

Etablierung eines *high content imaging*-basierten  
*in vitro* Testsystems zur Evaluierung genotoxischer Substanzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Yasmin Dietz

geb. am 6. Juli 1984 in Mainz

Mainz, 2014



Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 1. April 2014



**Versicherung gemäß § 19, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 22.12.2003:**

Ich habe die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) in der Arbeit angegeben.

Ich habe oder hatte die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine oder wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Ich hatte weder die jetzt als Dissertation vorgelegte Arbeit noch Teile einer Abhandlung bei einer anderen Fakultät bzw. einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht.

Mainz, Januar 2014

\_\_\_\_\_

Yasmin Dietz



**Danksagung**



## Zusammenfassung

Zur Registrierung von Pharmazeutika ist eine umfassende Analyse ihres genotoxischen Potentials von Nöten. Aufgrund der Vielzahl genotoxischer Mechanismen und deren resultierenden Schäden wird ein gestaffeltes Testdesign durch die ICH-Richtlinie S2(R1) „*Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)*“ definiert, um alle genotoxischen Substanzen zu identifizieren. Die Standardtestbatterie ist in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung aufgrund des geringen Durchsatzes und des Mangels an verfügbarer Substanzmenge vermindert anwendbar. Darüber hinaus verfügen *in vitro* Genotoxizitätstests in Säugerzellen über eine relativ geringe Spezifität. Für eine vollständige Sicherheitsbeurteilung wird eine *in vivo* Testung auf Kanzerogenität benötigt. Allerdings sind diese Testsysteme kosten- und zeitintensiv. Aufgrund dessen zielen neue Forschungsansätze auf die Verbesserung der Prädiktivität und die Erfassung des genotoxischen Potentials bereits in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung ab.

Die *high content imaging* (HCI)-Technologie offeriert einen Ansatz zur Verbesserung des Durchsatzes verglichen mit der Standardtestbatterie. Zusätzlich hat ein Zell-basiertes Modell den Vorteil Daten relativ schnell bei gleichzeitig geringem Bedarf an Substanzmenge zu generieren. Demzufolge ermöglichen HCI-basierte Testsysteme eine Prüfung in der frühen Phase der pharmazeutischen Arzneimittelentwicklung.

Das Ziel dieser Studie ist die Entwicklung eines neuen, spezifischen und sensitiven HCI-basierten Testsystems für Genotoxine und Progenotoxine *in vitro* unter Verwendung von HepG2-Zellen gewesen. Aufgrund ihrer begrenzten metabolischen Kapazität wurde ein kombiniertes System bestehend aus HepG2-Zellen und einem metabolischen Aktivierungssystem zur Testung progenotoxischer Substanzen etabliert. Basierend auf einer vorherigen Genomexpressionsprofilierung (Boehme et al., 2011) und einer Literaturrecherche wurden die folgenden neun unterschiedlichen Proteine der DNA-Schadensantwort als putative Marker der Substanz-induzierten Genotoxizität ausgewählt: p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15), GADD45A und p-Chk2 (Thr68).

Die Expression bzw. Aktivierung dieser Proteine wurde 48 h nach Behandlung mit den (pro-) genotoxischen Substanzen (Cyclophosphamid, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, Aflatoxin B<sub>1</sub>, 2-Acetylaminofluoren, Methylmethansulfonat, Actinomycin D, Etoposid) und den nicht-

genotoxischen Substanzen (D-Mannitol, Phenforminhydrochlorid, Progesteron) unter Verwendung der HCI-Technologie ermittelt. Die beste Klassifizierung wurde bei Verwendung der folgenden fünf der ursprünglichen neun putativen Markerproteine erreicht: p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981).

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden die fünf ausgewählten Proteine mit Substanzen, welche von dem *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind, getestet. Dieses neue Testsystem erzielte eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 86 %, was in einer Prädiktivität von 84 % resultierte. Der synergetische Effekt dieser fünf Proteine ermöglicht die Identifizierung von genotoxischen Substanzen, welche DNA-Schädigungen durch eine Vielzahl von unterschiedlichen Mechanismen induzieren, mit einem hohen Erfolg.

Zusammenfassend konnte ein hochprädiktives Prüfungssystem mit metabolischer Aktivierung für ein breites Spektrum potenziell genotoxischer Substanzen generiert werden, welches sich aufgrund des hohen Durchsatzes, des geringen Zeitaufwandes und der geringen Menge benötigter Substanz zur Substanzpriorisierung und -selektion in der Phase der Leitstrukturoptimierung eignet und darüber hinaus mechanistische Hinweise auf die genotoxische Wirkung der Testsubstanz liefert.

**Abstract**

Registration of pharmaceuticals requires a comprehensive assessment of their genotoxic potential. Due to the multitude of genotoxic mechanisms and resulting damages, a staggered testing design as defined by the ICH guideline S2(R1) '*Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)*' is chosen to identify all genotoxic compounds. The standard testing battery is less applicable in the early discovery phase of drug development because of the low throughput and the high compound demand. Furthermore, the *in vitro* mammalian tests imply a relatively low specificity. For a complete safety assessment *in vivo* carcinogenicity testing is needed. Unfortunately, these tests are costly and time-consuming. Therefore, various research approaches aim to improve predictivity and to detect the genotoxic potential in the early discovery phase of drug development.

The *high content imaging* (HCI) technology offers an approach to improve throughput compared to the standard testing battery. In addition, a cell-based model using HCI has the advantage of generating data rapidly with small compound needs. Therefore, HCI-based assays would enable screening in the early discovery phase of pharmaceutical drug development.

This study aimed to develop a novel, specific and sensitive HCI-based test system for mutagens and promutagens *in vitro* using HepG2 cells. Due to their limited metabolic capacity, a combined system of HepG2 cells and metabolic activation system has been established for promutagen testing. Based on previous whole-genome expression profiling (Boehme et al., 2011) and literature research the following nine different proteins involved in DNA-damage response were chosen as putative markers for compound-induced genotoxicity: p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-Chk1 (Ser345) p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/ Tyr15), GADD45A and p-Chk2 (Thr68).

The protein expression or activation changes of these markers were quantified 48 h after treatment with (pro-)genotoxicants (Cyclophosphamide, 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene, Aflatoxin B1, 2-Acetylaminofluorene, Methylmethane sulfonate, Actinomycin D, Etoposide) and non-genotoxicants (D-mannitol, Phenfomin hydrochloride, Progesterone) using the HCI technology. The best classification was achieved using the following five out of the nine putative marker proteins: p-p53 (Ser15), p21, p-H2A.X (Ser139), p-Chk1 (Ser345) and p-ATM (Ser1981).

In a second part of this thesis, these five proteins were tested with a compound set recommended by the *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) in order to judge the performance of *in vitro* genotoxicity tests. This novel test system achieved a sensitivity of 80 % and a specificity of 86 %, resulting in a predictivity of 84 %. The synergistic effect of these five proteins allowed the identification of genotoxins that induce DNA damage by a variety of different mechanisms of action with a high performance.

In summary, a highly predictive screening system including metabolic activation for a broad range of potentially genotoxic compounds was generated, which is due to its good throughput, short turnaround time and small requirement of compound appropriate for compound prioritization and selection during early phase of lead optimization and additionally provides mechanistic indications of the genotoxic effect of the compound.

**Inhaltsverzeichnis**

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VII</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>XXI</b>

**1 Einleitung ..... 1****1.1 Chemische Kanzerogenese ..... 1**

1.1.1 Risikofaktoren, Inzidenz und Sterberate der Krebserkrankung ..... 1

1.1.2 Modell der chemischen Kanzerogenese ..... 1

**1.2 Grundlagen genotoxischer Wirkung, DNA-Schädigung und -Reparatur ..... 4**

1.2.1 Spontane Genotoxizität ..... 4

1.2.2 Strahleninduzierte Genotoxizität ..... 6

1.2.3 Chemikalien-induzierte Genotoxizität ..... 7

1.2.3.1 Bedeutung des Fremdstoffmetabolismus bei der Chemikalien-induzierten Genotoxizität ..... 7

1.2.3.2 Struktur und Wirkweise genotoxischer Substanzen ..... 8

1.2.4 Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort ..... 15

**1.3 Testung auf Genotoxizität und Kanzerogenität ..... 18**

1.3.1 Genotoxizitätstestung ..... 18

1.3.2 Kanzerogenitätstestung ..... 22

1.3.3 Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Substanzen ..... 23

1.3.4 Limitierungen der *in vitro* Tests der Standardtestbatterie ..... 26

1.3.5 Zusätzliche nicht-regulatorische Genotoxizitätstests in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung ..... 30

**1.4 Zielstellung ..... 33****2 Material und Methoden ..... 35****2.1 Material ..... 35**

1.1.1 Substanzen und Lösungen ..... 35

2.1.1 Zellen ..... 38

2.1.2 Antikörper ..... 38

2.1.3 Blockpeptide ..... 39

2.1.4 Kits ..... 40

2.1.5 Verbrauchsmaterialien ..... 40

2.1.6 Geräte ..... 41

2.1.7 Software ..... 43

<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>44</b>
2.2.1	Zellkultur-Methoden .....	44
2.2.1.1	Kultivierung der Zelllinie HepG2 .....	44
2.2.1.2	Zählung der Zelllinie HepG2 .....	45
2.2.1.3	Kultivierung von humanen Primärhepatozyten.....	46
2.2.1.4	Zellzählung von humanen Primärhepatozyten .....	46
2.2.1.5	Behandlung der Zellen zur Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz .....	47
2.2.1.6	Behandlung der Zelllinie HepG2 zur Genotoxizitätstestung .....	48
2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	50
2.2.2.1	Viabilitätsbestimmung von Zellen .....	50
2.2.2.2	Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450 1A .....	51
2.2.2.3	Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450 3A4 .....	52
2.2.2.4	Proteinbestimmung nach Bradford.....	53
2.2.2.5	Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme .....	54
2.2.2.6	Immunofluoreszenzfärbung zur Genotoxizitätstestung .....	59
2.2.2.7	Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker .....	62
2.2.2.8	Bestimmung der Zytotoxizität.....	64
2.2.2.9	Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker.....	65
2.2.3	Biostatistische Methoden .....	69
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kapazität der Zelllinie HepG2 .....</b>	<b>71</b>
3.1.1	Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme .....	71
3.1.2	Aktivitätsbestimmung ausgewählter Cytochrom P450 Enzyme .....	74
<b>3.2</b>	<b>Etablierung des <i>in vitro</i> Testsystems zur toxikologischen Evaluierung genotoxischer Substanzen.....</b>	<b>76</b>
3.2.1	Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker .....	77
3.2.1.1	Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker .....	77
3.2.1.2	Genotoxizitätsbestimmung der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker .....	78
3.2.2	Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker.....	85
3.2.2.1	Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker .....	85
3.2.2.2	Testung auf Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärintikörpern bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker ..	86
3.2.2.3	Genotoxizitätsbestimmung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker ..	87

---

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>101</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz der Zelllinie HepG2 .....</b>	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b>Etablierung des <i>in vitro</i> Testsystems zur toxikologischen Evaluierung genotoxischer Substanzen.....</b>	<b>106</b>
4.2.1	Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker .....	107
4.2.2	Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker.....	109
4.2.2.1	Klassifizierung der (pro-)genotoxischen Substanzen.....	109
4.2.2.2	Charakterisierung der (pro-)genotoxischen Substanzen .....	114
4.2.2.3	Limitierung der Detektion von Aneugenen.....	115
4.2.2.4	Vergleich des etablierten Testsystems mit weiteren Genotoxizitätstests der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung .....	116
<b>5</b>	<b>Schlussfolgerung und Ausblick .....</b>	<b>121</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>125</b>
<b>7</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>141</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>145</b>



**Abkürzungsverzeichnis<sup>12</sup>**

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
AA	Anthranilsäure
AAF	2-Acetylaminofluoren
ABCB1	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>
ABCB11	<i>ATP-binding cassette sub-family C member 11</i>
ABCC2	<i>ATP-binding cassette sub-family C member 2</i>
ACT	Actinomycin D
ADI	<i>acceptable daily intake</i>
AF	Autofluoreszenz
AFB1	Aflatoxin B <sub>1</sub>
AHR	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>
ALARA	<i>as low as reasonably achievable</i>
APT	Ampicillintrihydrat
AP	depuriniert-depyriminiert
ARNT	<i>AHR nuclear translocator</i>
AT	Amitrol
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i>
ATRIP	<i>ATR interacting protein</i>
AZT	Azidothymidin
BA	Benzylalkohol
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BaP	Benzo[a]pyren
BAX	<i>apoptosis regulator BAX</i>
BC	<i>n</i> -Butylchlorid
BER	Basenexzisionsreparatur
BP	Blockpeptid
BRCA1	<i>breast cancer type 1 susceptibility protein</i>
BSEP	<i>bile salt export pump</i>
bzw.	beziehungsweise
CA	<i>p</i> -Chloranilin
CAP	Chloramphenicol
CAR	<i>constitutive androstane receptor</i>
CdCl <sub>2</sub>	Cadmiumchlorid
CDC2	<i>cyclin-dependant kinase 1</i>

<sup>1</sup> Die Protein- und Gennamen werden in der vorliegenden Arbeit nach Vorlage der UniProtKB Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) verwendet. Gemäß der Empfehlung des HUGO Gene Nomenclature Committee werden Gennamen kursiv in Großbuchstaben geschrieben (Wain et al., 2002). Proteinennamen hingegen werden in der gebräuchlichen Schreibweise gemäß den Angaben der UniProtKB Datenbank (<http://www.uniprot.org/>) geschrieben.

<sup>2</sup> Bezeichnungen und Eigennamen z.B. Institutionen, biologische Prozesse, Methoden, Proteine oder Gene, für welche es keine adäquate Übersetzung gibt, werden in englischer Sprache belassen und kursiv in der folgenden Arbeit dargestellt.

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
CDC25A	<i>M-phase inducer phosphatase 1</i>
CDK2	<i>cyclin-dependant kinase 2</i>
CDKN1	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor 1</i>
c(E <sub>max</sub> )	Konzentration mit maximaler Regulation
CH	Cyclohexanon
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i>
CMFDA	CellTracker™ Green 5-Chloromethylfluorescein-diacetat
CP	Cisplatin
CPA	Cyclophosphamid
CPD	Cyclobutanpyrimidindimer
CSA	<i>Cockayne syndrome A</i>
CSB	<i>Cockayne syndrome B</i>
CtIP	<i>CtBP-interacting protein</i>
CU	Curcumin
CYP	Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase
DA	Diethanolamin
DAT	2,4-Diaminotoluol
DB	1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin)
DCHT	N,N-Dicyclohexylthiourea
DEP	Diethylhexylphthalat
DEREK	<i>Deductive Estimation of Risk based on Existing Knowledge</i>
DL	D-Limonen
DMBA	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMN	Dimethylnitrosamin
DMSO	Dimetylsulfoxid
DP	2,4-Dichlorophenol
DSB	Doppelstrangbruch
EC <sub>x</sub>	Konzentration mit einem zytotoxischen Effekt von x % (bei 50% entspricht dies dem halbmaximalen zytotoxischen Effekt)
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
EH	2-Ethyl-1,3-hexandiol
Em	Emission
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
ENU	Ethylnitrosourea
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EPS	Ephedrinsulfat
ETAC	Ethylacrylat

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
ETAM	Ethionamid
ETO	Etoposid
EU	Europäische Union
EUG	Eugenol
Ex	Exzitation
EYS	Erythromycinstearat
FBS	fötales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FEN1	<i>flap endonuclease 1</i>
FM	Fluometuron
g	Erdbeschleunigung 9,81 m/s <sup>2</sup>
GADD45A	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha</i>
GADD153	<i>DNA damage-inducible transcript 3 protein</i>
h	Stunde
H2AX	Histon H2AX
HCE	Hexachlorethan
HCI	<i>high content imaging</i>
HepG2	HepG2-Zellen
HH	humane Hepatozyten
HMGN1	<i>high mobility group nucleosome-binding domain-containing protein 1</i>
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase
HQ	Hydroquinon
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBA	Isobutyraldehyd
ICH	<i>International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use</i>
ICH S2(R1)	<i>Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1)</i>
IQ	2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
Konz	Konzentration
LNT	<i>linear non-threshold</i>
LOEC	geringste beobachtete effektive Konzentration
LOEL	<i>lowest observed effect level</i>
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
MAN	D-Mannitol
MAS	metabolisches Aktivierungssystem
3-MC	3-Methylcholanthren
Mdm2	<i>double minute 2 protein</i>
Mdm4	<i>double minute 4 protein</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
MDR1	<i>multidrug resistance protein 1</i>
MEL	Melamin
MEN	D,L-Menthol
METC	Methylcarbamat
mfi	Median der Fluoreszenzintensität
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
min	Minute
MMS	Methylmethansulfonat
MRE11	<i>double-strand break protein MRE11</i>
MRN	<i>double-strand break protein MRE11</i> (MRE11), <i>DNA repair protein RAD50</i> (RAD50) und Nibrin (NBN)
MRP2	<i>multidrug resistance-associated protein 2</i>
MW	Mittelwert
NADPH	$\beta$ -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat tetranatriumsalzhydrat, reduzierte Form
NBN	Nibrin
nd	nicht detektierbar
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
NPH	<i>p</i> -Nitrophenol
NR1I2	nukleärer Rezeptor, Subfamilie 1, Gruppe I, Mitglied 2
NR1I3	nukleärer Rezeptor, Subfamilie 1, Gruppe I, Mitglied 3
OD	optische Dichte
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
OMEPR	Omeprazol
p21	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor 1</i>
p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
PA	Phenanthren
PAH	Phthalsäureanhydrid
PB	Phenobarbital
PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PFBE	Luciferin-6'-Pentafluorobenzylether
PG	Propylgallat
PHC	Phenforminhydrochlorid
PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b]pyridin
6-4 PP	6-4 Pyrimidinpyrimidonphotoprodukt
PRO	Progesteron
PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
p-W	p-Werte

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
PYR	Pyridin
QSAR	<i>quantitative structure-activity relationships</i>
RAD23	<i>UV excision repair protein RAD23</i>
RAD50	<i>DNA repair protein RAD50</i>
RAD51	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 1</i>
RAD51C	<i>DNA repair protein RAD51 homolog 3</i>
RAD54	<i>DNA repair and recombination protein RAD54</i>
REACH	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances</i>
RFU	relative Fluoreszenzeinheit
RIF	Rifampicin
RLU	relative Lumineszenzeinheit
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPA	<i>replication protein A</i>
RPL13A	ribosomales Protein L13a
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RXR	<i>retinoid X receptor</i>
SA	Natriumarsenit
SAPE	Streptavidin-konjugiertes R-Phycoerythrin
SCC	selektierte Zellzahl pro validem Feld
SD	Standardabweichung
sec	Sekunde
Ser	Serin
SMC1	<i>structural maintenance of chromosomes 1</i>
SO	Sulfisoxazol
SSA	Natriumsaccharin
SXS	Natriumxylolsulfonat
T	Taxol
TAC	(2-Chlorethyl)-trimethylammoniumchlorid
TBA	<i>tert</i> -Butylalkohol
TBHQ	<i>tert</i> -Butylhydroquinon
TEP	Tris(2-ethylhexyl)phosphat
TET	Trinatriumhydrogenethylendiamintetraacetat
TFRC	Transferrin Rezeptor
Thr	Threonin
TopBP1	<i>DNA topoisomerase 2-binding protein 1</i>
TP53	<i>cellular tumor antigen p53</i>
TTC	<i>Threshold of Toxicological Concern</i>
Tyr	Tyrosin
U	Urea
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen

<b>Abkürzung</b>	<b>Name</b>
UGT1A6	UDP-Glucuronosyltransferase 1 Familie, Polypeptid A6
XAB2	<i>XPA binding protein 2</i>
XF	gemittelter Wert der x-fachen Veränderung über der Kontrolle
XPC	<i>Xenoderma pigmentosum complementation group C</i>
XRCC1	<i>DNA repair protein XRCC1</i>
XRE	<i>xenobiotic response element</i>
z.B.	zum Beispiel

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1-1: Mehrstufenprozess der chemischen Kanzerogenese. ....	3
Abbildung 1-2: Metabolische Aktivierung von Cyclophosphamid. ....	9
Abbildung 1-3: Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren. ....	10
Abbildung 1-4: Metabolische Aktivierung von Dimethylnitrosamin. ....	11
Abbildung 1-5: Metabolische Aktivierung von 2-Acetylaminofluoren. ....	13
Abbildung 1-6: Metabolische Aktivierung von Aflatoxin B <sub>1</sub> . ....	13
Abbildung 1-7: Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort. ....	18
Abbildung 1-8: Ansatz zur Risikobewertung und Charakterisierung von Kanzerogenen nach den Überlegungen von Streffer et al. ....	26
Abbildung 2-1: Oxygenierung von Luciferin zu Oxyluciferin des <i>CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay</i> . ....	50
Abbildung 2-2: O-Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin. ....	51
Abbildung 2-3: Reaktion von Luciferin-PFBE zu Oxyluciferin des <i>P450-Glo<sup>™</sup> CYP3A4 Assay</i> . ....	52
Abbildung 2-4: Prinzip des <i>QuantiGene Plex 2.0 Assay</i> . ....	56
Abbildung 2-5: Reaktion des CellTracker Green <sup>™</sup> 5-Chloromethylfluorescein-diacetat (CMFDA) zum 5-Chloromethylfluorescein-Thioether Addukt. ....	60
Abbildung 2-6: Histogramm zur Kalkulation des <i>Isodata Threshold</i> . ....	61
Abbildung 2-7: Analyse fluoreszenzgefärbter HepG2-Zellen. ....	62
Abbildung 3-1: Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker (Teil 1). ....	77
Abbildung 3-2: Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker (Teil 2). ....	78
Abbildung 3-3: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14), p-Chk1 (Ser345) und p-Chk2 (Thr68). ....	83
Abbildung 3-4: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine GADD45A, p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15). ....	84
Abbildung 3-5: Ergebnisse der Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Testung der ECVAM-Substanzen. ....	85
Abbildung 3-6: Ergebnisse der Testung der Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern bei der Testung der ECVAM-Substanzen. ....	87
Abbildung 3-7: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-p53 (Ser15), p21 und p-H2AX (Ser139). ....	98
Abbildung 3-8: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) und Färbung mit CellTracker Green <sup>™</sup> 5-Chloromethylfluorescein-diacetat. ....	99



**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1-1: Klassifizierung humaner Kanzerogene der <i>International Agency for Research on Cancer</i> . .....	25
Tabelle 1-2: Gruppe 1 ECVAM-Substanzen. ....	28
Tabelle 1-3: Gruppe 2 ECVAM-Substanzen. ....	29
Tabelle 1-4: Gruppe 3 ECVAM-Substanzen. ....	30
Tabelle 2-1: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für HepG2-Zellen.....	44
Tabelle 2-2: Übersicht der zu verwendenden Volumina von Zellkulturmedium und Trypsin/ EDTA-Lösung für die Kultivierung von HepG2-Zellen.....	45
Tabelle 2-3: Zusammensetzung des Auftau-, Aussä- und Kultivierungsmediums für humane Hepatozyten.....	46
Tabelle 2-4: Induktoren der Cytochrom P450 Enzyme. ....	48
Tabelle 2-5: Kategorisierung der Substanzen zur Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker. .	48
Tabelle 2-6: Zusammensetzung des metabolischen Aktivierungssystems. ....	50
Tabelle 2-7: Gene des <i>QuantiGene Plex 2.0 Assay Plex Set 11563</i> , human.....	55
Tabelle 2-8: Reagenzien zur Herstellung des <i>Working Plex Set</i> . ....	57
Tabelle 2-9: Übersicht der untersuchten putativen Markerproteine für Genotoxizität. ....	59
Tabelle 2-10: Übersicht der Primärantikörper. ....	63
Tabelle 2-11: Übersicht der Blockpeptide. ....	64
Tabelle 2-12: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Immunfluoreszenz- färbung der Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker. ....	64
Tabelle 2-13: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Zytotoxizitätsbestimmung. ....	65
Tabelle 2-14: Übersicht der Primärantikörper. ....	67
Tabelle 2-15: Übersicht der Blockpeptide. ....	67
Tabelle 2-16: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Immunfluoreszenz- färbung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker und Zytotoxizitätsbestimmung. ..	68
Tabelle 3-1: Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in HepG2-Zellen. .....	72
Tabelle 3-2: Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in humanen Hepatozyten.....	73
Tabelle 3-3: Vergleich der Basalexpressionen von HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten. .....	74
Tabelle 3-4: Aktivitätsbestimmung von CYP1A1/2 und CYP3A4 in HepG2-Zellen. ....	75
Tabelle 3-5: Aktivitätsbestimmung von CYP1A1/2 und CYP3A4 in humanen Hepatozyten.	75

---

Tabelle 3-6: Zytotoxizitätsbestimmung der bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker verwendeten Substanzen.....	80
Tabelle 3-7: Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker.....	81
Tabelle 3-8: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 1 ECVAM-Substanzen. ....	88
Tabelle 3-9: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 1 ECVAM-Substanzen. ....	89
Tabelle 3-10: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 2 ECVAM-Substanzen. ....	91
Tabelle 3-11: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 2 ECVAM-Substanzen. ....	92
Tabelle 3-12: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 3 ECVAM-Substanzen. ....	94
Tabelle 3-13: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 3 ECVAM-Substanzen. ....	95
Tabelle 4-1: Vergleich der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz von HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten. ....	104
Tabelle 4-2: Übersicht der Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker.....	107
Tabelle 4-3: Vergleich des etablierten Testsystems mit weiteren Genotoxizitätstests der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung. ....	117

# 1 Einleitung

## 1.1 Chemische Kanzerogenese

### 1.1.1 Risikofaktoren, Inzidenz und Sterberate der Krebserkrankung

Der Erkrankung Krebs wird aufgrund der insgesamt betrachteten schlechten Heilbarkeit wie auch dem mit dieser Krankheit verbundenen hohen Leidensdruck ein besonderer Stellenwert zugeordnet (Eisenbrand, 2005). Krebs stellte 2011 in Deutschland neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar: Von den insgesamt ca. 850.000 verstorbenen Menschen verstarben 40,2 % an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems und 26 % an Krebs (Statistisches Bundesamt, 2012).

Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts lag die Anzahl der neu an Krebs erkrankten Personen in Deutschland im Jahr 2008 bei ca. 470.000. Die häufigste Krebsneuerkrankung war bei Männern mit 25,7 % das Prostatakarzinom und bei Frauen mit 32,1 % Brustkrebs; Darm- und Lungenkrebs zählten bei beiden Geschlechtern zu den zweit- und dritthäufigsten Krebsneuerkrankungen. Die Krebssterbefälle hingegen lagen im selben Jahr bei ca. 215.000, wobei 25,5 % der Männer an Lungenkrebs und 17,3 % der Frauen an Brustkrebs verstarben (Robert Koch-Institut, 2012).

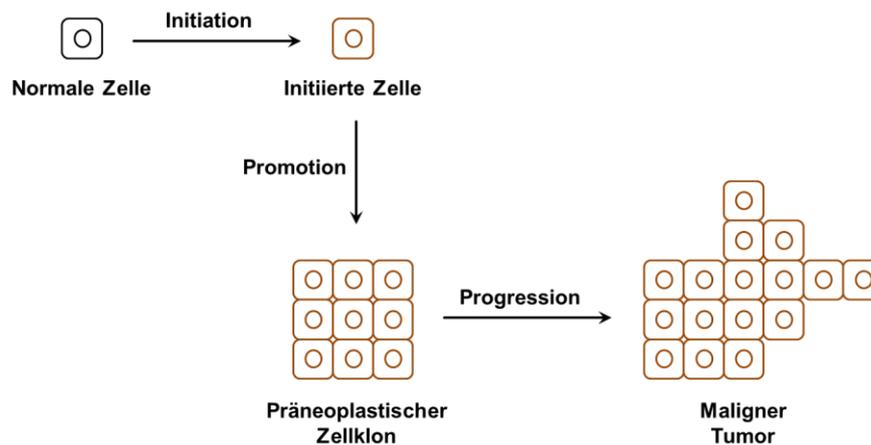
Die Ursachen für Krebserkrankungen werden vielfältig diskutiert und untersucht. Untersuchungen von Danaei et al. ergaben, dass 35 % aller weltweiten durch Krebs bedingten Sterbefälle auf neun modifizierbare Risikofaktoren zurückzuführen sind (Danaei et al., 2005). Diese Risikofaktoren sind: Übergewicht bzw. Adipositas, wenig Verzehr von Früchten und Gemüse, physikalische Inaktivität, Rauchen, Alkoholkonsum, ungeschützter Geschlechtsverkehr (sexuell übertragbare Infektionen), innerstädtische Luftverunreinigung, Rauch im Innenraum durch Verwendung von Brennstoffen und kontaminierte Injektionen (Hepatitis B- und C-Infektionen) (Danaei et al., 2005). Zu weiteren Risikofaktoren zählen Strahlungen (UV-Licht und Ionisationsstrahlung) wie auch die Gefahrenstoffbelastung am Arbeitsplatz (z.B. aromatische Amine bei der Farbenherstellung) (Doll et al., 1981). Der Beitrag von genetischen Prädispositionen zur Krebsentstehung ist schwer abzuschätzen (Aktories et al., 2013).

### 1.1.2 Modell der chemischen Kanzerogenese

Chemische Kanzerogene, welche Tumore im Menschen und/ oder im Tier verursachen, lassen sich in zwei verschiedene Klassen unterteilen: genotoxische und nicht-genotoxische

Kanzerogene (Bolt et al., 2004). Der kanzerogene Effekt nicht-genotoxischer Kanzerogene beruht auf einer gesteigerten Zellproliferation, welche durch mitogene Effekte (Hormone und/oder Wachstumsfaktoren inbegriffen) oder Toxizität und Regeneration verursacht werden kann (Cohen und Arnold, 2011).

Der Prozess der chemischen Kanzerogenese (Entstehung und Entwicklung maligner Tumoren) kann durch einen mehrstufigen Prozess (Abbildung 1-1) beschrieben werden, welcher sich aus den Phasen der Initiation, Promotion und Progression zusammensetzt (Eisenbrand, 2005). Die Einteilung in diese Phasen basiert auf Forschungsarbeiten von Berenblum (Cohen und Arnold, 2011), welcher die Entwicklung eines Tumors auf der Mäuserückenhaut nach einmaligem Auftragen des Kanzerogens 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA) nur dann auslösen konnte, wenn daraufhin das repetitive Auftragen von Crotonöl erfolgte (Berenblum und Shubik, 1947a; Berenblum und Shubik, 1947b). Die Transformation einer normalen proliferationsfähigen Zelle in eine initiierte Zelle erfolgt durch Mutation wachstumsregulierender Gene (Marquardt et al., 2013). Die resultierende Veränderung der DNA ist irreversibel (Cohen und Arnold, 2011). Als Promotion wird die Beschleunigung der Tumorentstehung verstanden, welche auf einer selektiven Vermehrung initiiertes Zellen beruht (Aktories et al., 2013). Eine beschleunigte Zellteilung bedingt durch hormonell wirksame exogene Stoffe, endogene Wachstumsfaktoren oder regenerative Hyperplasie nach einem zytotoxischen Ereignis stellt einen tumorpromovierenden Prozess dar, der das Manifestieren des DNA-Schadens als Mutation beschleunigt (Graefe et al., 2011). Darüber hinaus kann durch Induktion fremdstoffmetabolisierender Enzyme eine tumorpromovierende Zellteilung und Zelldifferenzierung verursacht werden (Graefe et al., 2011). Im Gegensatz zu der schnell verlaufenden irreversiblen Initiation ist die Promotion ein Prozess, der über Wochen, Monate oder Jahre andauern und bei Ausbleiben der promovierenden Wirkung wieder aufgehoben werden kann (Marquardt et al., 2013). Zur Progression, der Modifikation eines gutartigen in einen malignen Tumor, sind weitere Mutationen in bestimmten Genen von Nöten (Aktories et al., 2013). Die genetische Instabilität dieser Phase ist auf Inaktivierung oder Verlust von Genen zurückzuführen, welche an der DNA-Reparatur beteiligt sind, welche wiederum das vermehrte Auftreten von Mutationen bewirken (Marquardt et al., 2013). Maligne Tumorzellen lassen sich im Gegensatz zu normalen Zellen durch infiltrativ-destruktives Wachstum, metastasierendes Potential und eine unregelmäßige Zellteilung kennzeichnen (Graefe et al., 2011).



**Abbildung 1-1: Mehrstufenprozess der chemischen Kanzerogenese.**

(modifiziert nach Marquardt et al., 2013)

Maßgeblich beteiligt am Prozess der chemischen Kanzerogenese sind die permanente Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Graefe et al., 2011). Protoonkogene kodieren für Proteine, welche entscheidend an der Proliferation und Differenzierung von Zellen beteiligt sind (z.B. Wachstums- und Transkriptionsfaktoren) (Eisenbrand, 2005). Die Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen kann durch Genamplifikation, Basenaustauschmutation oder Translokation an eine andere Stelle im Genom vonstattengehen (Aktories et al., 2013). Tumorsuppressorgene sind an der Kontrolle der Wachstumsprozesse beteiligt, weshalb Mutationen in einem Tumorsuppressorgen, die zu einem inaktiven Genprodukt führen oder eine reduzierte Genexpression bewirken, in einem unkontrollierten Zellwachstum resultieren (Eisenbrand, 2005).

Bei dem in 50 % aller Tumore im Menschen mutierten Gen handelt es sich um das Tumorsuppressorgen *cellular tumor antigen p53* (p53), welchem eine Schlüsselrolle in der tumorsuppressiven DNA-Schadensantwort zukommt. Mäuse, welchen das für p53 kodierende Gen *TP53* fehlt, weisen eine erhöhte Anfälligkeit für Tumore auf und unterliegen häufig einer neoplastischen Erkrankung. Die Ursache des Li-Fraumeni Syndroms ist eine Keimbahnmutation im Gen *TP53*, was bei den betroffenen Patienten bereits in der frühen Lebensphase zur Entwicklung multipler Tumore führt (Reinhardt und Schumacher, 2012).

Neben genetischen Veränderungen können auch epigenetische Vorgänge zu einer Tumorsuppressorgeninaktivierung und Onkogenaktivierung führen. Eine verminderte Genexpression (*gene silencing*) wird durch Methylierung von Cytosinresten in der DNA, Acetylierung/ Deacetylierung der Histone und Hypermethylierung des Promotors vermittelt,

während eine gesteigerte Genexpression auf eine Hypomethylierung zurückzuführen ist (Ziech et al., 2010).

Der Annahme von Hanahan et al. zufolge lässt sich die Kanzerogenese durch das kombinierte Mehrdefektmodell beschreiben. Dieses Modell besagt, dass die meisten Tumore durch unterschiedliche Mechanismen die gleichen Funktionen im Verlauf ihrer Entwicklung erwerben. Diese sechs den Tumor kennzeichnenden Funktionen sind: Vermeiden der Apoptose, Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Invasion und Metastasierung des Gewebes, unendliches Replikationspotential und andauernde Angiogenese. Das postulierte Modell wurde 2012 überarbeitet. Neuen Forschungserkenntnissen zufolge sind zwei weitere den Tumor kennzeichnende Funktionen im Gespräch, deren Fähigkeiten jedoch zum aktuellen Zeitpunkt weder übergreifend definiert noch vollständig bestätigt sind. Diese beiden sich abzeichnenden Kennzeichen sind die Deregulierung des zellulären Metabolismus, um die Proliferation der Neoplasien zu begünstigen, wie auch das Vermeiden immunologischer Zerstörung im Besonderen durch B- und T-Lymphozyten. Darüber wurde das Modell um zwei weitere Kennzeichen ergänzt, bei welchen es sich um die genomische Instabilität und der folglich Mutagenität ebenso wie die tumorpromovierende Entzündung handelt (Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011).

Sowohl das Mehrstufenmodell als auch das kombinierte Mehrdefektmodell verdeutlichen, dass sich der Prozess der chemischen Kanzerogenese durch seine Komplexität auszeichnet und nicht durch einen einzigen, sondern durch eine Reihe unterschiedlicher Wege beschreiben lässt.

## **1.2 Grundlagen genotoxischer Wirkung, DNA-Schädigung und -Reparatur**

Genotoxizität umfasst jegliche schädigende Veränderung des genetischen Materials unabhängig von dem zugrundeliegenden Schaden-induzierenden Mechanismus (ICH, 2011a). Bleibt eine Reparatur des DNA-Schadens aus, manifestiert sich der Schaden als Mutation (Jannig et al., 2004). Mutationen lassen sich als „vererbare Veränderungen der genetischen Information“ definieren (Knippers, 2006).

### **1.2.1 Spontane Genotoxizität**

Neben einer Reihe genotoxischer Faktoren wie UV-Licht, ionisierender Strahlung und chemischen Verbindungen wird unser Genom ununterbrochen durch spontane Effekte

geschädigt (Diderich et al., 2011). Eine Schwachstelle in der DNA stellen glykosidische Bindungen zwischen den Basen und dem Zuckerphosphatrückgrat dar (Gates, 2009). Als Folge der Hydrolyse einer glykosidischen Bindung werden basenfreie Stellen, sogenannte depurinierte-depyriminierte-(AP-)Stellen, generiert (Gates, 2009). Da die Hydrolyse an Purinbasen leichter und somit auch häufiger als an Pyrimidinbasen stattfindet, handelt es sich bei AP-Stellen zumeist um depurinierte Stellen. Kalkulationen zufolge entstehen täglich durch spontane Hydrolyse an Purinbasen bis zu 10.000 AP-Stellen (Gates, 2009).

Durch Basenexzisionsreparatur (BER) können fehlerhafte Basen der DNA repariert werden (Pena-Diaz et al., 2012). Läsionsspezifische DNA-Glykosylasen erkennen und entfernen modifizierte Basen (Diderich et al., 2011). Die resultierenden AP-Stellen werden durch die AP Endonuklease 1 herausgeschnitten. Bei der sogenannten *short-patch BER* erfolgt daraufhin die Insertion eines einzelnen Nukleotids durch die Polymerase  $\beta$  unter gleichzeitigem Entfernen des basenfreien Zucker-Phosphat-Rests (Pena-Diaz et al., 2012). Die entstandenen Fragmente werden schließlich durch die DNA-Ligase III/ *DNA repair protein XRCC1* (XRCC1) miteinander verbunden (Pena-Diaz et al., 2012). Hingegen beim *long-patch BER* werden zwei bis sechs Nukleotide durch die Polymerase ersetzt. Die *flap endonuclease 1* (FEN1) schneidet die folglich entstandene überhängende Nukleotidsequenz ab und die DNA-Ligase I verbindet die eingefügten Nukleotide zu einem Strang (Pena-Diaz et al., 2012).

Replikationsfehler, wie die Fehlpaarung einzelner Basen und kurze Deletions- bzw. Insertionsschleifen infolge des irrtümlichen Einfügens einer Base, und des Gleitens der DNA-Polymerase während Rekombinations- oder Replikationsprozesse, können durch den Fehlpaarungsreparaturmechanismus, die sogenannte *mismatch repair*, eliminiert werden (Diderich et al., 2011). Die Reparatur eines solchen Schadens wird im direkten Anschluss an die Replikation durch die Proteine *DNA mismatch repair protein MutS* initiiert (Pena-Diaz et al., 2012). Der geschädigte Strang wird durch die Exonuklease 1 entfernt und letztlich mittels der Polymerase  $\delta$  und DNA-Ligase resynthetisiert (Pena-Diaz et al., 2012). Dass dieses System die Akkumulation der genannten Schäden verhindert und somit entscheidend zur Krebsprävention beiträgt, wird durch die Existenz des ererbten nicht-polypären Kolorektalkrebs, bei welchem Gene des Fehlpaarungsreparaturmechanismus mutiert sind, verdeutlicht (Diderich et al., 2011).

### 1.2.2 Strahleninduzierte Genotoxizität

Die Folgen strahleninduzierter Genotoxizität zeichnen sich durch ihre Mannigfaltigkeit aus. UVA- und UVB-Strahlung des Sonnenlichts sind als prävalenter Hauptkrebs induzierender Umweltfaktor bekannt (Cadet et al., 2012). UV-Strahlung katalysiert zwischen den Pyrimidinbasen (Thymin oder Cytosin) der DNA kovalente Bindungen (Yang, 2011). Zu den vorherrschenden durch UV-Licht verursachten photochemischen Reaktion mit der DNA zählen Cyclobutanpyrimidindimere (CPD, 80-90 %) und 6-4 Pyrimidinpyrimidonphotoprodukte (6-4 PP, 10-20 %) (Yang, 2011).

UV-Schäden an der DNA werden neben der Reversionsreparatur und BER hauptsächlich durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) korrigiert (Yang, 2011). Die NER stellt einen vielseitigen Reparaturmechanismus für DNA-Helix verformende Läsionen, wie 6-4 PP UV-Läsionen, große chemische Addukte, Intrastrangquervernetzungen und oxidative Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), dar (Diderich et al., 2011). Helikale Verformungen werden über zwei verschiedene Wege der NER erkannt und entfernt: die global genomische NER und transkriptionsgekoppelte NER (Kamileri et al., 2012).

Bindet der Multiproteinkomplex, unter anderem bestehend aus *xenoderma pigmentosum complementation group C* (XPC)-*UV excision repair protein RAD23* (RAD23)-*centrin 2*-Komplex und dem *UV damaged DNA-binding protein complex* an die geschädigte DNA wird die global genomische NER durch Dissoziation des RAD23 von XPC eingeleitet (Kamileri et al., 2012). Die DNA-Doppelhelix wird folglich durch den Transkriptionsfaktor IIIH entwunden und an den die Läsion umgebenden einzelsträngigen Stellen stabilisiert (Kamileri et al., 2012). Strukturspezifische Endonukleasen schneiden folglich ein 24-32 Nukleotide enthaltendes Fragment, welches die geschädigte DNA enthält (Kamileri et al., 2012). Die draus entstehende einzelsträngige Lücke wird daraufhin durch die replikative DNA-Polymerase  $\delta$  oder  $\epsilon$  oder die Translesions-DNA-Polymerase  $\kappa$  geschlossen und die entstehenden Fragmente durch die DNA-Ligase III/ XRCC1 miteinander verbunden (Kamileri et al., 2012). Translesions-Polymerasen sind im Gegensatz zu anderen Polymerasen in der Lage, Schädigungen in der DNA (z.B. Intrastrang-Quervernetzungen und AP-Stellen) zu umgehen ohne zu einer blockierten Replikation zu führen (Roos und Kaina, 2013). Eine übermäßige Anzahl von Schädigungen hingegen kann dennoch eine Blockierung der Replikation bewirken und zu Doppelstrangbrüchen an den zerbrechlichen, einzelsträngigen Regionen führen (Roos und Kaina, 2013).

