Oct 30; 37(2):147-51

Blowers SD, Anderson D

The in vivo genotoxic properties of the nitropeptide N-(N-acetyl-L-prolyl)-N-nitrosoglycine, *Food Chem Toxicol.* 1988 Sep; 26(9):785-90

Boateng J, Verghese M, Chawan CB, Shackelford L, Walker LT, Khatiwada J, Williams DS

Red palm oil suppresses the formation of azoxymethane (AOM) induced aberrant crypt foci (ACF) in Fisher 344 male rats, *Food Chem Toxicol.* 2006 Oct; 44(10):1667-73

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P

Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis, *JAMA.* 2008 Dec 17; 300(23):2765-78

Bruce WR

Recent hypotheses for the origin of colon cancer, *Cancer Res.* 1987 Aug 15;47(16):4237-42.

Byrne C, Sinha R, Platz EA, Giovannucci E, Colditz GA, Hunter DJ, Speizer FE, Willett WC

Predictors of dietary heterocyclic amine intake in three prospective cohorts, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun; 7 (6):523-9

Cairns RA, Khokha R, Hill RP

Molecular mechanisms of tumor invasion and metastasis: an integrated view, *Curr Mol Med*. 2003 Nov; 3(7):659-71

Calmels S, Ohshima H, Vincent P, Gounot AM, Bartsch H

Screening of microorganisms for nitrosation catalysis at pH 7 and kinetic studies on nitrosamine formation from secondary amines by *E. coli* strains, *Carcinogenesis* 1985 Jun; 6(6):911-5

Calmels S, Ohshima H, Crespi M, Leclerc H, Cattoen C, Bartsch H

N-nitrosamine formation by microorganisms isolated from human gastric juice and urine: biochemical studies on bacteria-catalysed nitrosation, *IARC Sci Publ*. 1987; (84):391-5

Calmels S, Ohshima H, Bartsch H

Nitrosamine formation by denitrifying and non-denitrifying bacteria: implication of nitrite reductase and nitrate reductase in nitrosation catalysis, *J Gen Microbiol*. 1988 Jan; 134(1):221-6

Calmels S, Ohshima H, Henry Y, Bartsch H

Characterization of bacterial cytochrome cd(1)-nitrite reductase as one enzyme responsible for catalysis of nitrosation of secondary amines, *Carcinogenesis* 1996 Mar; 17(3):533-6

Cameron TP, Hickman RL, Kornreich MR, Tarone RE

History, survival, and growth patterns of B6C3F1 mice and F344 rats in the National Cancer Institute Carcinogenesis Testing Program, *Fundam Appl Toxicol* 1985 Jun;5(3):526-38.

Challis BC, Hopkins AR, Milligan JR, Massey RC, Anderson D, Blowers SD

The mutagenic properties of N-nitrosopeptides in the Ames test, *Toxicol Lett*. 1985 Aug; 26(2-3):89-93

Challis BC

Chemistry and biology of nitrosated peptides, *Cancer Surv*. 1989; 8(2):363-84

Chao A, Thun MJ, Connell CJ, McCullough ML, Jacobs EJ, Flanders WD, Rodriguez C, Sinha R, Calle EE

Meat consumption and risk of colorectal cancer, *JAMA*. 2005 Jan 12; 293(2):172-82

Cohen SM, Ellwein LB

Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis, *Cancer Res*. 1991 Dec 15; 51(24):6493-505

Cole BF, Baron JA, Sandler RS

Folic acid for the prevention of colorectal adenomas: a randomized clinical trial, *Jama* 2007, 297(21):2351-2359

Coleman GL, Barthold W, Osbaldiston GW, Foster SJ, Jonas AM

Pathological changes during aging in barrier-reared Fischer 344 male rats, *J Gerontol*. 1977 May; 32(3):258-78.

Coleman WB, Tsongalis GJ

Multiple mechanisms account for genomic instability and molecular mutation in neoplastic transformation, *Clin Chem*. 1995 May; 41(5):644-57.

Conolly RB, Gaylor DW, Lutz WK

Population variability in biological adaptive responses to DNA damage and the shapes of carcinogen dose-response curves, *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 1; 207(2 Suppl):570-5.

Correa P

Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process--First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention, *Cancer Res*. 1992 Dec 15; 52(24):6735-40

Crofts FG, Sutter TR, Strickland PT

Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1, *Carcinogenesis*. 1998 Nov; 19(11):1969-73

Cross AJ, Pollock JR, Bingham SA

Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat, *Cancer Res.* 2003 May 15; 63(10):2358-60

Cross AJ, Sinha R

Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer, *Environ Mol Mutagen.* 2004; 44(1):44-55

Cupid BC, Zeng Z, Singh R, Shuker DE

Detection of O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine in DNA following reaction of nitric oxide with glycine and in human blood DNA using a quantitative immunoslot blot assay, *Chem Res Toxicol.* 2004 Mar; 17(3):294-300

Dashwood RH, Suzui M, Nakagama H, Sugimura T, Nagao M

High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat, *Cancer Res.* 1998 Mar 15; 58(6):1127-9

Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF

The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B, *Mol Cell Biol.* 1997 Apr;17(4):2030-7.

Di Cristofano A, Pandolfi PP

The multiple roles of PTEN in tumor suppression, *Cell* 2000 Feb 18;100(4):387-90

Di Gregorio C, Losi L, Fante R, Modica S, Ghidoni M, Pedroni M, Tamassia MG, Gafà L, Ponz de Leon M, Roncucci L

Histology of aberrant crypt foci in the human colon, *Histopathology.* 1997 Apr; 30(4):328-34

Dingley KH, Curtis KD, Nowell S, Felton JS, Lang NP, Turteltaub KW

DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999 Jun; 8(6):507-12

DiPaolo JA, Takano K, Popescu NC

Quantitation of chemically induced neoplastic transformation of BALB-3T3 cloned cell lines, *Cancer Res.* 1972 Dec; 32(12):2686-95

Dodge GR, Kovalszky I, Hassell JR, Iozzo RV

Transforming growth factor beta alters the expression of heparan sulfate proteoglycan in human colon carcinoma cells, *J Biol Chem.* 1990 Oct 15; 265(29):18023-9

Doi K, Wanibuchi H, Salim EI, Morimura K, Kinoshita A, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S

Lack of large intestinal carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine at low doses in rats initiated with azoxymethane, *Int J Cancer.* 2005 Jul 20; 115(6):870-8

Drasar BS, Irving D

Environmental factors and cancer of the colon and breast, *Br J Cancer* 1973 Feb; 27(2):167-72

Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN

Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas, *Gastroenterology* 1994 Oct;107(4):1183-8.