Bei der transkriptionsgekoppelten NER erfolgt die Erkennung des Schadens über die RNA-Polymerase II, welche die Rekrutierung des Reparaturkomplexes an die Stelle des Schadens bewerkstelligt (Kamileri et al., 2012). Hat die RNA-Polymerase II einen Schaden erkannt, verbleibt diese an der geschädigten Stelle und es bindet an selbige das Protein *Cockayne syndrome B* (CSB), eine DNA-abhängige ATPase, welche ihrerseits wiederum die verbleibenden NER-Faktoren und die *histone acetyltransferase p300* rekrutieren (Kamileri et al., 2012). Zu diesen Faktoren gehören unter anderem das Protein *Cockayne syndrome A* (CSA), ein Bestandteil des E3-Ubiquitin Ligase-Komplexes (Kamileri et al., 2012). Darüber hinaus erfolgt die Einberufung von *nucleosomal binding protein high mobility group nucleosome binding domain 1* (HMGN1), *XPA binding protein 2* (XAB2) und TFIIS durch CSA (gemeinsam mit CSB) (Kamileri et al., 2012). Die Entfernung der geschädigten DNA erfolgt daraufhin analog der global genomischen NER: Die Doppelhelix wird entwunden, die geschädigten Nukleotide entfernt, die entfernten Nukleotide ersetzt und folglich zu einem durchgängigen Strang ligiert (Kamileri et al., 2012).

### 1.2.3 Chemikalien-induzierte Genotoxizität

#### 1.2.3.1 Bedeutung des Fremdstoffmetabolismus bei der Chemikalien-induzierten Genotoxizität

Der Fremdstoffmetabolismus ist für die toxikologische Wirkung von Substanzen von zentraler Relevanz. Das Gleichgewicht zwischen metabolischer Aktivierung und metabolischer Detoxifizierung determiniert das kanzerogene Potential von chemischen Verbindungen. Man unterscheidet demnach direkte genotoxische Kanzerogene, welche ohne metabolische Aktivierung wirksam sind, und indirekt genotoxische bzw. progenotoxische Kanzerogene, welche ihre Aktivität erst nach metabolischer Aktivierung entfalten (Marquardt et al., 2013).

Im Wesentlichen lassen sich zwei Phasen des Fremdstoffmetabolismus unterscheiden. In der Phase I erfolgt die Funktionalisierung der Substrate durch Einführung oder Freisetzung nukleophiler oder elektrophiler Gruppen mittels Hydrolasen oder Oxidoreduktasen. Elektrophile Metabolite sind in der Lage mit elektronenreichen Strukturen in DNA, RNA oder Proteinen zu reagieren und können demnach ein signifikant mutagenes und/ oder zytotoxisches Potential aufzeigen. Hingegen geht von nukleophilen Metaboliten eine geringere Gefahr aus, da diese nicht in der Lage sind mit endogenen Makromolekülen zu reagieren. Eine Neutralisierung der biologischen Aktivität bzw. Detoxifizierung des Metaboliten erfolgt zumeist durch die Konjugation des entstandenen Zwischenprodukts mit

geladenen und somit gut wasserlöslichen endogenen Bausteinen (z.B. Glucuronsäure, Glutathion oder Sufat) im Rahmen der Phase II, welche gleichzeitig mit einer guten renalen und/ oder biliären Ausscheidbarkeit einhergeht (Croom, 2012; Marquardt et al., 2013; Seviour et al., 2012).

Die bedeutendsten Oxidoreduktasen des Phase I-Metabolismus stellen die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP) dar (Croom, 2012; Rodriguez-Antona und Ingelman-Sundberg, 2006). Im Menschen konnten insgesamt 107 Gene, welche für CYPs 18 verschiedener Familien und 45 Subfamilien kodieren, auffindig gemacht werden (Seviour et al., 2012). Von diesen 107 Genen konnten 57 isoliert, identifiziert und charakterisiert werden (Seviour et al., 2012). Die Nomenklatur dieser Enzyme basiert auf deren Sequenzverwandtschaft: Die Familie wird durch arabische Zahlen angezeigt, gefolgt von Großbuchstaben und einer weiteren Ziffer, welche die Unterfamilie und das Isoenzym charakterisiert (Marquardt et al., 2013; Seripa et al., 2010).

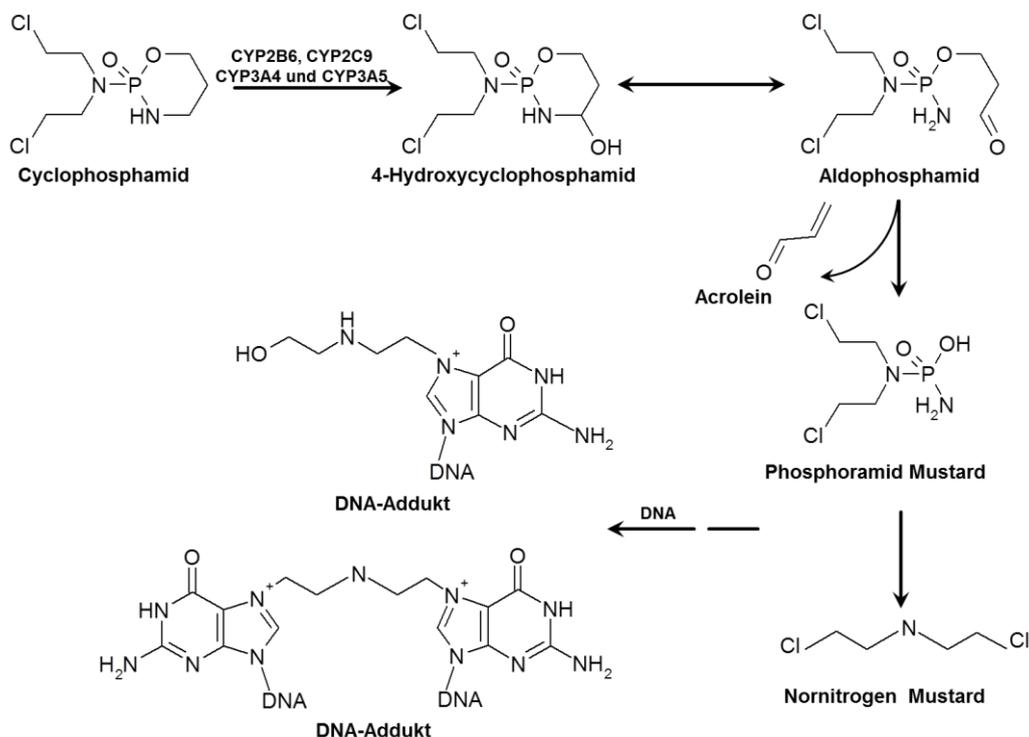
Weitere Vertreter der Oxidoreduktasen sind Flavin-abhängige Monooxygenasen, Cyclooxygenasen und Monoaminoxidasen. Carbonylreduktasen, Alkohol- und Aldehyddehydrogenasen repräsentieren im Wesentlichen die Gruppe der Reduktasen und Dehydrogenasen. Die Hydrolyse von Epoxiden, Glucuroniden, Estern, Sulfaten und Amidin wird von den Hydrolasen der Phase I katalysiert. Am Metabolismus der Phase II sind Transferasen beteiligt. Die Konjugation elektrophiler Substanzen erfolgt durch Glutathion-S-Transferasen, während UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Acetyltransferasen, Sulfotransferasen, Methyltransferasen und Acetyl-CoA-Aminosäure-N-Acetyltransferasen nukleophile Substanzen katalysieren (Croom, 2012; Marquardt et al., 2013; Seviour et al., 2012).

### **1.2.3.2 Struktur und Wirkweise genotoxischer Substanzen**

Zu den wichtigsten Stoffgruppen genotoxischer Substanzen gehören Alkylantien, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, aromatische Amine, diverse Naturstoffe und Metalle (Marquardt et al., 2013).

Ein bekannter Vertreter der alkylierenden Verbindungen stellt das Zytostatikum Cyclophosphamid (CPA) dar (Gor et al., 2010). Es handelt sich bei dieser Substanz um eine pro-genotoxische Substanz, deren Aktivierung vorwiegend durch das Phase I-Enzym CYP2B6 (Malayappan et al., 2010) wie auch durch CYP3A4, CYP3A5 und CYP2C9 erfolgt und deren Inaktivierung im Rahmen der Phase II hauptsächlich durch Konjugation mit Glutathion oder

Sulfat durch Gluthation-S-Transferasen vollzogen wird (Abbildung 1-2) (Gor et al., 2010). Der aktive Metabolit 4-Hydroxycyclophosphamid diffundiert in die Krebszellen und bewirkt die alkylierende Wirkung der Substanz (Gor et al., 2010). Die Tautomerisierung von 4-Hydroxycyclophosphamid resultiert in Aldophosphamid, welches nach  $\beta$ -Elimination von Acrolein zur Bildung des Phosphoramid Mustard führt (Li et al., 2010). Obwohl die beiden Metabolite Phosphoramid Mustard und Nornitrogen Mustard in der Lage sind Guanin an der Stelle N7 zu alkylieren, was in der Ausbildung des DNA-Monoaddukts N-[2-(N7-guaninyl)ethyl]-N-[2-hydroxyethyl]-amin und der DNA-Quervernetzung N,N-bis[2-(N7-guaninyl)ethyl]-amin resultiert, gilt Phosphoramid Mustard hauptsächlich als der DNA-reaktive Metabolit (Malayappan et al., 2010). Die Veränderungen an Guanin sind hydrolytisch labil und können spontan Addukte mit Nukleobasen und AP-Stellen in der DNA ausbilden (Malayappan et al., 2010). Beide Addukte sind stark zytotoxisch, wobei die zytotoxische Wirkung der 1,3-Intrastrang-Quervernetzung vorrangig für den antineoplastischen Effekt *in vivo* verantwortlich ist. Hervorgerufen wird dieser Effekt durch eine inhibierte Trennung des Doppelstrangs, welcher eine notwendige Voraussetzung für die Replikation und Transkription der DNA darstellt (Malayappan et al., 2010).

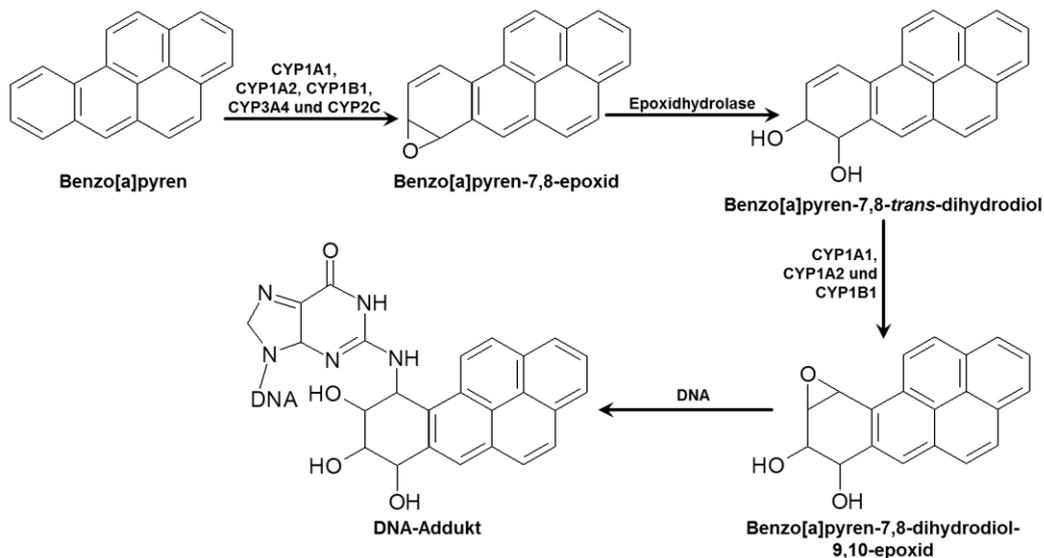


**Abbildung 1-2: Metabolische Aktivierung von Cyclophosphamid.**

(modifiziert nach Gor et al., 2010; Li et al., 2010; Malayappan et al., 2010)

Beno[a]pyren (BaP), ein polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff, ist aufgrund seiner genotoxischen Wirkweise und seiner Fähigkeit in diversen Organen zu akkumulieren, eine

Modellsubstanz für eine Vielzahl toxikologischer Untersuchungen. BaP kann inhalativ über Zigarettenrauch, oral über das Essen (z.B. Grillfleisch) aber auch dermal aufgenommen werden. Nach seiner inhalativen oder oralen Aufnahme gelangt es in Blut, Niere und Leber, dem Organ mit den meisten Enzymen zur Aktivierung von BaP. Der Metabolismus von BaP ist von besonderer Wichtigkeit, da der kanzerogene Effekt der Substanz einer metabolischen Aktivierung bedarf (Abbildung 1-3). Der erste Schritt der metabolischen Aktivierung zu einem mutagenen Metaboliten beinhaltet die Addition von Sauerstoff durch die Enzyme CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP3A4 und CYP2C unter Bildung eines BaP-7,8-epoxids. Die Epoxidhydrilase hydratisiert das Epoxid zu BaP-7,8-*trans*-dihydrodiol, welches weiterhin durch CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 zu BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid oxidiert wird. BaP-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid als ultimaler kanzerogener Metabolit von BaP kann Addukte an der Position N2 von Guanin ausbilden. Das starke kanzerogene Potential von BaP beruht auf der sogenannten Bay-Region, einem angularen Ring, welcher sich durch Fusion gesättigter Benzenringe ausbildet. Darüber hinaus sind auch weitere Metabolite von BaP wie BaP-4,5-oxid in der Lage mit der DNA Addukte auszubilden oder können wie 9-OH-BaP-4,5-oxid eine Bindung mit der DNA eingehen. Seine Fähigkeit mit der DNA Addukte auszubilden macht BaP zu einer stark genotoxischen Substanz (Verma et al., 2012).

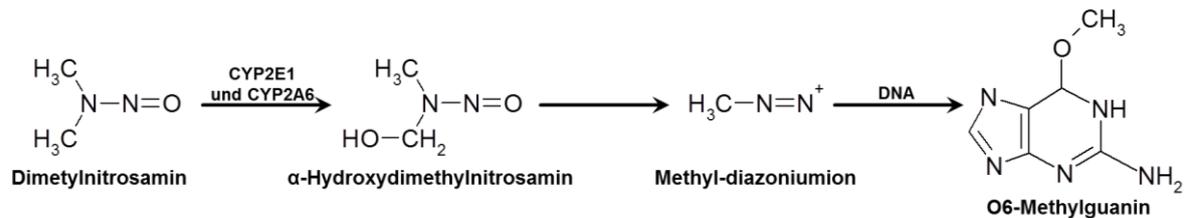


**Abbildung 1-3: Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren.**

(modifiziert nach Verma et al., 2012)

Nitrosamine repräsentieren eine Gruppe potenter humaner Kanzerogene, welche vom Menschen vorwiegend über die Nahrung (z.B. getrocknetes Gemüse und gepökelte Lebensmittel) oder über Zigarettenrauch aufgenommen werden (Chikan et al., 2012). Bei Dimethylnitrosamin (DMN) handelt es sich um das einfachste wie auch häufigste Nitrosamin,

von welchem eine akute Toxizität und potentielle Kanzerogenität ausgeht (Chikan et al., 2012). Die Aktivierung von DMN (Abbildung 1-4) erfolgt zunächst durch Oxidation zu  $\alpha$ -Hydroxydimethylnitrosamin (Chikan et al., 2012) katalysiert von den Enzymen CYP2E1 und CYP2A6, wobei CYP2E1 an der N-Demethylierung vorherrschend beteiligt ist (Chowdhury et al., 2012).  $\alpha$ -Hydroxydimethylnitrosamin wiederum metabolisiert zu dem ultimalen Kanzerogen Methyl-diazoniumion, dessen Methylgruppe übertragen auf die DNA das Methyladdukt O6-Methylguanin ausbilden kann (Chikan et al., 2012).



**Abbildung 1-4: Metabolische Aktivierung von Dimethylnitrosamin.**

(modifiziert nach Chikan et al., 2012; Chowdhury et al., 2012)

Die Reparatur der prämutagenen Läsion O6-Methylguanin kann durch das DNA-Reparaturprotein O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase bzw. Alkyltransferase erfolgen, auf welche die Methylgruppe übertragen wird (Aktories et al., 2013). Während der Replikation fügen DNA-Polymerasen an der gegenüberliegenden Stelle von O6-Methylguanin die Base Thymin ein (Chikan et al., 2012). Im Rahmen der Fehlpaarungsreparatur kann diese Stelle letztlich zu einem Doppelstrangbruch führen (Roos und Kaina, 2013). Darüber hinaus können große Addukte, welche die Replikation blockieren, ebenso wie nicht-reparierte N-Methylpurine und AP-Stellen zu Doppelstrangbrüchen führen (Roos und Kaina, 2013). Bei DNA-Doppelstrangbrüchen handelt es sich um hoch-toxische Schädigungen, welche die genetische Instabilität fördern (Chapman et al., 2012).

Die Reparatur von Doppelstrangbrüchen kann über zwei unterschiedliche Reparaturmechanismen erfolgen: nicht-homologe Strangverknüpfung und homologe Rekombination. Die nicht-homologe Strangverknüpfung ist während des gesamten Zellzyklus aktiv und findet jedoch vorzugsweise in der G<sub>1</sub>-Phase statt, während die homologe Rekombination hauptsächlich nach der Replikation vonstattengeht, da zu dieser Zeit das identische Schwesterchromatid als Vorlage verfügbar ist (Chapman et al., 2012).

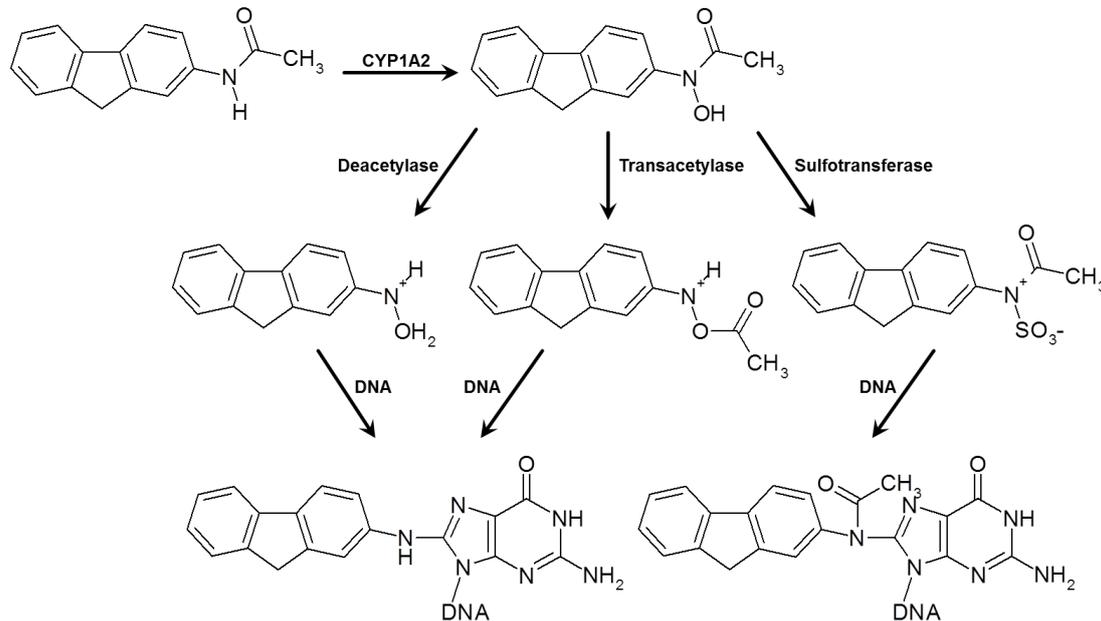
Das Heterodimer bestehend aus den Proteinen Ku70 und Ku80 bindet bei der nicht-homologen Strangverknüpfung an die Enden des Doppelstrangbruchs, verhindert den Abbau der 5'-Strangenden und sorgt zeitgleich für die räumliche Nähe derselben. Die DNA-Proteinkinase wird daraufhin aktiviert, welche den Reparaturmechanismus vorantreibt. Die

Bruchenden werden letztlich durch die DNA-Ligase IV miteinander verbunden, was dieses Reparatursystem im Gegensatz zur homologen Rekombination anfällig für Fehler macht (Chapman et al., 2012).

Im Rahmen der homologen Rekombination wird die Resektion der Doppelstrangbruchenden durch Bindung und Interaktion des MRN-Komplexes (*double-strand break protein MRE11* (MRE11), *DNA repair protein RAD50* (RAD50) und Nibrin (NBN)) und des *CtBP-interacting protein* (CtIP) initiiert (Chapman et al., 2012). RAD50, welches DNA-bindende Fähigkeit besitzt, bringt die beiden Enden des DSB in eine räumliche Nähe, während MRE11 mit Hilfe seiner Exo- und Endonukleaseaktivität die Enden des Bruchs prozessiert (Roos und Kaina, 2013). NBN vermittelt die Translokation des MRN-Komplexes in den Nukleus (Roos und Kaina, 2013). An die folglich generierten 3'-einzelsträngigen Überhänge bindet die Rekombinase *DNA repair protein RAD51 homolog 1* (RAD51) und bildet eine Filamentstruktur aus, welche in die homologe DNA des Schwesterchromatids eindringt und diese DNA als Vorlage zur Rekombination verwendet. Die ausgebildeten Intermediate können unterschiedliche Formen annehmen und definieren über die Genkonversion (Region des Austauschs der DNA-Sequenz), die Länge der einbezogenen Region und den reziproken Austausch das Resultat der Reparatur (Chapman et al., 2012).

Eine vielfältige von Forschern genutzte Modellsubstanz für genotoxische Kanzerogenität aus der Gruppe der aromatischen Amine ist 2-Acetylaminofluoren (AAF) (Verna et al., 1996). Diese Substanz war ursprünglich als Insektizid entwickelt worden und ist jedoch nie aufgrund seiner Toxizität in Langzeitstudien und Tumorgenität zugelassen worden (Verna et al., 1996). Zur Entfaltung der DNA-reaktiven Eigenschaft ist eine metabolische Aktivierung von Nöten (Abbildung 1-5) (Verna et al., 1996). Die Hydroxylierung von AAF zu N-Hydroxy-AAF wird durch das Enzym CYP1A2 katalysiert. N-Hydroxy-AAF kann daraufhin durch die Deacetylase zu N-Hydroxyaminofluoren deacetyliert werden (Verna et al., 1996). Darüber hinaus kann eine Sulfatgruppe durch die Sulfotransferase vermittelt an N-Hydroxy-AAF gekoppelt werden, was in dem Produkt N-Acetyl-N-Sulfoxyaminofluoren resultiert (Verna et al., 1996). Die Transacetylase hingegen katalysiert die Reaktion von N-Hydroxy-AAF zu N-Acetoxyaminofluoren (Verna et al., 1996). Die reaktiven Nitreniumionen dieser Verbindungen reagieren vorzugsweise mit Guanin an der Position C8, was *in vitro* in der Ausbildung von sowohl Aminofluorenaddukten als auch Acetylaminofluorenaddukten resultiert (Verna et al., 1996). *In vivo* werden die Acetylaminofluorenaddukte deacetyliert,

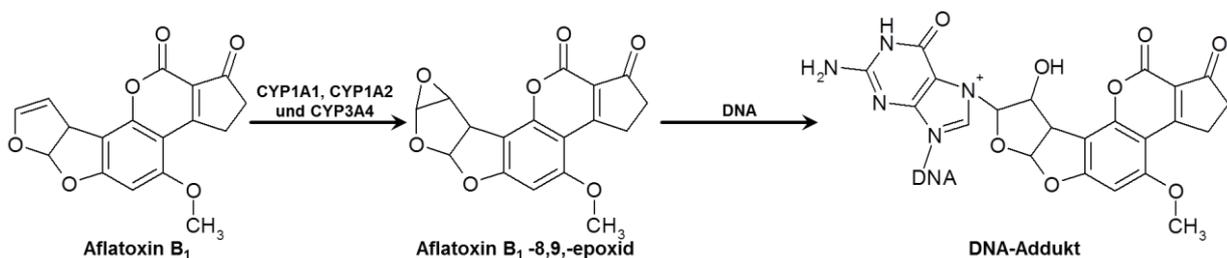
sodass ausschließlich Aminofluorenaddukte vorzufinden sind (Verna et al., 1996). Die entstandenen großen Addukte können die Replikation blockieren (Schorr et al., 2010).



**Abbildung 1-5: Metabolische Aktivierung von 2-Acetylaminofluoren.**

(modifiziert nach Verna et al., 1996)

Das potenteste Kanzerogen in Nahrungsmitteln ist das vom Schimmelpilz *Aspergillus flavus* produzierte Mycotoxin Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>). Häufig sind schlecht gelagerte Lebensmittel insbesondere Erdnüsse, Pistazien, Getreide und Reis von dem Schimmelpilz befallen. Die hepatokanzerogene Eigenschaft erhält die Substanz nach deren Biotransformation (Abbildung 1-6). AFB<sub>1</sub> wird in einem ersten Schritt zu AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxid oxidiert. An der Oxidation von AFB<sub>1</sub> beteiligte Enzyme sind CYP1A1, CYP1A2 und CYP3A4, wobei CYP1A2 vorwiegend die Oxidation zu AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxid katalysiert. Der hochreaktive Metabolit AFB<sub>1</sub>-8,9-epoxid kann Lysin-Addukte mit Serumalbumin und das prämutagene Addukt N7-AFB<sub>1</sub>-guanin mit der DNA ausbilden. Da es sich bei dem gebildeten DNA-Addukt um eine chemisch instabile Struktur handelt, kann sich folglich eine depurinierte Stelle in der DNA ausformen (Gross-Steinmeyer und Eaton, 2012).



**Abbildung 1-6: Metabolische Aktivierung von Aflatoxin B<sub>1</sub>.**

(modifiziert nach Bedard und Massey, 2006; Gross-Steinmeyer und Eaton, 2012)

Neben Aflatoxinen verfügt eine Vielzahl von Naturstoffen über ein DNA-reaktives Potential. Das von *Streptomyces paravulus* gebildete Actinomycin D (ACT) (Freissmuth et al., 2012) wird als Antibiotikum und Antikrebsmedikament verwendet (Paramanathan et al., 2012). Der Interaktionsmechanismus der DNA mit dem planaren tricyklischen Phenoxazonring ist bislang nicht abschließend geklärt worden, wobei die interkalierende Aktivität und die Einzelstrangbindung der Substanz im Vordergrund stehen (Paramanathan et al., 2012). Während die Interkalation die doppelsträngige DNA vor der Replikationsgabel stabilisiert, was zur Inhibition der Replikation führen kann, kann eine Einzelstrangbindung die DNA-Polymerase direkt blockieren (Paramanathan et al., 2012). Neueren Erkenntnissen zufolge findet die bevorzugte Bindung von ACT an die DNA an destabilisierten Doppelsträngen (wie es in Transkriptionsblasen der Fall ist) statt und kann demnach die RNA-Synthese inhibieren (Paramanathan et al., 2012). In hohen Konzentrationen ist ACT in der Lage die Topoisomerase II zu hemmen (Freissmuth et al., 2012).

Das Antikrebsmedikament Etoposid (ETO), ein Derivat des Podophyllotoxins aus dem nordamerikanischen *Podophyllum peltatum* (Maiapfel), wirkt ebenfalls als Inhibitor der Topoisomerase II (Freissmuth et al., 2012). Die ATP-abhängige Topoisomerase II ist für die Entwindung der Superspiralisierung während der Transkription und Replikation zuständig (Austin und Marsh, 1998). Topoisomerase II-Inhibitoren können einen Doppelstrangbruch in der DNA auslösen, was ein toxisches Ereignis für die Zelle darstellt (Austin und Marsh, 1988). Die durch ETO induzierten Strangbrüche steigern die Empfindlichkeit gegenüber Sekundärtumoren (Freissmuth et al., 2012) wie beispielsweise Leukämien (Ezoe, 2012). Neben strukturellen Abberationen ist von numerischen Abberationen und somit einer von einer aneugenen Wirkung von ETO berichtet worden (Mailhes et al., 1996).

Metallverbindungen stellen eine Klasse von Verbindungen dar, von welchen ein genotoxisches Potential ausgeht (Sigel et al., 2011). Ein prominenter Vertreter ist die Platinkomplexverbindung Cisplatin (CP), welche als Zytostatikum in der Behandlung zahlreicher Tumore zugelassen ist (Freissmuth et al., 2012). Nach der Aufnahme in die Zelle erfolgt die Hydrolyse von CP, welches folglich mit der DNA an der Position N7 von Guanin ein Monoaddukt ausbilden kann (Jamieson und Lippard, 1999). Ein weiterer hydrolytischer Schritt befähigt Cisplatin zur Ausbildung bifunktioneller Addukte, indem es an ein weiteres benachbartes Guanin oder Adenin oder nicht benachbartes Guanin bindet, was in Guanin-Guanin-, Adenin-Guanin-, Guanin-Base-Guanin-Intrastrangverbindungen oder Guanin-Guanin-Interstrangverbindungen resultiert (Jamieson und Lippard, 1999).

Intrastrangverbindungen werden durch NER repariert, während die Reparatur von Interstrangverbindungen einem komplexen Mechanismus, der Bestandteile der NER, Doppelstrangbruchreparatur und Translesionssynthese nutzt, folgt (Roos und Kaina, 2013). Bleibt die Reparatur dieser Läsionen aus, kann dies durch eine blockierte Transkription und/oder Replikation zur Einleitung der Apoptose führen (Roos und Kaina, 2013).

#### 1.2.4 Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort

Die Erkennung eines DNA-Schadens initiiert eine Proteinkaskade, welche letztlich in einem Zellzyklusarrest und der Reparatur des Schadens resultiert (Abbildung 1-7). Im Falle einer fehlgeschlagenen Reparatur oder einer übermäßigen Menge an Schäden erfolgt die Initiation der Apoptose. Eine Schlüsselrolle bei der Erkennung des Schadens nehmen die Phosphatidylinositol 3-Kinase-ähnlichen Kinasen *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) und *ATM- and Rad3-related* (ATR) ein (Roos und Kaina, 2013; Sirbu und Cortez, 2013).

Doppelstrangbrüche (DSB) werden sehr schnell detektiert. Die Signaltransduktion erfolgt durch eine Wechselwirkung des MRN-Komplexes mit ATM. Infolge der Rekrutierung an den MRN-assoziierten DSB erfolgt die Aktivierung von ATM durch Autophosphorylierung an Ser1981, was die Dissoziation inaktiver Dimere in katalytisch aktive Monomere bewirkt. Nach der Autophosphorylierung von ATM wird das Histon H2AX (H2AX) phosphoryliert und der MRN-Komplex, das *breast cancer type 1 susceptibility protein* (BRCA1) und *structural maintenance of chromosomes 1* (SMC1) werden unabhängig voneinander an die Stelle des DSB rekrutiert. Daraufhin wird aktiviertes ATM durch NBN und BRCA1 vermittelt an die Stellen des DSB lokalisiert. Aufgrund der räumlichen Nähe ist nun ATM in der Lage mit NBN, BRCA1 und SMC1 zu interagieren und diese zu phosphorylieren. Im Falle einer Aktivierung von ATM in Abwesenheit eines Doppelstrangbruches oder einer ausbleibenden Rekrutierung an die Stelle des DSB werden ausschließlich nukleoplasmatische Substrate (*cellular tumor antigen p53* (p53) und *checkpoint kinase 2* (Chk2)) phosphoryliert (Roos und Kaina, 2013; Shiloh und Ziv, 2013).

Eine blockierte Replikationsgabel an Stellen modifizierter DNA (z.B. Intrastrangverknüpfungen oder DNA-Methylierungen) kann an den resultierenden einzelsträngigen zerbrechlichen Stellen zu DSB führen (Roos und Kaina, 2013). Um diesen vorzubeugen existiert ein Detektionssystem, welches diese bruchanfälligen Stellen stabilisiert und die DNA-Reparatur initiiert (Roos und Kaina, 2013). Das *replication protein A* (RPA), der *ATR-ATR interacting protein* (ATRIP)-Komplex, das *DNA topoisomerase 2-binding protein 1* (TopBP1) und der 9-1-1-Komplex bildet das Detektionssystem (Roos und Kaina,

2013). Während der DNA-Replikation bindet RPA an einzelsträngige DNA und beugt der Bildung von Sekundärstrukturen vor (Roos und Kaina, 2013). Im Falle einer blockierten Replikation erfolgt die Rekrutierung von ATR über ATRIP aufgrund der gebundenen RPA (Roos und Kaina, 2013). Die Kinasen ATM und ATR stehen in einem Abhängigkeitsverhältnis zueinander, da die Phosphorylierung von TopBP1 durch ATM eine notwendige Voraussetzung für die Aktivierung von ATR darstellt (Roos und Kaina, 2013). Die Aktivierung von ATR erfolgt über zwei verschiedene Phosphorylierungsstellen: Ser428 (Sahu et al., 2009) und Thr1989 (Nam et al., 2011). Im Falle einer blockierten Replikationsgabel phosphoryliert ATR die Kinase ATM an Ser1981 (Roos und Kaina, 2013). Ähnlich wie ATM, phosphoryliert ATR eine Reihe von Proteinen wie beispielweise BRCA1 (Roos und Kaina, 2013). Ein durch ATR vielfältig aktivierter Signalweg stellt die homologe Rekombination dar, welche zur Beseitigung einer blockierten Replikation benötigt wird (Roos und Kaina, 2013).

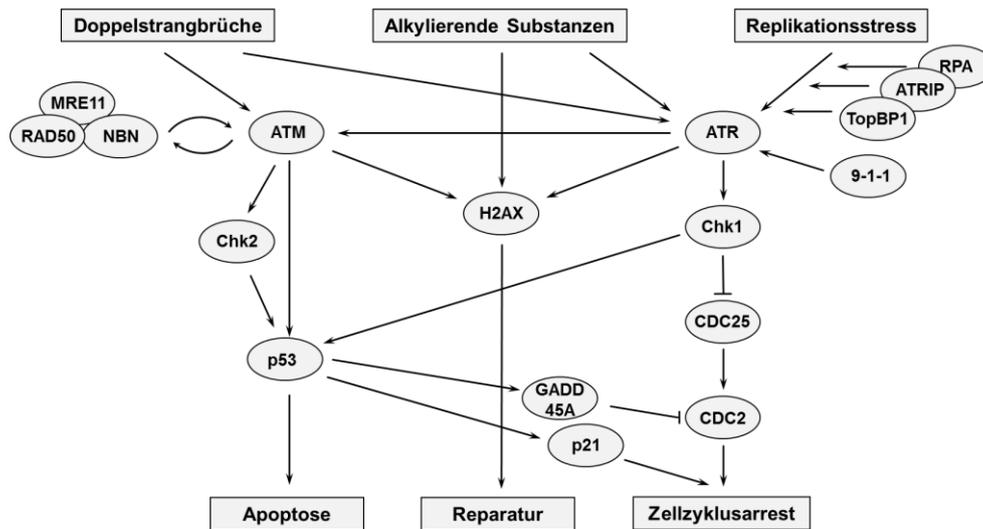
Als Resultat von DSB und blockierten Replikationsgabeln bewirken ATM und ATR die Phosphorylierung des H2AX an Ser139 (Roos und Kaina, 2013). Im Falle von DSB akkumuliert p-H2AX (Ser139) an den Schadensstellen im Nukleus bereits wenige Minuten nach der Schadeninduktion (Ivashkevich et al., 2012). Diese subnukleären Foki rekrutieren die DNA-Reparaturmaschinerie oder Signale der Schadensreparatur an die Schadensstellen (Burma et al., 2001). Die Vielzahl von unverzüglich nach einem DSB gebildeten p-H2AX (Ser139)-Foki wächst mit fortschreitender Reparatur individuell in ihrer Größe, wobei ihre Anzahl gleichzeitig vermindert wird (Dellaire et al., 2009).

Weitere wichtige Phosphorylierungsziele von ATM und ATR stellen Chk2, Chk1 (*checkpoint kinase 1*) und p53 dar (Zhou und Bartek, 2004). Nach der Formation von DSB erfolgte die Phosphorylierung von Chk2 an Thr68 durch ATM, während ATR Chk1 an Ser345 infolge einer blockierten Replikationsgabel phosphoryliert (Roos und Kaina, 2013). Chk1 und Chk2 phosphorylieren im Gegenzug p53 an der Stelle Ser20 (Roos und Kaina, 2013). Die Phosphorylierung von p53 an Ser20 führt zur Dissoziation von *double minute 2 protein* (Mdm2) und *double minute 4 protein* (Mdm4) (Jennings et al., 2013), wodurch die Ubiquitinierung durch Mdm2 ausbleibt und der Abbau von p53 verhindert wird (Roos und Kaina, 2013). Darüber hinaus kann eine Phosphorylierung von p53 an Ser15 auch direkt von ATM und ATR vollzogen werden, was eine erhöhte nukleäre Translokationsaktivität und DNA-bindende Aktivität des Transkriptionsfaktors p53 bewirkt und folglich zur transkriptionellen Aktivierung seiner Zielgene führt (Roos und Kaina, 2013). Zu den durch

p53 regulierten Genen gehören negative Regulatoren des Zellzyklus wie *cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (CDKN1)*, welches auch unter dem Namen *p21* bekannt ist, und *growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha (GADD45A)* und proapoptotische Gene wie *p53 upregulated modulator of apoptosis (PUMA)*, *apoptosis regulator BAX (BAX)* und *Bcl-2 homologous antagonist/killer (BAK)* (Reinhardt und Schumacher, 2012).

Das Protein p21 fungiert als Inhibitor von Cyclin E und dem Cyclin A-*cyclin-dependent kinase 2 (CDK2)*-Komplex, welche zur Transition der G<sub>1</sub>/S-Phase benötigt werden und demnach einen Zellzyklusarrest in der G<sub>1</sub>-Phase bewirken (Cazzalini et al., 2010). Die Progression des Zellzyklus durch p21 kann darüber hinaus auch unabhängig von Cyclin und *cyclin-dependent kinase* erfolgen, indem p21 an das *proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* bindet und somit die DNA-Replikation inhibiert (Cazzalini et al., 2010).

Das induzierte nukleäre Protein GADD45A interagiert mit der *cyclin-dependant kinase 1 (CDC2)* und führt zur Dissoziation vom CDC2-Cyclin B1-Komplex (Zhan et al. 2005). Das freie Cyclin B1 wird daraufhin in das Zytoplasma exportiert und Ubiquitin-vermittelt degradiert (Zhan et al. 2005). GADD45A inhibiert folglich die Aktivität der Kinase CDC2 und resultiert im Zellzyklusarrest während der G<sub>2</sub>/M-Transition (Zhan et al. 2005). Neben der GADD45A vermittelten Inhibition der Kinase CDC2 ist eine Inhibition durch Chk1 möglich (Zhou und Bartek, 2004). Hierbei phosphoryliert Chk1 die *M-phase inducer phosphatase 1 (CDC25A)*, was wiederum zu einer Ubiquitin-vermittelten Degradierung führt (Zhou und Bartek, 2004). Infolgedessen ist CDC25A nicht in der Lage CDC2 durch Dephosphorylierung zu aktivieren (Zhou und Bartek, 2004). Die Phosphorylierung an der Stelle Thr14 oder Ty15 führt zu einer 10-fach reduzierten Kinaseaktivität von CDC2, wobei die Phosphorylierung an beiden Stellen eine 100-fache Reduzierung der Aktivität bewirkt, wodurch die Aktivierung des CDC2-Cyclin B1-Komplexes ausbleibt und in einem Zellzyklusarrest während der G<sub>2</sub>/M-Transition resultiert (Flatt und Pietenpol, 2000).



**Abbildung 1-7: Molekulare Mechanismen der DNA-Schadensantwort.**

→: Aktivierung, ⊥: Inhibition. (modifiziert nach Reinhardt und Schumacher, 2012; Roos und Kaina, 2013; Zhan et al. 2005; Zhou und Bartek, 2004)

### 1.3 Testung auf Genotoxizität und Kanzerogenität

Die Identifizierung von kanzerogenen und genotoxischen Substanzen nimmt eine bedeutende Rolle in der Arzneimittelentwicklung ein. Als Genotoxizitätstest werden *in vitro* und *in vivo* Tests bezeichnet, welche Substanzen, die einen genetischen Schaden durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen induzieren, detektieren. Substanzen, die positiv in diesem Test detektiert werden, haben das Potential als humanes Kanzerogen und/ oder Mutagen zu wirken. Aus diesem Grund können die Befunde von Genotoxizitätstests für die Interpretation von Kanzerogenitätsstudien nützlich sein (ICH, 2011a).

#### 1.3.1 Genotoxizitätstestung

Eine umfassende Risikobeurteilung des genotoxischen Potentials ist für die Zulassung humaner Pharmaka unverzichtbar. Nach der Richtlinie „*Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1)*“ (ICH S2(R1)) erfolgt die Testung neuer kleinmolekularer Entwicklungssubstanzen auf Genotoxizität durch eine Serie von Tests, welche das mutagene Potential durch einen Rückmutationstest in Bakterien und die potentiell genotoxische Eigenschaft durch *in vitro* und/ oder *in vivo* Tests an Säugerzellen evaluieren. Mit dieser Richtlinie sind 2008 die beiden Richtlinien der *International Conference on Harmonization of technical requirements for registration of pharmaceutical for human use (ICH)* „*Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals S2A*“ und „*Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals S2B*“ kombiniert und ersetzt worden (ICH, 1996; ICH, 1997; ICH, 2011a).

Aufgrund der mannigfaltigen Variationen genotoxischer Mechanismen können die resultierenden genotoxischen Schäden nicht durch einen einzelnen Test detektiert werden, was die Durchführung einer Reihe von Tests, der Standardtestbatterie, bedingt. Die beiden folgenden Optionen der Standardtestbatterie sind nach der ICH S2(R1) gleichermaßen anwendbar:

Option 1:

- ein Rückmutationstest in Bakterien (Ames),
- ein zytogenetischer Test auf chromosomalen Schaden in Säugerzellen (*in vitro* Metaphasechromosomenabberationstest oder *in vitro* Mikrokerntest) oder ein *in vitro mouse lymphoma Tk* Genmutationstest und
- ein *in vivo* Test auf Genotoxizität (üblicherweise ein Test auf chromosomalen Schaden in hämatopoetischen Nagerzellen, entweder ein Mikrokerntest oder ein Chromosomenabberationstest in Metaphasezellen) oder

Option 2:

- ein Rückmutationstest in Bakterien (Ames) und
- eine *in vivo* Beurteilung der Genotoxizität in zwei unterschiedlichen Geweben (normalerweise ein Mikrokerntest in hämatopoetischen Nagerzellen und ein zweiter *in vivo* Test; zumeist handelt es sich hierbei um einen DNA Strangbruchtest in der Leber, wenn nicht anderweitig begründet) (ICH, 2011a).

Zu Modifikationen eines oder mehrerer Tests der Standardtestbatterie kann es aufgrund von technischen Limitierungen der Tests kommen. Bei der Testung von Substanzen, welche stark toxisch auf Bakterien wirken (z.B. Antibiotika), kann zusätzlich zum Rückmutationstest in Bakterien ein Mutationstest in Säugerzellen durchgeführt werden. Die Verwendung von sowohl einem akuten als auch einem Studiendesign mit wiederholter Gabe der *in vivo* Tests ist möglich. Im Falle der wiederholten Gabe sollte die Integration des Endpunktes in toxikologische Studien erfolgen. Wenn mehr als ein *in vivo* Endpunkt untersucht wird, sollten diese präferentiell innerhalb einer einzigen Testung erfolgen. Oftmals sind ausreichende Informationen zur möglichen Integration der Dosis in die Studien mit wiederholter Gabe vor dem Beginn der Studie verfügbar, sodass vorab entschieden werden kann, ob eine akute oder integrierte Testung vollzogen wird (ICH, 2011a).