Elledge SJ

Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis, *Science.* 1996 Dec 6; 274(5293):1664-72.

Ellis LM

Tumor Angiogenesis, *Surgical Research*, 2001, 401-413

Elsner F

Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows, Grundlegende Konzepte und Techniken, Version 2.7; Feb. 2009

Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Sugimura T

Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, Jpn J Cancer Res. 1989 Dec; 80(12):1176-8

Exon JH, South EH, Taruscio TG, Clifton GD, Fariss MW

Chemopreventive effect of dietary d-alpha-tocopheryl succinate supplementation on precancer colon aberrant crypt formation and vitamin E analogue levels in young and old rats, Nutr Cancer 2004; 49(1):72-80

Feldser DM, Hackett JA, Greider CW

Telomere dysfunction and the initiation of genome instability, Nat Rev Cancer 2003 Aug; 3(8):623-7.

Felton JS, Knize MG, Wood C, Wuebbles BJ, Healy SK, Stuermer DH, Bjeldanes LF, Kimble BJ, Hatch FT

Isolation and characterization of new mutagens from fried ground beef, Carcinogenesis 1984 Jan;5(1):95-102

Felton JS, Knize MG, Shen NH, Lewis PR, Andresen BD, Happe J, Hatch FT

The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), Carcinogenesis 1986 Jul; 7(7):1081-6

Frandsen H, Grivas S, Andersson R, Dragsted L, Larsen JC

Reaction of the N2-acetoxy derivative of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) with 2'-deoxyguanosine and DNA. Synthesis and identification of N2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-PhIP, Carcinogenesis. 1992 Apr; 13(4):629-35

Frei B

Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action, Am J Med. 1994 Sep 26; 97(3A):5S-13S; discussion 22S-28S

Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H

Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, Carcinogenesis 2004 Aug; 25(8):1495-505

Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Nakae D, Kishida H, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F

Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, Toxicol Sci. 2004 Jul; 80(1):109-14

Gavert N, Ben-Ze'ev A

beta-Catenin signaling in biological control and cancer, J Cell Biochem 2007 Nov 1;102(4):820-8.

Glatt H, Engelke CE, Pabel U, Teubner W, Jones AL, Coughtrie MW, Andrae U, Falany CN, Meini W

Sulfotransferases: genetics and role in toxicology, Toxicol Lett. 2000 Mar 15; 112-113:341-8

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC

Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men, Cancer Res. 1994 May 1; 54(9):2390-7.

Goldbohm RA, van den Brandt PA, van 't Veer P, Brants HA, Dorant E, Sturmans F, Hermus RJ

A prospective cohort study on the relation between meat consumption and the risk of colon cancer, Cancer Res. 1994 Feb 1; 54(3):718-23.

Gollin SM

Mechanisms leading to chromosomal instability, *Semin Cancer Biol.* 2005 Feb;15(1):33-42.

Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS

Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats, *Toxicol Appl Pharmacol.* 1979 Apr; 48(2):237-48.

Gottschalg E, Scott GB, Burns PA, Shuker DE

Potassium diazoacetate-induced p53 mutations in vitro in relation to formation of O6-carboxymethyl- and O6-methyl-2'-deoxyguanosine DNA adducts: relevance for gastrointestinal cancer, *Carcinogenesis* 2007 Feb; 28(2):356-62

Grady WM, Carethers JM

Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis, *Gastroenterology* 2008 Oct; 135(4):1079-99. Epub 2008 Sep 4.

Graf E, Eaton JW

Dietary suppression of colonic cancer: Fiber or phytate? *Cancer.* 1985 Aug 15; 56(4):717-8

Graham S, Marshall J, Haughey B, Mittelman A, Swanson M, Zielezny M, Byers T, Wilkinson G, West D

Dietary epidemiology of cancer of the colon in western New York, *Am J Epidemiol* 1988 Sep; 128(3):490-503

Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, Roberts HR, Williams AC, Paraskeva C, Kaidi A

The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment, *Carcinogenesis* 2009 Mar; 30(3):377-86. Epub 2009 Jan 9.

Gross GA, Turesky RJ, Fay LB, Stillwell WG, Skipper PL, Tannenbaum SR

Heterocyclic aromatic amine formation in grilled bacon, beef and fish and in grill scrapings, *Carcinogenesis* 1993 Nov;14(11):2313-8.

Guengerich FP, MacDonald TL

Mechanisms of cytochrome P-450 catalysis, *FASEB J.* 1990 May; 4(8):2453-9

Guengerich FP, Hosea NA, Parikh A, Bell-Parikh LC, Johnson WW, Gillam EM, Shimada T

Twenty years of biochemistry of human P450s: purification, expression, mechanism, and relevance to drugs, *Drug Metab Dispos.* 1998 Dec; 26(12):1175-8

Hagiwara A, Miyashita K, Nakanishi T, Sano M, Tamano S, Kadota T, Koda T, Nakamura M, Imaida K, Ito N, Shirai T

Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine, *Cancer Lett* 2001 Sep 28; 171(1):17-25

Hagiwara A, Yoshino H, Ichihara T, Kawabe M, Tamano S, Aoki H, Koda T, Nakamura M, Imaida K, Ito N, Shirai T

Prevention by natural food anthocyanins, purple sweet potato color and red cabbage color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in rats initiated with 1,2-dimethylhydrazine, *J Toxicol Sci.* 2002 Feb; 27(1):57-68

Hall CN, Badawi AF, O'Connor PJ, Saffhill R

The detection of alkylation damage in the DNA of human gastrointestinal tissues, *Br J Cancer* 1991 Jul; 64(1):59-63

Halle M, Schoenberg MH

Physical activity in the prevention and treatment of colorectal carcinoma, *Dtsch Arztebl Int.* 2009 Oct; 106 (44):722-7

Hanahan D, Weinberg RA

The hallmarks of cancer, *Cell*. 2000 Jan 7; 100(1):57-70.

Hannon GJ, Beach D

p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest, *Nature* 1994 Sep 15;371(6494):257-61.

Hao XP, Willis JE, Pretlow TG, Rao JS, MacLennan GT, Talbot IC, Pretlow TP

Loss of fragile histidine triad expression in colorectal carcinomas and premalignant lesions, *Cancer Res*. 2001 Jan 1; 60(1):18-21

Harlozinska A

Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis, *Anticancer Res*. 2005 Sep-Oct; 25(5):3327-33.

Harrison KL, Fairhurst N, Challis BC, Shuker DE

Synthesis, characterization, and immunochemical detection of O6-(carboxymethyl)-2'-deoxyguanosine: a DNA adduct formed by nitrosated glycine derivatives, *Chem Res Toxicol*. 1997 Jun; 10(6):652-9

Harrison KL, Jukes R, Cooper DP, Shuker DE

Detection of concomitant formation of O6-carboxymethyl- and O6-methyl-2'-deoxyguanosine in DNA exposed to nitrosated glycine derivatives using a combined immunoaffinity/HPLC method, *Chem Res Toxicol*. 1999 Jan; 12(1):106-11

Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Imaida K, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, Ito N

Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats *Carcinogenesis* 1993 Dec; 14(12):2553-7

Hein DW, Rustan TD, Bucher KD, Furman EJ, Martin WJ

Extrahepatic expression of the N-acetylation polymorphism toward arylamine carcinogens in tumor target organs of an inbred rat model, *J Pharmacol Exp Ther*. 1991 Jul 1; 258(1):232-6.

Hein DW, Rustan TD, Ferguson RJ, Doll MA, Gray K

Metabolic activation of aromatic and heterocyclic N-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases, *Arch Toxicol*. 1994; 68(2):129-33

Hein DW, Doll MA, Fretland AJ, Leff MA, Webb SJ, Xiao GH, Devanaboyina US, Nangju NA, Feng Y

Molecular genetics and epidemiology of the NAT1 and NAT2 acetylation polymorphisms, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000 Jan; 9(1):29-42

Hennekens CH

Antioxidant vitamins and cancer, *Am J Med*. 1994 Sep 26; 97(3A):2S-4S

Holme JA, Hongslo JK, S derlund E, Brunborg G, Christensen T, Alexander J, Dybing E

Comparative genotoxic effects of IQ and MeIQ in *Salmonella typhimurium* and cultured mammalian Cells, *Mutat Res*. 1987 Apr; 187(4):181-90

Holt PR

New insights into calcium, dairy and colon cancer, *World J Gastroenterol* 2008 Jul 28; 14(28):4429-33

Hu FB, Willett WC

Optimal diets for prevention of coronary heart disease, *JAMA*. 2002 Nov 27; 288(20):2569-78

Hughes R, Cross AJ, Pollock JR, Bingham S

Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic N-nitrosation, *Carcinogenesis* 2001 Jan; 22(1):199-202

IARC/NCI/EPA Working Group

Cellular and molecular mechanisms of cell transformation and standardization of transformation assay of established cell lines for the prediction of carcinogenic chemicals: overview and recommended protocols, *Cancer Res.* 1985, 45, 2395 - 2399

Inaguma S, Takahashi S, Ohnishi H, Suzuki S, Cho YM, Shirai T

High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis, *Cancer Sci.* 2003 Nov; 94(11):974-9

International Agency for Research on Cancer (IARC)

Summaries & Evaluations, 1993, (56) 229 oder <http://www.inchem.org/>

Internetquellen

<http://www.dkfz.de>

Ito N, Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Esumi H, Takayama S, Sugimura T

A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), *Carcinogenesis.* 1991 Aug; 12(8):1503-6

Jain RK

Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor, *Semin Oncol.* 2002 Dec;29(6 Suppl 16):3-9.

Kaderlik KR, Minchin RF, Mulder GJ, Ilett KF, Daugaard-Jenson M, Teitel CH, Kadlubar FF

Metabolic activation pathway for the formation of DNA adducts of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in rat extrahepatic tissues. *Carcinogenesis.* 1994 Aug; 15(8):1703-9

Kadlubar FF, Butler MA, Kaderlik KR, Chou HC, Lang NP

Polymorphisms for aromatic amine metabolism in humans: relevance for human carcinogenesis, *Environ Health Perspect.* 1992 Nov; 98:69-74

Kaidi A, Qualtrough D, Williams AC, Paraskeva C

Direct transcriptional up-regulation of cyclooxygenase-2 by hypoxia-inducible factor (HIF)-1 promotes colorectal tumor cell survival and enhances HIF-1 transcriptional activity during hypoxia, *Cancer Res.* 2006 Jul 1; 66(13):6683-91.

Kakiuchi H, Watanabe M, Ushijima T, Toyota M, Imai K, Weisburger JH, Sugimura T, Nagao M

Specific 5'-GGGA-3'-->5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Jan 31; 92(3):910-4

Kakunaga T, Crow JD

Cell variants showing differential susceptibility to ultraviolet light--induced transformation *Science* 1980 Jul 25; 209 (4455):505-7

Key TJ, Schatzkin A, Willett WC, Allen NE, Spencer EA, Travis RC

Diet, nutrition and the prevention of cancer, *Public Health Nutr* 2004 Feb; 7 (1A):187-200

Kim DY, Chung KH, Lee JH

Stimulatory effects of high-fat diets on colon cell proliferation depend on the type of dietary fat and site of the colon, *Nutr Cancer* 1998; 30(2):118-23

Kim YI

Folate and colorectal cancer: an evidence-based critical review, *Mol Nutr Food Res* 2007 51(3): 267-292

Kim J, Ng J, Arozullah A, Ewing R, Llor X, Carroll RE, Benya RV

Aberrant crypt focus size predicts distal polyp histopathology, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008 May; 17(5):1155-62

Kim MS, Lee J, Sidransky D

DNA methylation markers in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 2010 Mar; 29(1):181-206.

Kitchin KT, Brown JL

Dose-response relationship for rat liver DNA damage caused by 49 rodent carcinogens, *Toxicology* 1994 Mar 11; 88(1-3):31-49

Kleczkowska HE, Althaus FR

Response of human keratinocytes to extremely low concentrations of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, *Mutat Res.* 1996 Mar 1; 367 (3):151-9

Knize MG, Shen NH, Felton JS

A comparison of mutagen production in fried ground chicken and beef: effect of supplemental creatine. *Mutagenesis* 1988 Nov; 3 (6):503-8

Knize MG, Kulp KS, Salmon CP, Keating GA, Felton JS

Factors affecting human heterocyclic amine intake and the metabolism of PhIP, *Mutat Res.* 2002 Sep 30; 506-507:153-62

Kondraganti SR, Muthiah K, Jiang W, Barrios R, Moorthy B

Effects of 3-methylcholanthrene on gene expression profiling in the rat using cDNA microarray analyses, *Chem Res Toxicol.* 2005 Nov; 18 (11):1634-41

Kristiansen E

The role of aberrant crypt foci induced by the two heterocyclic amines 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the development of colon cancer in mice, *Cancer Lett.* 1996 Dec 20; 110 (1-2):187-92

Kühnel D, Taugner F, Scholtka B, Steinberg P

Inflammation does not precede or accompany the induction of preneoplastic lesions in the colon of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-fed rats, *Arch Toxicol.* 2009 Aug; 83(8):763-8

Kuhnle GG, Story GW, Reda T, Mani AR, Moore KP, Lunn JC, Bingham SA

Diet-induced endogenous formation of nitroso compounds in the GI tract, *Free Radic Biol Med.* 2007 Oct 1;43 (7):1040-7

Kyrtopoulos SA, Vrotsou B, Golematis B, Bonatsos M, Lakiotis G

O6-Methylguanine-DNA transmethylase activity in extracts of human gastric mucosa, *Carcinogenesis* 1984 Jul; 5(7):943-7

Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce MC, Kinzler KW, Vogelstein B

Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC, *Nat Genet.* 1997 Sep; 17(1):79-83

Landgraf KE, Pilling C, Falke JJ

Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain, *Biochemistry* 2008 Nov 25; 47(47):12260-9.