Die Testung auf Genotoxizität erstreckt sich über mehrere Phasen der Arzneimittelentwicklung und sollte nach Angaben der Richtlinie „*Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and marketing authorisation for Pharmaceuticals M3(R2)*“ vor Beginn der klinischen Phase II abgeschlossen sein (ICH, 2009a).

Die Standardtestbatterie kann kanzerogen wirkende Substanzen, welche ihre Wirkung primär über einen direkten genotoxischen Schaden entfalten, was für die meisten der bekannten Humankanzerogene gilt, detektieren (ICH, 2011a). Da die Kanzerogenitätstestung in den frühen Phasen der Arzneimittelentwicklung zu kosten- und zeitintensiv ist und zu einer verzögernden Bereitstellung eines neuen Medikaments für behandlungsbedürftige Patienten führen könnte (Faqi, 2013), werden diese Tests zur Prädiktion von Kanzerogenität verwendet (ICH, 2011a).

Der Grundgedanke der Testbatterie ist das Risiko falsch negativer Ergebnisse zu reduzieren, was im Gegenzug bedeutet, dass ein positiver Befund nicht immer ein genotoxisches/kanzerogenes Risiko für den Menschen zur Folge hat. Aus diesem Grund ist eine Evaluierung der beobachteten Testergebnisse von Nöten. Bei einem positiven Befund im Rückmutationstest in Bakterien (Ames) ist eine nachfolgende Testung *in vivo* zur Abschätzung des mutagenen und kanzerogenen Potentials nötig. Ein artifiziell positiver Effekt kann durch Kontamination mit Aminosäuren (im Falle von *Salmonella thyphimurium* Histidin und bei *Escherichia coli* Tryptophan) oder aufgrund eines für Bakterien spezifischen Metabolismus wie die Aktivierung durch bakterielle Nitroreduktasen auftreten. Da eine Reihe von Umständen aus der Fachliteratur bekannt ist, die zu einem fragwürdig positiven Effekt in *in vitro* Säugerzelltests führen können, ist jedes positive Ergebnis in einem solchen Versuch unter Einbeziehung des Stellenwertes des Befunds zu bewerten. Falls der positive Befund unter *in vivo* Bedingungen nicht auftreten würde oder aber nur bei stark toxischen Konzentrationen zu beobachten ist, ist von einem mangelnden genotoxischen Potential auszugehen, wodurch keine zusätzliche Testung benötigt wird. Sind hingegen unzureichende Hinweise für ein mangelndes genotoxisches Potential vorhanden, wird eine nachfolgende Testung entweder durch einen weiteren *in vitro* Test, welcher mechanistische Information beitragen soll, und einen *in vivo* Test oder alternativ durch zwei angemessene *in vivo* Tests (normalerweise in unterschiedlichen Geweben) empfohlen. Im Spezialfall eines positiven Befundes im *in vitro* Säugerzelltest ausschließlich in Kombination mit dem metabolischen Aktivierungssystem ist die Relevanz dieses Befundes durch einen *in vivo* Test abzuklären.

Darüber hinaus können fälschlicherweise auch negative Ergebnisse im *in vitro* Säugerzelltest bei Prüfsubstanzen auftreten, deren Struktur oder bekannter Metabolismus für die herkömmlichen metabolischen Aktivierungssysteme nicht geeignet ist und demnach eine nachfolgende Testung mit einer anderen geeigneten Methode vorgenommen werden sollte. Auch *in vivo* Testmethoden können falsch positive Resultate aufzeigen. Beispielsweise kann eine gestörte Erythropoese oder eine gestörte Physiologie (wie Hypo- oder Hyperthermie) zu einem Anstieg der Mikronukleiformation führen. Im Falle solcher Effekte ist ein Chromosomenabberationstest besser geeignet. Trotz einer negativen Standardtestbatterie kann eine Kanzerogenitätsstudie positive Befunde liefern, die keinen Hinweis auf einen indirekt genotoxischen Mechanismus liefern. Um den tatsächlich zugrundeliegenden Mechanismus zu verstehen, ist eine nachfolgende zusätzliche Testung nötig, die Modifizierungen des metabolischen Aktivierungssystems beinhalten, oder eine *in vivo* Testung in den Zielorganen der Tumorinduktion (ICH, 2011a).

Ein positives *in vitro* Ergebnis kann aufgrund der bis zu diesem Testpunkt relativ geringen Aufwendungen und der zu erwartenden aufwändigen und kostenintensiven nachfolgenden Testung in manchen Fällen zum Abbruch der Entwicklungssubstanz führen. Oftmals sind jedoch Moleküle als Backup verfügbar, die verbessert werden können, während das ursprünglich getestete Molekül weiterhin charakterisiert wird. Die Zulassung einer gut charakterisierten Entwicklungssubstanz kann trotz eines genotoxischen Befundes im Falle einer sorgfältigen Evaluierung des Sicherheitsrisikos für den Patienten möglich sein (Faqi, 2013).

Es gibt einige Ausnahmen, bei welchen die typische Testung auf Genotoxizität durch die Standardtestbatterie nicht vor den klinischen Studien benötigt wird. Da bei biotechnologischen Pharmazeutika, wie großen Proteinen oder monoklonalen Antikörpern, keine Interaktion mit der DNA zu erwarten ist, ist nach Angaben der Richtlinie „*Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1)*“ keine Testung in der Standardtestbatterie notwendig (ICH, 2011b). Krebstherapeutika benötigen nach der Richtlinie „*Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals S9*“ ebenfalls keiner Standardtestung zur Unterstützung der klinischen Entwicklung, sondern sind in diesem Falle lediglich aus Gründen der Vermarktung erforderlich (ICH, 2009b).

Während der Synthese, Aufreinigung und Lagerung neuer Arzneimittel können nach Angaben der ICH-Richtlinie „*Impurities In New Drug Substances Q3A(R2)*“ genotoxische Verunreinigungen entstehen (ICH, 2006). Die toxikologische Beurteilung dieser

Verunreinigungen stellt eine komplizierte Angelegenheit aufgrund der zur Verfügung stehenden variablen Informationen bezüglich dieser Verunreinigungen dar (EMA, 2006). Liegen keine Daten zur Beurteilung der genotoxischen Verunreinigungen vor, wird nach der Empfehlung der Richtlinie „*Guideline on the limits of genotoxic impurities*“ der *European Medicines Agency* (EMA) die Methode des *Threshold of Toxicological Concern* (TTC) angewandt (EMA, 2006). Die mit einem akzeptablen Risiko verbundene Dosis, der TTC-Wert, beträgt 1,5 µg pro Tag, was einem Krebsrisiko kleiner eins in 100.000 Fällen bei lebenslanger Behandlung entspricht (EMA, 2006). Hochpotente Verbindungen (z.B. Aflatoxine, N-Nitrosoverbindungen, Azoxyverbindungen) sind von dem TTC-Ansatz auszuschließen und benötigen zur Risikobeurteilung einer eigenen toxikologischen Testung (EMA, 2006).

### 1.3.2 Kanzerogenitätstestung

Der meist verwendete Test zur toxikologischen Evaluierung des kanzerogenen Potentials ist eine *in vivo* Kanzerogenitätsstudie am Nager, welche von der *Food and Drug Administration* (FDA), *Environmental Protection Agency* (EPA) und weiteren Regulierungsbehörden weltweit akzeptiert ist. Aufgrund der langen Dauer und der darüber hinaus anfallenden hohen Kosten von Kanzerogenitätsstudien wird die Testung von nicht-genotoxischen Substanzen auf Kanzerogenität zumeist im Anschluss an die Vervollständigung der klinischen Phasen I und II vorgenommen (Faqi, 2013).

Die Richtlinie „*OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 451 Carcinogenicity Studies*“ der *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) beschreibt primär die Beurteilung und Evaluierung von Kanzerogenitätsstudien am Nager. Die Dauer einer typischen Kanzerogenitätsstudie beträgt 2 Jahre. Die Behandlung der Versuchstiere (meist Ratte und Maus) erfolgt somit über einen Zeitraum, welcher den größten Teil ihrer Lebenszeit umfasst. Die Applikationsform der Testsubstanz hängt von der physikalischen und chemischen Beschaffenheit der Substanz und der humanen Applikationsform ab. Die höchste Dosierung sollte minimal toxische Effekte, wie beispielsweise ein Körpergewichtsverlust von bis zu 10 %, hervorrufen. Ausgehend von der höchsten Konzentration werden neben der Kontrollgruppe mindestens zwei weitere Dosierungsgruppen mit jeweils mindestens 50 männlichen und weiblichen Tieren verwendet. Neben einer Reihe von routinemäßigen Parametern zu Lebzeiten der Versuchstiere (z.B. Körpergewicht, Wasser- und Futteraufnahme), stellen pathologische und histopathologische Befunde den experimentellen Endpunkt dar (OECD, 2009).

Kanzerogenitätsstudien verfolgen mehrere Ziele: Neben der Identifizierung des kanzerogenen Potentials der Substanz, welches sich durch eine gesteigerte Inzidenz von Neoplasien, ein vermehrtes Vorkommen maligner Neoplasien oder eine verkürzte Entstehungszeit von Neoplasien auszeichnet, lassen sich Zielorgane für Kanzerogenität und der Zeitraum bis zum Auftreten von Neoplasien definieren. Ein weiteres Bestreben ist die Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung, die Extrapolation des kanzerogenen Effektes für geringe Dosen der humanen Exposition, die Bestimmung des *no observed adverse effect level* (NOAEL) oder einer Bezugsdosis. Darüber hinaus werden Daten aus Kanzerogenitätsstudien zur Hypothesentestung des Wirkmechanismus herangezogen (OECD, 2009).

### 1.3.3 Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Substanzen

Im Rahmen der Risikobewertung genotoxischer und kanzerogener Substanzen wird die Existenz von Schwellenwerten diskutiert (Neumann, 2009; Pratt et al., 2009). Nach der derzeit vorherrschenden Meinung können genotoxische Substanzen bereits nach einer einzigen Interaktion mit der DNA zu einer Mutation führen und infolgedessen schließlich eine Tumorbildung bewirken (Faqi, 2013). Demzufolge lassen sich für genotoxische und kanzerogene Substanzen im Allgemeinen keine Schwellenwerte definieren (Pratt et al., 2009).

Hingegen lassen sich nicht-genotoxische Kanzerogene durch die Existenz von Schwellenwerten charakterisieren, weshalb für diese Substanzen die konventionellen Prinzipien der Dosis-Wirkungs-Beziehung zutreffen (Bolt et al., 2004). Basierend auf dem *lowest observed effect level* (LOEL; niedrigste Konzentration, bei welcher im Tierversuch eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant häufigere toxische Wirkung detektiert werden kann) und dem NOAEL (Konzentration unterhalb des LOEL, bei der es zu keiner signifikanten adversen Wirkung kommt) erfolgt die Bestimmung von Grenz- und Richtwerten (Graefe et al., 2011). Der aus dem Tierversuch abgeleitete NOAEL wird unter Einsatz von Sicherheitsfaktoren zur Ermittlung von maximal zulässigen Belastungen für den Menschen wie z.B. *acceptable daily intake* (ADI; tolerierbare Dosis, bei der eine lebenslange tägliche Einnahme keine gesundheitlichen Schäden bewirkt) angewendet (Bolt et al., 2004; Pratt et al., 2009).

Bei genotoxischen Kanzerogenen erfolgt die Risikobewertung durch die Festlegung eines akzeptablen Risikos, welches zumeist mit einem Wert von 0,0001 % veranschlagt wird. Die Dosis, welche diesem Risiko entspricht, wird als *virtually safe dose* bezeichnet. In *in vivo* Kanzerogenitätsstudien am Nager werden (zur Kompensation der geringen Tierzahlen) Konzentrationen getestet, welche um ein Vielfaches oberhalb der menschlichen Exposition

liegen. Aufgrund dessen besteht die Notwendigkeit zur Extrapolation in den Bereich niedriger Dosierungen. Das niedrigste durch Kanzerogenitätsstudien zu detektierende Risiko liegt bei 5 %. Das akzeptable Risiko für den Menschen ist mit 0,001 % bis 0,00001 % weitaus niedriger und in einem Dosisbereich, der keine nutzbaren Ergebnisse im Tierversuch zur Risikoabschätzung für den Menschen erbringen kann. Die Basis aller Modelle zur mathematischen Extrapolation der zusätzlichen Krebsinzidenz für den Menschen anhand der ermittelten Krebsinzidenz im Tierversuch ist die Annahme, dass die beobachtete Korrelation von Dosis und Häufigkeit auf die niedrigen Dosierungen übertragen werden können und demnach keine Schwellenwerte existieren (Aktories et al., 2013).

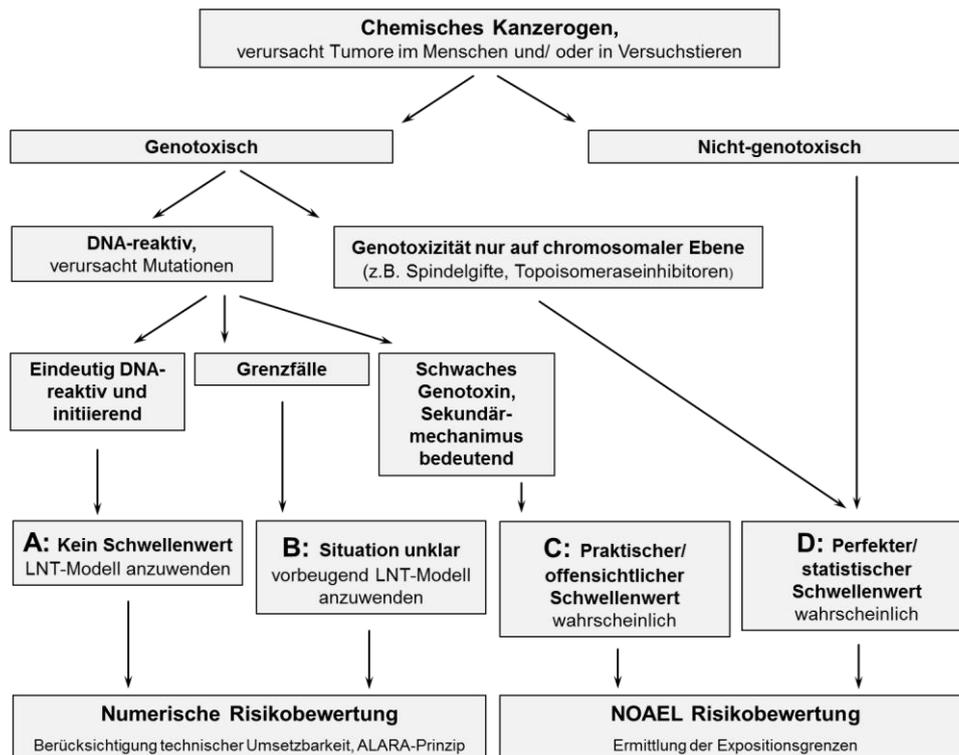
Strategien zur Risikobewertung und Charakterisierung kanzerogener Substanzen werden weltweit diskutiert. Die Berücksichtigung genotoxischer und kanzerogener Wirkmechanismen und der damit verbundenen Identifizierung von Schwellenwerten wird als generelle Idee zur verbesserten Klassifizierung von Kanzerogenen und der Ermittlung des damit verbundenen Risikopotentials betrachtet. In den Fokus der Debatten innerhalb Europas ist vor allem das Klassifizierungsmodell der Europäischen Union (EU) gerückt, welches in den frühen 80er Jahren eingeführt wurde. Während die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die sogenannte MAK-Kommission (MAK: maximale Arbeitsplatzkonzentration), durch die Einführung zwei neuer Kategorien zur Klassifizierung den aufkommenden Debatten zur Beachtung mechanistischer Daten Rechnung getragen hat, wurde das System der EU nicht angepasst (Bolt et al., 2004).

Ein weit verbreitetes System zur Klassifizierung kanzerogener Substanzen stellen die Kriterien zur Beurteilung des kanzerogenen Risikos für den Menschen der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) (Tabelle 1-1) dar (IARC, 2006). Diese wurden 1971 durch eine Serie von Monografien veröffentlicht und fortwährend aktualisiert (IARC, 2006). Mechanistische Daten können bei diesem Modell eine vorherrschende Rolle spielen (Cogliano et al., 2008). Seit 1991 ist es zulässig Substanzen als Humankanzerogen zu klassifizieren obwohl kein hinreichender Beweis im Menschen vorliegt, sondern lediglich ausreichende Belege im Tierversuch und starke Hinweise für einen kanzerogenen Mechanismus in exponierten Menschen vorliegen (Cogliano et al., 2008).

**Tabelle 1-1: Klassifizierung humaner Kanzerogene der *International Agency for Research on Cancer*.**  
(IARC, 2006)

Gruppe	Beschreibung
Gruppe 1	kanzerogen für den Menschen (hinreichende Evidenz für eine Kanzerogenität im Menschen)
Gruppe 2A	vermutlich kanzerogen für den Menschen (limitierte Evidenz für eine Kanzerogenität im Menschen und hinreichende Evidenz für eine Kanzerogenität im Versuchstier)
Gruppe 2B	möglicherweise kanzerogen für den Menschen (limitierte Evidenz für eine Kanzerogenität im Menschen und weniger als hinreichende Evidenz für eine Kanzerogenität im Versuchstier)
Gruppe 3	nicht klassifizierbar bezüglich der Kanzerogenität beim Menschen (mangelnde Evidenz für eine Kanzerogenität im Menschen und mangelnde oder limitierte Evidenz für eine Kanzerogenität im Versuchstier)
Gruppe 4	vermutlich nicht kanzerogen für den Menschen (Evidenz weist auf einen Mangel an Kanzerogenität im Menschen und Versuchstier hin)

Ein neuer Ansatz zur Risikobewertung und Charakterisierung von Kanzerogenen wurde 2004 basierend auf den Ausführungen von Streffer et al. unterbreitet. Es werden hierbei vier verschiedene Gruppen von Kanzerogenen unterschieden (Abbildung 1-8). Genotoxische Kanzerogene, welche über eine eindeutige DNA-reaktive und initiierende Wirkung verfügen und keine Schwellenwerte besitzen, bilden eine Gruppe. Die Risikoermittlung niedriger Dosen erfolgt über ein lineares Modell, das sogenannte *linear non-threshold* (LNT)-Modell. Die behördliche Regulierung verläuft nach dem *as low as reasonably achievable* (ALARA)-Prinzip, welchem zufolge die Exposition so gering wie möglich gehalten werden soll, unter Berücksichtigung der technischen Umsetzbarkeit und sozialpolitischer Aspekte (Gruppe A). Ist die Existenz eines Schwellenwerts für genotoxische Kanzerogene nicht ausreichend gesichert, wird vorbeugend das LNT-Modell angenommen und in diesen Fällen standardmäßig angewendet (Gruppe B). Bei genotoxischen Kanzerogenen, für welche ein Schwellenwert (sogenannter praktischer/ offensichtlicher Schwellenwert) durch mechanistische und/ oder toxikokinetische Studien belegt ist, erfolgt die Ermittlung der Expositionsgrenzen über den NOAEL (Gruppe C). Nicht DNA-reaktive Kanzerogene, deren Genotoxizität auf Ebene der Chromosomen stattfindet (z.B. Spindelgifte und Topoisomeraseinhibitoren) und nicht-genotoxische Kanzerogene verfügen über wahre Schwellenwerte, welche auch als perfekte/ statistische Schwellenwerte bezeichnet werden. Die Expositionsgrenzen dieser Substanzen werden ebenfalls über den NOAEL ermittelt (Gruppe D) (Bolt et al., 2004; Streffer et al., 2004).



**Abbildung 1-8: Ansatz zur Risikobewertung und Charakterisierung von Kanzerogenen nach den Überlegungen von Streffer et al.**

(modifiziert nach Bolt et al., 2004; Streffer et al., 2004)

### 1.3.4 Limitierungen der *in vitro* Tests der Standardtestbatterie

Das wichtigste Ziel eines jeden *in vitro* Tests ist es, die Resultate der *in vivo* Testung zu prädizieren. Im speziellen Fall der Genotoxizitätstestung sollten die *in vitro* Tests die Endpunkte der *in vivo* Genotoxizitätstestung und Kanzerogenitätsstudie bestmöglich voraussagen, um möglichst früh im Prozess der Arzneimittelentwicklung Substanzen auszusortieren, um eine anschließende Testung am Tier zu vermeiden (Faqi, 2013).

Der Rückmutationstest in Bakterien (Ames) zeichnet sich durch seine hohe Spezifität und Sensitivität aus. Allerdings ist die Sensitivität durch Substanzen, welche ihre Aktivität ausschließlich in eukaryotischen Zellen entfalten können, beschränkt. Das Testsystem ist manchmal nicht in der Lage Substanzen, welche große DNA-Deletionen verursachen oder aber einen nicht DNA-reaktiven Mechanismus (z.B. Aneugene) aufweisen, zu detektieren. Darüber hinaus können Substanzen, welche mit für Säugerzellen spezifischen Proteinen oder Strukturen wie der DNA-Polymerase, Topoisomerase oder dem Spindelapparat interagieren, zu einem falsch negativen Ergebnis führen. Falsch positive Ergebnisse hingegen können in seltenen Fällen durch einen für Bakterien spezifischen Metabolismus (z.B. Natriumazid und einige Nitrogruppen enthaltende Substanzen) bedingt sein, welche in Säugerzellen nicht auftreten würden (Garcia-Canton et al., 2012).

Für eine vollständige Beurteilung des genotoxischen Potentials einer Substanz im Rahmen der ersten Option der Richtlinie ICH S2(R1) sind *in vitro* Tests in Säugerzellen notwendig. Bedauerlicherweise verursachen diese Tests eine hohe Rate falsch positiver Ergebnisse. Es existiert eine Vielzahl an Ursachen, welche diese fehlerhaften Ergebnisse verursachen können. Die verwendeten Zellsysteme zeichnen sich durch einen defizienten DNA-Reparaturmechanismus aus. Darüber hinaus kann eine genetische Veränderung der Zellen während ihrer Subkultivierung zu einer vermehrten Anfälligkeit für genotoxische Schäden führen. Die für die hohen Testkonzentrationen benötigten Zytotoxizitätsbereiche können ebenfalls zu einem positiven Ergebnis führen, der nicht mit dem genotoxischen Potential der Substanz in Zusammenhang steht. Da die verwendeten Zellsysteme eine limitierte metabolische Aktivität aufweisen, ist die Mehrheit der Tests nicht in der Lage Substanzen, deren Metabolite genotoxisch wirken, zu detektieren. Aus diesem Grund wird ein metabolisches Aktivierungssystem zumeist in Form eines Rattenleber-S9, welcher aus mit CYP-Induktoren behandelten Tieren gewonnen wird, den Zellen zugefügt. Allerdings weist der zugefügte S9 aus der Rattenleber aufgrund seines Mangels an Phase II-Enzymen und Kofaktoren eine verminderte detoxifizierende Kapazität auf, was zu einer gesteigerten Anzahl an Metaboliten führen kann, welche unbedeutend für die *in vivo* Situation sind (Garcia-Canton et al., 2012).

Da positive Ergebnisse in *in vitro* Genotoxizitätstests in Säugerzellen eine nachfolgende zusätzliche *in vivo* Studie bedingen, würden Testsysteme mit einer erhöhten Spezifität bei möglichst gleichbleibender Sensitivität zu einer reduzierten Verwendung von Versuchstieren führen (Kirkland et al., 2006). Ein möglicher Ansatz, um die Anzahl falsch positiver Ergebnisse zu reduzieren, ist die Verwendung p53- und DNA-Reparatur-kompetenter Zellsysteme, deren fremdstoffmetabolisierende Kapazität charakterisiert ist, bei einer zusätzlichen Anpassung der Zytotoxizitätsgrenzen und einer geeigneten Methode zur Detektion der Zytotoxizität (Fowler et al., 2012a; Fowler et al., 2012b; Kirkland et al., 2007). Das *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) empfiehlt eine Reihe von Chemikalien, unterteilt in drei verschiedene Gruppen, die für die Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests eingesetzt werden sollte (Tabelle 1-2, 1-3 und 1-4) (Kirkland et al., 2008).

**Tabelle 1-2: Gruppe 1 ECVAM-Substanzen\*.**

(modifiziert nach Kirkland et al., 2008)

Name	Abkürzung	CAS-Nummer	weitere Information
<b>I. Ames-positive <i>in vivo</i> Genotoxine</b>			
<b>(i) O6- und N7-Alkylantien</b>			
Cyclophosphamid	CPA	6055-19-2	metabolische Aktivierung durch CYP2B6
Ethylnitrosourea	ENU	759-73-9	starkes Mutagen (O6-Alkylierung)
Methylmethansulfonat	MMS	66-27-3	starkes Mutagen (N7-Alkylierung)
<b>(ii) polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe</b>			
Benzo[a]pyren	BaP	50-32-8	metabolische Aktivierung durch CYP1A1, CYP1B1 und Epoxidhydrolase, bildet sperrige Addukte
7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen	DMBA	57-97-6	metabolische Aktivierung durch CYP1B1, bildet sperrige Addukte
<b>(iii) Nitrosamine und aromatische Amine</b>			
Dimethylnitrosamin	DMN	62-75-9	metabolische Aktivierung durch CYP2E1, bildet O6- und N7-Methylguanin
2-Acetylaminofluoren	AAF	53-96-3	Hydroxylierung durch CYP1A2 und dann Acetylierung, bildet C8-Addukt an Guanin
2,4-Diaminotoluol	DAT	95-80-7	metabolische Aktivierung
2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin	IQ	76180-96-6	metabolische Aktivierung
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin	PhIP	-	metabolische Aktivierung
<b>(iv) andere</b>			
Aflatoxin B <sub>1</sub>	AFB <sub>1</sub>	1162-65-8	metabolische Aktivierung durch CYP3A4, bildet zahlreiche Addukte
Cadmiumchlorid	CdCl <sub>2</sub>	10108-64-2	-
Cisplatin	CP	15663-27-1	quervernetzendes Agens
<i>p</i> -Chloranilin	CA	106-47-8	-
<b>II. <i>in vivo</i> Genotoxine negativ oder mehrdeutig in Ames</b>			
Etoposid	ETO	33419-42-0	Topoisomeraseinhibitor
Hydroquinon	HQ	123-31-9	Aneugen
Azidothymidin	AZT	30516-87-1	Nukleosidanaloga
Natriumarsenit	SA	7784-46-5	-
Taxol	T	33069-62-4	Aneugen
Chloramphenicol	CAP	56-75-7	Clastogen

\* Gruppe 1 Substanzen (*in vivo* Genotoxine, die positiv in *in vitro* Genotoxizitätstests an Säugerzellen detektiert werden sollten), welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind.

**Tabelle 1-3: Gruppe 2 ECVAM-Substanzen\*.**

(modifiziert nach Kirkland et al., 2008)

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>CAS-Nummer</b>
<b>(i) nicht-Kanzerogene mit negativen <i>in vivo</i> Genotoxizitätsdaten</b>		
Ampicillintrihydrat	APT	7177-48-2
D-Mannitol	MAN	69-65-8
<b>(ii) nicht-Kanzerogene ohne <i>in vivo</i> Genotoxizitätsdaten</b>		
Phenforminhydrochlorid	PHC	834-28-6
<i>n</i> -Butylchlorid	BC	109-69-3
(2-Chloroethyl)-trimethylammoniumchlorid	TAC	999-81-5
Cyclohexanon	CH	108-94-1
N,N-Dicyclohexylthiourea	DCHT	1212-29-9
Trinatriumhydrogenethylendiamintetraacetat	TET	150-38-9
Ephedrinsulfat	EPS	134-72-5
Erythromycinstearat	EYS	643-22-1
Fluometuron	FM	2164-17-2
Phenanthracen	PA	85-01-8
<b>(iii) nicht-genotoxische Kanzerogene</b>		
D-Limonen	DL	5989-27-5
Diethylhexylphthalat	DEP	117-81-7
Amitrol	AT	61-82-5
<i>tert</i> -Butylalkohol	TBA	75-65-0
Diethanolamin	DA	111-42-2
Melamin	MEL	108-78-1
Methylcarbammat	METC	598-55-0
Progesteron	PRO	57-83-0
Pyridin	PYR	110-86-1
Tris(2-ethylhexyl)phosphat	TEP	78-42-2
Hexachloroethan	HCE	67-72-1

\* Gruppe 2 Substanzen (nicht-DNA-reaktive Chemikalien (beinhaltet nicht-genotoxische Kanzerogene), die negative Ergebnisse in *in vitro* Genotoxizitätstests an Säugerzellen liefern sollten), welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind.

**Tabelle 1-4: Gruppe 3 ECVAM-Substanzen\*.**

(modifiziert nach Kirkland et al., 2008)

<b>Name</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>CAS-Nummer</b>
<b>(i) nicht-Kanzerogene, die negativ oder mehrdeutig für Genotoxizität <i>in vivo</i> sind</b>		
D,L-Menthol	MEN	15356-70-4
Phthalsäureanhydrid	PAH	85-44-9
<i>tert</i> -Butylhydroquinon	TBHQ	1948-33-0
Anthranilsäure	AA	118-92-3
1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin)	DB	108-46-3
2-Ethyl-1,3-hexandiol	EH	94-96-2
Sulfisoxazol	SO	127-69-5
<b>(ii) nicht-Kanzerogene ohne <i>in vivo</i> Genotoxizitätsdaten</b>		
Ethionamid	ETAM	536-33-4
Curcumin	CU	458-37-7
Benzylalkohol	BA	100-51-6
Urea	U	57-13-6
<b>(iii) nicht-genotoxische Kanzerogene oder kanzerogen aufgrund von (für den Menschen) irrelevanten Mechanismen</b>		
Natriumsaccharin	SSA	128-44-9
<b>(iv) ergänzende Liste (Prädiktion der <i>in vitro</i> Genotoxizitätsergebnisse eingeschränkt)</b>		
Propylgallat	PG	121-79-9
<i>p</i> -Nitrophenol	NPH	100-02-7
Natriumxylolsulfonat	SXS	1300-72-7
Ethylacrylat	ETAC	140-88-5
Eugenol	EUG	97-53-0
Isobutyraldehyd	IBA	78-84-2
2,4-Dichlorophenol	DP	120-83-2

\* Gruppe 3 Substanzen (nicht-DNA-reaktive Chemikalien (beinhaltet nicht-genotoxische Kanzerogene), metabolische Gifte und andere Substanzen, die negative Ergebnisse in *in vitro* Genotoxizitätstests an Säugerzellen liefern sollten, von welchen aber berichtet worden ist, dass diese Chromosomenabberationen oder Tk Mutationen in Maus-Lymphoma-Zellen, oftmals bei hohen Konzentrationen oder hohen Zytotoxizitätsniveaus, induzieren), welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind.

### 1.3.5 Zusätzliche nicht-regulatorische Genotoxizitätstests in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung

Bereits in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung können *in silico* Evaluierungen zur Priorisierung der Substanzen für Hochdurchsatztests vollzogen werden (Faqi, 2013). Darüber hinaus können vor der Nominierung des Substanzkandidaten Genotoxizitätstests in Form eines miniaturisierten Ames und/ oder Zytogenitätstests (zumeist ein Test auf Chromosomenabberationen oder Mikrokerne) durchgeführt werden (Faqi, 2013). Die Detektion genotoxischer Substanzen in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung kann eine nachfolgende Testung *in vitro* und/ oder *in vivo* vermeiden, was sowohl aus ökonomischen Aspekten als auch aus Gründen des Tierschutzes anzustreben ist. Diese Vorgehensweise trägt dem von W.M.S. Russel und R.L. Burch 1959 begründeten 3R-Prinzip

Rechnung, welches besagt, dass bei notwendigen Tierversuchen diese mit der minimal möglichen Anzahl an Versuchstieren (*Reduce*) unter Vermeidung inhumaner Prozeduren für die Tiere (*Refine*) durchgeführt werden sollen und nicht notwendige Tierversuche durch Alternativen ersetzt werden sollen (*Replace*) (Russell und Burch, 1959). Darüber hinaus hat die Entwicklung von Alternativmethoden zum Tierversuch durch das Inkrafttreten der EU-Verordnung für Chemikalien und deren sichere Nutzung, welche sich mit der Registrierung, Evaluierung, Zulassung und Beschränkung von chemischen Substanzen (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemical substances* (REACH)) befasst, zunehmend an Bedeutung gewonnen (Europäische Kommission, 2012).

Bei *in silico* Modellen handelt es sich um hilfreiche Computerprogramme zur Prädiktion von Strukturen und Substrukturen, von welchen ein genotoxisches Potential ausgeht (Faqi, 2013). Diese Modelle werden zur toxikologischen Beurteilung genotoxischer Verunreinigungen in Pharmazeutika, welche während der Syntheseprozesse und/ oder der Lagerung entstehen können, verwendet (Fioravanzo et al., 2012). Prinzipiell lassen sich zwei verschiedene Arten von *in silico* Systemen unterscheiden: zum einen Richtlinien-basierte Systeme, bei welchen alarmierende Hinweise auf der Basis von biologischen Daten aus der Literatur oder von Datenbanken (z.B. *Deductive Estimation of Risk based on Existing Knowledge* (DEREK), Tox Tree) erzeugt werden und zum anderen *quantitative structure-activity relationships* (QSAR)-Modelle, die Übungs- und Validierungsreihen, molekulare Beschreibungen und Algorithmen zur Modellerstellung verwenden (Faqi, 2013; Serafimova et al.; 2010). Bei einem positiven Befund des *in silico* Modells ist eine nachfolgende Testung in Form eines Ames-Test notwendig (Sutter et al., 2013).

Es existiert eine Reihe von Hochdurchsatztests, welche in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung zur Priorisierung der Substanzkandidaten verwendet wird. Bei dem GreenScreen<sup>®</sup> HC Test handelt es sich um einen *GADD45A*-Reportergentest der Firma Gentronix, welcher sich für einen erhöhten Durchsatz eignet. Die hierbei verwendete p53-kompetente humane Zelllinie TK6 ist mit einem *GADD45A-Green Fluorescent Protein*-Reportersystem transfiziert, welches einen genotoxischen Schaden durch eine gesteigerte Expression von *GADD45A* anzeigt (Birrell et al., 2010). Luciferase-basierte Reportergentests an HepG2-Zellen zur Untersuchung von *DNA repair protein RAD51 homolog 3* (*RAD51C*), *Cystatin A* und *p53*, welche in die DNA-Schadensantwort involviert sind, sind in der Lage mechanistische Informationen zur Genotoxizitätstestung in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung beizutragen (Westerink et al., 2010).

Neben dem Rückmutationstest in Bakterien (Ames) werden weitere genetisch modifizierte Bakterien zur Genotoxizitätstestung verwendet (Biran et al., 2010). Eine Vielzahl dieser Tests basiert auf der Regulation von Genen der SOS-Schadensantwort, welche infolge eines DNA-Schadens induziert werden (Biran et al., 2010). Die bei diesen Tests verwendeten Bakterien tragen ein Fusionsplasmid, wobei der Promotor des zu untersuchenden Gens die Transkription eines Reportergens reguliert (Biran et al., 2010). Sowohl beim umu-Test an *Salmonella typhimurium* (Oda et al., 1985) als auch dem SOS-Test an *Escherichia coli* (Quillardet et al., 1982) wird das für  $\beta$ -Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* als Reportergen verwendet (Biran et al., 2010). Der kommerziell erwerbliche Genotoxizitätstest VITOTOX<sup>TM</sup> an *Salmonella typhimurium* ermöglicht eine Echtzeit-Detektion der SOS-Schadensantwort durch Verwendung von Reportergenen, welche für Licht-emittierende Proteine kodieren (Biran et al., 2010; van der Lelie et al., 1997). Des Weiteren werden Genotoxizitätstests an Hefen durchgeführt (Westerink et al., 2009). Bei dem RadarScreen-Test handelt es sich um einen Reportergentest an Hefen, bei welchem  $\beta$ -Galaktosidase transkriptionell durch den Promotor des Gens *RAD54* (*DNA repair and recombination protein RAD54*), welches im Rahmen der DNA-Schadensantwort an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt ist, reguliert wird (Westerink et al., 2009).

Abseits der bereits erwähnten Technologien hat die des *high content imaging* (HCI) in den letzten Jahren eine vermehrte Anwendung in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung erfahren (Taylor et al., 2007). Bei dieser Technologie handelt es sich um eine automatisierte Bildgebungsplattform, deren Fluoreszenzmikroskop mit Bildanalysealgorithmen und Informatiktools ausgestattet ist, um die Detektion und Analyse der Fluoreszenzbilder von Millionen von Zellen in Mikrotiterplatten zu gewährleisten (Haney, 2008). Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Wellenlänge ermöglicht die Detektion einer Vielzahl zellulärer Eigenschaften in einem einzigen Präparat, wobei die Software zur Bildanalyse sowohl qualitative als auch quantitative Daten aus einer Vielzahl von fluoreszierenden Parametern (z.B. Fluoreszenzintensitäten, relative Intensitätsraten, Strukturen innerhalb bestimmter Regionen, zelluläre und subzelluläre Morphometrien und die absolute Anzahl zellulärer Bestandteile wie Nuklei oder Aktinfilamente) gewinnen kann (Haney, 2008). Nicht nur aufgrund des erhöhten Durchsatzes, sondern auch aufgrund der relativ geringen Substanzmenge und der relativ kurzen Durchführungszeit eignet sich die HCI-Technologie besonders zum Einsatz in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung (Mondal et al., 2010).

Eine verbreitete Anwendung der HCI-Technologie zur toxikologischen Evaluierung genotoxischer Substanzen stellt der Mikrokerntest dar. Hierbei handelt es sich um eine valide Alternative zum manuellen Mikrokerntest (Diaz et al., 2007). Der HCI-basierte Mikrokerntest eignet sich dazu im Rahmen der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung einen Zusammenhang zwischen der Struktur und dem genotoxischen Potential der Substanz aufzudecken und darüber hinaus dazu mechanistische genotoxische Studien durchzuführen (Mondal et al., 2010). Des Weiteren offeriert diese Methode die Diskriminierung zwischen aneugenen und clastogenen Substanzen (Westerink et al., 2011).

In den vergangenen Jahren wurde H2AX vermehrt zur Detektion von Doppelstrangbruch-induzierenden Substanzen, mitunter auch integriert in mechanistischen Studien, eingesetzt (Garcia-Canton et al., 2012). H2AX kann mittels verschiedener Methoden quantifiziert und detektiert werden (Garcia-Canton et al., 2012). Kim et al. konnten 2011 den Zusammenhang zwischen der Fokianzahl von phosphoryliertem H2AX und der vorhandenen DNA-Schädigung mittels der Entwicklung und Durchführung eines quantitativen, Zell-basierten HCI-Testsystems zeigen (Kim et al., 2011). Die HCI-Technologie wurde in der Vergangenheit bereits zur Detektion von durch ionisierende Strahlung induzierten Doppelstrangbrüchen eingesetzt, um den Effekt der Strahlenbelastung (Hou et al., 2009) und von Radiosensitizern nachzuweisen (Fu et al., 2012).