Lapré JA, De Vries HT, Van der Meer R

Cytotoxicity of fecal water is dependent on the type of dietary fat and is reduced by supplemental calcium phosphate in rats, *J Nutr.* 1993 Mar; 123(3):578-85.

Layrisse M, Cook JD, Martinez C, Roche M, Kuhn IN, Walker RB, Finch CA

Food iron absorption: a comparison of vegetable and animal foods, *Blood* 1969 Mar; 33(3):430-43.

Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS

Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research, *Carcinogenesis* 1995 Jan; 16(1):39-52

Leach SA, Cook AR, Challis BC, Hill MJ, Thompson MH

Bacterially mediated N-nitrosation reactions and endogenous formation of N-nitroso compounds, *IARC Sci Publ.* 1987; (84):396-9

Lee DY, Chapkin RS, Lupton JR

Dietary fat and fiber modulate colonic cell proliferation in an interactive site-specific manner, *Nutr Cancer.* 1993; 20 (2):107-18

Lee IM

Antioxidant vitamins in the prevention of cancer, *Proc Assoc Am Physicians.* 1999 Jan-Feb; 111(1):10-15

Le Marchand L, Wilkens LR, Kolonel LN, Hankin JH, Lyu LC

Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer, *Cancer Res.* 1997 Nov 1; 57(21):4787-94.

Lin D, Kaderlik KR, Turesky RJ, Miller DW, Lay JO Jr, Kadlubar FF

Identification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, with DNA, *Chem Res Toxicol.* 1992 Sep-Oct; 5(5):691-7

Lindner MA

A fish oil diet inhibits colon cancer in mice, *Nutr Cancer.* 1991; 15(1):1-11

Lindsey JR

Historical foundations In *The Laboratory Rat Vol. 1, Biology and Diseases* (H. J. Baker, J. R. Lindsey, and S. H. Weisbroth, eds.), pp.2-33. Academic Press, 1979 New York.

Liu G

Ethyl Diazoacetate (EDA), *Synlett* 2008, No 17: 2721 – 2722

Mareel M, Leroy A

Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion, *Physiol Rev.* 2003 Apr; 83(2):337-76.

Margison GP, Santibáñez Koref MF, Povey AC

Mechanisms of carcinogenicity/chemotherapy by O6-methylguanine, *Mutagenesis* 2002 Nov; 17(6):483-7

Marquardt H, Schäfer S

Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2te Auflage, 2004

Martínez ME, Giovannucci E, Spiegelman D, Hunter DJ, Willett WC, Colditz GA

Leisure-time physical activity, body size, and colon cancer in women. Nurses' Health Study Research Group, *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jul 2; 89(13):948-55

Mascolo MG, Perdichizzi S, Rotondo F, Morandi E, Guerrini A, Silingardi P, Vaccari M, Grilli S, Colacci A

BALB/c 3T3 cell transformation assay for the prediction of carcinogenic potential of chemicals and environmental mixtures, *Toxicol In Vitro.* 2010 Jun; 24 (4):1292-300

Mason JB, Dickstein A, Jacques PF

A temporal association between folic acid fortification and an increase in colorectal cancer rates may be illuminating important biological principles: a hypothesis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007, 16(7): 1325-1329

Massey RC, Key PE, Mallett AK, Rowland IR

An investigation of the endogenous formation of apparent total N-nitroso compounds in conventional microflora and germ-free rats, *Food Chem Toxicol.* 1988 Jul; 26(7):595-600

Mendelsohn J, Baselga J

Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer, *J Clin Oncol* 2003 Jul 15; 21(14):2787-99.

Mendelsohn J, Baselga J

Epidermal growth factor receptor targeting in cancer, *Semin Oncol.* 2006 Aug; 33(4):369-85.

Meyer AL

In vitro transformation assays for chemical carcinogens, *Mutat Res.* 1983 Aug; 115(3):323-38

Miller EC

Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address, *Cancer Res.* 1978 Jun; 38(6):1479-96

Minoura T, Takata T, Sakaguchi M, Takada H, Yamamura M, Hioki K, Yamamoto M

Effect of dietary eicosapentaenoic acid on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats, *Cancer Res.* 1988 Sep 1; 48(17):4790-4

Mirvish SS

Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC, *Cancer Lett.* 1995 Jun 29; 93(1):17-48

Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M

Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors, *Cancer Res.* 1994 Jun 1; 54(11):3011-20

Miyata M, Takano H, Takahashi K, Sasaki YF, Yamazoe Y

Suppression of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine-induced DNA damage in rat colon after grapefruit juice intake, *Cancer Lett* 2002 Sep 8; 183(1):17-22

Moonen HJ, Dommels YE, van Zwam M, van Herwijnen MH, Kleinjans JC, Alink GM, de Kok TM

Effects of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-mediated DNA adduct formation by heterocyclic aromatic amines in human adenocarcinoma colon cells, *Mol Carcinog.* 2004 Jul; 40(3):180-8

Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW

Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC, *Science.* 1997 Mar 21; 275(5307):1787-90

Müller E

Über Pseudodiazoessigsäure

Mitteilung aus dem Chem. Institut der Universität Heidelberg, August 1908, 41(2); 3116 - 3139

Nagao M, Ochiai M, Ushijima T, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H

Genetic determinant and environmental carcinogens, *Mutat Res.* 1998 Jun 18; 402(1-2):85-91

Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Ishiguro Y, Sugimura T, Nagao M

Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine, PhIP, *Cancer Lett* 1999 Sep 1; 143(2):205-9

Nakagama H, Ochiai M, Ubagai T, Tajima R, Fujiwara K, Sugimura T, Nagao M

A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP, *Mutat Res.* 2002 Sep 30; 506-507:137-44

Newmark HL, Wargovich MJ, Bruce WR

Colon cancer and dietary fat, phosphate, and calcium: a hypothesis, *J Natl Cancer Inst.* 1984 Jun; 72(6):1323-5.

Nicholson ML, Neoptolemos JP, Clayton HA, Talbot IC, Bell PR

Inhibition of experimental colorectal carcinogenesis by dietary N-6 polyunsaturated fats, *Carcinogenesis* 1990 Dec; 11(12):2191-7

Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E

Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies, *Int J Cancer.* 2002 Mar 10; 98(2):241-56

Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, Mazuir M, Overvad K, Olsen A, Tjønneland A, Clavel F, Boutron-Ruault MC, Kesse E, Boeing H, Bergmann MM, Nieters A, Linseisen J, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Tountas Y, Berrino F, Palli D, Panico S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Peeters PH, Engeset D, Lund E, Skeie G, Ardanaz E, González C, Navarro C, Quirós JR, Sanchez MJ, Berglund G, Mattisson I, Hallmans G, Palmqvist R, Day NE, Khaw KT, Key TJ, San Joaquin M, Hémon B, Saracci R, Kaaks R, Riboli E

Meat, fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jun 15; 97(12):906-16

Nowell PC

The clonal evolution of tumor cell populations, *Science* 1976 Oct 1; 194(4260):23-8

Nozawa H, Tazumi K, Sato K, Yoshida A, Takata J, Arimoto-Kobayashi S, Kondo K

Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon, *Mutat Res.* 2004 Apr 11; 559(1-2):177-87

Nunney L

The population genetics of multistage carcinogenesis, *Proc Biol Sci.* 2003 Jun 7; 270(1520):1183-91.

Ochiai M, Watanabe M, Kushida H, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M

DNA adduct formation, cell proliferation and aberrant crypt focus formation induced by PhIP in male and female rat colon with relevance to carcinogenesis, *Carcinogenesis.* 1996a Jan; 17(1):95-8

Ochiai M, Nakagama H, Watanabe M, Ishiguro Y, Sugimura T, Nagao M

Efficient method for rapid induction of aberrant crypt foci in rats with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Jpn J Cancer Res.* 1996b Oct; 87(10):1029-33

Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H

Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, *Am J Pathol.* 2003 Oct; 163(4):1607-14

O'Driscoll M, Macpherson P, Xu YZ, Karran P

The cytotoxicity of DNA carboxymethylation and methylation by the model carboxymethylating agent azaserine in human cells, *Carcinogenesis* 1999 Sep; 20 (9):1855-62

Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM

Suppression of intestinal polyposis in *Apc delta716* knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2), *Cell.* 1996 Nov 29; 87(5):803-9.

Ostling O, Johanson KJ

Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Aug 30; 123(1):291-8

Pathak S, Multani AS, Furlong CL, Sohn SH

Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer, *Int J Oncol.* 2002 Mar; 20(3):637-41.

Paulsen JE, Steffensen IL, Namork E, Alexander J

Scanning electron microscopy of aberrant crypt foci in rat colon, *Carcinogenesis*. 1994 Oct; 15(10):2371-3

Perreault N, Vachon PH, Beaulieu JF

Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa, *Anat Rec*. 1995 Jun; 242(2):242-50

Pierre F, Taché S, Petit CR, Van der Meer R, Corpet DE

Meat and cancer: haemoglobin and haemin in a low-calcium diet promote colorectal carcinogenesis at the aberrant crypt stage in rats, *Carcinogenesis*. 2003 Oct; 24(10):1683-90

Pischon T, Lahmann PH, Boeing H, Friedenreich C, Norat T, Tjønneland A, Halkjaer J, Overvad K, Clavel-Chapelon F, Boutron-Ruault MC, Guerne G, Bergmann MM, Linseisen J, Becker N, Trichopoulou A, Trichopoulos D, Sieri S, Palli D, Tumino R, Vineis P, Panico S, Peeters PH, Bueno-de-Mesquita HB, Boshuizen HC, Van Guelpen B, Palmqvist R, Berglund G, Gonzalez CA, Dorransoro M, Barricarte A, Navarro C, Martinez C, Quirós JR, Roddam A, Allen N, Bingham S, Khaw KT, Ferrari P, Kaaks R, Slimani N, Riboli E

Body size and risk of colon and rectal cancer in the European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC), *J Natl Cancer Inst*. 2006 Jul 5; 98 (13):920-31

Polakis P

Wnt signaling and cancer, *Genes Dev*. 2000 Aug 1; 14(15):1837-51.

Potten CS, Allen TD

Ultrastructure of cell loss in intestinal mucosa, *J Ultrastruct Res*. 1977 Aug; 60(2):272-7

Potten CS, Wilson JW, Booth C

Regulation and significance of apoptosis in the stem cells of the gastrointestinal epithelium, *Stem Cells*. 1997; 15(2):82-93

Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurcisek JA, Stellato TA

Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa, *Cancer Res*. 1991 Mar 1; 51(5):1564-7

Pretlow TP, O'Riordan MA, Somich GA, Amini SB, Pretlow TG

Aberrant crypts correlate with tumor incidence in F344 rats treated with azoxymethane and phytate. *Carcinogenesis* 1992 Sep; 13(9):1509-12

Pretlow TP, Roukhadze EV, O'Riordan MA, Chan JC, Amini SB, Stellato TA

Carcinoembryonic antigen in human colonic aberrant crypt foci, *Gastroenterology*. 1994 Dec; 107(6):1719-25

Przybyszewski J, Box HC, Kulesz-Martin M

Induction of reactive oxygen species without 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA of initiated mouse keratinocytes treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Carcinogenesis* 1998 Aug; 19(8):1467-74

Purewal M, Fretland AJ, Schut HA, Hein DW, Wargovich MJ

Association between acetylator genotype and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) DNA adduct formation in colon and prostate of inbred Fischer 344 and Wistar Kyoto rats, *Cancer Lett*. 2000a Feb 28; 149(1-2):53-60

Purewal M, Velasco M, Fretland AJ, Hein DW, Wargovich MJ

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine induces a higher number of aberrant crypt foci in Fischer 344 (rapid) than in Wistar Kyoto (slow) acetylator inbred rats, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000b May; 9(5):529-32

Raju J

Azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci: relevance in studying chemoprevention of colon cancer, *World J. Gastroenterol.* 2008 Nov 21; 14(43):6632-5

Renehan AG, Bach SP, Potten CS

The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine, *Can J Gastroenterol* 2001 Mar;15(3):166-76.