#### **1.4 Zielstellung**

Unter Verwendung der HCI-Technologie sollte in dieser Arbeit ein sensitiver und spezifischer Test zur Identifizierung von genotoxischen und progenotoxische Substanzen entwickelt werden. In einer vorangegangenen Studie wurden globale Genexpressionsanalysen an dem Zellkultursystem der Hepatomazelllinie HepG2 durchgeführt (Boehme et al., 2011). Basierend auf den identifizierten Genen und Signaltransduktionswegen und darüber hinaus einer Literaturrecherche der DNA-Schadensantwort wurde eine Auswahl an potentiell prädiktiven Genen für einen genotoxischen Effekt getroffen. Das erste Ziel der Arbeit war es, die Prädiktivität dieser putativen Markerproteine mit einer Auswahl an genotoxischen Modellsubstanzen (MMS, ACT, ETO), progenotoxischen Modellsubstanzen (CPA, DMBA, AFB1 und AAF) und nicht-genotoxischen Substanzen (MAN, PHC und PRO) ausfindig zu machen. Das nächste Ziel dieser Arbeit war es mit den prädiktivsten Markerproteinen ein multi-parametrisches HCI-basiertes Testsystem zu etablieren. Nach der Etablierung des Testsystems wurde die Leistung desselben durch Testung einer Reihe von Chemikalien, welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro*

Genotoxizitätstests empfohlen ist (Kirkland et al., 2008), überprüft. Das Ziel war es zu testen, ob sich dieses HCI-basierte Testsystem durch seinen möglichen hohen Durchsatz, den geringen Zeitaufwand und die geringe Menge benötigter Substanz für den Einsatz in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung eignet und eine spezifische und sensitive Detektion genotoxischer Substanzen gewährleistet.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 1.1.1 Substanzen und Lösungen

Name	Hersteller
2-Acetylaminofluoren	Acros Organics N.V., Geel, Belgien
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Aflatoxin B <sub>1</sub>	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2-Amino-3-methyl-imidazo[4,5-f]chinolin	Apollo Scientific Ltd., Cheshire, England
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin	Apollo Scientific Ltd., Cheshire, England
Amitrol	TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien
Ampicillintrihydrat	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Anthranilsäure	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Azidothymidin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Benzo[a]pyren	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Benzylalkohol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
<i>n</i> -Butylchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Cadmiumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
CASY <sup>®</sup> clean	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CASY <sup>®</sup> ton	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
CellTracker™ Green	Molecular Probes <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
5-Chloromethylfluorescein-diacetat	
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
<i>p</i> -Chloranilin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
(2-Chlorethyl)-trimethylammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Cisplatin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Coomassie <sup>®</sup> Brillantblau G250	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Curcumin	Acros Organics N.V., Geel, Belgien
Cyclohexanon	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Cyclophosphamid	Calbiochem <sup>®</sup> / Merck Millipore /Merck KGaA, Billerica, USA
Dexamethason	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2,4-Diaminotoluol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2,4-Dichlorophenol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
N,N-Dicyclohexylthiourea	TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien
Diethanolamin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Diethylhexylphthalat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
7,12-Dimethylbenz[a]anthracen	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Dimethylnitrosamin	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO) Hybri-Max <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> / F-12 + 12,92 mM HEPES + 2,5 mM L-Glutamin (DMEM/F-12) mit Phenolrot	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> / F-12 + 15,02 mM HEPES + 2,5 mM L-Glutamin (DMEM/F-12) ohne Phenolrot	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (PBS) ohne Calcium/ Magnesium (1×; 10×)	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Einfriermedium	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Ephedrinsulfat	LGC Standards Ltd., Teddington, England
Erythromycinstearat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Eserserum	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol LiChrosolv <sup>®</sup>	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethionamid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
7-Ethoxyresorufin (Resorufinethylether)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Ethylacrylat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2-Ethyl-1,3-hexandiol	Acros Organics N.V., Geel, Belgien
Ethylnitrosourea	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Etoposid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Eugenol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Fluometuron	Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Deutschland
Formaldehydlösung (37 %) in Wasser	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
fötale Kälberserum (FBS)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gentamicin	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Hexachlorethan	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Hoechst 33342, Trihydrochlorid, Trihydrat	Molecular Probes <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Hydroquinon	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Insulinlösung, human (1,74 mM)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Insulin (72,41 mM)-Transferrin (6,88 mM)-Selenium (3,87 µM)-Lösung	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Isobutyraldehyd	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Limonen	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
D-Luciferin Kaliumsalz	Promega Corp., Madison, USA
Magnesiumchlorid	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
D-Mannitol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Melamin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
D,L-Menthol	TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien
Methylcarbamat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
3-Methylcholanthren	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Natriumarsenit	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumpyruvat (100 mM)	Gibco <sup>®</sup> / Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Natriumsaccharin	TCI Europe N.V., Zwijndrecht, Belgien
Natriumxyloisulfonat	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
$\beta$ -Nicotinamidadenindinukleotid-2'-phosphat Tetranatriumsalzhydrat, reduzierte Form (NADPH)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
<i>p</i> -Nitrophenol	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Omeprazol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Phenanthracen	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Phenforminhydrochlorid	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Phenobarbital Natriumsalz	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Phosphorsäure (85 %)	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phthalsäureanhydrid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Progesteron	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
2-Propanol	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Propylgallat	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Pyridin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Resorufin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Rifampicin	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Rinderserumalbumin (2 mg/ml) als Proteinstandard	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Rinderserumalbumin (35 %) in PBS	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
S9 Phenobarbital-/ $\beta$ -Naphthoflavon-induziert (Bestellnummer: 098R1081.S9, Charge: 0710507)	tebu-bio SAS, Le Perray en Yvelines Cedex, Frankreich
Salicylamid	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Sulfisoxazol	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Taxol	Acros Organics N.V., Geel, Belgien
<i>tert</i> -Butylalkohol	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
<i>tert</i> -Butylhydroquinon	Acros Organics N.V., Geel, Belgien
Trinatriumhydrogenethylendiamintetraacetat	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Tris(2-ethylhexyl)phosphat	Fluka/ Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Triton™ X-100	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Trypanblau 0,5 %	EuroClone S.p.A., Paro, Italien
Trypsin/ EDTA-Lösung (0,05 %) mit Phenolrot	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Tween® 20	Calbiochem®/ Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Urea	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA
Ziegenserum	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA

### 2.1.1 Zellen

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
HepG2 (Bestellnummer HB-8065, Charge 3129867)	ATCC, Manassas, USA
humane kryopräservierte Hepatozyten (Bestellnummer HMCPIA A , Chargen Hu0910, Hu1389, Hu1419, Hu4197 und Hu4199)	Invitrogen™/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA

### 2.1.2 Antikörper

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Alexa Fluor® 488 Esel anti-Kaninchen IgG (H+L) (Bestellnummer A21206)	Molecular Probes®/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 488 Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) (Bestellnummer A11008)	Molecular Probes®/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 555 Esel anti-Ziege IgG (H+L) (Bestellnummer A21432)	Molecular Probes®/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
Alexa Fluor® 647 Esel anti-Maus IgG (H+L) (Bestellnummer A31571)	Molecular Probes®/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA
anti-GADD45A monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 4632)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
anti-p21 monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 2947)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p21 polyklonaler Antikörper Ziege IgG (Bestellnummer AF1047)	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
anti-p-ATM (Ser1981) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 5883)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p-ATM (Ser1981) monoklonaler Antikörper Maus IgG1 $\kappa$ (Bestellnummer 05-740)	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-p-ATR (Ser428) polyklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 2853)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p-CDC2 (Tyr15/Thr14) polyklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer sc-12340-R)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
anti-p-Chk1 (Ser345) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 2348)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p-Chk1 (Ser345) polyklonaler Antikörper Ziege IgG (Bestellnummer 21866)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
anti-p-Chk2 (Thr68) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 2197)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p-Histon H2AX (Ser139) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 9718)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
anti-p-H2AX (Ser139) monoklonaler Antikörper Maus IgG1 (Bestellnummer 05-636-KC)	Merck Millipore/ Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
anti-p-p53 (Ser15) ABfinity™, monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG (Bestellnummer 700439)	Novex®/ Life Technologies Corp., Carlsbad, USA

### 2.1.3 Blockpeptide

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
GADD45A Blockpeptid (Bestellnummer 4632T)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p21 Blockpeptid (Bestellnummer 1055)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p21 Blockpeptid (Bestellnummer H00001026-P02)	Abnova Corp., Taipei City, Taiwan

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
p-ATM (Ser1981) Blockpeptid (Bestellnummer ab13767)	Abcam Inc., Cambridge, USA
p-ATM (Ser1981) Blockpeptid (Bestellnummer 5883T)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-ATR (Ser428) Blockpeptid (Bestellnummer 2853T)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-CDC2 (Thr14/Tyr15) Blockpeptid (Bestellnummer sc-12340-P)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
p-H2AX (Ser139) Blockpeptid (Bestellnummer 1260)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-H2AX (Ser139) Blockpeptid (kundenspezifisch synthetisiert)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland
p-Chk1 (Ser345) Blockpeptid (Bestellnummer 21866)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA
p-Chk1 (Ser345) Blockpeptid (Bestellnummer 2348T)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-Chk2 (Thr68) Blockpeptid (Bestellnummer 1255)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, USA
p-p53 (Ser15) Blockpeptid (kundenspezifisch synthetisiert)	Biomol GmbH, Hamburg, Deutschland

#### 2.1.4 Kits

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
<i>CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay</i>	Promega Corp., Madison, USA
<i>P450-Glo<sup>™</sup> CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE) Cell-Based/Biochemical Assay</i>	Promega Corp., Madison, USA
<i>QuantiGene Plex 2.0 Assay Kit (Magnetic Separation)</i>	Panomics Solutions/ Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA
<i>QuantiGene Plex 2.0, Plex Set, #311563-316, human</i>	Panomics Solutions/ Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA
<i>QuantiGene Plex 2.0 Sample Processing Kit for culture cell</i>	Panomics Solutions/ Affymetrix, Inc., Santa Clara, USA

#### 2.1.5 Verbrauchsmaterialien

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
CASY <sup>®</sup> cup	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Kanüle, Sterican <sup>®</sup> (Gr.16, 23G x 1'')	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Klebefolie für Mikrotiterplatten, Aluminium	Köhler Technische Produkte, Neulußheim, Deutschland

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Klebefolie für Mikrotiterplatten, klar	Axygen®/ Corning Inc. Life Sciences, Tewksbury, USA
Kombitips plus (2 ml, 5 ml, 10 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene®/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
96-Loch-Mikrotiterplatten, Biocoat™, Collagen I-beschichtet, steril, klar/ schwarz, klarer Boden	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
96-Loch-Mikrotiterplatten, Biocoat™, Poly-D-Lysin-beschichtet, steril, schwarz, klarer Boden	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
96-Loch-Mikrotiterplatten, steril, klar/ schwarz/ weiß, klarer Boden	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
96-Loch-Mikrotiterplatten, steril, weiß, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
96-Loch-Mikrotiterplatten, unsteril, klar/ weiß	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten, Glas (150 mm, 230 mm)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen, Art®, RNase-frei, steril (10REACH, 20P, 100E, 200, 1000E)	Molecular BioProducts Inc., San Diego, USA
Pipettenspitzen, PLASTIBRAND®, unsteril (0,1-20 µl, 2-200 µl, 5-300 µl, 50-1000 µl)	BRAND GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Reagenzreservoirs	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen, Cellstar (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
serologische Pipettenspitzen, steril (1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml)	Nunc™/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Spritzen, Omnifix® (5 ml, 10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filtertop, Cellstar (T75, T175)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 40 µm	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

### 2.1.6 Geräte

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe BVC 21 NT	Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
ArrayScan® V <sup>TI</sup> HCS Reader mit CRS Catalyst Express und ArrayScan® V <sup>TI</sup> Brightfield Module	Cellomics®/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav, VARIOKLAV <sup>®</sup> Dampfsterilisator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CASY <sup>®</sup> Model TTC Zellzähler	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Einkanalpipette, manuell (P10, P100, P200, P1000)	Gilson, Inc., Middleton, USA
Einkanalpipette, Research, manuell (0,5-10 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Flüssigstickstofftank, ARPEGE 40	Gaz Industriels Services, Les Plessis-Robinson, Frankreich
Fuchs-Rosenthal-Kammer	Laboroptik Ltd., Lancing, England
Heizblock ThermoStat plus	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Hitzeversiegelungsgerät ALPS <sup>™</sup> 50V für Mikrotiterplatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Inkubator HERAcell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Kryo-Einfriergerät Qualifreeze	Qualilab
Luminex <sup>®</sup> 200 System	Luminex Corp., Austin, USA
Luminometer Lumistar Galaxy	BMG LABTECH GmbH Ortenberg, Deutschland
Mehrkanalpipette, Research Plus, 12-Kanal, manuell (0,5-10 µl, 10-100 µl, 30-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mehrkanalpipette, Research Pro, 12-Kanal, elektronisch (20-300 µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
Minizentrifuge Sprout	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Pipettierhilfe pipetus <sup>®</sup>	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Plattenleser Tecan Infinite <sup>®</sup> F500	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Plattenwascher Tecan HydroFlex <sup>™</sup> für 96-Loch-Mikrotiterplatten	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Reinstwasseranlage Milli-Q Synthesis	Merck Millipore/ Merck KGaA, Billerica, USA
Schüttelinkubator VorTemp <sup>™</sup> 56 Labnet	Labnet International, Inc., Woodbridge, USA
Schüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Vaccubrand Absaugpumpe BVC 21 NT	Vaccubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland
Vortexer Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., Bohemia, USA
Waage AT261 DeltaRange®	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Waage CP124S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad SW22	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Multifuge 3S-R	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

### 2.1.7 Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
ArrayScan® V <sup>II</sup> Scan (iDev and classic) Version 7.6.2.4 mit Bioapplikationen Version 4	Cellomics®/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
ArrayScan® V <sup>II</sup> View Version 1.6.2.3	Cellomics®/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
CASY® Software	Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
Cell <sup>F</sup> 2.4	Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland
EndNote X6	Thomson Reuters Corp., New York, USA
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA
ISIS <sup>TM</sup> / Draw 2.4	MDL Information Systems, Inc./ Accelrys Inc., San Diego, USA
Luminex xPONENT 4.30-0	Luminex Corp., Austin, USA
LUMIstar Galaxy	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Deutschland
Magellan V6.6	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Office 2010	Microsoft Corp., Redmond, USA
OriginLab 8.1	OriginLab Corp., Northampton, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur-Methoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung der Zelllinie HepG2

Die adhärenente humane Hepatomazelllinie HepG2 wurde aus einem 15-jährigen männlichen Kaukasier isoliert (ATCC, 2012). Einen der ersten Hinweise für eine fremdstoffmetabolisierende Kompetenz der Zellen und deren Applikation im Bereich der Genotoxizität gaben Dearfield et al. bereits 1983, wobei eine Induktion des Schwesterchromatidaustauschs nach Behandlung mit einer progenotoxischen Substanz nachgewiesen werden konnte (Dearfield et al., 1983). Darüber hinaus wurde festgestellt, dass p53-kompetente Zelllinien, wie HepG2, weniger anfällig für falsch positive Ergebnisse bei der Testung auf Genotoxizität sind (Fowler et al., 2012a).

Die erworbenen gefrorenen Zellen wurden in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad 2 min inkubiert und anschließend in eine T75 Flasche mit 10 ml vorgelegtem temperiertem Kultivierungsmedium (Tabelle 2-1) überführt, welches nach 6-12 h gewechselt wurde. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

**Tabelle 2-1: Zusammensetzung des Kultivierungsmediums für HepG2-Zellen.**

Reagenz	finale Konzentration
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> / F-12 +12,92 mM HEPES + 2,5 mM L-Glutamin (DMEM/F-12) mit Phenolrot	variabel
FBS	10 % (v/v)
Penicillin (10 kU/ml)- Streptomycinlösung (10 mg/ml)	1 % (v/v)
Gentamicin (50 mg/ml)	0,1 % (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM

Bei einer Konfluenz von etwa 80 % wurden die Zellen subkultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte durch Verwerfen des Zellkulturmediums, anschließendem Waschen der Zellen mit einem dem Kultivierungsmedium äquivalenten Volumen PBS und schließlich wurde für eine Dauer von 2-5 min 1 ml Trypsin/ EDTA-Lösung 0,05 % (v/v) auf die Zellen gegeben. Nach Absaugen von etwa der Hälfte dieser Lösung wurden die Zellen für eine Dauer von etwa 7-15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert bis diese sich vom Flaschenboden gelöst hatten. Die Zellen wurden anschließend in Medium aufgenommen und klumpige Zellen durch Verwendung eines 40 µm Zellsieb aus der Suspension entfernt. Die Zellen wurden bis zu einer Passagenzahl von höchstens 18 kultiviert. Tabelle 2-2 zeigt eine Übersicht der zu verwendenden Volumina von Zellkulturmedium und Trypsin/ EDTA-Lösung für die Kultivierung in verschiedenen Zellkulturflaschen.

Zur Viabilitätstestung und Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz der Zellen wurden 25.000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl einer 96-Loch-Mikrotiterplatte ausgesät. Sollten die Zellen zur fluoreszenzmikroskopischen Analyse verwendet werden, so wurden vor der Zählung die Zellen zur Vereinzelnung durch eine Kanüle (Gr.16; 23G x 1“) gedrückt und 20.000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl auf schwarzen Poly-D-Lysin-beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät.

**Tabelle 2-2: Übersicht der zu verwendenden Volumina von Zellkulturmedium und Trypsin/EDTA-Lösung für die Kultivierung von HepG2-Zellen.**

Gefäß	Anwendung	Medium [ml]	Trypsin/ EDTA [ml]
T75	Kultivierung	10	1
T175	Kultivierung	20	2

Zur Generierung eines Zellvorrats wurden die Zellen in einer möglichst niedrigen Passage kryopräserviert. Hierzu wurden  $5,5 \times 10^6$  Zellen/ml in 1,5 ml Einfriermedium gegeben und in ein Kryo-Einfriergerät gefüllt mit 2-Propanol bei  $-80\text{ °C}$  für 24 h eingefroren und anschließend in den Stickstofftank zur langfristigen Lagerung gegeben.

### 2.2.1.2 Zählung der Zelllinie HepG2

Die Zellzählung erfolgte mit dem CASY<sup>®</sup> Model TCC Zellzähler. Die CASY<sup>®</sup>-Technologie verbindet das Widerstandsmessprinzip, eine Methode zur Partikelmessung, mit der Pulsflächenanalyse, ein Verfahren zur Signalauswertung. Die Zellen werden nach ihrer Suspension in einer isotonen Elektrolytlösung, dem CASY<sup>®</sup>ton, von einer Präzisionsmesspore definierter Größe angesaugt. Durch die Anlegung eines Niederspannungsfeldes an die Kapillare kann die Veränderung des Widerstandes gemessen werden, da intakte Zellen als Isolatoren wirken und die mit CASY<sup>®</sup>ton gefüllte Präzisionsmesspore als Widerstand fungiert. Die Änderung des gemessenen Widerstandes ist ein Maß für das Volumen der Zellen. Tote Zellen, deren Membran defekt ist, werden über die Größe des Nukleus erfasst. Über eine Pulsflächenanalyse werden die elektrischen Signale digital aufgezeichnet. Die Messung liefert neben der Gesamtzellzahl die Zellzahl viabler Zellen, den Aggregationsfaktor und die prozentuale Viabilität der Zellen (Schärfe System, 2003).

Von der zu zählenden Zellsuspension wurden 20 µl der Suspension in ein mit 10 ml CASY<sup>®</sup>ton gefülltes CASY<sup>®</sup>cup gegeben, anschließend invertiert und unter Angabe der Verdünnung gemessen (Schärfe System, 2003).

### 2.2.1.3 Kultivierung von humanen Primärhepatozyten

Die humanen kryopräservierten Primärhepatozyten wurden in einem auf 37 °C temperierten Wasserbad inkubiert und die Zellen in ein mit 48 ml Auftaumedium (Tabelle 2-3) gefülltes 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß nach mehrmaligem Invertieren 5 min bei 50 g zentrifugiert. Der Zellüberstand wurde anschließend vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet mit 5-10 ml Aussämedium (Tabelle 2-3) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend mit der Fuchs-Rosenthal-Kammer gezählt, währenddessen die restlichen Zellen auf Eis vor Licht geschützt aufbewahrt wurden. Nach entsprechender Verdünnung wurden 40.000 Zellen pro Vertiefung in 100 µl auf Collagen I-beschichteten 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät. Nach 4-5 h wurde das Aussämedium mit Kultivierungsmedium (Tabelle 2-3) ersetzt.

**Tabelle 2-3: Zusammensetzung des Auftau-, Aussä- und Kultivierungsmediums für humane Hepatozyten.**

Reagenz	finale Konzentration Auftaumedium	finale Konzentration Aussämedium	finale Konzentration Kultivierungsmedium
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium/ F-12 + 15,02 mM HEPES + 2,5 mM L-Glutamin (DMEM/F-12) ohne Phenolrot</i>	variabel	variabel	variabel
FBS	10 % (v/v)	10 % (v/v)	-
Penicillin (10 kU/ml)- Streptomycinlösung (10 mg/ml)	1 % (v/v)	1 % (v/v)	1 % (v/v)
Natriumpyruvat	1 mM	1 mM	1 mM
Insulin	-	0,87 µM	
Dexamethason (in Wasser)	-	-	0,1 µM
Insulin (72,41 mM)- Transferrin (6,88 mM)- Selenium (3,87 µM)- Lösung	-	-	1 % (v/v)
Rinderserumalbumin	-	-	0,05 % (v/v)

### 2.2.1.4 Zellzählung von humanen Primärhepatozyten

Die Zellzählung erfolgte in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer. Hierzu wurden 50 µl der Zellsuspension in eine Lösung bestehend aus 500 µl Trypanblau (0,05 %) und 500 µl Medium gegeben. Diese Lösung wurde anschließend vorsichtig durch Pipettieren gemischt und für eine Dauer von 2 min inkubiert. Von dieser Lösung wurden 20 µl in die Zählkammer

gegeben. Die Zählkammer mit einer Tiefe von 0,2 mm ist in 16 Großquadrate mit einer Fläche von je 1 mm<sup>2</sup> unterteilt. Zur besseren Orientierung ist jedes Großquadrat wiederum in 16 Kleinquadrate unterteilt. Gezählt wurden die toten von Trypanblau gefärbten und vitalen ungefärbten Zellen in vier Großquadraten. Zellen auf dem Rand des Großquadrates wurden nicht gezählt. Die prozentuale Vitalität der Zellen kann durch Beziehen der Zahl vitaler Zellen auf die Gesamtzellzahl ermittelt werden. Durch Multiplikation des Mittelwertes der Zellzahl aus den vier gezählten Großquadraten mit dem Kammerfaktor 5.000 und dem Verdünnungsfaktor 21 wurde die Zellzahl vitaler Zellen pro ml bestimmt.

#### **2.2.1.5 Behandlung der Zellen zur Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz**

Zur Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz der Zelllinie HepG2 und der humanen Primärhepatozyten wurden diese 18-24 h nach der Aussaat mit Cytochrom P450-induzierenden Substanzen, die im Folgenden auch als Induktoren bezeichnet werden, behandelt (Tabelle 2-4).

Die Konzentrationen der Induktoren wurden entsprechend der Empfehlung der FDA-Konzept-Richtlinie für die Industrie „*Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations*“ ausgewählt (FDA, 2012) gewählt. Zur Auswahl nicht zytotoxischer Konzentrationen unterhalb des EC<sub>20</sub> (Konzentration mit einem zytotoxischen Effekt von 20 %) wurden vorab Viabilitätstests an HepG2-Zellen durchgeführt. Auf eine Viabilitätstestung mit humanen Hepatozyten wurde verzichtet, da die ausgewählten Konzentrationen bei der Routinetestung auf CYP-Induktion verwendet werden. Im Falle von HepG2-Zellen erfolgte die Viabilitätstestung und die Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in vier Experimenten und die Aktivitätsbestimmung ausgewählter Cytochrom P450 Enzyme in drei Experimenten (mit jeweils zwei Replikaten). Die Experimente wurden mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl von 4-18 durchgeführt. Im Falle von humanen Hepatozyten erfolgte die Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme an fünf unterschiedlichen Donoren (mit jeweils drei Replikaten) und die Aktivitätsbestimmung ausgewählter Cytochrom P450 Enzyme an einem Donor in drei unterschiedlichen Experimenten (mit jeweils zwei Replikaten).

**Tabelle 2-4: Induktoren der Cytochrom P450 Enzyme.**

(Hewitt et al., 2007a; Hukkanen, 2012; Yoshinari et al., 2010; Zanger und Schwab, 2013)

<b>induzierende Substanz</b>	<b>induzierte Cytochrom P450 Enzyme</b>
3-Methylcholanthren (3-MC)	CYP1A1/2
Omeprazol (OMEPR)	CYP1A1/2
Phenobarbital (PB)	CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19, CYP2E1, CYP3A4
Rifampicin (RIF)	CYP1A1/2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8/9/19, CYP2E1, CYP3A4

Die Behandlung der Zellen erfolgte über 48 h bei täglicher Behandlung. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 100 µl des jeweiligen Behandlungsmediums zugegeben. Die Substanzen wurden je nach Löslichkeit in DMSO oder Wasser gelöst. Der prozentuale Anteil von DMSO sollte möglichst gering gehalten werden, um einen potenziellen durch das Lösemittel bedingten Effekt zu minimieren. Alle Substanzen wurden mit einer finalen Konzentration von 1 % DMSO (v/v) für HepG2-Zellen und 0,1 % DMSO (v/v) für humane Primärhepatozyten in Kultivierungsmedium getestet.

### 2.2.1.6 Behandlung der Zelllinie HepG2 zur Genotoxizitätstestung

Die Behandlung der HepG2-Zellen mit genotoxischen Substanzen erfolgte 18-24 h nach der Aussaat und Kultivierung bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. In einer ersten Testreihe wurde eine Auswahl an progenotoxischen Substanzen unter Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (MAS) und genotoxische und nicht-genotoxische Verbindungen ohne MAS (Tabelle 2-5) auf die Regulation neun putativer Marker für Genotoxizität getestet. Hierbei wurden Substanzen unterschiedlichster Substanzklassen und Wirkmechanismen ausgewählt. Die getesteten Konzentrationen wurden in Anlehnung an frühere Experimente an HepG2-Zellen gewählt (Boehme et al., 2010). Die Experimente (mit jeweils zwei Replikaten) wurden viermal mit HepG2-Zellen unterschiedlicher Passagenzahl von 4-18 durchgeführt.

**Tabelle 2-5: Kategorisierung der Substanzen zur Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker.**

<b>genotoxisch</b>	<b>progenotoxisch</b>	<b>nicht-genotoxisch</b>
Methylmethansulfonat	Cyclophosphamid	D-Mannitol
Actinomycin D	7,12-Dimethylbenz[a]anthracen	Progesteron
Etoposid	Aflatoxin B <sub>1</sub>	Phenforminhydrochlorid
	2-Acetylaminofluoren	

In einer zweiten Versuchsreihe wurden fünf der neun putativen Marker für Genotoxizität der ersten Testreihe mit 62 von der ECVAM empfohlenen genotoxischen und nicht-genotoxischen Substanzen zur Beurteilung der Güte eines neuen oder verbesserten Genotoxizitätstests (Tabellen 1-2, 1-3 und 1-4) durchgeführt (Kirkland et al., 2008). Die Substanzen wurden wie in der Richtlinie ICH S2(R1) vorgeschlagen mit einer maximalen

Konzentration von 1 mM getestet, insofern es die Löslichkeit und/ oder Autofluoreszenz der Substanzen zugelassen hat (ICH, 2011a). Jede Substanz wurde mit neun verschiedenen Konzentrationen jeweils mit und ohne MAS getestet. Die Experimente (je 2 Replikate) wurden dreimal mit HepG2-Zellen unterschiedlicher Passagenzahl von 4-18 durchgeführt.

Die Substanzbehandlung der HepG2-Zellen zur Genotoxizitätstestung erfolgte täglich über einen Zeitraum von 48 h in 75 µl Kultivierungsmedium pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte. Die Substanzen wurden je nach Löslichkeit in DMSO oder Wasser gelöst. Der prozentuale Anteil von DMSO sollte möglichst gering gehalten werden, um einen potenziellen durch das Lösemittel bedingten Effekt zu minimieren. Alle Substanzen mit der Ausnahme von Cisplatin und Natriumarsenit wurden mit einer finalen Konzentration von 1 % DMSO (v/v) in Kultivierungsmedium getestet. DMSO ist als Störfaktor der Genotoxizität von Natriumarsenit bekannt (Pérez-Pastén et al., 2006). Cisplatin bildet mit DMSO in einer schnellen Reaktion Addukte aus, was die biologischen und therapeutischen Charakteristika der Substanz verändert und deren Fähigkeit an doppelsträngige DNA zu binden mindert und demnach die toxische Wirkung beeinflusst (Fischer et al., 2008). Aus diesem Grund wurde bei der Behandlung mit diesen Substanz auf DMSO verzichtet und Wasser verwendet.

Die Behandlung der HepG2-Zellen unter Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (MAS) bestehend aus einem S9-Mix erfolgte im Gegensatz zur Behandlung ohne MAS diskontinuierlich. Das MAS wurde mit Medium im Verhältnis 1 zu 3,33 gemischt und mit der zu testenden Substanz versetzt. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 75 µl dieser Lösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 h wurden die Zellen mit einem äquivalenten Volumen Medium gewaschen und anschließend dasselbe Volumen an Medium auf die Zellen gegeben. Nach einer Erholungsphase von 18 h wurde das Behandlungsschema wiederholt.

Die Zusammensetzung des MAS ist in Tabelle 2-6 dargestellt. Zur Herstellung des verwendeten 0,2 M Phosphatpuffers pH 7,4 wurde eine 0,4 M Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat-Lösung mit einer 0,4 M Di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat-Lösung im Verhältnis 1 zu 5 gemischt. Nach dem Zufügen eines äquivalenten Volumens sterilen Wassers wurde der Puffer autoklaviert.

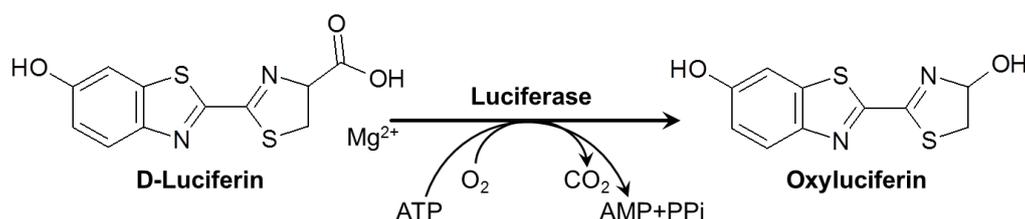
**Tabelle 2-6: Zusammensetzung des metabolischen Aktivierungssystems.**

Reagenz	finale Konzentration im Behandlungsmedium	Reagenz pro 1 ml S9-Mix
MgCl <sub>2</sub> /KCl-Lösung (0,4 M/ 1,64 M)	2,4 mM/ 9,84 mM	0,02 ml
NADPH (0,1 M in Phosphatpuffer)	3,6 mM	0,12 ml
Phosphatpuffer pH 7,4 (0,2 M)	30 mM	0,5 ml
β-Naphtoflavon-/ Phenobarbital- induzierter Ratten-S9	750 pmol CYP/ml	2500 pmol CYP
steriles Wasser	variabel	ad 1 ml

## 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Viabilitätsbestimmung von Zellen

Zur luminometrischen Bestimmung der Zellviabilität wurde das Kit *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Luminescent Cell Viability Assay* der Firma Promega verwendet. Diese Methode beruht auf der Oxygenierung von D-Luciferin durch die Luciferase in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>, Adenosintriphosphat (ATP) und molekularem Sauerstoff zu Oxyluciferin (Abbildung 2-1). Das hierbei emittierte Licht ist proportional zu dem Gehalt an ATP, welches zur Bemessung des Zellviabilität herangezogen werden kann (Promega, 2011).



**Abbildung 2-1: Oxygenierung von Luciferin zu Oxyluciferin des *CellTiter-Glo*<sup>®</sup> *Luminescent Cell Viability Assay*.**

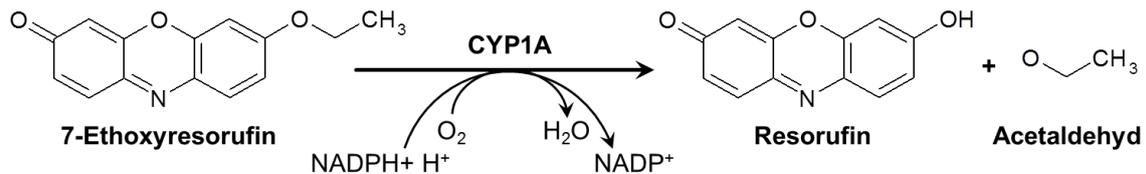
(modifiziert nach Promega, 2012)

Den in einer weißen 96-Loch-Mikrotiterplatte (mit klarem Boden) ausgesäten Zellen wurden nach der Substanzbehandlung ein dem Behandlungsvolumen äquivalentes Volumen *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Substrat hinzugefügt. Zur Bestimmung des zu korrigierenden Hintergrundsignals wurde ebenso eine Mischung bestehend aus *CellTiter-Glo*<sup>®</sup>-Substrat und Medium zu gleichen Teilen in die Platte ohne Zellen gegeben. Die Platte wurde anschließend 2 min auf einem Plattenschüttler mit etwa 500 rpm geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 10 min mit dem Tecan Infinite<sup>®</sup> F500 gemessen (Promega, 2011).

Zur Ermittlung der Konzentration, bei welcher ein halbmaximaler zytotoxischer Effekt zu verzeichnen ist, dem sogenannten EC<sub>50</sub>, wurde die Software OriginLab Version 8.1 verwendet. Des Weiteren wurde der EC<sub>20</sub> und EC<sub>80</sub> bestimmt.

### 2.2.2.2 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450 1A

Eine sensible und spezifische Methode zur fluorimetrischen Bestimmung der CYP1A-Aktivität ist die O-Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin (Burke and Mayer, 1974). Katalysiert wird diese Reaktion durch ein Cytochrom P450 der Familie 1A, der 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase (Burke et al., 1983; Burke et al., 1994). Der Reaktion (Abbildung 2-2) wird Salicylamid zugesetzt, um zu vermeiden, dass das fluoreszierende Resorufin zu einem nicht fluoreszierenden Sulfat umgesetzt wird (Burke et al., 1983).



**Abbildung 2-2: O-Dealkylierung von 7-Ethoxyresorufin zu Resorufin.**

(modifiziert nach Burke und Mayer, 1974)

Die Zellen wurden in schwarzen 96-Loch-Mikrotiterplatten mit klarem Boden ausgesät und mit den CYP1A-Induktoren 3-Methylcholanthren (3-MC) und Omeprazol (OMEPR) über einen Zeitraum von 48 h täglich behandelt. Nach dem Waschen der Zellen mit 100 µl Medium wurden 50 µl einer 1%igen Salicylamidlösung (v/v) zugefügt. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurde diese Lösung ebenso in Vertiefungen ohne Zellen gegeben. Die 1%ige Salicylamidlösung (v/v) wurde mittels Verdünnung einer 0,3 M Salicylamidlösung in Aceton mit PBS hergestellt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C wurden 50 µl einer 0,01 mM 7-Ethoxyresorufinlösung zugegeben. Diese Lösung wurde mittels Verdünnung einer 1 mM 7-Ethoxyresorufinlösung in DMSO mit PBS angesetzt. Direkt nach der Zugabe wurde die Messung mit dem Tecan Infinite<sup>®</sup> F500 durchgeführt. Nach einem einmaligen Schütteln von 10 sec wurde die Messung bei einer Temperatur von 37 °C über einen Zeitraum von 20 min in Intervallen von 1 min bei einer Anregungswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bei einer 80-fachen Verstärkung mit dem Tecan Infinite<sup>®</sup> F500 durchgeführt. Daraufhin wurde eine Proteinbestimmung mittels Bradford durchgeführt.

Zur Quantifizierung von Resorufin wurde eine Resorufin-Standardkurve gemessen. Hierzu wurden zunächst jeweils 50 µl einer 1%igen Salicylamidlösung (v/v) in die Vertiefungen einer schwarzen 96-Loch-Mikrotiterplatte mit klarem Boden vorgelegt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 37 °C wurden aus einer 10 mM Resorufinlösung (in DMSO) folgende Verdünnungen mit PBS hergestellt: 0 pmol/ml, 1 pmol/ml, 2,5 pmol/ml, 5 pmol/ml, 10 pmol/ml, 25 pmol/ml, 50 pmol/ml, 100 pmol/ml, 250 pmol/ml, 500 pmol/ml und

1000 pmol/ml. Jede Verdünnung und das Hintergrundsignal wurde in Vierfachbestimmungen analog der oben aufgezeigten Einstellungen mit dem Tecan Infinite® F500 gemessen.

Die Aktivitätsrate wurde folgendermaßen bestimmt:

$$A = \frac{FI}{f \times t \times m}$$

*A*: Aktivität [pmol/(min x mg)]

*FI*: gemessene Fluoreszenz [RFU]

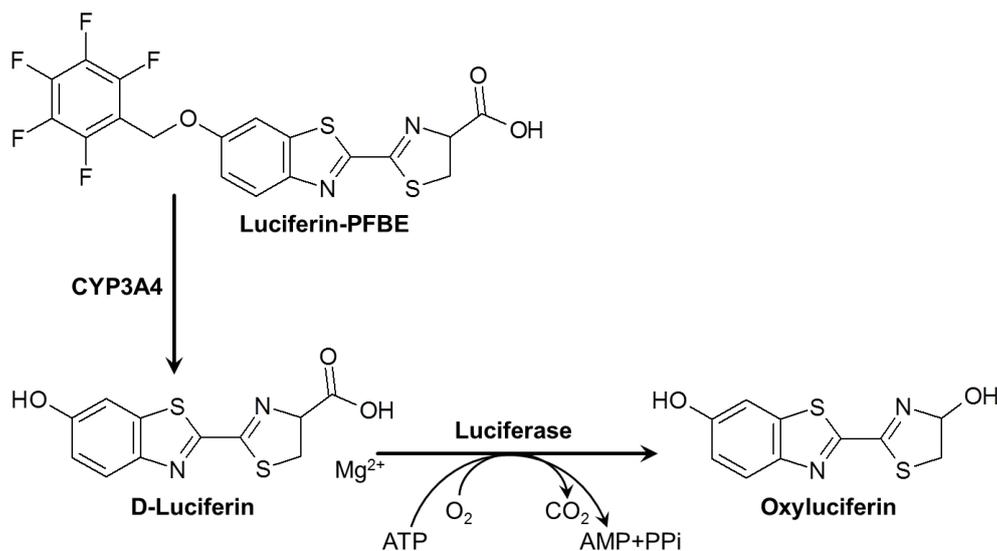
*f*: Steigung der Standardkurve [RFU/(pmol/ml)]

*t*: Zeit [min]

*m*: Proteinmenge [mg/ml]

### 2.2.2.3 Aktivitätsbestimmung von Cytochrom P450 3A4

Zur luminometrischen Bestimmung der CYP3A4-Aktivität wurde das Kit *P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Luciferin-PFBE)* der Firma Promega verwendet. Die Reaktion des zellpermeablen Substrats Luciferin-6'-Pentafluorobenzylether (Luciferin-PFBE) zu Luciferin wird vom Cytochrom P450 3A4 katalysiert. Die im Detektionsreagenz enthaltene Luciferase katalysiert anschließend die oxidative Carboxylierung von Luciferin unter ATP- und Sauerstoffverbrauch zu Oxyluciferin. Die bei dieser Reaktion freigesetzte Lumineszenz ist proportional zu der CYP3A4-Aktivität (Abbildung 2-3) (Branchini et al., 1998; Promega, 2012).



**Abbildung 2-3: Reaktion von Luciferin-PFBE zu Oxyluciferin des *P450-Glo™ CYP3A4 Assay*.** (modifiziert nach Branchini et al., 1998; Promega, 2012)

Die Zellen wurden in 96-Loch-Mikrotiterplatten mit klarem Boden ausgesät und mit den CYP3A4-Induktoren Rifampicin (RIF) und Phenobarbital (PB) über einen Zeitraum von 48 h

täglich behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit 100 µl Medium gewaschen und 50 µl einer 50 µM Luciferin-6'-Pentafluorobenzylether (Luciferin-PFBE)-Lösung zugegeben. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurde diese Lösung ebenso in Vertiefungen ohne Zellen gegeben. Die 50 µM Luciferin-PFBE-Lösung wurde durch Verdünnung der 2 mM Luciferin-PFBE-Lösung in Medium hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden 25 µl der Lösung in eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt und mit 25 µl Luciferin-Detektionsreagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur (RT) wurde die Lumineszenzmessung mit dem Tecan Infinite® F500 durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Proteinbestimmung mittels Bradford durchgeführt (Promega, 2011).

Zur Quantifizierung von D-Luciferin wurde eine Standardkurve gemessen. Hierzu wurden aus einer 2 mM D-Luciferin-Lösung (in Wasser) folgende Verdünnungen mit Medium hergestellt: 0 µM, 0,016 µM, 0,08 µM, 0,4 µM und 2 µM. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 25 µl in eine weiße 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und mit 25 µl Detektionsreagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT wurde jede Verdünnung und auch das Hintergrundsignal in Vierfachbestimmungen mit dem Tecan Infinite® F500 gemessen.

Die Aktivitätsrate wurde folgendermaßen bestimmt:

$$A = \frac{FI}{f \times t \times m}$$

*A*: Aktivität [pmol/(min x mg)]

*FI*: gemessene Lumineszenz [RLU]

*f*: Steigung der Standardkurve [RLU/(pmol/ml)]

*t*: Zeit [min]

*m*: Proteinmenge [mg/ml]

#### 2.2.2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Die schnelle und sensitive Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Bindung von Coomassie Brilliantblau G250 an Protein, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 365 nm nach 595 nm verschiebt, was photometrisch bestimmt werden kann (Bradford, 1976).

Um den Proteingehalt von Zellen bestimmen zu können, wurden diese zunächst lysiert. Pro Vertiefung einer 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden 100 µl Lysepuffer bestehend aus 0,1 % Triton in PBS zugegeben. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurde der Lysepuffer

ebenso in Vertiefungen ohne Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 min unter leichtem Schütteln (150 rpm) auf einem Plattenschüttler wurden 10 µl des Lysats in eine klare 96-Loch-Mikrotiterplatte überführt. Anschließend wurden jeweils 200 µl Bradford-Reagenz zugegeben. Dieses Reagenz wurde durch Lösen von 100 µg Coomassie Brillantblau in 50 ml Ethanol und 100 ml Phosphorsäure (85 %) und anschließendem Auffüllen auf 1000 ml mit Wasser hergestellt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min unter leichtem Schütteln (150 rpm) wurde die Absorptionsmessung bei 595 nm in Dreifachbestimmungen mit dem Tecan Infinite® F500 durchgeführt.

Zur Quantifizierung des Proteingehalts wurde eine Standardkurve gemessen. Hierzu wurden aus einer 2 mg/ml Rinderserumalbuminlösung mit einer 0,1%igen Triton-PBS-Lösung folgende Verdünnungen hergestellt: 0 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml, 400 µg/ml und 500 µg/ml. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 10 µl in eine klare 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 5-10 min unter leichtem Schütteln (150 rpm) wurde die Absorptionsmessung der Proben und des Hintergrunds in Vierfachbestimmungen mit dem Tecan Infinite® F500 durchgeführt.

Der Proteingehalt wurde folgendermaßen bestimmt:

$$E = m \times c + b$$

*E*: Extinktion [OD]

*m*: Steigung der Standardkurve [OD/(µg/ml)]

*c*: Proteinkonzentration [µg/ml]

*b*: Schnittpunkt der Geraden mit der y-Achse

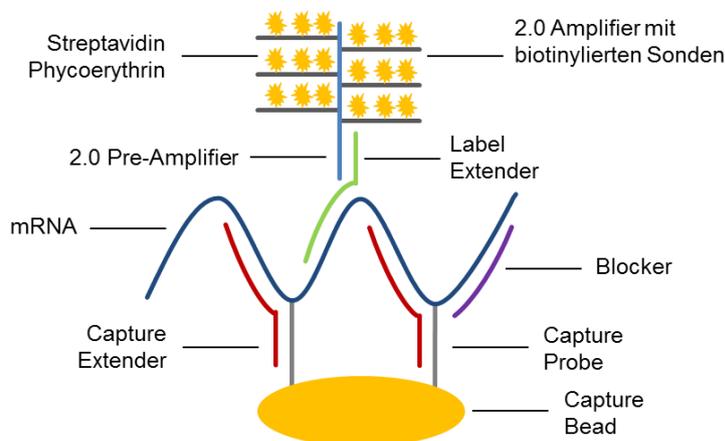
#### **2.2.2.5 Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme**

Zur Bestimmung der Genexpression ausgewählter fremdstoffmetabolisierender Enzyme wurde der *QuantiGene Plex 2.0 Assay* von Affymetrix verwendet. In Tabelle 2-7 sind die kundenspezifisch zusammengestellten untersuchten Gene des *QuantiGene Plex 2.0 Assay (Plex Set 11563, human)* dargestellt (Affymetrix, 2010; Affymetrix, 2012).

**Tabelle 2-7: Gene des *QuantiGene Plex 2.0 Assay Plex Set 11563, human.***  
(Affymetrix, 2012)

<b>Gensymbol</b>	<b>Genname</b>	<b>Accession Nummer</b>
<b>Phase I- und II-Enzyme</b>		
<i>CYP1A1</i>	Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie A, Polypeptid 1	NM_000499
<i>CYP1A2</i>	Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie A, Polypeptid 2	NM_000761
<i>CYP2B6</i>	Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie B, Polypeptid 6	NM_000767
<i>CYP2C9</i>	Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie C, Polypeptid 9	NM_000771
<i>CYP2C19</i>	Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie C, Polypeptid 19	NM_000769
<i>CYP3A4</i>	Cytochrom P450, Familie 3, Subfamilie A, Polypeptid 4	NM_017460, NM_001202855
<i>UGT1A6</i>	UDP-Glucuronosyltransferase 1 Familie, Polypeptid A6	NM_001072
<b>nukleäre Rezeptoren</b>		
<i>AHR</i>	<i>aryl hydrocarbon receptor</i>	NM_001621
<i>PXR (NR1I2)</i>	<i>pregnane X receptor</i> (nukleärer Rezeptor, Subfamilie 1 Gruppe I, Mitglied 2)	NM_003889, NM_022002, NM_033013
<i>CAR (NR1I3)</i>	<i>constitutive androstane receptor</i> (nukleärer Rezeptor, Subfamilie 1 Gruppe I, Mitglied 3)	NM_005122, NM_001077480, NM_001077482, NM_001077478, NM_001077469, NM_001077479, NM_001077472, NM_001077471, NM_001077474, NM_001077481, NM_001077477, NM_001077476, NM_001077473, NM_001077470
<b>Transporter</b>		
<i>MDR1 (ABCB1)</i>	<i>multidrug resistance protein 1 (ATP-binding cassette sub-family B member 1)</i>	NM_000927
<i>BSEP (ABCB11)</i>	<i>bile salt export pump (ATP-binding cassette sub-family B member 11)</i>	NM_003742
<i>MRP2 (ABCC2)</i>	<i>multidrug resistance-associated protein 2 (ATP-binding cassette sub-family C member 2)</i>	NM_000392
<b>Referenzgene</b>		
<i>HPRT</i>	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase	NM_000194
<i>RPL13A</i>	ribosomales Protein L13a	NM_012423, NR_073024, NM_001270491
<i>TFRC</i>	Transferrin Rezeptor	NM_003234, NM_001128148

Der *QuantiGene Plex 2.0 Assay* kombiniert die Signalamplifikation der *branched DNA*-Methode mit der Multi-Analyten-Untersuchung der xMAP<sup>®</sup>-Technologie (Abbildung 2-4). Dieser Technologie liegt die Verwendung fluoreszierender magnetischer Mikrosphären (*Capture Beads*) zugrunde, welche eine individuelle Farbkodierung besitzen, was die Analyse der Expression von bis zu 100 Genen in einer Probe ermöglicht. Das sogenannte *Probe Set* eines jeden Gens bestehend aus den drei sequenzspezifischen Oligonukleotiden *Capture Extender*, *Label Extender* und *Blocker* ordnet jeder mRNA eines Gens einen *Capture Bead* zu. Die mRNA Sequenzen der zu analysierenden Gene in der Probe binden spezifisch über Oligonukleotidsequenzen, sogenannte *Capture Extender*, an die *Capture Probe*, welche wiederum an *Capture Beads* gebunden sind. Sogenannte *Blocker* verhindern sequenzunspezifische Bindungen, indem diese an umgebende Sequenzen der mRNA binden. Sequenzspezifisch binden *Label Extender* an die mRNA Sequenzen. An diese binden wiederum DNA-Moleküle, sogenannte *2.0 Pre-Amplifier* und *2.0 Amplifier* mit biotinylierten Sonden, in einer verzweigten Struktur, was eine Signalamplifikation ermöglicht. An die biotinylierten Sonden bindet daraufhin das Streptavidin-konjugierte R-Phycoerythrin (SAPE). Das gemessene Fluoreszenzsignal des SAPE ist proportional zu der Menge an mRNA-Transkripten (Affymetrix, 2010).