Reznikoff CA, Bertram JS, Brankow DW, Heidelberger C

Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division, *Cancer Res.* 1973 Dec; 33(12):3239-49

Rieger MA, Parlesak A, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G, Bode C

A diet high in fat and meat but low in dietary fibre increases the genotoxic potential of 'faecal water'. *Carcinogenesis.* 1999 Dec; 20(12):2311-6

Robert Koch-Institut und Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.
Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2005/2006
Häufigkeiten und Trends, 7. Ausgabe 2010

Robert-Koch-Institut

Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland, ISBN 978-3-89606-208-6, Broschüre vom 23.02.2010

Robertson FM, Beavis AJ, Oberyzyzyn TM, O'Connell SM, Dokidos A, Laskin DL, Laskin JD, Reiners JJ Jr

Production of hydrogen peroxide by murine epidermal keratinocytes following treatment with the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Cancer Res.* 1990 Sep 15; 50(18):6062-7

Rohrmann S, Becker N

Die Aufnahme heterozyklischer aromatischer Amine in Deutschland, *Ernährungsumschau* 48:2005, 447-450

Rohrmann S, Zoller D, Hermann S, Linseisen J

Intake of heterocyclic aromatic amines from meat in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Heidelberg cohort, *Br J Nutr.* 2007 Dec; 98 (6):1112-5

Roncucci L, Stamp D, Medline A, Cullen JB, Bruce WR

Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon, *Hum Pathol.* 1991 Mar; 22 (3):287-94

Sakai A

BALB/c 3T3 cell transformation assays for the assessment of chemical carcinogenicity, *AATEX* 2007, 14, Special Issue, 367-373

Sandhu MS, White IR, McPherson K

Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 May; 10 (5):439-46

Sawa T, Akaike T, Kida K, Fukushima Y, Takagi K, Maeda H

Lipid peroxyl radicals from oxidized oils and heme-iron: implication of a high-fat diet in colon carcinogenesis, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Nov;7(11):1007-12.

Schmidt R, Thews G, Lang F. (alle Herausgeber)

Physiologie des Menschen, 28. Auflage 2000

Schwartz S, Ellefson M

Quantitative fecal recovery of ingested hemoglobin-heme in blood: comparisons by HemoQuant assay with ingested meat and fish, *Gastroenterology.* 1985 Jul; 89 (1):19-26

Segditsas S, Tomlinson I

Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway, *Oncogene* 2006 Dec 4;25(57):7531-7.

Sesink AL, Termont DS, Kleibeuker JH, Van der Meer R

Red meat and colon cancer: the cytotoxic and hyperproliferative effects of dietary heme, *Cancer Res.* 1999 Nov 15; 59(22):5704-9.

Shamsuddin AK, Weiss L, Phelps PC, Trump BF

Colon epithelium. IV. Human colon carcinogenesis. Changes in human colon mucosa adjacent to and remote from carcinomas of the colon, *J Natl Cancer Inst.* 1981 Feb; 66 (2):413-9

Shanmugathan M, Jothy S

Apoptosis, anoikis and their relevance to the pathobiology of colon cancer, *Pathol Int.* 2000 Apr; 50 (4):273-9

Shioya M, Wakabayashi K, Sato S, Nagao M, Sugimura T

Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose, *Mutat Res.* 1987 Jul-Aug; 191 3-4):133-8

Shirai T, Sano M, Tamano S, Takahashi S, Hirose M, Futakuchi M, Hasegawa R, Imaida K, Matsumoto K, Wakabayashi K, Sugimura T, Ito N

The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods, *Cancer Res.* 1997 Jan 15; 57(2):195-8

Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Grankin M, Bernheim J

Proliferating cell nuclear antigen as a marker of cell kinetics in aberrant crypt foci, hyperplastic polyps, adenomas, and adenocarcinomas of the human colon, *Am J Surg.* 1997 Oct; 174(4):425-30

Shpitz B, Bomstein Y, Mekori Y, Cohen R, Kaufman Z, Neufeld D, Galkin M, Bernheim J

Aberrant crypt foci in human colons: distribution and histomorphologic characteristics, *Hum Pathol.* 1998 May; 29(5):469-75

Shuker DE, Margison GP

Nitrosated glycine derivatives as a potential source of O6-methylguanine in DNA, *Cancer Res.* 1997 Feb 1; 57 (3):366-9

Silvester KR, Bingham SA, Pollock JR, Cummings JH, O'Neill IK

Effect of meat and resistant starch on fecal excretion of apparent N-nitroso compounds and ammonia from the human large bowel, *Nutr Cancer.* 1997; 29(1):13-23

Silvester KR, Cummings JH

Does digestibility of meat protein help explain large bowel cancer risk?, *Nutr Cancer.* 1995; 24(3):279-88

Sim E, Payton M, Noble M, Minchin R

An update on genetic, structural and functional studies of arylamine N-acetyltransferases in eucaryotes and prokaryotes, *Hum Mol Genet.* 2000 Oct; 9(16):2435-41

Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, Levander OA, Knize MG, Lang NP, Kadlubar FF

Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans, *Cancer Res.* 1994 Dec 1; 54 (23):6154-9

Sinha R, Rothman N, Brown ED, Salmon CP, Knize MG, Swanson CA, Rossi SC, Mark SD, Levander OA, Felton JS

High concentrations of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-b]pyridine (PhIP) occur in chicken but are dependent on the cooking method, *Cancer Res.* 1995 Oct 15; 55(20):4516-9

Sinha R, Chow WH, Kulldorff M, Denobile J, Butler J, Garcia-Closas M, Weil R, Hoover RN, Rothman N

Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas, *Cancer Res.* 1999 Sep 1; 59(17):4320-4

Sinha R, Kulldorff M, Chow WH, Denobile J, Rothman N

Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001 May; 10(5):559-62

Sinha R, Peters U, Cross AJ, Kulldorff M, Weissfeld JL, Pinsky PF, Rothman N, Hayes RB

Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma, *Cancer Res.* 2005 Sep 1; 65(17):8034-41

Sinicrope FA, Gill S

Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 2004 Jan-Jun; 23(1-2):63-75.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR

New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *J Natl Cancer Inst.* 1990 Jul 4; 82(13):1107-12

Slattery ML, Potter J, Caan B, Edwards S, Coates A, Ma KN, Berry TD

Energy balance and colon cancer--beyond physical activity, *Cancer Res.* 1997 Jan 1;57 (1):75-80.