**Abbildung 2-4: Prinzip des *QuantiGene Plex 2.0 Assay*.**  
(modifiziert nach Affymetrix, 2010)

Die Zellen wurden in klaren 96-Loch-Mikrotiterplatten ausgesät und über 48 h mit den CYP-Induktoren 3-Methylcholanthren, Omeprazol, Phenobarbital und Rifampicin behandelt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden analog dem *QuantiGene Plex 2.0 Assay manual* durchgeführt. Zur Lyse der Zellen wurde nach der Behandlung das Behandlungsmedium verworfen und 100 µl Lysepuffer zugefügt. Dieser Puffer wurde durch Verdünnung der *Lysis Mixture* mit Medium im Verhältnis 1 zu 3 angesetzt und je ml der Lösung 5 µl Proteinase K

zugefügt. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> konnten die Lysate abgenommen und bei -80 °C bis zu eine Woche aufbewahrt werden.

Nachdem das *Probe Set* 5 min in einem Heizblock bei 95 °C inkubiert und die *Capture Beads* 15 sec durch Vortexen gemischt worden waren, konnte das *Working Plex Set* hergestellt werden, dessen Reagenzien zur Herstellung in Tabelle 2-8 dargestellt sind (Affymetrix, 2010).

**Tabelle 2-8: Reagenzien zur Herstellung des *Working Plex Set*.**

(Affymetrix, 2010)

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro ml <i>Working Plex Set</i> [µl]</b>
Nuklease-freies Wasser	260
<i>Lysis Mixture</i>	330
Blockierungseagenz	100
Proteinase K	10
<i>Capture Beads</i>	50
<i>Probe Set</i>	250

In eine klare 96-Loch-Hybridisierungsplatte wurden nach gründlichem Vortexen jeweils 20 µl des *Working Plex Set* vorgelegt. Hierzu wurden 80 µl des Zelllysats gegeben. Das Lysat der humanen Hepatozyten wurde 1 zu 2 mit Lysepuffer verdünnt und das der HepG2-Zellen unverdünnt eingesetzt. Zur Bestimmung des Hintergrundsignals wurde zudem ausschließlich Lysepuffer gemessen. Die Platte wurde folglich mit einer Folie von dem Hitzeversiegelungsgerät ALPS<sup>TM</sup> 50V versiegelt, indem die Platte 3-5 sec in dem Gerät angepresst wurde.

Nach einer Inkubationszeit von 16-20 h bei 54 °C und 600 rpm wurde die Lösung in die *Magnetic Separation Plate* überführt. Die Platte wurde daraufhin dreimalig mit je 100 µl Waschpuffer pro Vertiefung mit dem Plattenwascher Tecan HydroFlex<sup>TM</sup> gewaschen. Der Waschpuffer wurde aus einer Mischung von 0,6 ml Waschpuffer Komponente 1 und 10 ml Waschpuffer Komponente 2, welche mit Wasser auf 200 ml aufgefüllt wurde, hergestellt. Daraufhin wurden 100 µl *Pre-Amplifier Working Reagent* pro Vertiefung zugeführt. Diese Lösung wurde durch Mischen von 12 ml *Amplifier Diluent* mit 36 µl *Pre-Amplifier* hergestellt. Die Platte wurde schließlich mit einer Klebefolie verschlossen, 1 min bei 800 rpm geschüttelt und bei 50 °C und 600 rpm für eine Dauer von 1 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte erneut dreimalig mit je 100 µl Waschpuffer pro Vertiefung mittels des Plattenwaschers Tecan HydroFlex<sup>TM</sup> gewaschen. Anschließend wurden 100 µl *Amplifier Working Reagent* pro Vertiefung zugeführt. Diese Lösung setzte sich aus 12 ml

*Amplifier Diluent* und 36  $\mu\text{l}$  *Amplifier* zusammen. Daraufhin wurde die verschlossene Platte 1 min bei 800 rpm geschüttelt und bei 50 °C und 600 rpm für eine Dauer von 1 h inkubiert.

Auf den dreimaligen Waschschritt mit je 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Vertiefung mit Hilfe des Plattenwaschers Tecan HydroFlex™ folgend, wurden jeweils 100  $\mu\text{l}$  *Label Probe Working Reagent* zugegeben. Diese Lösung wurde aus 12 ml *Label Probe Diluent* mit 36  $\mu\text{l}$  *Label Probe* angesetzt. Nach einem kurzen Schütteln für 1 min bei 800 rpm wurde die Platte bei 50 °C und 600 rpm inkubiert. Im Anschluss an die Inkubationszeit von 1 h wurde die Platte wiederholt dreimalig mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Waschpuffer pro Vertiefung mittels des Plattenwaschers Tecan HydroFlex™ gewaschen. Es wurden anschließend jeweils 100  $\mu\text{l}$  SAPE-*Working Reagent* hinzugefügt. Diese Lösung wurde durch Mischen von 12 ml SAPE-*Diluent* mit 36  $\mu\text{l}$  SAPE hergestellt. Die verschlossene Platte wurde schließlich 1 min bei 800 rpm geschüttelt und bei RT und 600 rpm für eine Dauer von 30 min inkubiert. Letztlich wurde die Platte dreimalig mit dem SAPE-Waschpuffer gewaschen und daraufhin 130  $\mu\text{l}$  SAPE-Waschpuffer zugefügt. Die Platte wurde bei RT für 2-3 min bei 800 rpm geschüttelt und schließlich die Proben und das Hintergrundsignal mit dem Luminex® 200 gemessen. Folgende Einstellungen wurden hierbei getroffen: Volume: 100, Timeout: 45, DD-Gating: 5.000-20.000, Gain: default, Analysis: none, Units: mfi und Counts: 100 (Affymetrix, 2010).

Die Genregulation wurde folgendermaßen bestimmt:

$$R_x = \frac{\frac{FI_G^{\text{behandelt}}}{FI_H^{\text{behandelt}}}}{\frac{FI_G^{\text{Kontrolle}}}{FI_H^{\text{Kontrolle}}}}$$

$R_x$ : Regulation des Gens x

$FI_{G/H}$ : Median der Fluoreszenzintensität des Gens/ Haushaltsgens [mfi]

Der Vergleich der Basalexpressionen von unbehandelten HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten wurde folgendermaßen bestimmt:

$$R_x = \frac{\frac{FI_G^{\text{HepG2}}}{FI_H^{\text{HepG2}}}}{\frac{FI_G^{\text{HH}}}{FI_H^{\text{HH}}}}$$

$R_x$ : Regulation des Gens x

$FI_{G/H}$ : Median der Fluoreszenzintensität des Gens/ Haushaltsgens der Kontrolle [mfi]

Es wurden nur Gene ausgewertet, deren mittlere Fluoreszenzeinheiten größer als das Detektionslimit des jeweiligen Gens gewesen sind. Das Detektionslimit ist definiert durch die Summe aus der mittleren Fluoreszenzeinheit des Hintergrundsignals und der dreifachen Standardabweichung des Hintergrundsignals (Affymetrix, 2010).

### 2.2.2.6 Immunfluoreszenzfärbung zur Genotoxizitätstestung

Die Detektion von putativen Markerproteinen für Genotoxizität an HepG2-Zellen erfolgte durch Immunfluoreszenzfärbung. Eine Übersicht der untersuchten Proteine inklusive ihrer posttranslational phosphorylierten Stellen ist in Tabelle 2-9 dargestellt.

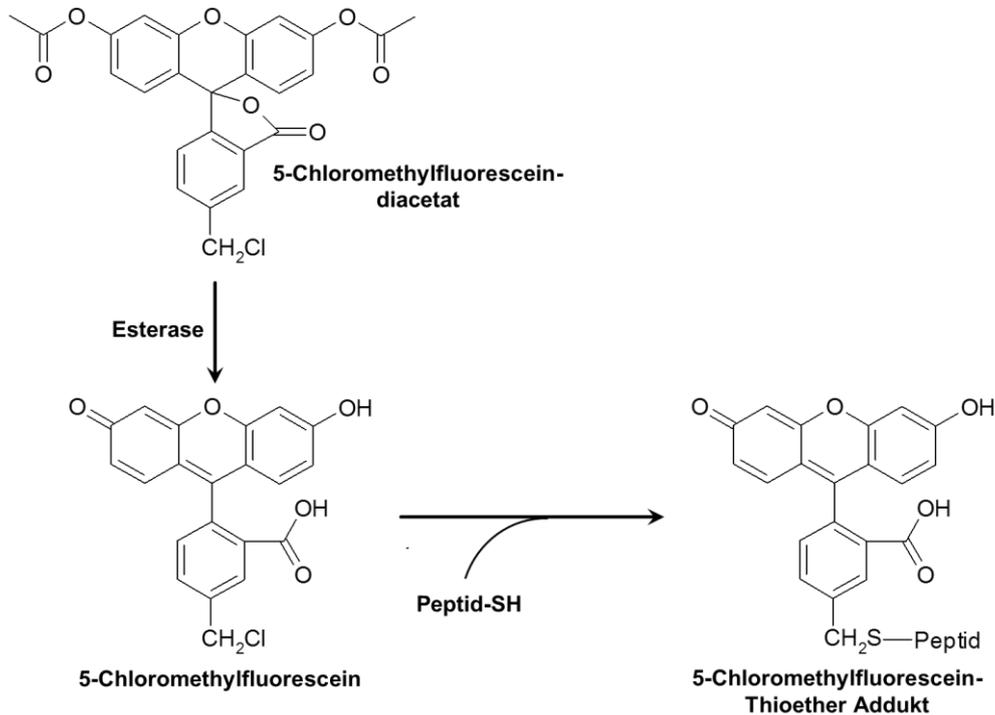
**Tabelle 2-9: Übersicht der untersuchten putativen Markerproteine für Genotoxizität.**

Proteinsymbol	Proteinname	Accession Nummer	phosphorylierte Stelle
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i> (Serin-Proteinkinase ATM)	Q13315	Ser1981
ATR	<i>ATM- and Rad3-related</i> (Serin/Threonin-Proteinkinase ATR)	Q13535	Ser428
CDC2	<i>cyclin-dependent kinase 1</i>	P06493	Thr14/ Tyr15
Chk1	<i>checkpoint kinase 1</i> (Serin/Threonin-Proteinkinase Chk1)	O14757	Ser345
Chk2	<i>checkpoint kinase 2</i> (Serin/Threonin-Proteinkinase Chk2)	O96017	Thr68
GADD45A	<i>growth arrest and DNA damage-inducible protein GADD45 alpha</i>	P24522	-
H2AX	Histon H2AX	P16104	Ser139
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>	P38936	-
p53	<i>cellular tumor antigen p53</i>	P04637	Ser15

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde neben einer Zellzahlbestimmung eine Färbung der Zellen mit dem Farbstoff CellTracker Green<sup>TM</sup> 5-Chloromethylfluorescein-diacetat (CMFDA) vorgenommen. Dieser per se nicht fluoreszierende Farbstoff kann durch die Zellmembran in die Zelle gelangen. Die intrazelluläre Esterase hydrolysiert CMFDA zum zell-impermeablen fluoreszierenden Produkt 5-Chloromethylfluorescein. Aus der Reaktion mit Thiolgruppen in Peptiden oder Proteinen resultiert ein ebenfalls impermeables 5-Chloromethylfluorescein-Thioether Addukt, welches durch Aldehyd fixiert werden kann (Abbildung 2-5) (Life Technologies, 2008).

Die Aktivität der Esterase kann als Indikator für die Viabilität von Zellen herangezogen werden (Papadopoulos et al., 1994). Zudem haben Thiol-enthaltende Substanzen von niedrigerem Molekulargewicht, in Säugerzellen hauptsächlich das *de novo* synthetisierte

Thioredoxin und Gluthation, eine bedeutende Funktion bei der Entgiftung von Toxinen (Dickinson und Forman, 2002).

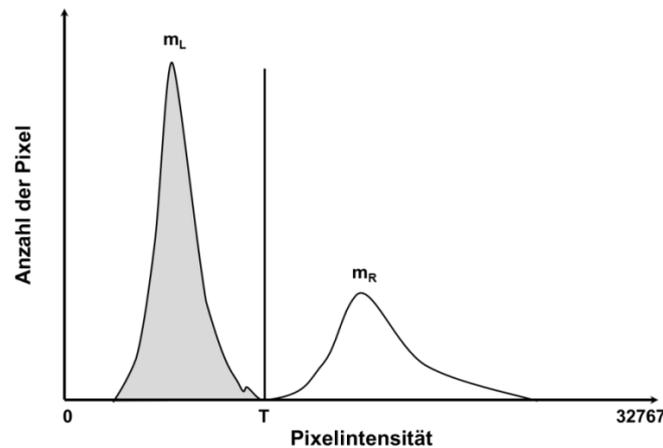


**Abbildung 2-5: Reaktion des CellTracker Green™ 5-Chloromethylfluorescein-diacetat (CMFDA) zum 5-Chloromethylfluorescein-Thioether Addukt.**  
(modifiziert nach Life Technologies, 2008)

Zur Aufnahme und Analyse der fluoreszenzgefärbten Zellen wurde die Technologie *des high content imaging* (HCI) verwendet. Die Bildaufnahme und -analyse erfolgte mit dem System ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan HCS Reader mit der Software ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan (iDev and classic). Die Analysesoftware ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan bietet die Möglichkeit die Morphologie und Intensität fluoreszenzgefärbter Strukturen und Moleküle der Zelle durch verschiedene Software-Module (Bioapplikationen) zu analysieren.

Die Bioapplikation *Molecular Translocation* (Version 4) ermöglicht die Intensität fluoreszenzgefärbter Makromoleküle im Nukleus und Zytoplasma zu untersuchen. Die Identifizierung und Validierung des fluoreszenzgefärbten Nukleus erfolgt durch Eingabe zelltypspezifischer morphologischer Merkmale wie auch Intensitätsmerkmale des Nukleus. Die Analyse des Nukleus erfolgte im vorliegenden Fall durch Verwendung des *Isodata Threshold*. Bei dieser Methode wird ein Schwellenwert zur Identifikation des Nukleus anhand des Intensitätshistogramms kalkuliert. Der Schwellenwert entspricht bei dieser Methode dem Durchschnitt der Summe der mittleren Pixelintensität links  $m_L$  und rechts  $m_R$  des Schwellenwerts  $T$  (Abbildung 2-6). Angewendet wurde diese Methode auf Bilder, deren

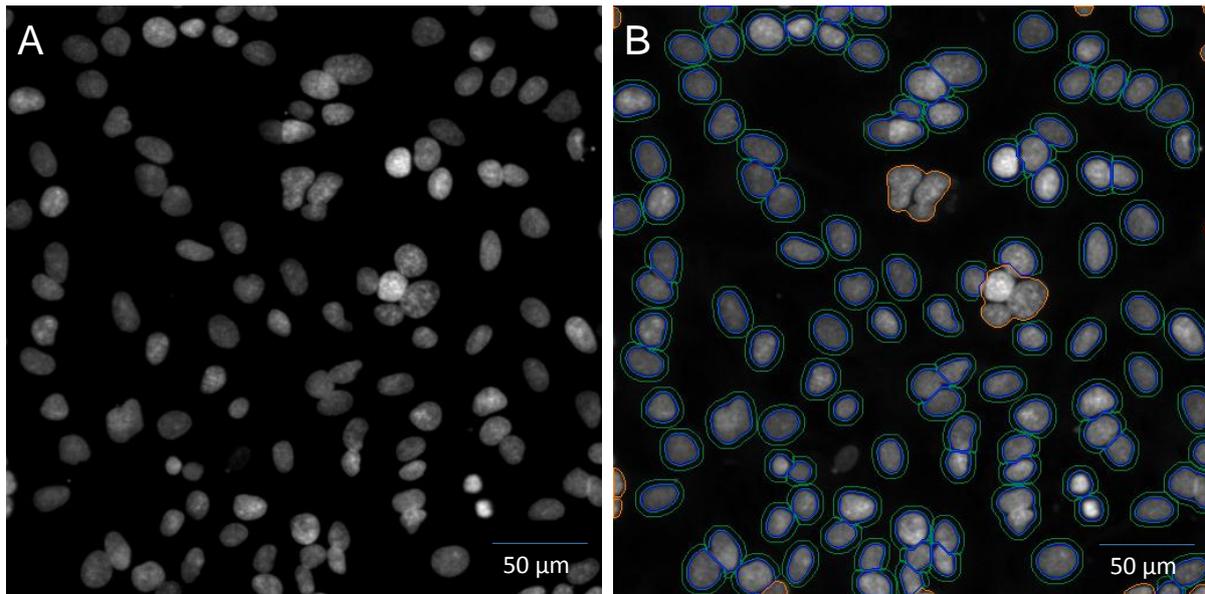
Hintergrund vorab korrigiert worden war. Zur Korrektur des Hintergrunds wurde die *low-pass filter*-Methode verwendet. Hierbei wird das lokale Minimum einer Fläche definierter Pixelzahl von einer definierten Region des Bildes subtrahiert (Thermo Scientific, 2010).



**Abbildung 2-6: Histogramm zur Kalkulation des Isodata Threshold.**

Der Peak des Hintergrunds ist grau und der des Objekts bzw. Nukleus weiß dargestellt. (modifiziert nach Thermo Scientific, 2010)

Für jeden individuell identifizierten Nukleus wird eine Maske, der sogenannte *Circ*, kreiert. Die ringförmige Region um den Nukleus bzw. *Circ*, der sogenannte *Ring*, repräsentiert das Zytoplasma der jeweiligen Zelle (Abbildung 2-7). Die *Ring*-Region definiert sich aus dem Bereich zwischen einer inneren und äußeren Grenze um den *Circ*. Der Abstand zwischen *Circ* und der inneren Grenze der *Ring*-Region kann eingestellt werden ebenso wie der Abstand zwischen der inneren und äußeren *Ring*-Grenze. Die Detektion fluoreszenzgefärbter Makromoleküle in den definierten *Ring*- und/ oder *Circ*-Regionen einer jeden Zelle kann durch die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen unterschiedlicher Spektren erfolgen. Die Identifizierung der zu untersuchenden Objekte und die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der *Ring*- und *Circ*-Regionen erfolgt bei dieser Analyse an Bildern, deren Hintergrund vorab korrigiert worden ist. Zur Hintergrundkorrektur wurde die *surface-fitting*-Methode verwendet. Bei dieser Methode wird das Bild zunächst virtuell in Quadrate definierter Pixelzahl unterteilt. Die lokalen Minima dieser definierten Flächen werden zur Generierung eines Bildes gefitteter Oberfläche verwendet. Dieses gefittete Bild repräsentiert den Hintergrund und wird von dem zu korrigierenden Bild subtrahiert (Thermo Scientific, 2010).



**Abbildung 2-7: Analyse fluoreszenzgefärbter HepG2-Zellen.**

(A) Die mit dem Farbstoff Hoechst 33342 angefärbten Nuklei der HepG2-Zellen wurden mit einem 20x Objektiv mit dem ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan HCS Reader aufgenommen. (B) Die Analyse des Bildes erfolgte mit der Bioapplikation *Molecular Translocation* (Version 4) der Analysesoftware ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan. Blau umrandet sind die Nuklei, der sogenannte *Circ*, der selektierten Zellen, welche durch die eingegebenen Parameter identifiziert und validiert wurden. Die in grün dargestellten ringförmigen Regionen um den Nukleus, der sogenannte *Ring*, repräsentiert das Zytoplasma. Orange gekennzeichnet sind die Nuklei, welche von der Analyse ausgeschlossen wurden, da sie sich am Rand des Bildes befinden und/ oder als Nukleus identifiziert werden konnten (durch den Schwellenwert, die Segmentierung und Glättung) und durch mindestens einen der restlichen Parameter nicht validiert werden konnten. Durch Übertragung der generierten Maske auf dieselben Zellen, welche parallel mit Fluorophoren anderer Spektren gefärbt worden sind, kann die Intensität von fluoreszenzgefärbten Makromolekülen in den definierten *Ring*- und/ oder *Circ*-Regionen detektiert werden.

### 2.2.2.7 Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

Zur Auswahl putativer Markerproteine für Genotoxizität wurden die in Tabelle 2-9 angegebenen Proteine separat voneinander angefärbt. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde zusätzlich in einem parallel durchgeführten Experiment eine Zellzahlbestimmung und eine Färbung mit dem Farbstoff CMFDA vorgenommen.

### Immunfluoreszenzfärbung

Die Zellen wurden nach der Behandlung mit 35 µl PBS gewaschen bevor diese mit 35 µl einer 3,7%igen Formaldehydlösung in PBS für 20 min fixiert wurden. Daraufhin wurden die Zellen nach einem erneuten zweimaligen Waschschrift mit je 35 µl PBS durch Zugabe von 35 µl einer Lösung bestehend aus 0,3 % Triton<sup>TM</sup> X-100 und 7,5 % Ziegen Serum in PBS permeabilisiert und blockiert. Im Anschluss an eine Inkubationszeit von 30 min wurden die Primärantikörper wie in Tabelle 2-10 angegeben in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 35 µl auf die Zellen gegeben. Nach einer

Inkubationszeit von 16-18 h bei 4-8°C wurden die Zellen zweimalig mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS gewaschen. Anschließend wurde der Sekundärantikörper Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Ziege anti-Kaninchen IgG auf eine finale Konzentration von 2 µg/ml in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Dieser Färbelösung wurden 16 µM Hoechst 33342 durch Verdünnung einer 16 mM Stammlösung (in Wasser) zugefügt: Von dieser Färbelösung wurden jeweils 35 µl auf die Zellen gegeben. Auf eine Inkubationszeit von 1 h folgend wurden die Zellen zweimalig zunächst mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS und dann mit 35 µl PBS gewaschen und letztlich 100 µl PBS auf die Zellen gegeben.

**Tabelle 2-10: Übersicht der Primärantikörper.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Immunogenesequenz</b>	<b>finale Konzentration</b>
anti-GADD45A monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	10 µg/ml
anti-p21 monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	10 µg/ml
anti-p-ATM (Ser1981) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	5 µg/ml
anti-p-ATR (Ser428) polyklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	10 µg/ml
anti-p-CDC2 (Tyr15/Thr14) polyklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	4 µg/ml
anti-p-Chk1 (Ser345) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	20 µg/ml
anti-p-Chk2 (Thr68) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	unbekannt	20 µg/ml
anti-p-H2AX (Ser139) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG1	unbekannt	2,5 µg/ml
anti-p-p53 (Ser15) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	SVEPPL[pS]QETF	2 µg/ml

Um die Spezifität der verwendeten Primärantikörper nachzuweisen, wurden Blockpeptide verwendet, welche die Immunogenesequenz des jeweiligen primären Antikörpers enthalten. Jeder primäre Antikörper wurde dabei einzeln jeweils mit und ohne das korrespondierende Blockpeptid vorinkubiert. Das Blockpeptid wurde bezogen auf den Primärantikörper doppelt konzentriert nach einer Vorinkubation von 30 min auf die Zellen gegeben (Tabelle 2-11).

**Tabelle 2-11: Übersicht der Blockpeptide.**

Blockpeptid	Aminosäuresequenz	finale Konzentration
GADD45A	unbekannt	20 µg/ml
p21	unbekannt	20 µg/ml
p-ATM (Ser1981)	unbekannt	10 µg/ml
p-ATR (Ser428)	unbekannt	20 µg/ml
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	unbekannt	8 µg/ml
p-Chk1 (Ser345)	unbekannt	40 µg/ml
p-Chk2 (Thr68)	unbekannt	40 µg/ml
p-H2AX (Ser139)	unbekannt	5 µg/ml
p-p53 (Ser15)	SVEPPL[pS]QETF	4 µg/ml

Die Bildaufnahme der fluoreszenzgefärbten Zellen erfolgte unter Verwendung eines 20x Objektivs mit dem ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>TI</sup> Scan HCS Reader. Die Bildanalyse wurde mit der Software ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>TI</sup> Scan (iDev und classic) unter Verwendung der Bioapplikation *Molecular Translocation* (Version 4) vorgenommen. Es wurden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte jeweils 20 Bilder aufgenommen, wobei in der Mitte der Vertiefung begonnen wurde. In Tabelle 2-12 ist eine Übersicht der verwendeten Filter und gemessenen Parameter dargestellt. Eine detaillierte Auflistung aller Parameter zur Bildaufnahme und -analyse sind im Anhang 8.1 zu finden.

**Tabelle 2-12: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Immunfluoreszenzfärbung der Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker.**

Farbstoff	Filter (Ex/Em)	Messparameter
Hoechst 33342	365 ± 25 nm/ 515 ± 10 nm	-
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	475 ± 20 nm/ 515 ± 10 nm	mittlere Intensität des Proteins im Nukleus

Der Schwellenwert für jeden putativen Genotoxizitätsmarker wurde durch die Summe aus dem Wert der Lösemittelkontrolle und der dreifachen Standardabweichung der Lösemittelkontrolle bezogen auf den Wert der Lösemittelkontrolle festgelegt. Für p-Chk2 (Thr68) wurde 1,9, für p21, p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15) und GADD45A 1,6 und für p-p53 (Ser15), p-H2AX (Ser139) und p-ATM (Ser1981) wurde 1,5 als Schwellenwert festgelegt. Werte größer oder gleich dem definierten Schwellenwert führten zu einem positiven genotoxischen Befund.

### 2.2.2.8 Bestimmung der Zytotoxizität

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden die Zellen nach der Zellbehandlung mit 35 µl PBS gewaschen bevor 75 µl einer 10 µM CMFDA-Lösung zugegeben wurden. Diese Lösung wurde durch Verdünnung einer 10 mM Stammlösung (in DMSO) mit Kultivierungsmedium

DMEM/F-12 hergestellt. Infolge einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurden die Zellen mit 50 µl PBS gewaschen bevor diese mit 35 µl einer 3,7%igen Formaldehydlösung in PBS für 20 min fixiert wurden. Zuletzt wurden die Zellen zweimalig zunächst mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS und dann mit 50 µl PBS gewaschen bevor 100 µl PBS auf die Zellen gegeben wurden.

Zur Bildaufnahme wurde der ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>II</sup> Scan HCS Reader verwendet. Die Bioapplikation *Molecular Translocation* (Version 4) der Software ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>II</sup> Scan (iDev and classic) wurde zur Analyse der aufgenommenen Bilder verwendet. Pro Vertiefung der Mikrotiterplatte wurden mit einem 10x Objektiv jeweils 20 Bilder mittig beginnend aufgenommen. In Tabelle 2-13 ist eine Übersicht der verwendeten Filter und gemessenen Parameter dargestellt. Eine detaillierte Auflistung aller Parameter zur Bildaufnahme und -analyse sind im Anhang 8.1 zu finden.

**Tabelle 2-13: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Zytotoxizitätsbestimmung.**

<b>Farbstoff</b>	<b>Filter (Ex/Em)</b>	<b>Messparameter</b>
Hoechst 33342	365 ± 25 nm/ 515 ± 10 nm	selektierte Zellzahl pro validem Feld
CMFDA	475 ± 20 nm/ 515 ± 10 nm	mittlere Intensität von CMFDA im Zytoplasma

Von der Bewertung der Genotoxizität wurden Konzentrationen ausgeschlossen, welche bei einem der beiden Parameter für Zytotoxizität (selektierte Zellzahl pro validem Feld und mittlere Intensität von CMFDA im Zytoplasma) einen Wert kleiner 50 % gegenüber der Kontrolle angenommen haben.

### **2.2.2.9 Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker**

Zur Testung der ausgewählten Genotoxizitätsmarker (p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345), p-ATM (Ser1981)) wurden parallel zwei verschiedene FärbeprozEDUREN (Färbung A und B) für jede zu testende der 62 ECVAM-Substanzen jeweils mit und ohne metabolischem Aktivierungssystem durchgeführt.

#### **Färbung A**

Im Anschluss an die Zellbehandlung wurden die Zellen mit 35 µl PBS gewaschen bevor diese mit 35 µl einer 3,7%igen Formaldehydlösung in PBS für 20 min fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen nach einem erneuten WaschschrITt mit 35 µl PBS durch Zugabe von 35 µl einer Lösung bestehend 0,25 % Triton<sup>TM</sup> X-100 und 2 % Eselserum in PBS permeabilisiert und blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Primärantikörper wie in

Tabelle 2-14 angegeben in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 35 µl auf die Zellen gegeben. Auf eine Inkubationszeit von 16-18 h bei 4-8°C folgend wurden die Zellen mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Sekundärantikörper Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 Esel anti-Kaninchen IgG, Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 Esel anti-Ziege IgG und Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Esel anti-Maus IgG1 auf eine finale Konzentration von 5 µg/ml in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Dieser Färbelösung wurden 16 µM Hoechst 33342 durch Verdünnung einer 16 mM Stammlösung (in Wasser) zugefügt. Von dieser Färbelösung wurden jeweils 35 µl zugefügt. Infolge einer Inkubation von 1 h wurden die Zellen zweimalig zunächst mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS und dann mit 35 µl PBS gewaschen und letztlich 100 µl PBS auf die Zellen gegeben.

### **Färbung B**

Nach der Zellbehandlung wurden die Zellen mit 35 µl PBS gewaschen bevor 75 µl einer 10 µM CMFDA-Lösung zugegeben wurden. Diese Lösung wurde durch Verdünnung einer 10 mM Stammlösung (in DMSO) mit Kultivierungsmedium DMEM/F-12 hergestellt. Infolge einer Inkubation von 30 min bei 37 °C wurden die Zellen mit 35 µl PBS gewaschen bevor diese mit 35 µl einer 3,7%igen Formaldehydlösung in PBS für 20 min fixiert wurden. Anschließend wurden die Zellen nach einem erneuten Waschschrift mit 35 µl PBS durch Zugabe von 35µl einer Lösung bestehend 0,25 % Triton<sup>™</sup> X-100 und 2 % Eseserum in PBS permeabilisiert und blockiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden die Primärantikörper wie in Tabelle 2-14 angegeben in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Von dieser Lösung wurden jeweils 35 µl auf die Zellen gegeben. Auf eine Inkubationszeit von 16-18 h bei 4-8°C folgend wurden die Zellen mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Sekundärantikörper Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 Esel anti-Ziege IgG und Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 Esel anti-Maus IgG1 auf eine finale Konzentration von 5 µg/ml in Permeabilisierungs-/Blockierungslösung verdünnt. Dieser Färbelösung wurden 16 µM Hoechst 33342 durch Verdünnung einer 16 mM Stammlösung (in Wasser) zugefügt. Von dieser Färbelösung wurden jeweils 35 µl auf die Zellen gegeben. Infolge einer Inkubation von 1 h wurden die Zellen zweimalig zunächst mit 35 µl einer 0,05%igen Tween<sup>®</sup> 20-Lösung in PBS und dann mit 35 µl PBS gewaschen und letztlich 100 µl PBS auf die Zellen gegeben.

**Tabelle 2-14: Übersicht der Primärantikörper.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Immunogenesequenz</b>	<b>finale Konzentration</b>
anti-p21 polyklonaler Antikörper Ziege IgG	SEPAGDVRQNPCGSKACRRLFGPVD SEQLSRDCDALMAGCIQEARERWNF DFVTETPLEGDFAWERVRGLGLPKL YLPTGPRRGRDELGGRRPGTSPALL QGTAEEDHVDLSLSCTLVPRSGEQAE GSPGGPGDSQGRKRRQTSMTDFYHS KRRLIFSKRKP	0,8 µg/ml
anti-p-ATM (Ser1981) monoklonaler Antikörper Maus IgG1κ	SLAFEEG[pS]QSTTISS	4 µg/ml
anti-p-Chk1 (Ser345) polyklonaler Antikörper Ziege IgG	unbekannt	4 µg/ml
anti-p-H2AX (Ser139) monoklonaler Antikörper Maus IgG1	C-KATQA[pS]QEY	4 µg/ml
anti-p-p53 (Ser15) monoklonaler Antikörper Kaninchen IgG	SVEPPL[pS]QETF	2 µg/ml

Um die Spezifität der verwendeten Primärantikörper beider Färbungen nachzuweisen, wurden Blockpeptide verwendet, welche die Immunogenesequenz des jeweiligen primären Antikörpers enthalten. Jeder primäre Antikörper wurde dabei einzeln jeweils mit und ohne das korrespondierende Blockpeptid vorinkubiert. Das Blockpeptid wurde bezogen auf den Primärantikörper doppelt konzentriert nach einer Vorinkubation von 30 min auf die Zellen gegeben (Tabelle 2-15).

**Tabelle 2-15: Übersicht der Blockpeptide.**

<b>Blockpeptid</b>	<b>Aminosäuresequenz</b>	<b>finale Konzentration</b>
p21	MSEPAGDVRQNPCGSKACRRLFGPV DSEQLSRDCDALMAGCIQEARERWN FDFVTETPLEGDFAWERVRGLGLPK LYLPTGPRRGRDELGGRRPGTSPAL LQGTAEDHVDLSLSCTLVPRSGEQA EGSPGGPGDSQGRKRRQTSMTDFYH SKRRLIFSKRKP	1,6 µg/ml
p-ATM (Ser1981)	SLAFEEG[pS]QSTTISS	8 µg/ml
p-Chk1 (Ser345)	unbekannt	8 µg/ml
p-H2AX (Ser139)	C-KATQA[pS]QEY	8 µg/ml
p-p53 (Ser15)	SVEPPL[pS]QETF	4 µg/ml

Darüber hinaus wurde jeder der verwendeten Primärantikörper mit den bei der parallelen Färbung verwendeten Sekundärantikörpern getestet, um unerwünschte Kreuzreaktionen auszuschließen.

Die Bildaufnahme der fluoreszenzgefärbten Zellen erfolgte mit dem ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>TI</sup> HCS Reader mit einem 20x Objektiv. Die Analyse der Bilder erfolgte mit der Software ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>TI</sup> Scan (iDev und classic) unter Verwendung der Bioapplikation *Molecular Translocation* (Version 4). Es wurden pro Vertiefung einer Mikrotiterplatte jeweils 50 Bilder aufgenommen, wobei in der Mitte der Vertiefung begonnen wurde. In Tabelle 2-16 ist eine Übersicht der verwendeten Filter und gemessenen Parameter dargestellt. Eine detaillierte Auflistung aller Parameter zur Bildaufnahme und -analyse sind im Anhang 8.1 zu finden.

**Tabelle 2-16: Verwendete Farbstoffe, Filter und Messparameter zur Immunfluoreszenzfärbung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker und Zytotoxizitätsbestimmung.**

Farbstoff	Filter (Ex/Em)	Messparameter
<b>Färbung A</b>		
Hoechst 33342	365 ± 25 nm/ 515 ± 10 nm	-
Alexa Fluor <sup>®</sup> 488	475 ± 20 nm/ 515 ± 10 nm	mittlere Intensität von p-p53 (Ser15) im Nukleus
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555	549 ± 4 nm/ 600 ± 12,5 nm	mittlere Intensität von p21 im Nukleus
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	655 ± 15 nm/ 730 ± 25 nm	mittlere Intensität von p-H2AX (Ser139) im Nukleus
<b>Färbung B</b>		
Hoechst 33342	365 ± 25 nm/ 515 ± 10 nm	selektierte Zellzahl pro validem Feld
CMFDA	475 ± 20 nm/ 515 ± 10 nm	mittlere Intensität von CMFDA im Zytoplasma
Alexa Fluor <sup>®</sup> 555	549 ± 4 nm/ 600 ± 12,5 nm	mittlere Intensität von p-Chk1 (Ser345) im Nukleus
Alexa Fluor <sup>®</sup> 647	655 ± 15 nm/ 730 ± 25 nm	mittlere Intensität von p-ATM (Ser1981) im Nukleus

Der Schwellenwert für jeden putativen Genotoxizitätsmarker wurde durch die Summe aus dem Wert der Lösemittelkontrolle und der dreifachen Standardabweichung der Lösemittelkontrolle bezogen auf den Wert der Lösemittelkontrolle festgelegt. Für p-H2AX (Ser139) und p-Chk1 (Ser345) wurde 2,1, für p-p53 (Ser15) 1,9 und für p21 und p-ATM (Ser1981) 1,8 als Schwellenwert festgelegt. Wurde der Schwellenwert bei einem Protein überschritten, ist die getestete Substanz positiv genotoxisch bewertet worden. Wurde hingegen bei keinem Protein der Schwellenwert überschritten, erfolgte eine negativ genotoxische Klassifizierung der Substanz.

Konzentrationen, bei welchen aufgrund von Autofluoreszenz der Substanz keine Analyse der Zellen möglich gewesen ist, wurden ausgeschlossen. Ebenso wurden Konzentrationen, welche bei einem der beiden Zytotoxizitätsparameter (selektierte Zellzahl pro validem Feld und

mittlere Intensität von CMFDA im Zytoplasma) einen Wert kleiner 50 % gegenüber der Kontrolle angenommen haben, von der Bewertung der Genotoxizität ausgeschlossen.

Die Parameter Sensitivität, Spezifität und Prädiktivität wurden wie folgt kalkuliert:

- Sensitivität: Prozentualer Anteil der genotoxischen Substanzen (durch die Literatur beschrieben), die durch das vorliegende Testsystem positiv klassifiziert werden konnten.
- Spezifität: Prozentualer Anteil nicht-genotoxischer Substanzen (durch die Literatur beschrieben), die durch das vorliegende Testsystem negativ klassifiziert werden konnten.
- Prädiktivität: Prozentualer Anteil der getesteten Substanzen, die korrekt klassifiziert werden konnten.

### 2.2.3 Biostatistische Methoden

Zum Vergleich zweier Mittelwerte aus normalverteilten Grundgesamtheiten wurde der Student's Test verwendet, welcher von W.S. Gosset (1876-1935) eingeführt und nach seinem Pseudonym Student benannt wurde. Hierbei erfolgt eine Prüfung der Nullhypothese  $H_0$ , welche bei dem Vergleich zweier miteinander verbundener bzw. gepaarter Stichproben (Kontrolle und Behandlung) besagt, dass kein Unterschied zwischen dem Mittelwert von den beiden paarweise zugeordneten Stichproben besteht (Köhler et al., 2007; Storm, 1995).

Die Berechnung des t-Wertes zweier verbundener bzw. gepaarter Stichproben erfolgt folgendermaßen (Köhler et al., 2007):

$$t = \frac{\bar{d}}{s_d} \sqrt{n}$$

$\bar{d}$ : Mittelwert der Differenzen zwischen den gepaarten Stichproben

$s_d$ : Stichprobenstandardabweichung der Differenzen zwischen den gepaarten Stichproben

$n$ : Stichprobenumfang

Die zugrunde liegende Wahrscheinlichkeitsverteilung ist von dem Freiheitsgrad  $m$  abhängig, welcher sich aus der Differenz des Stichprobenumfangs  $n$  und eins berechnet. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  legt die maximale Irrtumswahrscheinlichkeit fest, welche in dieser Arbeit auf einen Wert von 0,05 festgelegt wurde. In Tabellen kann unter Angabe des t-Wertes, des Freiheitsgrades  $m$  und des Signifikanzniveaus  $\alpha$  ein Wert abgelesen werden. Ist der t-Wert größer als der abgelesene Wert, so wird die Nullhypothese  $H_0$  abgelehnt; andernfalls wird die

Nullhypothese  $H_0$  beibehalten. Alternativ zur Verwendung von Tabellen können zur Durchführung des Tests Statistikprogramme verwendet werden. Diese ermitteln den sogenannten p-Wert. Ist dieser Wert größer oder gleich dem Signifikanzniveau  $\alpha$ , so wird die Nullhypothese  $H_0$  beibehalten; andernfalls wird die Alternativhypothese angenommen (Köhler et al., 2007).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kapazität der Zelllinie HepG2

Eine besondere Problematik bei der Bestimmung der im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus gebildeten Metabolite ergibt sich durch interindividuelle Unterschiede im Metabolismus des Menschen, die durch Differenzen in Alter, Geschlecht oder genetischer Prädisposition bedingt sein können, und durch Unterschiede zwischen den Spezies, welche die Übertragung der Ergebnisse aus Tierversuchen auf den Menschen begrenzen (Marquardt et al., 2013). Die Bestimmung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz des verwendeten Testsystems nimmt aus diesem Grunde einen besonderen Stellenwert ein.

Eine Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kapazität der Zelllinie HepG2 ist zur nachfolgenden Interpretation der Ergebnisse der progentoxischen Substanzen hilfreich. Neben HepG2-Zellen wurde eine Bestimmung an humanen Hepatozyten zum Vergleich vorgenommen. Humane Hepatozyten stellen das Zielsystem der zu entwickelnden Pharmazeutika dar, weshalb der Fremdstoffmetabolismus dieser Zellen als Goldstandard gilt.

Zur Dosisfindung der verwendeten Induktoren wurden vorab Viabilitätsbestimmungen mit HepG2-Zellen durchgeführt und ausschließlich Konzentrationen verwendet, welche unterhalb des  $EC_{20}$  liegen. Die Ergebnisse der Viabilitätsbestimmung sind im Anhang 8.2 dargestellt. Auf eine Viabilitätsbestimmungen mit humanen Hepatozyten wurde verzichtet, da die verwendeten Induktorkonzentrationen mit diesen Zellen routinemäßig getestet werden.

##### 3.1.1 Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme

Die Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme wurde mittels dem *QuantiGene Plex 2.0 Assay (Plex Set 11563, human)* durchgeführt. Untersucht wurden hierbei Enzyme der Phase I und II, nukleäre Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren. Zur Normalisierung wurden die Referenzgene Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyltransferase (*HPRT*), ribosomales Protein L13a (*RPL13A*) und Transferrin Rezeptor (*TFRC*) verwendet. Da das Referenzgen *HPRT* mfi-Werte im Bereich der zu analysierenden Gene aufwies, wurde *HPRT* als Referenzgen für die folgenden Analysen eingesetzt.