Solleveld HA, Haseman JK, McConnell EE

Natural history of body weight gain, survival, and neoplasia in the F344 rat, *J Natl Cancer Inst.* 1984 Apr; 72(4):929-40

Stadler J, Stern HS, Yeung KS, McGuire V, Furrer R, Marcon N, Bruce WR

Effect of high fat consumption on cell proliferation activity of colorectal mucosa and on soluble faecal bile acids, *Gut* 1988 Oct; 29(10):1326-31

Stecca C, Gerber GB

Adaptive response to DNA-damaging agents: a review of potential mechanisms, *Biochem Pharmacol.* 1998 Apr 1; 55(7):941-51.

Stevenson MA, Pollock SS, Coleman CN, Calderwood SK

X-irradiation, phorbol esters, and H₂O₂ stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates, *Cancer Res.* 1994 Jan 1; 54(1):12-5

Sugimura T

Overview of carcinogenic heterocyclic amines
Mutat Res. 1997 May 12; 376(1-2):211-9

Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M

DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats, *Jpn J Cancer Res.* 1989 Dec; 80(12):1145-8

Thompson LH, Tucker JD, Stewart SA, Christensen ML, Salazar EP, Carrano AV, Felton JS.

Genotoxicity of compounds from cooked beef in repair-deficient CHO cells versus Salmonella mutagenicity, *Mutagenesis.* 1987 Nov; 2(6):483-7

Thornton WH Jr, MacDonald RS

Dietary fat quantity and composition induce changes in proliferation and membrane lipids in rat colon cells, *Ann Nutr Metab.* 1997; 41(4):260-8

Thygesen LC, Grønbaek M, Johansen C, Fuchs CS, Willett WC, Giovannucci E

Prospective weight change and colon cancer risk in male US health professionals, *Int J Cancer.* 2008 Sep 1; 123(5):1160-5

Tomlinson IP, Novelli MR, Bodmer WF

The mutation rate and cancer, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10; 93(25):14800-3.

Tsuchiya T, Umeda M

Improvement in the efficiency of the in vitro transformation assay method using BALB/3T3 A31-1-1 cells, *Carcinogenesis*. 1995 Aug; 16(8):1887-94

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN

Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells, *Cell* 1998 May 29; 93(5):705-16.

Tudek B, Bird RP, Bruce WR

Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods, *Cancer Res*. 1989 Mar 1; 49(5):1236-40

Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF

Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon, *Carcinogenesis* 1991 Oct; 12(10):1839-45

Turesky RJ, Richoz J, Constable A, Curtis KD, Dingley KH, Turteltaub KW

The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats, *Chem Biol Interact*. 2003 Jun 15; 145(3):251-65

Turesky RJ, Taylor J, Schnackenberg L, Freeman JP, Holland RD

Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS, *J Agric Food Chem*. 2005 Apr 20; 53(8):3248-58

Ubagai T, Ochiai M, Kawamori T, Imai H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H

Efficient induction of rat large intestinal tumors with a new spectrum of mutations by intermittent administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in combination with a high fat diet, *Carcinogenesis*. 2002 Jan; 23(1):197-200

Uchida K, Kado S, Onoue M, Tohyama K

Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon, *Jpn J Cancer Res*. 1997 Sep; 88(9):807-14

Upton A, Johnson N, Sandy J, Sim E

Arylamine N-acetyltransferases - of mice, men and microorganisms, *Trends Pharmacol Sci*. 2001 Mar; 22(3):140-6

Van der Meer R, Lapré JA, Govers MJ, Kleibeuker JH

Mechanisms of the intestinal effects of dietary fats and milk products on colon carcinogenesis, *Cancer Lett* 1997 Mar 19; 114(1-2):75-83

Vogelstein B, Kinzler KW

Cancer genes and the pathways they control, *Nat Med*. 2004 Aug; 10(8):789-99.

Wakabayashi K, Ushiyama H, Takahashi M, Nukaya H, Kim SB, Hirose M, Ochiai M, Sugimura T, Nagao M

Exposure to heterocyclic amines, *Environ Health Perspect*. 1993 Mar; 99:129-34

Wang D, Buchanan FG, Wang H, Dey SK, DuBois RN

Prostaglandin E2 enhances intestinal adenoma growth via activation of the Ras-mitogen-activated protein kinase cascade, *Cancer Res*. 2005 Mar 1; 65(5):1822-9.

Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Pereira CB, Louderback M, Nakagama H, Bailey GS, Williams DE, Dashwood RH

Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and beta-catenin expression in the rat, *Carcinogenesis* 2008 Apr; 29(4):834-9

Wang R, Dashwood WM, Löhr CV, Fischer KA, Nakagama H, Williams DE, Dashwood RH

beta-catenin is strongly elevated in rat colonic epithelium following short-term intermittent treatment with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and a high-fat diet, *Cancer Sci.* 2008 Sep;99(9):1754-9

Wargovich MJ, Eng VW, Newmark HL

Calcium inhibits the damaging and compensatory proliferative effects of fatty acids on mouse colon epithelium, *Cancer Lett.* 1984 Jul; 23(3):253-8

Weinstein IB

The origins of human cancer: molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment--twenty-seventh G.H.A. Clowes memorial award lecture, *Cancer Res.* 1988 Aug 1; 48(15):4135-43

Weinberg RA

The retinoblastoma protein and cell cycle control, *Cell* 1995 May 5; 81(3):323-30

Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE

Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women *N Engl J Med.* 1990 Dec 13; 323(24):1664-72

Willett WC

Diet, nutrition, and avoidable cancer, *Environ Health Perspect* 1995 Nov; 103 Suppl 8:165-70

Winder T, Lenz HJ

Vascular endothelial growth factor and epidermal growth factor signaling pathways as therapeutic targets for colorectal cancer, *Gastroenterology* 2010 Jun; 138(6):2163-76.

Wolin KY, Yan Y, Colditz GA, Lee IM

Physical activity and colon cancer prevention: a meta-analysis, *Br J Cancer* 2009 Feb 24; 100(4):611-6.

Wong WM, Wright NA

Cell proliferation in gastrointestinal mucosa, *J Clin Pathol.* 1999 May; 52(5):321-33

Wynder EL

Amount and type of fat/fiber in nutritional carcinogenesis, *Prev Med.* 1987 Jul; 16(4):451-9

Xu GP, Reed PI

Instability of N-nitroso compounds in gastric juice and preliminary results from analyses of fresh samples by using an improved analytical method, *Eur J Cancer Prev.* 1993a Sep; 2(5):381-6

Xu GP, Reed PI

N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method, *Carcinogenesis* 1993b Dec; 14(12):2547-51

Xu M, Chen R, Dashwood RH

Effect of carcinogen dose fractionation, diet and source of F344 rat on the induction of colonic aberrant crypts by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, *Carcinogenesis.* 1999 Dec; 20(12):2293-8

Zhao K, Murray S, Davies DS, Boobis AR, Gooderham NJ

Metabolism of the food derived mutagen and carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) by human liver microsomes, *Carcinogenesis* 1994 Jun; 15(6):1285-8

Zöfel P

Statistik verstehen, Ein Begleitbuch zur computergestützten Anwendung, Addison-Wesley Verlag, 2002

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die Dissertation ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die in der Arbeit beschriebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Urte Blume

Danksagung

Während der Promotionszeit haben mich zahlreiche Menschen auf unterschiedlichste Art und Weise unterstützt und dadurch die Voraussetzungen für die Fertigstellung dieser Arbeit geschaffen.

Prof. Dr. Pablo Steinberg ermöglichte mir durch die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, fortwährende Unterstützung und Interesse am Fortgang der Arbeit die erfolgreiche Fertigstellung.

Dr. René Thierbach schaffte durch seine fachliche Kompetenz und zahlreichen anregenden Diskussionen die besten Voraussetzungen für ein stetiges wissenschaftliches Vorankommen.

Außerdem standen mir die Labormitarbeiter der Lebensmitteltoxikologie der TiHo Hannover viel zur Seite. Besonders hervorheben möchte ich Babette Wagenhaus, die einen hervorragenden Job macht.

Bei dem Tierversuch wurde ich von zahlreichen Mitarbeiterinnen des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung (Max-Rubner-Labors/Bergholz Rehbrücke) insbesondere, Elke Thom und Janet Krause, unterstützt.

Bei der Anfertigung und Begutachtung der histologischen Präparate hat mich Dr. Simone Florian wachsamem Auge unterstützt.

Dr. Anja Voigt und Dr. Carsten Müller haben beide durch hilfreiche Tipps und Ideen zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Dr. Mark Birringer stand mir für meine chemischen Fragen zur Seite und unterstützte mich bei der Synthese des KDA. Herrn PD Dr. Albrecht Seidel nahm die PhIP-Synthese vor.

Ihnen allen soll an dieser Stelle gedankt werden.

Des Weiteren bedanke ich mich für das geduldige Korrigieren des Manuskriptes und den zahlreichen kritischen Anmerkungen bei Ines Fiddecke, Fredericke Eickemeier, Anja Tichatschke und Michael Hettwer.

Für die Unterstützung in allen Lebenslagen, sowohl beim Feiern und Überwinden vorübergehender Aussichtslosigkeit danke ich meiner Großfamilie und engen Freunden. Für den sportlichen Ausgleich bedanke ich mich bei den Fußballdamen von Hannover 96.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Urte Blume
Geburtsdatum/-ort 22.12.1977 in Königs Wusterhausen

Beruflicher Werdegang

Seit 11/2010 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Rostock,
Medizinische Biochemie und Molekularbiologie

01/2010 – 01/2011 Fertigstellung der Dissertation und Abschluss der Promotion

04/2008 – 12/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Stiftung Tierärztliche
Hochschule Hannover, Abteilung für Lebensmitteltoxikologie
und Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch

10/2007 – 03/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Potsdam, Abteilung
Ernährungstoxikologie

07/2006 – 09/2007 Anfertigung der Diplomarbeit, Universität Potsdam, Abteilung
Ernährungstoxikologie

01/2007 – 05/2007; Studentische Hilfskraft (SHK), Universität Potsdam,
01/2006 – 06/2006 Abteilung Ernährungstoxikologie

02/2005 – 12/2005 SHK am Deutschen Institut für Ernährungsforschung, Abteilung
Klinische Ernährung

Berufliche Qualifikation

09/2009 Regulatorische Toxikologie, 30 Stunden (DGPT)

06/2009 Versuchstierkunde II, praktischer Teil, 30 Stunden (Deutsche
Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie; DGPT)
nach FELASA-Empfehlungen der Kategorie B und C zertifiziert

10/2008 Klinische Toxikologie, 30 Stunden (DGPT)

11/2007 Chemische Kanzerogenese und Mutagenese, 40 Stunden
(DGPT)

10/2007 Versuchstierkunde und Biostatistik I, theoretischer Teil, 30
Stunden (DGPT)

Bildungsweg

- 10/2007 – 01/2011 Promotion, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover
Thema: „Die Rolle von 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin und Kaliumdiazoacetat in der chemisch induzierten Dickdarmkrebsentstehung“
- 10/2000 – 09/2007 Studium der Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam
Diplomarbeitsthema: „Untersuchung zur Wirkung von AICA-Ribosid auf Brustkrebszelllinien unter dem Einfluss verschiedener Zellzyklusphasen“
- 08/1997 – 01/2000 Ausbildung zur Zahnarzthelferin bei Detlev Bork, Berlin
- 06/1997 Allgemeine Hochschulreife am Friedrich-Wilhelm-Gymnasium in Königs Wusterhausen

Poster/Konferenzbeiträge

Wirkung einer „Western style“-Diät auf die Zahl der im Rattendickdarm durch eine humanrelevante Konzentration von PhIP hervorgerufenen aberranten Kryptenherde
Urte Blume, René Thierbach, Pablo Steinberg, DGPT-Tagung 2010

Die Rolle einer fettreichen Ernährung in der chemisch-induzierten Dickdarmkrebsentstehung
Urte Blume, Pablo Steinberg, René Thierbach, DGE-Tagung 2010

Development of an *in vitro* test system to identify compounds with cell transforming activity
Thierbach René, **Urte Blume**, Pablo Steinberg, Eurotox 2009

Advances in the development of an *in vitro* high-throughput test system to evaluate the carcinogenic potential of chemicals
Pablo Steinberg, **Urte Blume**, René Thierbach,
VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Science, Rom 2009

Combination of two *in vitro*-systems to identify compounds with cell transforming activity without animal testing
Urte Blume, Pablo Steinberg, René Thierbach, DGPT-Tagung 2009

Effects of AICA-riboside on ATP production at different stages of the cell cycle
Urte Blume, Kristina Ullmann, Gunnar Drewes, Michael Ristow, Pablo Steinberg, René Thierbach, DGPT-Tagung 2008

Publikationen

The Friedreich's Ataxia protein frataxin modulates DNA base excision repair in prokaryotes and mammals
René Thierbach, Gunnar Drewes, Markus Fusser, Anja Voigt, Doreen Kuhlow, **Urte Blume**, Tim J. Schulz, Carina Reiche, Hansruedi Glatt, Bernd Epe, Pablo Steinberg, Michael Ristow, *Biochemical Journal*, 2010 im Druck