**Tabelle 3-1: Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in HepG2-Zellen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) nach Induktion mit 3-Methylcholanthren (3-MC), Omeprazol (OMEP), Rifampicin (RIF) und Phenobarbital (PB) wie auch die zugehörige Standardabweichung (SD) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die ermittelten Student's T-Test p-Werte (p-W) sind für die jeweilig getestete Konzentration (Konz) aufgezeigt und bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  mit \* versehen. Als Referenzgen wurde HPRT verwendet. Eine Hochregulation gegenüber der Kontrolle von  $\geq 1,5$  und  $\leq 2,0$  bzw.  $\geq 2,0$  ist gelb bzw. rot dargestellt. Nicht detektierbare Gene sind mit nd markiert.

Induktor	Konz [µM]	3-MC		OMEP		RIF		PB	
		0,25	1	10	25	10	50	500	1000
<i>CYP1A1</i>	XF	8,01*	28,5*	32,7*	54,7*	1,39*	1,75*	2,66*	3,92*
	SD	3,17	12,2	6,2	10,0	0,21	0,42	0,77	0,87
	p-W	1,21E-02	9,57E-03	5,79E-05	6,22E-05	2,22E-02	2,47E-02	8,10E-03	8,10E-04
<i>CYP1A2</i>	XF	4,19*	9,53*	9,50*	11,8*	1,53	2,80	3,02	4,19*
	SD	1,27	5,41	6,21	5,1	1,10	1,73	2,43	1,39
	p-W	3,69E-02	1,30E-02	5,64E-03	4,83E-03	3,35E-01	5,55E-02	9,07E-02	1,94E-03
<i>CYP2B6</i>		nd							
<i>CYP2C9</i>		nd							
<i>CYP2C19</i>		nd							
<i>CYP3A4</i>	XF	2,73*	2,05	3,01	3,13	3,42	2,66*	3,60*	4,73*
	SD	0,61	0,82	1,00	1,66	1,72	0,95	2,04	1,46
	p-W	2,24E-03	1,10E-01	1,58E-01	5,13E-02	9,56E-02	9,89E-03	3,71E-02	2,69E-02
<i>UGT1A6</i>	XF	1,72	1,88*	1,90	3,15*	-1,33	1,04	1,35	1,30
	SD	1,01	0,38	0,81	0,72	0,57	0,81	0,51	0,49
	p-W	2,39E-01	1,99E-02	1,25E-01	7,60E-03	3,30E-01	8,70E-01	2,38E-01	3,26E-01
<i>AHR</i>	XF	1,11	-1,00	1,17	1,16	1,18	-1,03	1,14	1,03
	SD	0,16	0,17	0,21	0,13	0,14	0,18	0,19	0,21
	p-W	2,38E-01	8,76E-01	1,79E-01	6,80E-02	6,70E-02	7,02E-01	2,38E-01	8,60E-01
<i>PXR</i> ( <i>NR1I2</i> )	XF	1,20	1,11	1,28	1,40*	1,01	1,09	1,24*	1,05
	SD	0,25	0,19	0,23	0,27	0,15	0,16	0,16	0,21
	p-W	1,86E-01	3,00E-01	7,30E-02	4,58E-02	8,05E-01	2,99E-01	4,13E-02	6,61E-01
<i>CAR</i> ( <i>NR1I3</i> )	XF	1,33	1,06	1,43	1,16	-1,05	1,37	1,16	1,34
	SD	0,45	0,55	0,49	0,35	0,27	0,34	0,64	0,33
	p-W	2,99E-01	9,72E-01	1,88E-01	5,58E-01	6,33E-01	1,66E-01	6,79E-01	1,58E-01
<i>MDR1</i> ( <i>ABCBI</i> )	XF	1,25*	1,18	1,28	1,32*	1,10	1,15	1,30*	1,17
	SD	0,14	0,25	0,21	0,15	0,16	0,22	0,14	0,19
	p-W	2,31E-02	2,22E-01	5,79E-02	1,31E-02	2,88E-01	2,55E-01	1,87E-02	1,75E-01
<i>BSEP</i> ( <i>ABCBI1</i> )		nd							
<i>MRP2</i> ( <i>ABCC2</i> )	XF	1,35	1,12	1,30	1,22	1,14	1,26*	1,47*	1,55*
	SD	0,34	0,22	0,24	0,17	0,10	0,17	0,11	0,28
	p-W	8,16E-02	3,61E-01	5,50E-02	6,89E-02	8,79E-02	3,39E-02	7,59E-05	9,50E-03

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in HepG2-Zellen sind in Tabelle 3-1 dargestellt. Während nach Induktion mit 3-MC, OMEP, RIF und PB vorzugsweise Induktionen der Cytochrom P450 Enzyme *CYP1A1*, *CYP1A2* und *CYP3A4* nachgewiesen werden konnten, konnte ebenso eine Induktion von UDP-Glucuronosyltransferase 1 (*UGT1A6*) ermittelt werden. Nicht detektierbar sind hingegen *CYP2B6*, *CYP2C9* und *CYP2C19* gewesen.

**Tabelle 3-2: Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme in humanen Hepatozyten.**

Dargestellt sind die Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle der fünf Donoren Hu0910, Hu1389, Hu1419, Hu4197 und Hu4199 nach Induktion mit 3-Methylcholanthren, Omeprazol, Rifampicin und Phenobarbital. Als Referenzgen wurde HPRT verwendet. Eine Hochregulation gegenüber der Kontrolle von  $\geq 1,5$  und  $\leq 2,0$  bzw.  $\geq 2,0$  ist gelb bzw. rot dargestellt.

Donor	Hu 0910	Hu 1389	Hu 1419	Hu 4197	Hu 4199	Hu 0910	Hu 1389	Hu 1419	Hu 4197	Hu 4199	Hu 0910	Hu 1389	Hu 1419	Hu 4197	Hu 4199	Hu 0910	Hu 1389	Hu 1419	Hu 4197	Hu 4199
Induktor	3-Methylcholanthren 5 $\mu$ M					Omeprazol 25 $\mu$ M					Rifampicin 50 $\mu$ M					Phenobarbital 1000 $\mu$ M				
<i>CYP1A1</i>	69,6	62,6	103	75,6	39,9	35,0	38,2	51,8	42,9	16,2	2,28	1,89	3,04	4,21	2,38	2,06	2,02	2,81	3,26	1,56
<i>CYP1A2</i>	16,3	31,8	56,8	27,3	24,3	10,3	33,1	39,6	26,9	20,2	0,96	0,82	1,30	1,02	0,76	1,18	2,02	2,65	1,72	1,38
<i>CYP2B6</i>	1,18	1,09	1,30	0,51	0,47	3,10	1,48	3,67	2,63	1,02	4,54	2,08	3,99	2,85	2,54	6,07	3,12	6,72	4,81	2,98
<i>CYP2C9</i>	1,14	0,76	1,05	0,95	0,93	0,91	0,88	1,57	1,25	0,85	1,89	1,86	3,11	3,05	2,99	1,48	2,36	3,40	3,10	2,74
<i>CYP2C19</i>	1,45	0,80	1,02	1,14	0,84	1,43	0,78	0,85	0,79	0,67	1,99	1,09	1,24	1,05	1,24	1,64	1,39	1,42	1,08	1,16
<i>CYP3A4</i>	0,34	0,41	1,13	0,83	0,14	2,31	3,20	7,82	3,77	1,88	15,9	15,9	35,3	26,7	14,1	5,33	13,7	31,0	13,7	6,64
<i>UGT1A6</i>	1,35	0,71	0,70	0,86	0,74	0,91	0,82	0,74	0,89	0,74	0,98	0,81	0,98	0,93	0,92	1,10	1,20	1,07	1,02	1,03
<i>AHR</i>	0,81	0,93	0,91	0,73	0,99	0,60	0,68	0,69	0,57	0,72	1,02	1,04	1,35	1,01	1,21	1,20	1,04	1,17	0,84	1,01
<i>PXR</i> ( <i>NR1I2</i> )	1,33	1,12	1,77	0,98	1,22	0,80	0,99	1,05	0,87	0,83	0,76	0,94	0,91	0,84	0,99	0,92	1,22	1,52	1,01	1,16
<i>CAR</i> ( <i>NR1I3</i> )	2,18	2,23	4,62	1,57	2,13	1,22	2,53	3,16	2,62	1,96	0,68	0,47	1,05	1,05	0,56	1,09	1,35	2,53	1,44	1,62
<i>MDR1</i> ( <i>ABCB1</i> )	1,27	0,84	1,25	1,07	0,74	1,13	0,80	0,86	0,75	0,69	1,57	1,68	1,71	1,39	1,46	2,14	2,41	2,50	1,67	1,71
<i>BSEP</i> ( <i>ABCB11</i> )	0,81	1,00	1,52	0,86	0,47	0,82	1,59	1,62	0,95	1,06	0,65	1,33	1,46	0,92	1,16	0,77	1,91	2,14	0,94	1,42
<i>MRP2</i> ( <i>ABCC2</i> )	1,34	1,39	1,32	1,25	1,13	1,05	1,27	1,20	1,02	0,95	1,36	1,42	1,56	1,44	1,48	1,54	1,89	1,90	1,39	1,46

Bei der Bestimmung der Genexpression fremdstoffmetabolisierender Enzyme der fünf Donoren Hu0910, Hu1389, Hu1419, Hu4197 und Hu4199 humaner Hepatozyten (Tabelle 3-2) konnte neben der detektierten Induktion der nukleären Rezeptoren *pregnane X receptor* (*PXR*) und *constitutive androstane receptor* (*CAR*), der Transporter *multidrug resistance protein 1* (*MDR1*) und *multidrug resistance-associated protein 2* (*MRP2*) vorzugsweise die Expression der untersuchten Phase I-Enzyme *CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* und *CYP3A4* ermittelt werden.

**Tabelle 3-3: Vergleich der Basalexpressionen von HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten.**

Die Basalexpression (nach Behandlung mit DMSO) gemittelt aus vier Experimenten mit HepG2-Zellen (HepG2) unterschiedlicher Passagenzahl wurde jeweils gegenüber einen der fünf Donoren Hu0910, Hu1389, Hu1419, Hu4197 und Hu4199 humaner Hepatozyten (HH) in Bezug gesetzt. Nicht detektierbare Gene sind mit nd markiert.

Vergleich HepG2 gegenüber HH	Hu0910	Hu1389	Hu1419	Hu4197	Hu4199
<i>CYP1A1</i>	-38,3	-24,9	-16,7	-59,9	-25,1
<i>CYP1A2</i>	-12838	-1670	-1772	-4010	-19290
<i>CYP2B6</i>	nd in HepG2				
<i>CYP2C9</i>	nd in HepG2				
<i>CYP2C19</i>	nd in HepG2				
<i>CYP3A4</i>	-1885	-124	-128	-228	-383
<i>UGT1A6</i>	-7142	-4929	-4226	-5167	-43546
<i>AHR</i>	-1,97	-2,27	-1,71	-1,55	-2,38
<i>PXR (NR1I2)</i>	-10,3	-5,09	-4,75	-6,69	-3,86
<i>CAR (NR1I3)</i>	-187	-23,1	-23,4	-22,5	-62,4
<i>MDR1 (ABCB1)</i>	-5,65	-3,93	-3,44	-4,81	-13,2
<i>BSEP (ABCB11)</i>	nd in HepG2				
<i>MRP2 (ABCC2)</i>	-4,97	-3,13	-2,83	-4,22	-14,5

Vergleicht man die basalen Expressionen der Zelllinie HepG2 mit den der humanen Hepatozyten (Tabelle 3-3), so konnte durchweg eine verminderte Expression der untersuchten Gene in der Zelllinie HepG2 detektiert werden. Nicht detektierbar bei der Analyse der Zelllinie HepG2 sind die Gene der Cytochrom P450 Enzyme *CYP2B6*, *CYP2C9* und *CYP2C19* wie auch des Transporters *BSEP* gewesen.

### 3.1.2 Aktivitätsbestimmung ausgewählter Cytochrom P450 Enzyme

Neben der durchgeführten Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme wurde die Aktivität der Enzyme *CYP1A1/2* und *CYP3A4* in HepG2-Zellen (Tabelle 3-4) und humanen Hepatozyten (Tabelle 3-5) ermittelt.

**Tabelle 3-4: Aktivitätsbestimmung von CYP1A1/2 und CYP3A4 in HepG2-Zellen.**

Die gemittelten Aktivitäten nach Behandlung mit DMSO und den Induktoren 3-Methylcholanthren (3-MC), Omeprazol (OMEP), Rifampicin (RIF) und Phenobarbital (PB) wie auch die zugehörige Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF), die zugehörige Standardabweichung (SD) und die ermittelten Student's T-Test p-Werte für die jeweilig getestete Konzentration (Konz) sind aufgezeigt. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert von  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen. Eine Hochregulation gegenüber der Kontrolle von  $\geq 2,0$  ist rot dargestellt.

CYP	Substanz	Konz [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität [ $\text{pmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ ]	SD	XF	SD	p-Wert
1A1/2	DMSO 1 %	-	4,17E-03	8,38E-04	-	-	-
	3-MC	0,25	4,64E-02	1,16E-03	11,4*	2,2	5,13E-04
		1	1,10E-01	1,78E-02	27,4*	8,7	9,97E-03
	OMEP	10	5,84E-03	1,21E-03	1,45	0,48	2,19E-01
		25	1,26E-02	2,42E-03	3,15*	1,07	3,85E-02
3A4	DMSO 1 %	-	2,45E-04	6,57E-05	-	-	-
	RIF	10	5,68E-04	5,20E-05	2,40*	0,47	6,68E-03
		50	7,18E-04	1,81E-04	2,99*	0,64	2,74E-02
	PB	500	6,16E-04	8,14E-05	2,58*	0,36	2,15E-03
		1000	8,35E-04	7,92E-05	3,52*	0,60	3,92E-04

In HepG2-Zellen konnte nach Induktion mit 3-MC eine bis zu 27-fach erhöhte Regulation gegenüber der Kontrolle von CYP1A1/2 mit einem p-Wert kleiner 0,05 ermittelt werden. Eine verhältnismäßig geringere Hochregulation von 3,15 bei einem p-Wert kleiner 0,05 wurde nach Behandlung mit dem Induktor OMEP erzielt. Neben der Induktion des Enzyms CYP1A1/2 konnte auch eine Hochregulation von CYP3A4 sowohl nach Induktion mit RIF als auch mit PB detektiert werden. Die höchste ermittelte Regulation von CYP3A4 lag für RIF bei 2,99 und für PB bei 3,52, wobei diese einen p-Wert kleiner 0,05 aufzeigten.

**Tabelle 3-5: Aktivitätsbestimmung von CYP1A1/2 und CYP3A4 in humanen Hepatozyten.**

Die gemittelten Aktivitäten nach Behandlung des Donors Hu4199 mit DMSO und den Induktoren 3-Methylcholanthren (3-MC), Omeprazol (OMEP), Rifampicin (RIF) und Phenobarbital (PB) wie auch die zugehörige Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten. Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF), die zugehörige Standardabweichung (SD) und die ermittelten Student's T-Test p-Werte für die jeweilig getestete Konzentration (Konz) sind aufgezeigt. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert von  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen. Eine Hochregulation gegenüber der Kontrolle von  $\geq 2,0$  ist rot dargestellt.

CYP	Substanz	Konz [ $\mu\text{M}$ ]	Aktivität [ $\text{pmol}/(\text{min} \times \text{mg})$ ]	SD	XF	SD	p-Wert
1A1/2	DMSO 0,1 %	-	7,20E-03	3,86E-03	-	-	-
	3-MC	5	1,08E-01	3,37E-02	18,6*	9,9	3,31E-02
	OMEP	25	8,67E-02	4,81E-02	13,4	5,7	9,77E-02
3A4	DMSO 0,1 %	-	1,11E-03	7,90E-04	-	-	-
	RIF	50	5,93E-03	2,53E-03	6,08*	1,55	4,13E-02
	PB	1000	3,43E-03	2,95E-03	2,96	0,69	2,06E-01

Neben HepG2-Zellen wurde eine Aktivitätsbestimmung in humanen Hepatozyten durchgeführt. Eine 18,6-fache Regulation von CYP1A1/2 gegenüber der Kontrolle mit einem p-Wert kleiner 0,05 nach Behandlung mit 3-MC wurde ermittelt. Nach Behandlung mit OMEP konnte eine Regulation von 13,4 detektiert werden. Eine bis zu 6-fache Regulation von CYP3A4 gegenüber der Kontrolle konnte in humanen Hepatozyten nach Induktion mit RIF ermittelt werden.

Beim Vergleich der beiden untersuchten Zellsysteme konnte eine um 1,7-fach erhöhte und somit fast doppelt so hohe Basalaktivität von CYP1A1/2 in humanen Hepatozyten gegenüber HepG2-Zellen nachwiesen werden. Nach Induktion mit der hohen Konzentration von 3-MC ließ sich bei den HepG2-Zellen eine ebenso starke Aktivität wie in humanen Hepatozyten nach Induktion mit 3-MC aufzeigen. Eine um 4,5-fach erhöhte CYP3A4-Basalaktivität von humanen Hepatozyten verglichen mit HepG2-Zellen konnte ermittelt werden. Durch Induktion konnte wie bereits erwähnt eine bis zu 3,5-fache Hochregulation von CYP3A4 in HepG2-Zellen erreicht werden, wobei die maximal detektierte CYP3A4-Aktivität den humanen Hepatozyten um das 7-Fache nachsteht.

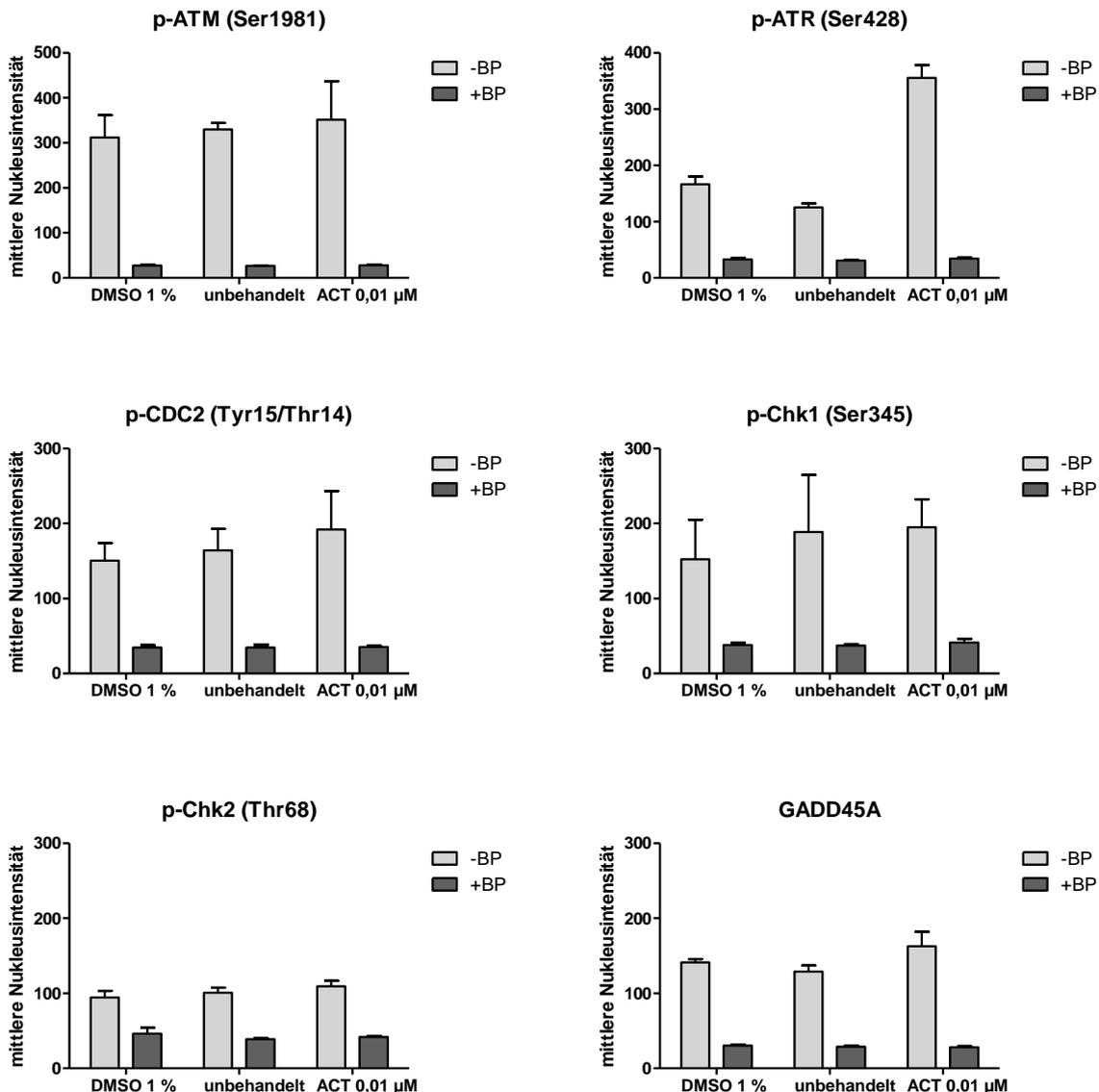
### **3.2 Etablierung des *in vitro* Testsystems zur toxikologischen Evaluierung genotoxischer Substanzen**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es gewesen einen sensitiven und spezifischen Test zur Identifizierung von genotoxischen und progenotoxische Substanzen unter Verwendung der HCI-Technologie zu entwickeln. Um die Prädiktivität einer Auswahl putativer Markerproteine ausfindig zu machen, wurden HepG2-Zellen mit genotoxischen Modellsubstanzen (Methylmethansulfonat (MMS), Actinomycin D (ACT), Etoposid (ETO)), progenotoxischen Modellsubstanzen (Cyclophosphamid (CPA), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), 2-Acetylaminofluoren (AAF)) und nicht-genotoxischen Substanzen (D-Mannitol (MAN), Phenforminhydrochlorid (PHC), Progesteron (PRO)) getestet. Die prädiktivsten putativen Markerproteine wurden daraufhin zur Etablierung eines multi-parametrischen HCI-basierten Testsystems verwendet, dessen Leistung durch Testung einer Reihe von Chemikalien, welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen ist, überprüft wurde (Kirkland et al., 2008).

### 3.2.1 Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

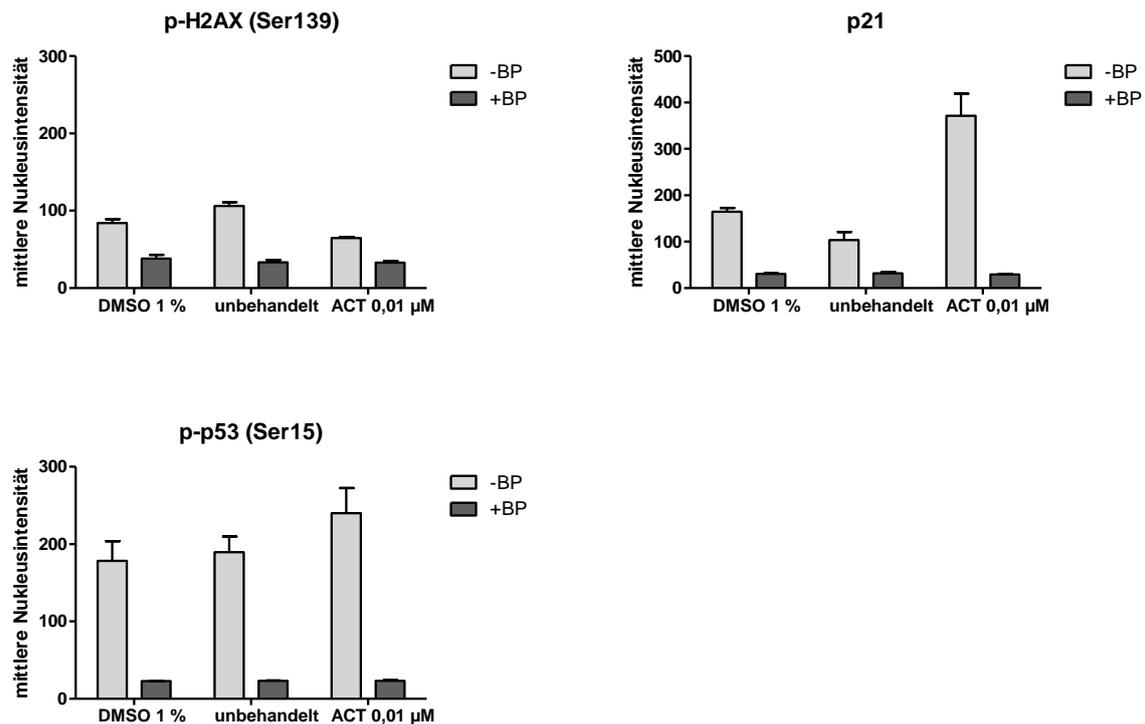
#### 3.2.1.1 Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

Zum Nachweis der Spezifität der verwendeten Primäantikörper wurden Blockpeptide verwendet, welche die Immunogensequenzen der jeweiligen Primäantikörper enthalten (Abbildung 3-1 und 3-2).



**Abbildung 3-1: Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker (Teil 1).**

Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Antikörper gegen p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14), p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thr68) und GADD45A nach Immunofluoreszenzfärbung ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Zugabe des zugehörigen Blockpeptids (-/+BP). Die Mittelwerte der absoluten Fluoreszenzintensitäten und die zugehörigen Standardabweichungen ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Actinomycin D (ACT).



**Abbildung 3-2: Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker (Teil 2).**

Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Antikörper gegen p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15) nach Immunofluoreszenzfärbung ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Zugabe des zugehörigen Blockpeptids (-/+BP). Die Mittelwerte der absoluten Fluoreszenzintensitäten und die zugehörigen Standardabweichungen ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Actinomycin D (ACT).

Jeder der getesteten Antikörper erzielte nach Zugabe des Blockpeptids eine gegenüber der Testung ohne Blockpeptid verminderte Fluoreszenzintensität (unterhalb von 50). Die ermittelten Intensitäten lagen im Bereich der Intensitäten, welche auch ausschließlich nach Zugabe des Sekundärantikörpers detektiert wurden. Der getestete Primärantikörper konnte demnach durch das Blockpeptid wirksam blockiert werden (Abbildung 3-1 und 3-2). Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang 8.3 aufgeführt.

### 3.2.1.2 Genotoxizitätsbestimmung der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

Basierend auf den Ergebnissen einer vorangegangenen Studie mit Genomexpressionsprofilierung nach Behandlung von HepG2-Zellen mit (pro-)genotoxischen Substanzen (Boehme et al., 2011) und einer Literaturrecherche wurden die folgenden neun unterschiedlichen Proteine der DNA-Schadensantwort als putative Marker der Substanz-induzierten Genotoxizität ausgewählt und getestet: p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15), GADD45A

und p-Chk2 (Thr68). Diese wurden hierzu separat voneinander mittels einer Immunofluoreszenzfärbung detektiert. Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurde zusätzlich in einem parallel durchgeführten Experiment die Zellzahlbestimmung und eine Färbung mit dem Farbstoff CMFDA vorgenommen. Konzentrationen, bei welchen einer der beiden Zytotoxizitätsparameter (selektierte Zellzahl pro validem Feld und mittlere Intensität von CMFDA im Zytoplasma) einen Wert kleiner 50 % gegenüber der Kontrolle angenommen hatte, wurden von der Bewertung der Genotoxizität ausgeschlossen.

Da die Spezifität der verwendeten Antikörper bereits durch das Blockexperiment gezeigt werden konnte, wurde von dem Mitführen von Positivkontrollen für die neun zu detektierenden Proteine abgesehen. Darüber hinaus wurde auf das Mitführen von Positivkontrollen für das MAS und die verwendeten Zytotoxizitätsparameter aufgrund der Entsprechung der Resultate mit vorherigen Studien verzichtet.

Eine Gegenüberstellung der Ergebnisse der beiden detektierten Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SSC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA) (Tabelle 3-6 und Anhang 8-4) und der Ergebnisse der Viabilitätsbestimmung von CPA, AFB1 und DMBA aus einem vorherigen Projekt (Dietz, 2009) ergab vergleichbare Resultate. Für alle getesteten Konzentrationen von AFB1 und DMBA bis einschließlich 1000  $\mu\text{M}$  (sowohl mit als auch ohne MAS) konnte keine Zytotoxizität größer oder gleich 50 % gegenüber der Kontrolle detektiert werden (Dietz, 2009). Auch im vorliegenden Experiment konnte bei einer Testung von AFB1 bis 200  $\mu\text{M}$  und DMBA bis 400  $\mu\text{M}$  (mit MAS) keine zytotoxische Wirkung größer oder gleich 50 % festgestellt werden. Im Falle von CPA wurde im vorherigen Experiment bei einer Testung bis einschließlich 100  $\mu\text{M}$  ohne MAS keinerlei Zytotoxizität ermittelt im Gegensatz zu der Testung mit MAS, bei welcher ein  $\text{EC}_{50}$  von 195  $\mu\text{M}$  ermittelt werden konnte (Dietz, 2009). In der vorliegenden Arbeit lag bei der Detektion der SCC eine Zytotoxizität größer oder gleich 50 % bei der höchst getesteten Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  vor. Für CMFDA konnte bereits bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eine auf 42,1 % herunterregulierte Intensität gegenüber der Kontrolle und somit ein knapp über der Zytotoxizitätsgrenze von 50 % liegendes Ergebnis ermittelt werden.

Das in vorherigen Projekten etablierte metabolische Aktivierungssystem (Boehme et al., 2010, Dietz, 2009) wurde ebenfalls in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die in den vorherigen Projekten detektierten Induktionen von aktiviertem p53 konnten für alle getesteten direkt genotoxischen Substanzen (MMS, ACT, ETO) und progenotoxischen Substanzen mit

MAS (CPA, DMBA und AFB1) (Boehme et al., 2010; Dietz, 2009) auch in der vorliegenden Arbeit für p-p53 (Ser15) nachgewiesen werden.

**Tabelle 3-6: Zytotoxizitätsbestimmung der bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker verwendeten Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) der beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Konzentrationen größer oder gleich bzw. kleiner dem EC<sub>50</sub> (Konzentration mit einem halbmaximalen zytotoxischen Effekt) führen zu einer positiv (rot) bzw. negativ (grün) zytotoxischen Klassifizierung. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen.

Substanzklasse		direkt genotoxisch			progenotoxisch + MAS			nicht-genotoxisch			
Substanz		MMS	ACT	ETO	CPA	DMBA	AFB1	AAF	MAN	PRO	PHC
<b>höchste Konz [µM]</b>		<b>1000</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>200</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>	<b>1000</b>
höchste Konz < EC <sub>50</sub> [µM]		250	0,013	2	50	400	200	1000	1000	15,63	125
<b>SSC</b>	Konz [µM]	500	0,025	-	200	-	-	-	-	31,25	250
	≥ EC <sub>50</sub> XF [%]	32,4*	25,3*	-	18,2	-	-	-	-	48,0*	49,7
<b>CMFDA</b>	Konz [µM]	1000	-	-	100	-	-	-	-	62,5	-
	≥ EC <sub>50</sub> XF [%]	19,9*	-	-	42,1*	-	-	-	-	45,4*	-

AAF: 2-Acetylaminofluoren; ACT: Actinomycin D; AFB1: Aflatoxin B<sub>1</sub>; CPA: Cyclophosphamid; DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen; ETO: Etoposid; MAN: D-Mannitol; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MMS: Methylmethansulfonat; PHC: Phenforminhydrochlorid; PRO: Progesteron.

Die Ergebnisse der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker sind in Tabelle 3-7 dargestellt und darüber hinaus detailliert im Anhang 8.4 aufgeführt. Die beste Prädiktivität für Genotoxizität zeigten die Proteine p21 und p-p53 (Ser15), welche beide sechs von insgesamt sieben getesteten (pro-)genotoxischen Substanzen korrekt klassifizieren konnten. Fünf der getesteten (pro-)genotoxischen Substanzen konnten von p-Chk1 (Ser345) und p-H2AX (Ser139) als genotoxische Substanz richtig zugeordnet werden. P-ATM (Ser1981) bzw. p-ATR (Ser428) und p-CDC2 (Tyr15/Thr14) konnten drei bzw. zwei der progenotoxischen Substanzen eine genotoxische Klassifizierung zuweisen. Demgegenüber konnte bei p-Chk2 (Thr68) lediglich eine und bei GADD45A keine genotoxische Substanz korrekt positiv eingestuft werden. Keines der getesteten putativen Markerproteine führte zu einem falsch positiven Resultat.

**Tabelle 3-7: Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker.**

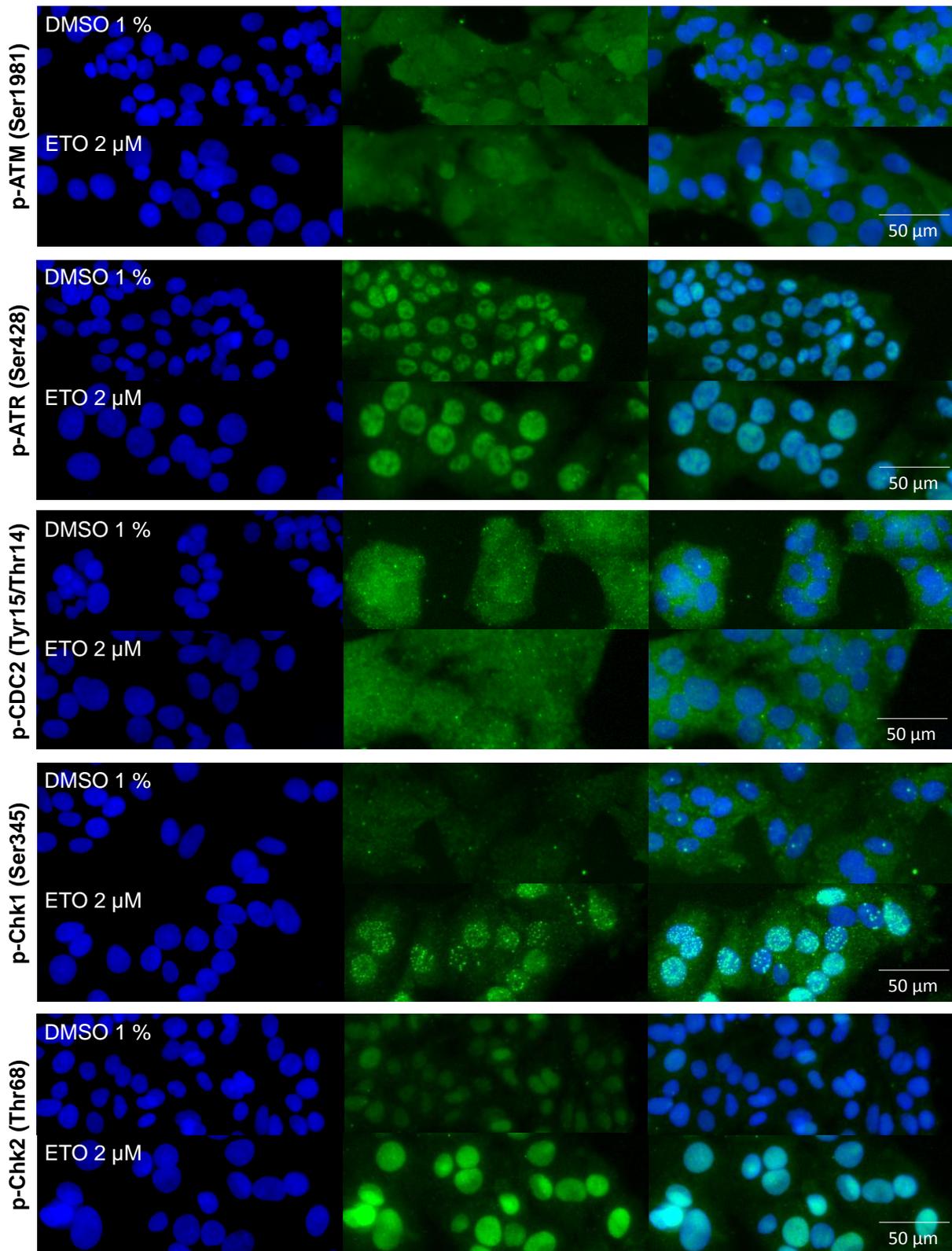
Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Für p-Chk2 (Thr68) wurde 1,9, für p21, p-Chk1 (Ser345), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15) und GADD45A 1,6 und für p-p53 (Ser15), p-H2AX (Ser139) und p-ATM (Ser1981) wurde 1,5 als Schwellenwert festgelegt. Die Konzentration mit maximaler Regulation ( $c(E_{max})$ ) ist aufgezeigt. Substanzen mit Regulation oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei Konzentrationen ohne ein zytotoxisches Ereignis (geringste beobachtete effektive Konzentration, LOEC) werden positiv genotoxisch klassifiziert (rot). Substanzen mit Regulationen kleiner dem definierten Schwellenwert führen zu einer negativen Klassifizierung (grün) ebenso wie Substanzen mit Regulationen oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei zytotoxischen Konzentrationen (orange). Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen.

Substanzklasse		direkt genotoxisch			progenotoxisch + MAS			nicht-genotoxisch				
Substanz		MMS	ACT	ETO	CPA	DMBA	AFB1	AAF	MAN	PRO	PHC	
<b>p-ATM (Ser1981)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	-	50	50	1000	-	-	-	
		XF	-	-	-	1,74*	1,60*	2,15*	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	500	0,025	-	100	400	200	1000	-	125	500
		XF	1,95*	1,63*	-	2,44*	2,52*	2,70*	2,15*	-	2,13*	1,64*
<b>p-ATR (Ser428)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	-	50	100	-	-	-	-	
		XF	-	-	-	1,77*	1,72*	-	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	1000	0,1	-	100	100	200	-	-	62,5	500
		XF	3,28*	2,38*	-	2,76*	2,36*	1,97*	-	-	1,71*	1,77*
<b>p-CDC2 (Tyr15/ Thr14)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	-	-	200	1000	-	-	-	
		XF	-	-	-	-	1,86*	1,67*	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	1000	-	-	-	200	1000	-	-	-	
		XF	1,64*	-	-	-	1,86*	1,67*	-	-	-	
<b>p-Chk1 (Ser345)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	0,5	50	50	50	1000	-	-	
		XF	-	-	1,61*	1,87*	2,63*	2,04*	3,89*	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	1000	0,05	2	100	400	200	1000	-	125	1000
		XF	5,07*	2,67*	2,3*	4,36*	5,12*	7,39*	3,89*	-	2,42*	1,64*
<b>p-Chk2 (Thr68)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	0,5	-	-	-	-	-	-	
		XF	-	-	2,37*	-	-	-	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	-	0,2	2	-	-	-	-	-	125	-
		XF	-	3,00*	2,63*	-	-	-	-	-	2,85*	-
<b>GADD 45A</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		XF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		XF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>p-H2AX (Ser139)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	125	-	0,25	50	50	50	-	-	-	
		XF	1,58*	-	1,60*	2,20*	2,34*	1,56*	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	1000	0,2	2	100	100	200	-	-	250	-
		XF	9,51*	4,70*	5,67*	2,92*	3,54*	4,41*	-	-	2,15	-
<b>p21</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	125	0,003	0,125	50	50	12,5	-	-	-	
		XF	1,99*	4,76*	1,77*	2,13*	1,85*	1,78*	-	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	250	0,0125	2	50	100	50	-	-	-	
		XF	2,94*	9,60*	6,74*	2,13*	1,96*	2,42*	-	-	-	
<b>p-p53 (Ser15)</b>	LOEC	[ $\mu$ M]	250	-	0,5	50	25	50	1000	-	-	
		XF	1,89*	-	2,08*	1,64*	1,86*	1,76*	1,71*	-	-	
	$c(E_{max})$	[ $\mu$ M]	1000	0,2	2	100	200	200	1000	-	-	
		XF	4,32*	3,87*	2,67*	2,09*	3,23*	4,10*	1,71*	-	-	

AAF: 2-Acetylaminofluoren; ACT: Actinomycin D; AFB1: Aflatoxin B<sub>1</sub>; CPA: Cyclophosphamid; DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen; ETO: Etoposid; MAN: D-Mannitol; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MMS: Methylmethansulfonat; PHC: Phenforminhydrochlorid; PRO: Progesteron.

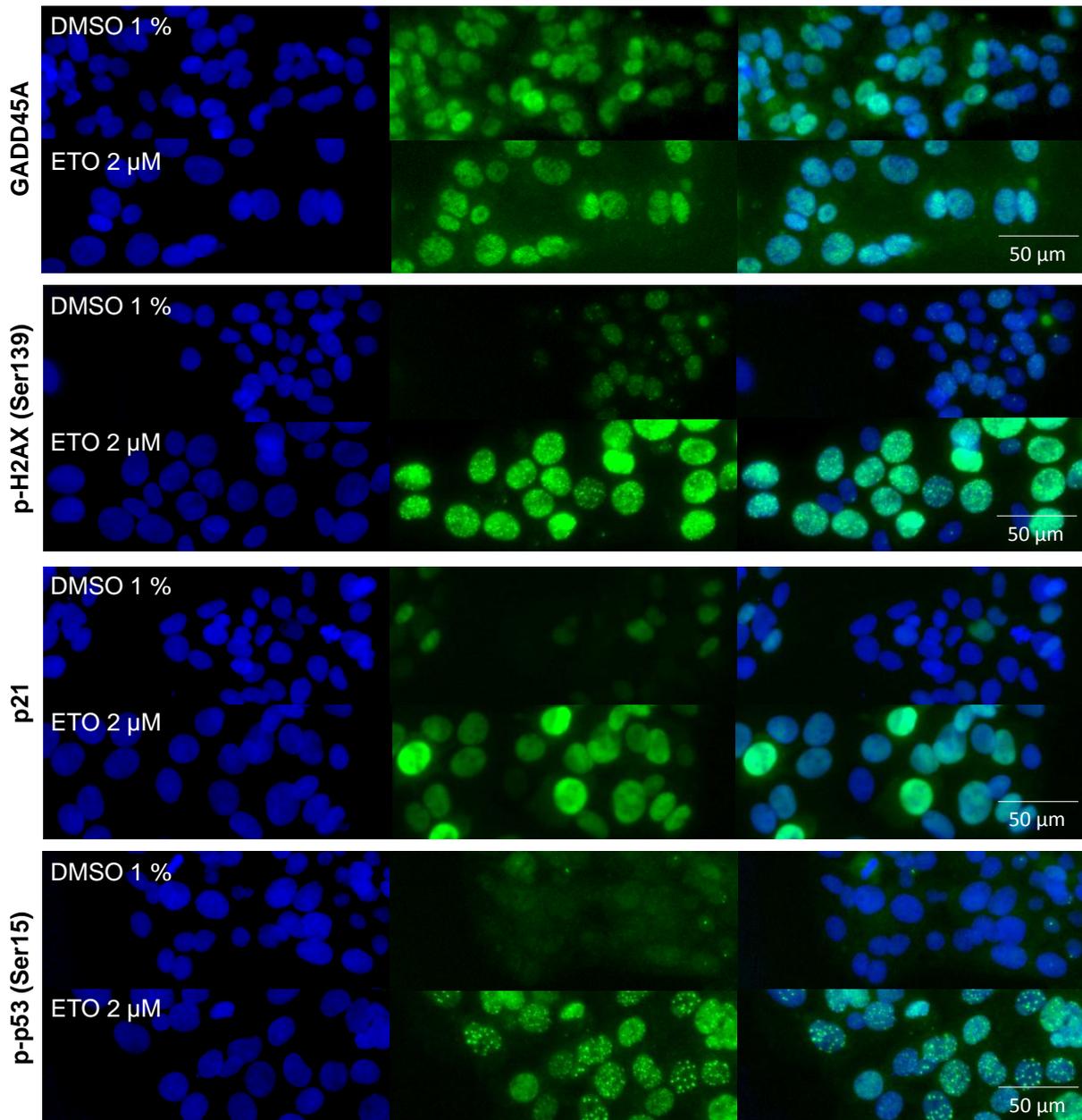
Die Proteine, welche mindestens drei (pro-)genotoxische Substanzen korrekt klassifizieren ohne ein falsch positives Ergebnis für eine nicht-genotoxische Substanz hervorzurufen, wurden in einem nachfolgenden Experiment mit den von der ECVAM empfohlenen Substanzen zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests getestet. Bei diesen Proteinen handelt es sich um p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981). Jedes dieser final ausgewählten Proteine außer p-ATM (Ser1981) wies einen relativ großen dynamischen Bereich mit Regulationen von bis zu dem 4-fachen über der Kontrolle auf.

Zur Visualisierung der gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 3-3 und 3-4 Aufnahmen der durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen an HepG2-Zellen, welche mit der genotoxischen Substanz ETO 2  $\mu$ M und der Kontrolle (1 % DMSO) behandelt wurden, dargestellt. Die Immunofluoreszenzfärbungen von p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14) und GADD45A lassen keine gegenüber der Kontrolle erhöhte Expression nach Behandlung der Zellen mit ETO 2  $\mu$ M erkennen (Abbildung 3-3), was mit den ermittelten x-fachen Veränderungen über der Kontrolle der Proteine übereinstimmt. Demgegenüber ist nach Behandlung mit 2  $\mu$ M ETO eine vermehrte Expression von p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thr68), p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15) gegenüber der Kontrolle zu erkennen (Abbildung 3-4), wobei bei p-Chk1 (Ser345), p-H2AX (Ser139) und p-p53 (Ser15) die Induktion in Form von subnukleären Foki zu erkennen ist.



**Abbildung 3-3: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14), p-Chk1 (Ser345) und p-Chk2 (Thr68).**

Abgebildet sind HepG2-Zellen nach Behandlung mit DMSO 1 % und Etoposid (ETO) 2 μM. Für jedes gefärbte Protein ist die Nukleusfärbung mit Hoechst 33342 (blau) und die Immunofluoreszenzfärbung mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (grün) dargestellt. Die Bilder wurden mit dem ArrayScan® V<sup>TI</sup> unter Verwendung eines 20x Objektivs generiert.



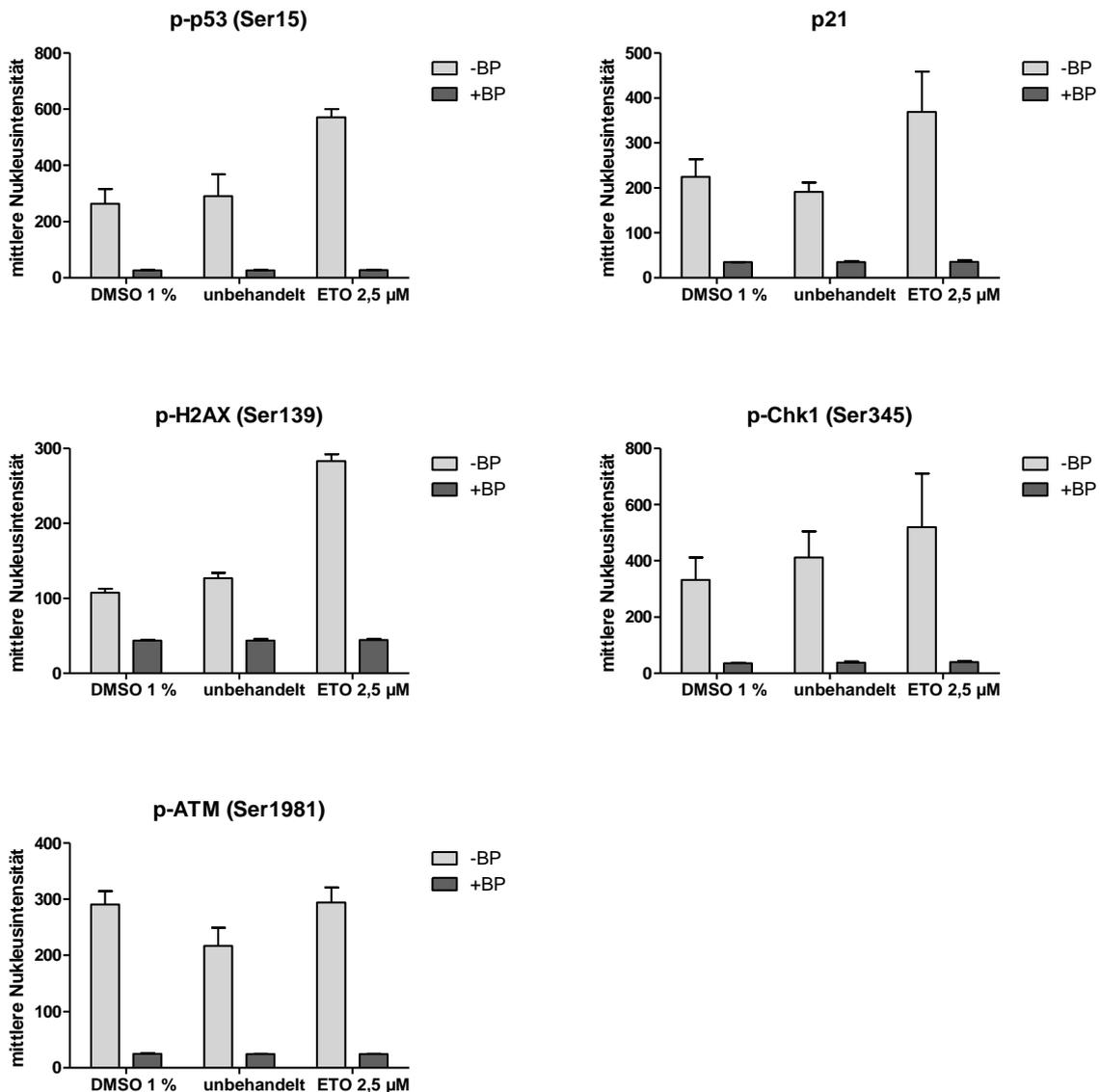
**Abbildung 3-4: Immunfluoreszenzfärbung der Proteine GADD45A, p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15).**

Abgebildet sind HepG2-Zellen nach Behandlung mit DMSO 1 % und Etoposid (ETO) 2 μM. Für jedes gefärbte Protein ist die Nukleusfärbung mit Hoechst 33342 (blau) und die Immunfluoreszenzfärbung mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (grün) dargestellt. Die Bilder wurden mit dem ArrayScan® V<sup>TI</sup> unter Verwendung eines 20x Objektivs generiert.

### 3.2.2 Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker

#### 3.2.2.1 Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker

Zum Nachweis der Spezifität der verwendeten Primärantikörper wurden Blockpeptide verwendet, welche die Immunogensequenzen der jeweiligen Primärantikörper enthalten (Abbildung 3-5).



**Abbildung 3-5: Ergebnisse der Testung der Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Testung der ECVAM-Substanzen.**

Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der Antikörper gegen p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) nach Immunofluoreszenzfärbung ohne (hellgrau) und mit (dunkelgrau) Zugabe des zugehörigen Blockpeptids (-/+BP). Die Mittelwerte der absoluten Fluoreszenzintensitäten und die zugehörigen Standardabweichungen ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Etoposid (ETO).

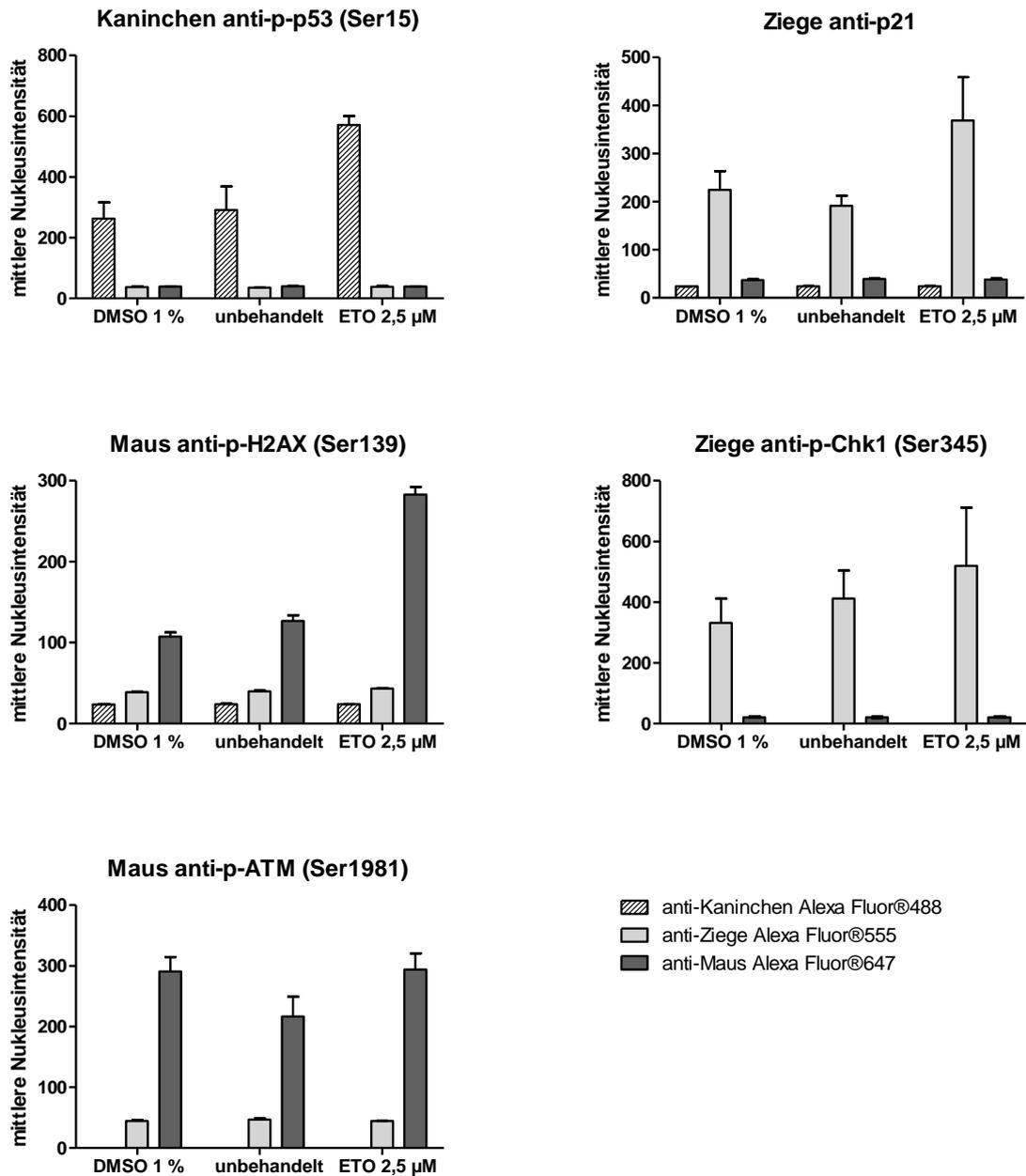
Jeder der getesteten Antikörper erzielte nach Zugabe des Blockpeptids eine gegenüber der Testung ohne Blockpeptid verminderte Fluoreszenzintensität (unterhalb von 50). Die ermittelten Intensitäten lagen im Bereich der Intensitäten, welche ausschließlich nach Zugabe des Sekundärantikörpers detektiert wurden. Der getestete Primärantikörper konnte demnach durch das Blockpeptid wirksam blockiert werden (Abbildung 3-5). Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang 8.5 aufgeführt.

### **3.2.2.2 Testung auf Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker**

Um unerwünschte Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern bei der Testung der ECVAM-Substanzen auszuschließen wurden diese experimentell untersucht (Abbildung 3-6).

Keiner der verwendeten Sekundärantikörper hat mit einem Primärantikörper aus einer anderen Spezies kreuzreagiert. Demnach konnten durch dieses Experiment unerwünschte Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind tabellarisch im Anhang 8.6 aufgeführt.

Um die Qualität des Experiments darüber hinaus bei jedem Durchlauf zu überprüfen, wurden Kontrollsubstanzen mitgeführt (Daten nicht gezeigt). Als Positivsubstanz für die beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA wurde Valinomycin in den Konzentrationen 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  verwendet. Um die Qualität und Funktionalität der Immunofluoreszenzfärbung aufzuzeigen, wurden als Negativkontrolle MAN in der Konzentration 1000  $\mu\text{M}$  und als Positivkontrolle MMS in den Konzentrationen 500  $\mu\text{M}$  und 1000  $\mu\text{M}$  und ACT in den Konzentrationen 0,025  $\mu\text{M}$  und 0,05  $\mu\text{M}$  verwendet. Zur Prüfung der Funktionalität des MAS wurde PhIP mit und ohne MAS in den Konzentrationen 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  und 500  $\mu\text{M}$  getestet. Die Funktionalität des MAS galt als geprüft, wenn mit MAS im Gegensatz zu der Testung ohne die stärkere Regulation über dem Schwellenwert bei mindestens einem untersuchten Protein festgestellt werden konnte.



**Abbildung 3-6: Ergebnisse der Testung der Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern bei der Testung der ECVAM-Substanzen.**

Dargestellt sind die absoluten Fluoreszenzintensitäten der fünf Primärantikörper gegen p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) nach Immunofluoreszenzfärbung mit jeweils den Sekundärantikörpern anti-Kaninchen Alexa Fluor® 488 (hellgrau) (nicht in Kombination mit p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981)), anti-Ziege Alexa Fluor® 555 (dunkelgrau) und anti-Maus Alexa Fluor® 647 (schwarz). Die Mittelwerte der absoluten Fluoreszenzintensitäten und die zugehörigen Standardabweichungen ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Etoposid (ETO).

### 3.2.2.3 Genotoxizitätsbestimmung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker

Die ausgewählten Genotoxizitätsmarker p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) wurden zur Untersuchung der Prädiktivität mit den von der

ECVAM empfohlenen Chemikalien zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests getestet (Tabellen 3-9, 3-11 und 3-13). Die Evaluierung der Zytotoxizität wurde durch Bestimmung der selektierten Zellzahl pro validem Feld und Färbung der Zellen mit dem Farbstoff CellTracker Green<sup>TM</sup> 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) vorgenommen (Tabellen 3-8, 3-10, 3-12 und Anhang 8.7, 8.8, 8.9). Konzentrationen mit einem Wert kleiner 50 % gegenüber der Kontrolle bei einem der beiden Zytotoxizitätsparameter wurden von der Bewertung der Genotoxizität ausgeschlossen.

**Tabelle 3-8: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 1 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) der beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Konzentrationen größer oder gleich bzw. kleiner dem EC<sub>50</sub> (Konzentration mit einem halbmaximalen zytotoxischen Effekt) führen zu einer positiv (rot) bzw. negativ (grün) zytotoxischen Klassifizierung. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert ≤ 0,05 sind mit \* versehen. Eine mögliche Limitierung der höchsten Konzentration (Konz) von 1 mM (mM) durch Autofluoreszenz (AF) ist vermerkt. Etoposid wurde über zwei verschiedene Konzentrationsbereiche beginnend mit 1000 µM (ETO<sub>1000</sub>) und 5 µM (ETO<sub>5</sub>) getestet.

Substanz	höchste Konz [mM]	Limit	SSC				CMFDA	
			höchste Konz		Konz ≥ EC <sub>50</sub> [µM] (XF [%])			
			< EC <sub>50</sub> [µM]		- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
CPA	1	mM	1000	62,5	-	-	-	125 (9,67*)
ENU	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
MMS	1	mM	250	250	500 (49,4*)	1000 (28,5*)	1000 (36,2*)	500 (47,0*)
BaP	0,125	AF	3,91	125	7,81 (33,2*)	-	-	-
DMBA	1	mM	125	500	250 (45,8*)	1000 (49,1*)	500 (12,2*)	-
DMN	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
AAF	1	mM	500	1000	1000 (49,7*)	-	-	-
DAT	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
IQ	1	mM	1000	125	-	250 (36,1*)	-	250 (35,7*)
PhIP	1	mM	500	1000	1000 (32,7*)	-	1000 (7,72*)	-
AFB1	1	mM	31,25	500	62,5 (48,4*)	1000 (39,8*)	1000 (9,30*)	1000 (43,9*)
CdCl <sub>2</sub>	1	mM	31,25	62,5	62,5 (25,4*)	250 (48,3*)	125 (16,0*)	125 (45,3*)
CP	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
CA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
ETO <sub>1000</sub>	1	mM	-	1000	3,91 (47,7*)	-	-	-
ETO <sub>5</sub>	0,005	mM	2,5	5	5 (47,1*)	-	-	-
HQ	1	mM	250	1000	500 (27,9*)	-	500 (16,8*)	-
AZT	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
SA	1	mM	7,81	125	15,63(47,3*)	250 (14,4*)	125 (28,5*)	250 (36,1*)
T	1	mM	1000	500	-	1000 (45,8*)	-	-
CAP	1	mM	1000	1000	-	-	-	-

AAF: 2-Acetylaminofluoren; AFB1: Aflatoxin B<sub>1</sub>; AZT: Azidothymidin; BaP: Benzo[a]pyren; CA: *p*-Chloranilin; CAP: Chloramphenicol; CdCl<sub>2</sub>: Cadmiumchlorid; CP: Cisplatin; CPA: Cyclophosphamid; DAT: 2,4-Diaminotoluol; DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen; DMN: Dimethylnitrosamin; ENU: Ethylnitrosourea; ETO: Etoposid; HQ: Hydroquinon; IQ: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MMS: Methylmethansulfonat; PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin; SA: Natriumarsenit; T: Taxol.

**Tabelle 3-9: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 1 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Für p-H2AX (Ser139) und p-Chk1 (Ser345) wurde 2,1, für p-p53 (Ser15) 1,9 und für p21 und p-ATM (Ser1981) wurde 1,8 als Schwellenwert festgelegt. Die Konzentration mit maximaler Regulation ( $c(E_{max})$ ) ist aufgezeigt. Substanzen mit Regulation oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei Konzentrationen ohne ein zytotoxisches Ereignis (geringste beobachtete effektive Konzentration, LOEC) werden positiv genotoxisch klassifiziert (rot). Substanzen mit Regulationen kleiner dem definierten Schwellenwert führen zu einer negativen Klassifizierung (grün) ebenso wie Substanzen mit Regulationen oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei zytotoxischen Konzentrationen (orange). Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen. Etoposid wurde über zwei verschiedene Konzentrationsbereiche beginnend mit 1000  $\mu\text{M}$  (ETO<sub>1000</sub>) und 5  $\mu\text{M}$  (ETO<sub>5</sub>) getestet.

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu\text{M}$ ] (XF)/ $c(E_{max})$ [ $\mu\text{M}$ ] (XF)									
CPA	-	-	-	-	-	62,5 (2,16*)/ 62,5 (2,16*)	-	-	-	-
ENU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS	250 (2,34*)/ 1000 (5,37*)	-/ 1000 (4,62*)	-	-	250 (2,70*)/ 1000(26,7*)	250 (2,16)/ 1000 (9,74*)	-/ 1000 (3,75*)	-	250 (1,88*)/ 1000 (6,09*)	-/ 1000 (2,65*)
BaP	3,91 (2,17*)/ 62,5 (2,67*)	125 (1,93*)/ 125 (1,93*)	3,91 (4,06*)/ 3,91 (4,06*)	-	3,91 (3,51*)/ 31,25 (6,09*)	125 (2,14*)/ 125 (2,14*)	-	-	3,91 (1,91*)/ 31,25 (3,77*)	-
DMBA	-/ 250 (2,10*)	125 (1,95*)/ 250 (2,08*)	-	-	-	-/ 1000 (2,48*)	-	-	-	250 (1,82*)/ 1000 (2,04*)
DMN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AAF	-	-	500 (1,87*)/ 500 (1,87*)	-	-	-	500 (2,25*)/ 500 (2,25*)	-	250 (3,60*)/ 1000 (3,70*)	-
DAT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IQ	-	-	-	-/ 500 (2,72*)	-	-/ 250 (2,63*)	-	-/ 500 (2,26*)	500 (1,93*)/ 1000(2,33*)	-
PhIP	-	31,25 (1,94)/ 1000 (2,87*)	-	-	-	31,25(3,38*)/ 125 (8,13*)	-	-	-	31,25(2,40*)/ 500 (2,66*)
AFB1	31,25(1,92*)/ 250 (2,29*)	250 (2,13*)/ 500 (2,81*)	15,63(1,83*)/ 31,25 (1,94*)	-	7,81 (2,29*)/ 500 (14,55*)	15,63(2,66*)/ 500 (12,16*)	-	-	31,25(2,33*)/ 500 (4,92*)	-/ 1000 (1,87*)
CdCl <sub>2</sub>	-	-	-/ 125 (3,25*)	-	-/ 500 (4,37*)	-/ 500 (2,89)	-/ 125 (3,24*)	-	-/ 62,5 (3,35*)	-

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu$ M] (XF)/ c(Emax) [ $\mu$ M] (XF)									
CP	31,25(2,22*)/ 62,5 (3,08*)	-	125 (2,56*)/ 125 (2,56*)	-	62,5 (4,05*)/ 500 (5,85*)	125 (2,24)/ 125 (2,24)	-	-	125 (1,96*)/ 500 (3,24*)	-
CA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000 (1,81*)/ 1000 (1,81*)
ETO <sub>1000</sub>	-/ 15,63 (3,40*)	125 (2,06*)/ 1000 (2,52)	-/ 500 (3,30*)	125 (1,82*)/ 500 (1,91*)	-/ 1000 (6,72*)	125 (2,44*)/ 1000 (3,94*)	-	-	-/ 500 (3,88*)	-
ETO <sub>5</sub>	0,31 (1,92*)/ 5 (3,29*)	-	0,63(1,81*)/ 5 (2,60*)	-	0,63 (2,60*)/ 5 (5,43*)	-	0,63 (2,15*)/ 0,63 (2,15*)	-	-	-
HQ	-	-	-	-	250 (3,01*)/ 500 (3,45)	-	-/ 1000 (2,45*)	-	-/ 500 (3,70*)	-
AZT	1000 (2,30*)/ 1000 (2,30*)	-	-	-	500 (2,32*)/ 1000 (3,28*)	-	-	-	-	-
SA	-/ 500 (4,36*)	-	-/ 1000 (2,88*)	-/ 1000 (1,97*)	-/ 1000 (23,2*)	125 (3,28*)/ 1000 (8,47*)	-/ 500 (3,31*)	-/ 500 (2,99*)	-/ 500 (6,17*)	125 (2,63*)/ 250 (2,73*)
T	-	-	1000 (5,41*)/ 1000 (5,41*)	500 (5,51)/ 500 (5,51)	500 (2,27)/ 1000 (6,22*)	500 (4,21*)/ 500 (4,21*)	1000 (3,59)/ 1000 (3,59)	-/ 1000 (2,45*)	62,5 (1,89*)/ 1000 (2,52*)	-
CAP	-	-	-	-	-	-	-	-	1000 (2,06*)/ 1000 (2,06*)	-

AAF: 2-Acetylaminofluoren; AFB1: Aflatoxin B<sub>1</sub>; AZT: Azidothymidin; BaP: Benzo[a]pyren; CA: *p*-Chloranilin; CAP: Chloramphenicol; CdCl<sub>2</sub>: Cadmiumchlorid; CP: Cisplatin; CPA: Cyclophosphamid; DAT: 2,4-Diaminotoluol; DMBA: 7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen; DMN: Dimethylnitrosamin; ENU: Ethylnitrosourea; ETO: Etoposid; HQ: Hydroquinon; IQ: 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MMS: Methylmethansulfonat; PhIP: 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin; SA: Natriumarsenit; T: Taxol.

Die Testung der 20 Gruppe 1 ECVAM-Substanzen führte zu 16 korrekt als Genotoxin klassifizierten Substanzen, was in einer Spezifität von 80 % resultierte (Tabelle 3-9). Aus der Gruppe der O6- und N7-Alkylantien konnten Cyclophosphamid (CPA) und Methylmethansulfonat (MMS) im Gegensatz zu Ethylnitrosourea (ENU) korrekt positiv klassifiziert werden. Für Dimethylnitrosamin (DMN) und 2,4-Diaminotoluol (DAT), Vertreter der Nitrosamine und aromatischen Amine, konnten keine Regulationen oberhalb der Schwellenwerte detektiert werden. Darüber hinaus ist es nicht möglich gewesen Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) positiv genotoxisch zu klassifizierten. Zwar zeigte CdCl<sub>2</sub> bei p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) Regulationen oberhalb des Schwellenwertes, jedoch wurden für diese Konzentrationen zytotoxische Befunde kleiner 50 %

gegenüber der Kontrolle bei einem der beiden Zytotoxizitätsparameter festgestellt, sodass es nicht möglich gewesen ist eine Aussage über die Genotoxizität der Substanz zu treffen. Aufgrund einer stark zytotoxischen Wirkung von Etoposid (ETO), wurde diese Substanz über zwei verschiedene Konzentrationsbereiche beginnend mit 1000  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  getestet, um eine adäquate Aussage über die Genotoxizität der Substanz treffen zu können.

**Tabelle 3-10: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 2 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) der beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Konzentrationen größer oder gleich bzw. kleiner dem  $\text{EC}_{50}$  (Konzentration mit einem halbmaximalen zytotoxischen Effekt) führen zu einer positiv (rot) bzw. negativ (grün) zytotoxischen Klassifizierung. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen. Eine mögliche Limitierung der höchsten Konzentration (Konz) von 1 mM (mM) durch Autofluoreszenz (AF) ist vermerkt.

Substanz	höchste Konz [mM]	Limit	höchste Konz < $\text{EC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]		SSC		CMFDA	
			- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
					Konz $\geq \text{EC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ] (XF [%])			
APT	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
MAN	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
PHC	1	mM	500	1000	1000 (44,3*)	-	-	-
BC	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
TAC	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
CH	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DCHT	1	mM	500	500	1000 (36,8*)	-	-	1000 (47,7*)
TET	1	mM	500	1000	1000 (47,9*)	-	-	-
EPS	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
EYS	1	mM	31,25	125	62,5 (47,5*)	250 (34,4*)	125 (42,0*)	250 (48,9*)
FM	1	mM	500	1000	1000 (49,6*)	-	-	-
PA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DL	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DEP	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
AT	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
TBA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
MEL	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
METC	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
PRO	1	mM	62,5	250	250 (22,7*)	1000 (27,4*)	125 (44,9*)	500 (49,8*)
PYR	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
TEP	1	mM	7,81	1000	1000 (48,6*)	-	15,63(41,6*)	-
HCE	1	mM	1000	1000	-	-	-	-

APT: Ampicillintrihydrat; AT: Amitrol; BC: *n*-Butylchlorid; CH: Cyclohexanon; DA: Diethanolamin; DCHT: N,N-Dicyclohexylthiourea; DEP: Diethylhexylphthalat; DL: D-Limonen; EPS: Ephedrinsulfat; EYS: Erythromycinstearat; FM: Fluometuron; HCE: Hexachloroethan; MAN: D-Mannitol; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MEL: Melamin; METC: Methylcarbamat; PA: Phenanthracen; PHC: Phenforminhydrochlorid; PRO: Progesteron; PYR: Pyridin; TAC: (2-Chloroethyl)-trimethylammoniumchlorid; TBA: *tert*-Butylalkohol; TEP: Tris(2-ethylhexyl)phosphat; TET: Trinatriumhydrogenethylen-diamintetraacetat.

**Tabelle 3-11: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 2 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Für p-H2AX (Ser139) und p-Chk1 (Ser345) wurde 2,1, für p-p53 (Ser15) 1,9 und für p21 und p-ATM (Ser1981) wurde 1,8 als Schwellenwert festgelegt. Die Konzentration mit maximaler Regulation ( $c(E_{max})$ ) ist aufgezeigt. Substanzen mit Regulation oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei Konzentrationen ohne ein zytotoxisches Ereignis (geringste beobachtete effektive Konzentration, LOEC) werden positiv genotoxisch klassifiziert (rot). Substanzen mit Regulationen kleiner dem definierten Schwellenwert führen zu einer negativen Klassifizierung (grün) ebenso wie Substanzen mit Regulationen oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei zytotoxischen Konzentrationen (orange). Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen.

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu\text{M}$ ] (XF)/ $c(E_{max})$ [ $\mu\text{M}$ ] (XF)									
APT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MAN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PHC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-/ 1000 (2,12*)
BC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCHT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TET	-	-	-	-	-/ 1000 (2,63*)	-	-	-	-	-
EPS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EYS	-	-	-	-	-	-/ 250 (2,29*)	-	-	-/ 62,5 (2,28*)	-
FM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PA	-	-	-	-	-	-	-	-	1000 (1,88)/ 1000 (1,88)	-
DL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DEP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu$ M] (XF)/ c(E <sub>max</sub> ) [ $\mu$ M] (XF)									
METC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRO	-	-	-	-	-/ 250 (2,56*)	-	-/ 250 (2,51*)	-	62,5 (2,69)/ 250 (5,24*)	-
PYR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TEP	-	-	-	-	-	-	-	-	-/ 1000 (2,20*)	-
HCE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

APT: Ampicillinhydrat; AT: Amitrol; BC: *n*-Butylchlorid; CH: Cyclohexanon; DA: Diethanolamin; DCHT: N,N-Dicyclohexylthiourea; DEP: Diethylhexylphthalat; DL: D-Limonen; EPS: Ephedrinsulfat; EYS: Erythromycinstearat; FM: Fluometuron; HCE: Hexachloroethan; MAN: D-Mannitol; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MEL: Melamin; METC: Methylcarbammat; PA: Phenanthracen; PHC: Phenforminhydrochlorid; PRO: Progesteron; PYR: Pyridin; TAC: (2-Chloroethyl)-trimethylammoniumchlorid; TBA: *tert*-Butylalkohol; TEP: Tris(2-ethylhexyl)phosphat; TET: Trinatriumhydrogenethylen-diamintetraacetat.

Die Testung der Gruppe 2 ECVAM-Substanzen (nicht DNA-reaktive Chemikalien) ergab zwei falsch positiv klassifizierte Substanzen (Tabelle 3-11). Sowohl Phenanthracen (PA) als auch Progesteron (PRO) wurde aufgrund der Hochregulation von p-ATM (Ser1981) falsch positiv klassifiziert. Im Falle von PA wurde für die höchste Konzentration von 1000  $\mu$ M (ohne MAS) eine 1,88-fache Veränderung über der Kontrolle detektiert, für welche im Student's T-Test ein p-Wert größer als 0,05 ermittelt wurde. PRO hingegen zeigte mit einer 2,69-fachen Veränderung bei einer Konzentration von 62,5  $\mu$ M (ohne MAS) eine Induktion, welche stark oberhalb des definierten Schwellenwertes von 1,8 lag. Jedoch konnte auch für diesen Wert im Student's T-Test kein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 ermittelt werden und somit keine statistisch signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle vermerkt werden. Des Weiteren ist anzuzeigen, dass die Konzentration von 62,5  $\mu$ M die höchste getestete Konzentration von PRO gewesen ist, welche eine Zytotoxizität kleiner 50 % aufwies. Eine Reihe weitere Substanzen wie Phenforminhydrochlorid (PHC), Trinatriumhydrogenethylen-diamintetraacetat (TET), Erythromycinstearat (EYS) und Tris(2-ethylhexyl)phosphat (TEP) zeigte ebenso Regulationen oberhalb der definierten Schwellenwerte. Allerdings lagen die Konzentrationen im zytotoxischen Bereich, sodass keine positive Klassifizierung der Substanzen vorgenommen werden konnte. Da 21 der 23 ECVAM-Substanzen aus Gruppe 2 korrekt negativ genotoxisch klassifiziert werden konnten, wurde folglich eine Sensitivität von 91,3 % kalkuliert.

**Tabelle 3-12: Zytotoxizitätsbestimmung der Gruppe 3 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) der beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Konzentrationen größer oder gleich bzw. kleiner dem EC<sub>50</sub> (Konzentration mit einem halbmaximalen zytotoxischen Effekt) führen zu einer positiv (rot) bzw. negativ (grün) zytotoxischen Klassifizierung. Werte mit einem Student's T-Test p-Wert ≤ 0,05 sind mit \* versehen. Eine mögliche Limitierung der höchsten Konzentration (Konz) von 1 mM (mM) durch Autofluoreszenz (AF) ist vermerkt.

Substanz	höchste Konz [mM] Limit		höchste Konz		Konz ≥ EC <sub>50</sub> [µM] (XF [%])			
			- MAS	+ MAS	SSC		CMFDA	
			- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
MEN	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
PAH	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
TBHQ	1	mM	125	1000	250 (34,3*)	-	250 (29,1*)	-
AA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DB	1	mM	1000	500	-	-	-	1000 (48,9*)
EH	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
SO	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
ETAM	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
CU	0,125	AF	31,25	125	62,5 (2,25*)	-	62,5 (24,9*)	-
BA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
U	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
SSA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
PG	1	mM	500	1000	1000 (23,0*)	-	-	-
NPH	1	mM	500	1000	1000 (27,3*)	-	1000 (31,6*)	-
SXS	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
ETAC	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
EUG	1	mM	1000	125	-	250 (27,4*)	-	250 (43,9*)
IBA	1	mM	1000	1000	-	-	-	-
DP	1	mM	250	500	500 (48,9*)	1000 (20,7*)	-	-

AA: Anthranilsäure; BA: Benzylalkohol; CU: Curcumin; DB: 1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin); DP: 2,4-Dichlorphenol; EH: 2-Ethyl-1,3-hexandiol; ETAC: Ethylacrylat; ETAM: Ethionamid; EUG: Eugenol; IBA: Isobutyraldehyd; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MEN: D,L-Menthol; NPH: *p*-Nitrophenol; PAH: Phthalsäureanhydrid; PG: Propylgallat; SO: Sulfisoxazol; SSA: Natriumsaccharin; SXS: Natriumxylolsulfonat; TBHQ: *tert*-Butylhydroquinon; U: Urea.

**Tabelle 3-13: Genotoxizitätsbestimmung der Gruppe 3 ECVAM-Substanzen.**

Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Für p-H2AX (Ser139) und p-Chk1 (Ser345) wurde 2,1, für p-p53 (Ser15) 1,9 und für p21 und p-ATM (Ser1981) wurde 1,8 als Schwellenwert festgelegt. Die Konzentration mit maximaler Regulation ( $c(E_{max})$ ) ist aufgezeigt. Substanzen mit Regulation oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei Konzentrationen ohne ein zytotoxisches Ereignis (geringste beobachtete effektive Konzentration, LOEC) werden positiv genotoxisch klassifiziert (rot). Substanzen mit Regulationen kleiner dem definierten Schwellenwert führen zu einer negativen Klassifizierung (grün) ebenso wie Substanzen mit Regulationen oberhalb oder gleich dem Schwellenwert bei zytotoxischen Konzentrationen (orange). Werte mit einem Student's T-Test p-Wert  $\leq 0,05$  sind mit \* versehen.

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu$ M] (XF)/ $c(E_{max})$ [ $\mu$ M] (XF)									
MEN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PAH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TBHQ	-	-	-	-	-/ 250 (6,47)	-	-	-	-/ 250 (2,46)	-
AA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DB	-	-	-	-	-	-/ 1000 (5,79*)	-	-	-	-
EH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETAM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CU	-/ 62,5 (1,97*)	-	-/ 62,5 (2,67*)	-	-/ 62,5 (4,30*)	-	-/ 62,5 (3,39*)	-	-/ 62,5 (4,80*)	-
BA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG	31,25(2,02*)/ 250 (2,21*)	-	-	-	15,63(3,43*)/ 125 (8,92*)	-	-/ 1000 (2,93*)	-	500 (2,09*)/ 1000 (4,02*)	-
NPH	-	-	-	-	-	-	500 (2,28)/ 1000 (2,71*)	-	250 (2,23*)/ 1000 (2,79*)	-
SXS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ETAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Substanz	p-p53 (Ser15)		p21		p-H2AX (Ser139)		p-Chk1 (Ser345)		p-ATM (Ser1981)	
	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS	- MAS	+ MAS
	LOEC [ $\mu$ M] (XF)/ c(Emax) [ $\mu$ M] (XF)									
EUG	-	-	-	-	-	125 (2,92*)/ 500 (6,28*)	-	-	-	-
IBA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DP	-	-/ 1000 (2,01*)	-	-	-/ 1000 (3,09*)	-	-/ 1000 (4,53*)	-	250 (2,18*)/ 1000 (5,55*)	-/ 1000 (1,90*)

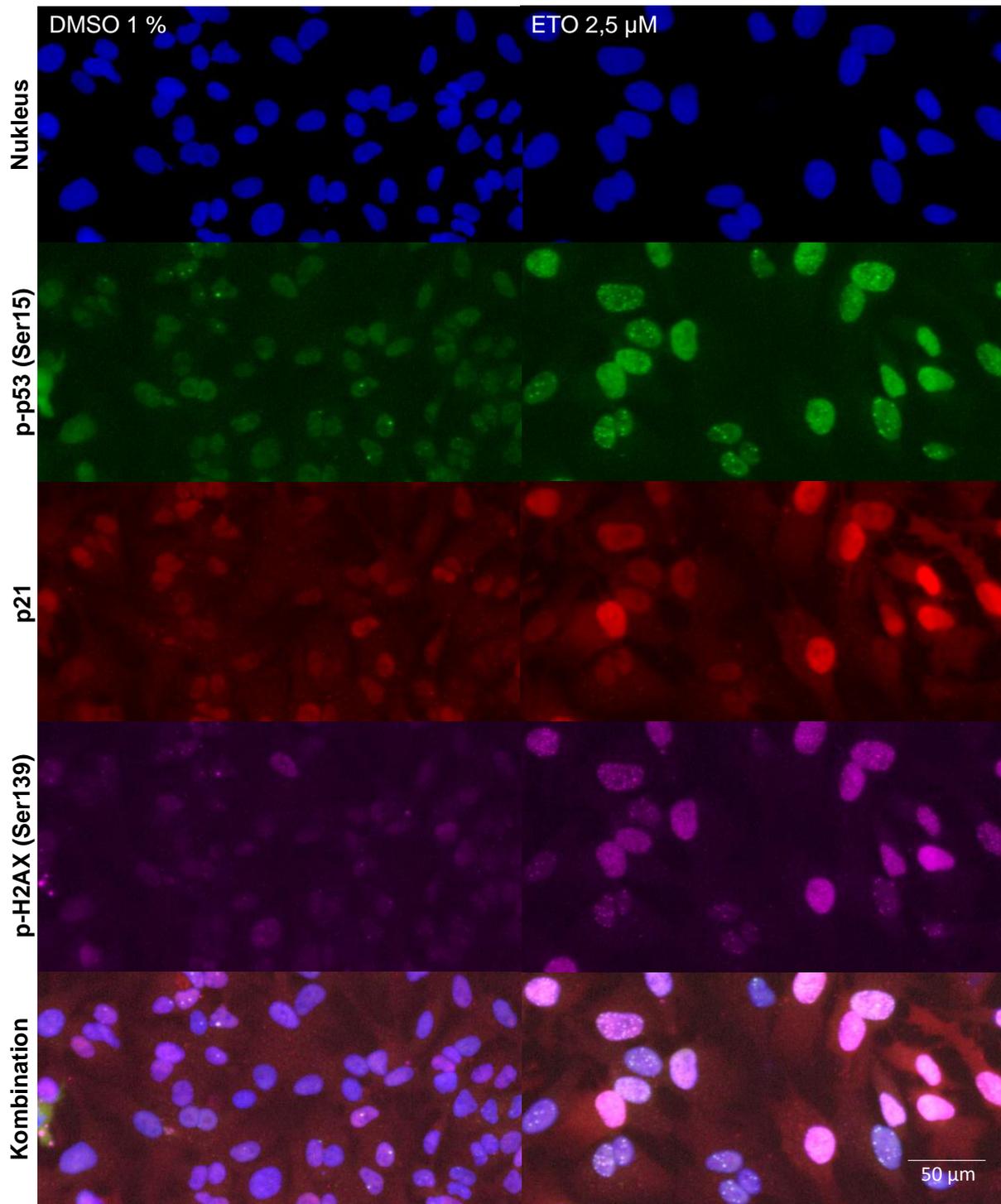
AA: Anthranilsäure; BA: Benzylalkohol; CU: Curcumin; DB: 1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin); DP: 2,4-Dichlorophenol; EH: 2-Ethyl-1,3-hexandiol; ETAC: Ethylacrylat; ETAM: Ethionamid; EUG: Eugenol; IBA: Isobutyraldehyd; MAS: metabolisches Aktivierungssystem; MEN: D,L-Menthol; NPH: *p*-Nitrophenol; PAH: Phthalsäureanhydrid; PG: Propylgallat; SO: Sulfoxazol; SSA: Natriumsaccharin; SXS: Natriumxyloisulfonat; TBHQ: *tert*-Butylhydroquinon; U: Urea.

Aus der Gruppe 3 der ECVAM-Substanzen wurden vier Substanzen falsch positiv klassifiziert (Tabelle 3-13). Jede dieser falsch positiven Substanzen gehört der Subgruppe der Substanzen an deren Prädiktion der *in vitro* Genotoxizitätsergebnisse eingeschränkt ist. Im Falle von Propylgallat (PG) konnte bei allen untersuchten Proteinen außer p21 und p-Chk1 (Ser345) für die Testung ohne MAS ein positives Ergebnis detektiert werden. *P*-Nitrophenol (NPH) hingegen zeigte für p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) ebenfalls bei der Testung ohne MAS positive Resultate. Die beiden Substanzen Eugenol (EUG) und 2,4-Dichlorophenol (DP) zeigten bei lediglich einem untersuchten Protein ein positives Ergebnis. Im Falle von EUG zeigte p-H2AX (Ser139) mit einer Änderung von 2,92 (Student's T-Test p-Wert kleiner oder gleich 0,05) bei einer Konzentration von 125  $\mu$ M (mit MAS) eine positive Antwort, wobei zu vermerken ist, dass 125  $\mu$ M die höchste getestete Konzentration von EUG gewesen ist, welche eine Zytotoxizität kleiner 50 % aufwies. DP wurde hingegen aufgrund einer 2,18-fachen Regulation (Student's T-Test p-Wert kleiner oder gleich 0,05) von p-ATM (Ser1981) bei einer Konzentration von 250  $\mu$ M (ohne MAS) positiv klassifiziert. Diese Konzentration ist die höchste gewesen, für welche kein zytotoxisches Ereignis kleiner als 50 % ermittelt werden konnte. Auch weitere Substanzen wie *tert*-Butylhydroquinon (TBHQ), 1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin) (DB) und Curcumin (CU), die nicht der Gruppe der Substanzen angehören deren Prädiktion der *in vitro* Genotoxizitätsergebnisse eingeschränkt ist, zeigten ebenso Regulationen oberhalb der definierten Schwellenwerte. Allerdings lagen die Konzentrationen im zytotoxischen Bereich, sodass keine positive Klassifizierung der Substanzen vorgenommen werden konnte. Die Ermittlung der Sensitivität anhand der Ergebnisse der Gruppe 3 der ECVAM-Substanzen ergab bei einer korrekt negativen Klassifizierung von 15

der insgesamt 19 geprüften Substanzen einen Wert von 78,9 %.

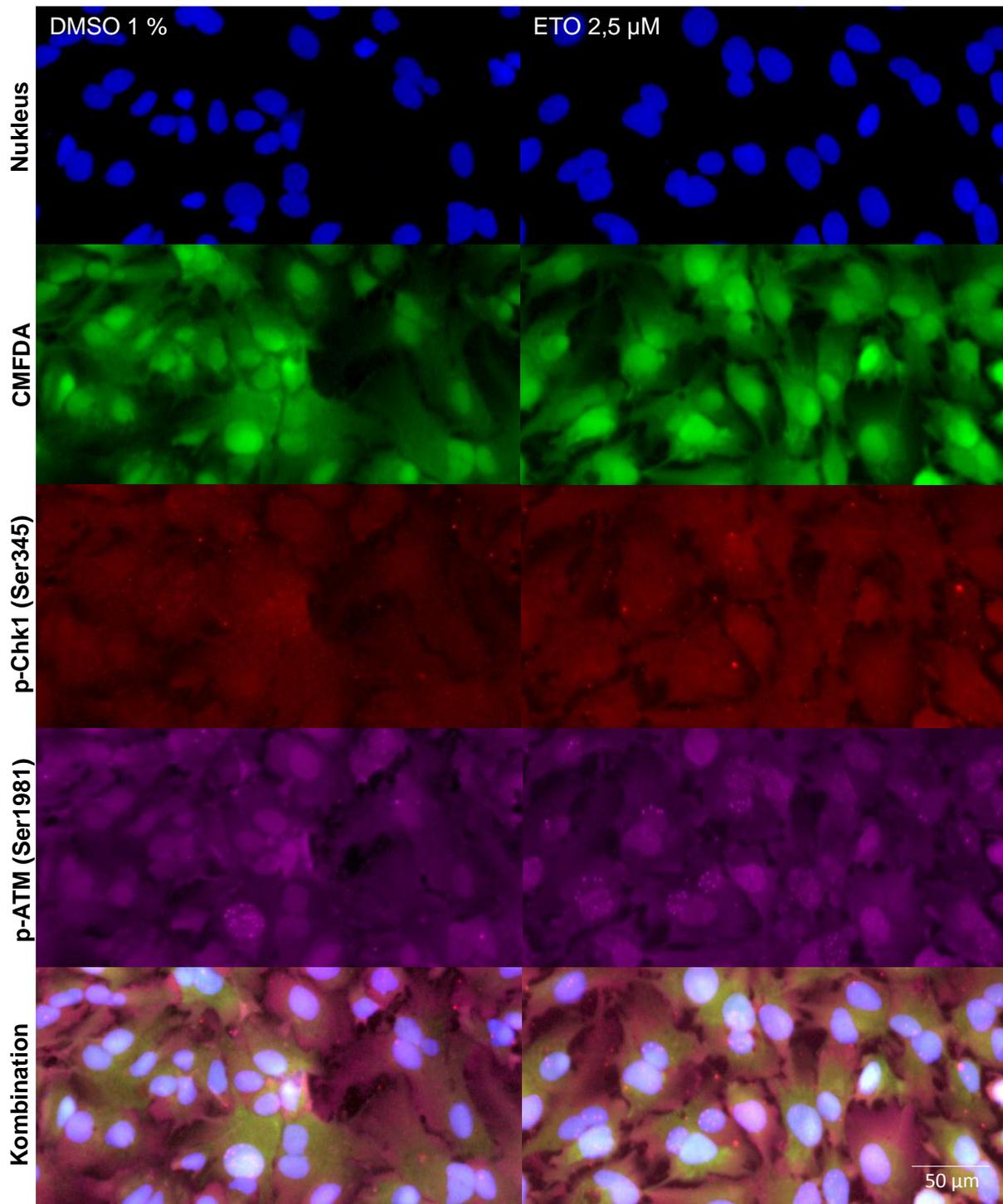
Zusammenfassend konnte durch Testung der ECVAM-Substanzen Gruppe 2 und 3 (Tabelle 3-11 und 3-13) eine Spezifität von 86 % ermittelt werden, wobei die Testung der Gruppe 1 (Tabelle 3-9) eine Sensitivität von 80 % ergab. Für das vorliegende Testsystem konnte aufgrund der korrekten Klassifizierung von 52 der insgesamt 62 getesteten Substanzen eine Prädiktivität von 84 % kalkuliert werden.

Zur Visualisierung der gemessenen Ergebnisse sind in Abbildung 3-7 und 3-8 Aufnahmen der durchgeführten Immunofluoreszenzfärbungen an HepG2-Zellen, welche mit der genotoxischen Substanz ETO 2,5  $\mu$ M und der Kontrolle (1 % DMSO) behandelt wurden, dargestellt. Für p-p53 (Ser15), p21 und p-H2AX (Ser139) konnte nach Behandlung mit 2,5  $\mu$ M ETO eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Expression detektiert werden (Abbildung 3-7), was mit den ermittelten x-fachen Veränderungen gegenüber der Kontrolle übereinstimmt. Für p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) konnten hingegen keine Induktionen oberhalb der definierten Schwellenwerte von 2,1 bzw. 1,8 festgestellt werden, was in Abbildung 3-8 visualisiert wird. Allerdings sind bei p-ATM (Ser1981) in der Kontrolle und vermehrt nach Behandlung mit dem Genotoxin ETO subnukleäre Foki zu erkennen, was auf eine Induktion von 1,61 gegenüber der Kontrolle zurückzuführen ist (Abbildung 3-8). Ebenfalls sind bei p-p53 (Ser15) und p-H2AX (Ser139) nach Behandlung mit dem direkten Genotoxin ETO subnukleäre Foki zu erkennen (Abbildung 3-7). Bei der Färbung mit CMFDA konnte keine verminderte Intensität im Zytoplasma nach Behandlung mit ETO in der Konzentration von 2,5  $\mu$ M gegenüber der Kontrolle aufgezeigt werden (Abbildung 3-8), was sich auch in den Ergebnissen der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle widerspiegelt.



**Abbildung 3-7: Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-p53 (Ser15), p21 und p-H2AX (Ser139).**

Abgebildet sind HepG2-Zellen nach Behandlung mit DMSO 1 % und Etoposid (ETO) 2,5  $\mu\text{M}$ . Die Nukleusfärbung mit Hoechst 33342 (blau) und die Immunofluoreszenzfärbung der Proteine p-p53 (Ser15), p21 und p-H2AX (Ser139) mit den Sekundärantikörpern anti-Kaninchen Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 (grün), anti-Ziege Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 (rot) und anti-Maus Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 (violett) ist dargestellt. Die Bilder wurden mit dem ArrayScan<sup>®</sup> V<sup>II</sup> unter Verwendung eines 20x Objektivs generiert.



**Abbildung 3-8: Immunfluoreszenzfärbung der Proteine p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) und Färbung mit CellTracker Green™ 5-Chloromethylfluorescein-diacetat.**

Abgebildet sind HepG2-Zellen nach Behandlung mit DMSO 1 % und Etoposid (ETO) 2,5  $\mu\text{M}$ . Die Nukleusfärbung mit Hoechst 33342 (blau), die Färbung mit CellTracker Green™ 5-Chloromethylfluorescein-diacetat (CMFDA) (grün) und die Immunfluoreszenzfärbung der Proteine p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) mit den Sekundärantikörpern anti-Ziege Alexa Fluor® 555 (rot) und anti-Maus Alexa Fluor® 647 (violett) ist dargestellt. Die Bilder wurden mit dem ArrayScan® V<sup>TI</sup> unter Verwendung eines 20x Objektivs generiert.



## 4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es gewesen, ein multi-parametrisches HCI-basiertes Testsystem zu entwickeln, welches sich durch seinen möglichen hohen Durchsatz für den Einsatz in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung eignet und eine spezifische und sensitive Detektion genotoxischer Substanzen gewährleistet.

Dazu ist es zunächst notwendig gewesen, die fremdstoffmetabolisierende Kompetenz des Zellsystems zu bestimmen, um das Potential der Zelllinie HepG2 progenotoxische Substanzen zu metabolisieren ausfindig zu machen. Darüber hinaus wurde ein Vergleich mit humanen Hepatozyten vorgenommen, da humane Hepatozyten das Zielsystem zu entwickelnder Pharmazeutika darstellen und der Fremdstoffmetabolismus dieser Zellen als Goldstandard angesehen wird.

Schließlich wurde die Sensitivität und Spezifität des Testsystems ermittelt und ein Vergleich mit weiteren Testsystemen der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung vorgenommen.

### 4.1 Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz der Zelllinie HepG2

Die Zelllinie HepG2 entstammt einem männlichen Kaukasier und wurde mit der Absicht humane Hepatozyten in der frühen Phase der toxikologischen Testung zu ersetzen generiert (Hewitt und Hewitt, 2004). Aufgrund der Tatsache, dass HepG2-Zellen unterschiedlicher Herkunft in ihrer Ausstattung mit fremdstoffmetabolisierenden Enzymen variieren können, ist zur vollständigen Interpretation von toxikologischen Befunden die Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz erforderlich (Hewitt und Hewitt, 2004). Cytochrom P450 Enzyme (CYP) dominieren den Metabolismus und die Bioaktivierung kanzerogener Substanzen mit 66 %, wobei an der Bioaktivierung kanzerogener Substanzen durch CYP vorzugsweise CYP 1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2E1 und 3A4 mit 77 % beteiligt sind (Rendic und Guengerich, 2012). Demnach ist zur Detektion progenotoxischer Substanzen, welche nach metabolischer Aktivierung ihre genotoxische Wirkung entfalten, ein Zellkultursystem mit fremdstoffmetabolisierender Fähigkeit notwendig.

Zur Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz der Zelllinie HepG2 wurde sowohl eine Genexpressionsanalyse als auch eine Analyse der Aktivität ausgewählter CYP durchgeführt. Verwendet wurden hierzu die CYP-Induktoren 3-Methylcholanthren (3-MC), Omeprazol (OMEP), Phenobarbital (PB) und Rifampicin (RIF).

Sowohl OMEP als auch 3-MC (als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe) induzieren die Transkription von *CYP1A1* und *CYP1A2* über den durch Liganden zu aktivierenden Transkriptionsfaktor *aryl hydrocarbon receptor* (AHR) (Hukkanen, 2012). Das Heterodimer bestehend aus AHR und *AHR nuclear translocator* (ARNT) bindet an *xenobiotic response elements* (XRE) und aktiviert auf diese Weise die Transkription seiner Zielgene (Hukkanen, 2012). Die Enzyme CYP1A1/2 sind an der Aktivierung wie auch Detoxifizierung von aromatischen und heterozyklischen Aminen in Verbrennungsprodukten wie auch zahlreichen in der Umwelt vorkommenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen beteiligt (Rodriguez-Antona und Ingelman-Sundberg, 2006). Eine Induktion des über Liganden zu aktivierenden Transkriptionsfaktors AHR konnte nach Behandlung mit 3-MC und OMEP nicht ermittelt werden. Hingegen konnte nach Behandlung mit 3-MC eine signifikante 28,5- und 9,53-fache Expression von *CYP1A1* und *CYP1A2* gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Weiterhin wiesen *CYP1A1* und *CYP1A2* für OMEP statistisch signifikante Induktionen bis zu 54,7- bzw. 11,8-fach über der Kontrolle auf. Da eine Analyse der Genexpression nicht zwangsläufig mit der auf Proteinebene übereinstimmen muss, wurde darüber hinaus eine Aktivitätsbestimmung von CYP1A1/2 durchgeführt: Die Induktoren 3-MC und OMEP führten zu einer signifikanten Induktion von bis zu maximal 27,4- bzw. 3,15-fach über der Basalexpression von  $4,17E-03$  pmol/(min x mg).

PB hingegen ist in der Lage unabhängig von AHR eine Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 vermutlich über den nukleären Faktor *constitutive androstane receptor* (CAR) zu vermitteln (Yoshinari et al., 2010). In Anwesenheit eines Liganden transloziert CAR in den Nukleus und bindet als Heterodimer bestehend aus *retinoid X receptor* (RXR) und CAR an das XRE und aktiviert die Transkription seiner Zielgene (Hukkanen, 2012). PB erzielte durch CAR-vermittelt in der vorliegenden Arbeit eine signifikante Induktion von *CYP1A1* und *CYP1A2* von bis zu 3,92- und 4,19-fach gegenüber der Lösemittelkontrolle.

Im Gegenzug dazu stellt RIF einen Agonist des nukleären Faktors *pregnane X receptor* (PXR) dar, welcher die Induktion von CYP1A2 bewirkt (Hukkanen, 2012). Liganden-gebundenes PXR bildet mit einem weiteren nukleären Rezeptor, RXR, ein Heterodimer, welches wiederum an den Promotor einer Vielzahl von Zielgenen bindet und somit deren Genexpression bewirkt (Hukkanen, 2012). Nach Behandlung der HepG2-Zellen mit RIF konnte über PXR-vermittelt lediglich für *CYP1A1* eine signifikante Induktion von maximal 1,75 gegenüber der Kontrolle ermittelt werden; *CYP1A2* wurde bis zu 2,8-fach induziert. Die

durch RIF und PB ermittelten Induktionen sind verglichen mit denjenigen nach Behandlung mit 3-MC und OMEP verhältnismäßig niedriger.

Nicht zu detektieren sind die Genexpressionen von *CYP2B6*, *CYP2C9* und *CYP2C19* gewesen. Eine mögliche Ursache für die fehlende Expression dieser Enzyme könnte in der schwachen bzw. nicht induzierbaren Expression der nukleären Rezeptoren *CAR* und *PXR* liegen, welche die Transkription der untersuchten Gene aktivieren. Von einer fehlenden Genexpression der Phase I-Enzyme *CYP2C9* und *CYP2C19* wurde bereits in einer Studie von Boehme et al. (2010) berichtet (Boehme et al., 2010). Hewitt und Hewitt (2004) konnten bei einer untersuchten Zellcharge keine Aktivitäten der Phase I-Enzyme *CYP2C9* und *CYP2E1* feststellen (Hewitt und Hewitt, 2004). Allerdings konnte in der Arbeit von Boehme et al. (2010) die Genexpression von *CYP2B6* im Gegensatz zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit detektiert werden (Boehme et al., 2010).

Da einige Gene des Fremdstoffmetabolismus (*CYP3A4*, *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19*, *multidrug resistance protein 1 (MDR1)* und *multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)*) in ihren Promotoren sowohl Binderegionen für *CAR* als auch für *PXR* enthalten (Wang et al., 2012), können viele durch PB induzierte Gene auch über RIF aktiviert werden. Von besonderer Relevanz ist *CYP3A4*, welches an der Metabolisierung von etwa 50 % der auf dem Markt befindlichen Medikamente beteiligt ist (Hukkanen, 2012). Für *CYP3A4* konnte bei allen verwendeten Induktoren eine etwa 2- bis 4,7-fach gesteigerte Expression gegenüber der Kontrolle ermittelt werden, wobei die stärkste statistisch signifikante Induktion von 4,73 gegenüber der Kontrolle nach Behandlung mit PB ermittelt werden konnte. Die Basalaktivität von *CYP3A4* lag bei  $2,45E-04$  pmol/(min x mg) und konnte durch Induktion signifikant um 2,40- bis 3,52-fach gesteigert werden, was verglichen mit den Ergebnissen der Genexpressionsanalyse auf demselben Niveau lag. Die *CYP1A*-Induktoren OMEP und 3-MC führten zu einer bis zu 3-fachen Induktion gegenüber der Kontrolle. Von der Fähigkeit von OMEP sowohl *CYP3A4* wie auch *CYP2B6* zu induzieren wurde bereits berichtet (Hewitt et al., 2007b).

Neben den analysierten Phase I-Enzymen wurden ebenso das Phase II-Enzym UDP-Glucuronosyltransferase 1A6 (*UGT1A6*) wie auch Transporter des Fremdstoffmetabolismus untersucht. *UGT1A6* erzielte nach Behandlung mit 3-MC und OMEP eine bis zu 3,15-fach erhöhte signifikante Induktion gegenüber der Kontrolle. Diese Induktion wird durch *AHR* vermittelt (Bock und Bock-Hennig, 2010). Darüber hinaus wurde die Expression der Transporter *MDR1*, *bile salt export pump (BSEP)* und *MRP2* ermittelt. Eine Induktion von

*BSEP* konnte im Gegensatz zu *MDR1* und *MRP2* nicht detektiert werden. Von einer nicht zu detektierenden Expression des Transporters *BSEP* wurde bereits von Boehme et al. (2010) berichtet (Boehme et al., 2010). Die Induktionen von *MDR1* und *MRP2* werden sowohl über CAR als auch über PXR vermittelt (Wang et al., 2012), sodass nach Induktion mit PB, welches sowohl über CAR als auch PXR seine Wirkung entfaltet (Hukkanen, 2012), für *MRP2* eine gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Expression von 1,55 ermittelt werden konnte.

Um ausfindig zu machen inwiefern der Fremdstoffmetabolismus von HepG2-Zellen mit dem von humanen Hepatozyten, dem Zielsystem zu entwickelnder Pharmazeutika, übereinstimmt, wurde darüber hinaus eine Charakterisierung der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz von humanen Hepatozyten vorgenommen (Tabelle 4-1).

**Tabelle 4-1: Vergleich der fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz von HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten.**

Dargestellt ist eine Übersicht der Genexpression fremdstoffmetabolisierender Enzyme und der Aktivität von CYP1A1/2 und CYP3A4 in HepG2-Zellen und humanen Hepatozyten. Eine Hochregulation gegenüber der Kontrolle von  $\leq 1,5$ ,  $\geq 1,5$  und  $\leq 2,0$  bzw.  $\geq 2,0$  ist mit +, ++ bzw. +++ gekennzeichnet. Nicht detektierbare Gene sind mit nd markiert. Die Ergebnisse der fünf untersuchten Donoren werden bei humanen Hepatozyten gegebenenfalls durch einen Bereich angegeben, wobei die Enzymaktivität eines analysierten Donors aufgezeigt ist.

Zellsystem	HepG2-Zellen	humane Hepatozyten
<b>Genexpression</b>		
<i>CYP1A1</i>	+++	+++
<i>CYP1A2</i>	+++	+++
<i>CYP2B6</i>	nd	+++
<i>CYP2C9</i>	nd	++ bis +++
<i>CYP2C19</i>	nd	+ bis ++
<i>CYP3A4</i>	+++	+++
<i>UGT1A6</i>	+++	+
<i>AHR</i>	+	+
<i>PXR (NR1I2)</i>	+	+ bis ++
<i>CAR (NR1I3)</i>	+	+++
<i>MDR1 (ABCB1)</i>	+	++ bis +++
<i>BSEP (ABCB11)</i>	nd	+ bis +++
<i>MRP2 (ABCC2)</i>	++	+ bis ++
<b>Aktivität</b>		
CYP1A1/2	+++	+++
CYP3A4	+++	+++

Nach Behandlung mit 3-MC und OMEP konnte für humane Hepatozyten eine Hochregulation von *CYP1A1* zwischen 16,2- und 103-fach bzw. von *CYP1A2* zwischen 10,3- und 56,8-fach gegenüber der jeweiligen Kontrolle ermittelt werden. Hingegen konnten bei HepG2-Zellen für

*CYP1A1* Induktionen zwischen 8,0- und 54,7-fach bzw. für *CYP1A2* zwischen 4,19- und 11,8-fach gegenüber der Kontrolle gemessen werden. Insgesamt wurde sowohl für *CYP1A1* als auch *CYP1A2* eine bis zu 13-fach höhere Expression in humanen Hepatozyten bezogen auf HepG2-Zellen festgestellt. Auf Proteinebene konnte ebenfalls eine erhöhte Basalaktivität in humanen Hepatozyten ermittelt werden. Humane Hepatozyten wiesen eine gegenüber HepG2-Zellen doppelt so hohe basale Aktivität von CYP1A1/2 auf, wobei nach Induktion mit 3-MC beide untersuchten Zellsysteme eine Aktivität von etwa  $1,10E-01$  pmol/(min x mg) aufzeigten. RIF und PB führten in beiden Zellsystemen zu vergleichbaren Induktionen von *CYP1A1* und *CYP1A2*. Nach Behandlung mit RIF und PB konnten für humane Hepatozyten maximale Induktionen von *CYP3A4* um das 35,3- und 31,0-Fache gegenüber der Kontrolle ermittelt werden, wohingegen HepG2-Zellen Induktionen zwischen 2,66 und 4,73 aufzeigten, woraus sich eine bis zu etwa 13-fach geringere Expression in HepG2-Zellen ableiten lässt. Diese Ergebnisse stimmen mit jenen auf Proteinebene überein. Die *CYP3A4*-Basalaktivität ist in humanen Hepatozyten mit  $1,11E-03$  pmol/(min x mg) um 4,5-fach höher als in HepG2-Zellen. Nach Induktion mit RIF und PB in der hohen Konzentration konnten in HepG2-Zellen Aktivitäten von  $7,18E-04$  pmol/(min x mg) und  $8,37E-04$  pmol/(min x mg) ermittelt werden, welche im Bereich der Basalaktivität von humanen Hepatozyten lagen. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Untersuchung konnten Westerink und Schoonen eine verglichen mit humanen Hepatozyten geringere Basalaktivität der Phase I-Enzyme *CYP1A* und *3A4* in HepG2-Zellen ermitteln (Westerink und Schoonen, 2007). OMEP führte, wie bereits in HepG2-Zellen festgestellt werden konnte, zu einer Induktion von *CYP3A4* und darüber hinaus zu einer *CYP2B6*-Induktion. Von der Fähigkeit mittels OMEP *CYP3A4* wie auch *CYP2B6* zu induzieren wurde bereits berichtet (Hewitt et al., 2007b). Neben *CYP2B6* konnten in humanen Hepatozyten im Gegensatz zu HepG2-Zellen die Phase I-Enzyme *CYP2C9* und *CYP2C19* und der Transporter *BSEP* detektiert und induziert werden. Darüber hinaus konnten in humanen Hepatozyten Induktionen der nukleären Rezeptoren *PXR* und *CAR* und des Transporters *MDR1* ermittelt werden, welche wiederum HepG2-Zellen nicht aufgezeigt haben.

Vergleicht man die Basalexpression der beiden untersuchten Zellsysteme, so lässt sich durchweg eine verminderte Expression der betrachteten Gene in HepG2-Zellen feststellen. Darüber hinaus ist zu vermerken, dass zwischen den einzelnen Donoren humaner Hepatozyten starke Unterschiede in sowohl der basalen Expression als auch der Genexpression nach Induktion zu verzeichnen waren. Diese interindividuellen Unterschiede sind sowohl auf pheno- als auch genotypische Variationen sowie genetische Faktoren, wie vor allem Polymorphismen, und nicht-genetische Faktoren, wie den hormonellen Status, Alter,

Ernährung, Rauchen, Medikamente, Krankheit und die Exposition gegenüber Umweltchemikalien, zurückzuführen (Hewitt et al., 2007a).

Zusammenfassend konnte in Konformität mit den Erkenntnissen von Mersch-Sundermann in HepG2-Zellen ein Phase I- und Phase II-Metabolismus nachgewiesen werden (Mersch-Sundermann et al., 2004). Allerdings konnten für HepG2-Zellen sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene verglichen mit humanen Hepatozyten verminderte Expressionen detektiert werden, wobei eine tendenzielle Korrelation von den Enzymaktivitäten und den Genexpressionen der jeweiligen Zellsysteme zu verzeichnen war. Darüber hinaus wurde bei HepG2-Zellen keine Expression von *CYP2B6*, *CYP2C9*, *CYP2C19* und *BSEP* ermittelt. Dennoch sind HepG2-Zellen im Gegensatz zu häufig in konventionellen *in vitro*-Tests verwendeten metabolisch inkompetenten Zellen grundsätzlich in der Lage xenobiotische Substanzen zu aktivieren und zu detoxifizieren, wodurch diese Zellen dem Fremdstoffmetabolismus im Menschen nahekommen (Mersch-Sundermann et al., 2004). Ferner sind humane Hepatozyten nicht zur Anwendung im zu etablierenden Testsystem geeignet, da diese nicht proliferieren und somit nicht die Detektion von Proteinen der DNA-Schadensantwort, welche im Rahmen des Zellzyklus reguliert werden, ermöglichen. Zur Kompensierung der limitierten fremdstoffmetabolisierenden Kompetenz wurde den HepG2-Zellen ein metabolisches Aktivierungssystem in Form eines  $\beta$ -Naphthoflavon-/ Phenobarbital- bzw. CYP1A-/ CYP2B-induzierten Ratten-S9 zugesetzt, wobei dieses nicht in der Lage ist die gegenüber humanen Hepatozyten verminderte Expression vollständig auszugleichen.

#### **4.2 Etablierung des *in vitro* Testsystems zur toxikologischen Evaluierung genotoxischer Substanzen**

Zur Etablierung des HCI-basierten multiparametrischen Testsystems wurde zunächst die Expression selektierter putativer Markerproteine in HepG2-Zellen nach Behandlung mit genotoxischen Modellsubstanzen (Methylmethansulfonat (MMS), Actinomycin D (ACT), Etoposid (ETO)), progenotoxischen Modellsubstanzen (Cyclophosphamid (CPA), 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen (DMBA), Aflatoxin B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), 2-Acetylaminofluoren (AAF)) und nicht-genotoxischen Substanzen (D-Mannitol (MAN), Phenforminhydrochlorid (PHC), Progesteron (PRO)) untersucht. Daraufhin wurde die Leistungsfähigkeit der prädictivsten putativen Markerproteine durch Testung von Chemikalien, welche von dem *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind, ausfindig gemacht (Kirkland et al.,

2008). Letztlich wurde ein Vergleich mit weiteren etablierten Testsystemen der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung vorgenommen.

#### 4.2.1 Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

Basierend auf einer vorherigen Genomexpressionsprofilierung (Boehme et al., 2011) und einer Literaturrecherche wurden die folgenden neun unterschiedlichen Proteine der DNA-Schadensantwort als putative Marker der Substanz-induzierten Genotoxizität ausgewählt: p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345), p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15), GADD45A und p-Chk2 (Thr68). Die untersuchten Proteine sind an der Schadensantwort einer Vielzahl unterschiedlicher DNA-Schäden und deren Mechanismen (Doppelstrangbrüche, alkylierende Substanzen und Replikationsstress) beteiligt. Die Expression dieser Proteine wurde 48 h nach Behandlung mit (pro-)genotoxischen Substanzen (CPA, DMBA, AFB1, AAF, MMS, ACT, ETO) und nicht-genotoxischen Substanzen (MAN, PHC, PRO) unter Verwendung der HCI-Technologie ermittelt (Tabelle 4-2). Die selektierten Substanzen gehören unterschiedlichen Substanzklassen an und zeichnen sich durch ihre unterschiedliche DNA-schädigende Wirkungsweise aus.

##### **Tabelle 4-2: Übersicht der Auswahl putativer Genotoxizitätsmarker.**

Dargestellt ist die Anzahl der korrekt prädiktierten Substanzen von insgesamt zehn getesteten Substanzen mittels Detektion putativer Markerproteine für Genotoxizität.

<b>Substanzklasse</b>	<b>(pro-)genotoxisch</b>	<b>nicht-genotoxisch</b>
p-ATM (Ser1981)	3	3
p-ATR (Ser428)	2	3
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	2	3
p-Chk1 (Ser345)	5	3
p-Chk2 (Thr68)	1	3
GADD45A	0	3
p-H2AX (Ser139)	5	3
p21	6	3
p-p53 (Ser15)	6	3

Die beste Klassifizierung der untersuchten Modellsubstanzen haben p21 und p-p53 (Ser15) mit jeweils sechs korrekt klassifizierten der insgesamt neun getesteten (pro-)genotoxischen Substanzen erreicht. Die Proteine p-H2AX (Ser139) und p-Chk1 (Ser345) bzw. p-ATM (Ser1981) haben zur korrekten genotoxischen Klassifizierung von je fünf bzw. drei der untersuchten Genotoxine geführt. Positiv zu verzeichnen ist, dass keines der untersuchten Proteine zu einem falsch positiven Ergebnis geführt hat und alle nicht-genotoxischen Substanzen korrekt klassifiziert werden konnten.

Während die prädiktive Eigenschaft von p53 für promutagene und mutagene Substanzen in HepG2-Zellen bereits in einer vorherigen Studie von Boehme et al. aufgezeigt werden konnte (Boehme et al., 2010), wurde auch H2AX in den letzten Jahren vermehrt zur Ermittlung von DNA-Schäden *in vitro* verwendet (Garcia-Canton et al., 2012). Exemplarisch wurden zur Detektion von durch ionisierende Strahlung induzierten Doppelstrangbrüchen Analysen von p-H2AX (Ser139) mittels HCI-Technologie vorgenommen, um den Effekt der Strahlenbelastung (Hou et al., 2009) und von Radiosensitizern nachzuweisen (Fu et al., 2012).

Gegenüber den anderen getesteten Proteinen haben p-ATR (Ser428) und p-CDC2 (Tyr15/Thr14) bzw. p-Chk2 (Thr68) in der vorliegenden Untersuchung bei jeweils lediglich zwei bzw. einer der insgesamt neun getesteten genotoxischen Substanzen zu einem positiven Resultat geführt. Eine Riftalfieber-Virusinfektion humaner Lungenepithelzellen löste nach Angaben von Baer et al. eine DNA-Schadensantwort unter Hochregulation von p-ATM (Ser1981), p-Chk2 (Thr68), p-H2AX (Ser139) und p53 (Ser15) aus, während p-ATR (Ser428) negative Regulation zu verzeichnen hatte (Baer et al. 2012). Für p-ATR (Ser428) konnten in der vorliegenden Untersuchung Negativregulationen bei ausschließlich hochtoxischen Konzentrationen von CPA und PRO nachgewiesen werden, während auch Hochregulationen des analysierten Proteins ermittelt werden konnten.

Obwohl GADD45A bereits bei dem GreenScreen<sup>®</sup> HC und BlueScreen<sup>™</sup> HC in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung eingesetzt wird (Birrell et al. 2010; Luzy et al., 2012; Simpson et al., 2013), hat in der vorliegenden Studie keine der getesteten (pro-) genotoxischen Substanzen zu einem positiven Ereignis geführt. Eine Ursache für diese unterschiedliche Sensitivität von GADD45A könnte in dem beim GreenScreen<sup>®</sup> HC und BlueScreen<sup>™</sup> HC verwendeten TK6-Zellsystem begründet sein, welches sich von dem verwendeten Zellsystem der vorliegenden Arbeit unterscheidet.

Vergleicht man die vorliegenden Ergebnisse mit der Genomexpressionsprofilierung von Boehme et al., so konnte in HepG2-Zellen nach Induktion mit (pro-)mutagenen Substanzen eine transkriptionelle Regulation von p21 ermittelt werden (Boehme et al., 2011). GADD45A, dessen Deregulation auf Proteinebene in der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden konnte, gelang auch nicht im Rahmen der Genexpressionsanalyse von Boehme et al. unter die 91 prädiktivsten Gene, obwohl für dieses eine 1,5-fache Regulation über der Kontrolle detektiert werden konnte (Boehme et al., 2011). Die weiterhin im Zuge der vorliegenden Studie untersuchten Proteine (p-p53 (Ser15), p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Thr14/Tyr15) und p-Chk2 (Thr68)) gelangten

vermutlich aufgrund von Modifikationen, welche posttranslational erfolgen, nicht unter die 91 prädiktivsten Gene für eine (pro-)genotoxische Zellantwort (Boehme et al., 2011). Demgegenüber wiesen p-p53 (Ser15), p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) p-ATM (Ser1981) auf Proteinebene positive Regulationen gegenüber der Kontrollen auf.

Zusammenfassend konnte die beste Klassifizierung unter Verwendung der folgenden fünf der insgesamt neun untersuchten putativen Markerproteine erreicht werden: p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) (Tabelle 4-2). Folglich wurden diese prädiktivsten putativen Markerproteine zur Etablierung eines multi-parametrischen HCI-basierten Testsystems eingesetzt.

#### **4.2.2 Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker**

Die Prädiktivität der fünf ausgewählten Proteine p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) wurde mit Substanzen, welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind (Kirkland et al., 2008), getestet.

##### **4.2.2.1 Klassifizierung der (pro-)genotoxischen Substanzen**

Die Testung der 20 Gruppe 1 ECVAM-Substanzen (*in vivo* Genotoxine, die positiv in *in vitro* Genotoxizitätstests an Säugerzellen detektiert werden sollten) (Kirkland et al., 2008) führte zu 16 korrekt als Genotoxin klassifizierten Substanzen, was in einer Sensitivität von 80 % resultierte.

Im Gegensatz zu den O6- und N7-Alkylantien Cyclophosphamid (CPA) und Methylmethansulfonat (MMS) konnte Ethylnitrosourea (ENU) nicht korrekt positiv klassifiziert werden. Eine korrekt positive Ermittlung von ENU ist mittels eines HCI-basierten Mikrokerntests in HepG2-Zellen ebenfalls nicht möglich gewesen (Westerink et al., 2011). ENU ist ein direkt wirkendes alkylierendes Agens und induziert hauptsächlich O6-Etylguanin (Shibuya und Morimoto, 1993). Die Reparatur von O6-Alkyladdukten erfolgt durch das Enzym O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) im Rahmen einer einstufigen Reaktion, bei welcher die Alkylgruppe von dem Sauerstoffatom in der DNA auf den Cysteinrest des Enzyms MGMT übertragen wird (Kaina et al., 2007). Die Alkylierung der O6-Position in Guanin kann aufgrund einer Fehlpaarung mit Thymin während der Replikation in einer Transition von Guanin-Cytosin zu Adenin-Thymin resultieren (Tubbs et al., 2007). Eine mögliche Ursache für eine fehlende genotoxische Detektion könnte die Detoxifizierung

von O6-Etylguanin durch MGMT sein. Die Inhibition von MGMT könnte die Detektion des genotoxischen Potentials von ENU ermöglichen.

Während die beiden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzo[a]pyren und 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen korrekt positiv klassifiziert werden konnten, ist eine Klassifizierung als Genotoxin für Dimethylnitrosamin (DMN) und 2,4-Diaminotoluol (DAT), Vertreter der Nitrosamine und aromatischen Amine, im Gegensatz zu den darüber hinaus getesteten aromatischen Aminen nicht möglich gewesen. Die Aktivierung des potenten humanen Kanzerogens, DMN, erfolgt durch Oxidation zu  $\alpha$ -Hydroxydimethylnitrosamin katalysiert von den Enzymen CYP2E1 und CYP2A6, wobei CYP2E1 an der N-Demethylierung vorherrschend beteiligt ist (Chowdhury et al., 2012). Eine inkorrekte Klassifizierung von DMN könnte durch eine unzureichende Expression von CYP2E1 und CYP2A6 der Zelllinie HepG2 begründet sein, welche durch Zugabe eines  $\beta$ -Naphthoflavon- und Phenobarbital-behandelten und somit CYP1A- und CYP2B-induzierten Ratten-S9 nicht kompensiert werden konnte. Erschwerend hinzukommt, dass CYP2E1 in der Rattenleber keine hohe Expression aufweist (Kirkland et al., 2008). Diverse Studien haben Hinweise gegeben, nach welchen ein unzulänglicher Phase I-Metabolismus nicht als hauptsächliche Ursache für eine falsch negative Klassifizierung von Nitrosaminen deklariert werden kann (Boehme et al., 2010; Westphal et al., 2000). Die Detoxifizierung durch den in dieser und weiteren Untersuchungen ermittelten Phase II-Metabolismus könnte eine Detektion von Nitrosaminen limitieren (Boehme et al., 2010). Des Weiteren konnten Valentin-Severin et al. genotoxische Effekte von DMN erst bei sehr hohen Dosen ermitteln: Die Testung auf Mikrokerne führte bei 6,4 mM und der Comet-Test bei 27 mM zu einem positiven Ergebnis (Valentin-Severin et al., 2003). Die flüchtige Eigenschaft der genotoxischen Metaboliten könnte darüber hinaus die Analyse von Nitrosaminen erschweren (Westphal et al., 2000). Die Testung höherer Konzentrationen wie auch die Blockierung des Phase II-Metabolismus (Boehme et al., 2011) könnte die Detektion des genotoxischen Potentials von DMN ermöglichen. Ferner stellt die Verwendung von CYP2E1- und CYP2A6-induziertem S9 oder Mikrosomen, welche im Gegensatz zu S9 keine zytosolische Fraktion mit dem Großteil von Phase II-Enzymen enthalten (Croom, 2012), eine Möglichkeit zur Ermittlung von DMN dar.

Betrachtet man die Gruppe der aromatischen Amine, so konnte DAT im Kontrast zu 2-Acetylaminofluoren, 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin und 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin nicht als Genotoxin ermittelt werden. Die Umsetzung des Kanzerogens DAT zu einem genotoxischen Intermediat erfolgt durch CYP1A (Cheung et al.,

1996). Da sowohl eine intrinsische CYP1A-Aktivität in HepG2-Zellen nachgewiesen werden konnte als auch das zugefügte MAS CYP1A enthält, ist es unwahrscheinlich, dass DAT aufgrund einer metabolischen Limitierung nicht detektiert werden konnte. Séverin et al. führten eine Genotoxizitätstestung von DAT an HepG2-Zellen durch (Séverin et al., 2005). Während im UDS-Test genotoxische Effekte bereits bei Konzentrationen zwischen 0,01 mM und 5 mM ausfindig gemacht werden konnten, zeigte DAT im Mikrokerntest und Comet-Test erst genotoxische Effekte im vergleichsweise höheren Konzentrationsbereich von 1,45 mM bis 6,80 mM (Séverin et al., 2005). Eine mögliche Ursache für die falsch negative Detektion von DAT könnte demnach die im Vergleich zu anderen Studien verwendete niedrigere Testkonzentration von 1 mM gemäß der Empfehlung der Richtlinie ICH S2(R1) sein. Mit dem Ersatz bzw. der Kombinierung der beiden ICH-Richtlinien „*Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals S2A*“ und „*Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals S2B*“ durch die „*Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1)*“ (ICH S2(R1)) ging eine Reduzierung der höchsten Testkonzentration von 10 mM bzw. 5 mg/ml auf 1 mM bzw. 0,5 mg/ml einher (ICH, 1996; ICH, 1997; ICH, 2011a). Eine Reihe von Genotoxizitätstests der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung, wie den Luciferase-basierten *RAD51C*-, *Cystatin A*- und *p53*-Reportergentests und dem HCl-basierten Mikrokerntest, konnte an der Zelllinie HepG2 für Konzentrationen unterhalb von 1 mM positive Ergebnisse ermitteln (Westerink et al., 2010; Westerink et al., 2011). Da ist der vorliegenden Arbeit mit steigender Konzentration im Bereich von 250 µM bis 1000 µM eine ansteigende Induktion von p21 und p-H2AX (Ser139) bis zu 1,5-fach über der Kontrolle (bei Behandlung ohne MAS) ermittelt werden konnte (Details siehe Anhang 8.7), ist zu vermuten, dass in Konzentrationsbereichen oberhalb der getesteten Höchstkonzentration von 1 mM ein positives Ereignis zu erwarten gewesen wäre.

Aus der Gruppe der weiteren Ames-positiven *in vivo* Genotoxine konnte lediglich Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) nicht korrekt positiv klassifiziert werden. Eine schwache Phosphatbindung von  $\text{Cd}^{2+}$ , welche *in vitro* beobachtet werden kann, scheint die alleinige Wechselwirkung von Cd(II) und der DNA zu sein (Bal et al., 2011). Von größerer toxikologischer Relevanz sind indirekte Wirkmechanismen wie die Inhibition der DNA-Reparatur (Bal et al., 2011). Berichtet wurde von einer Blockierung der Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur (Bal et al., 2011; Candéias et al., 2010; Fatur et al., 2003) und der Fehlpaarungsreparatur (Bal et al., 2011; Lützen et al., 2004). Wu et al. konnten des Weiteren eine inhibitorische Eigenschaft der Topoisomerase II von Cadmium

ermitteln (Wu et al., 2011), was zu einem Doppelstrangbruch in der DNA führen kann (Austin und Marsh, 1988). In der vorliegenden Arbeit konnten für p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) mit steigender Konzentration steigende Hochregulationen oberhalb der Schwellenwerte ermittelt werden, wobei die zugehörigen Konzentrationen allerdings im zytotoxischen Bereich lagen. Der Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) stieg bei Testung von 31,25  $\mu\text{M}$  und 62,5  $\mu\text{M}$  ohne metabolisches Aktivierungssystem von einer moderaten Toxizität von etwa 25 % auf eine starke Toxizität von fast 75 % (Details siehe Anhang 8.7). Obwohl  $\text{CdCl}_2$  mit den definierten Konzentrationen dieses Testsystems aufgrund seiner steilen Dosis-Wirkungs-Kurve für SCC nicht korrekt detektiert werden konnte, ist zu vermuten, dass bei wiederholter Testung dazwischenliegender Konzentrationen  $\text{CdCl}_2$  korrekt analysiert werden würde.

Aus der letzten Subgruppe der Gruppe 1, den Ames-negativen oder -mehrdeutigen *in vivo* Genotoxinen, konnten alle Substanzen durch das etablierte Testsystem korrekt klassifiziert werden.

Die Testung der insgesamt 23 ECVAM-Substanzen der Gruppe 2 (nicht DNA-reaktive Chemikalien) (Kirkland et al., 2008) ergab zwei falsch positiv klassifizierte Substanzen, aufgrund dessen eine Spezifität von 91,3 % kalkuliert werden konnte. Phenanthracen (PA) und Progesteron (PRO) zeigten eine Regulation von p-ATM (Ser1981) oberhalb des definierten Schwellenwertes auf und wurden folglich falsch positiv klassifiziert. PA wies bei der höchsten getesteten Konzentration von 1000  $\mu\text{M}$  mit 1,88 eine Regulation knapp oberhalb des Schwellenwertes auf. Für PRO konnte bei einer Konzentration von 62,5  $\mu\text{M}$ , welche sich zugleich mit einer Viabilität von 57,8 % knapp unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze befand, eine Regulation von 2,69 festgestellt werden (Details siehe Anhang 8.8). In beiden Fällen wurde zudem im Student's T-Test ein p-Wert größer als 0,05 ermittelt. Aufgrund dieser Datenlage ist zu vermuten, dass es sich sowohl bei PA als auch PRO um keine genotoxisch relevanten Effekte handelt. Unterstützt werden kann die Vermutung einer nicht-genotoxisch relevanten Wirkung durch die Tatsache, dass ATM neben der hauptsächlichen Funktion in der DNA-Schadensantwort auch an weiteren zellulären Prozessen (wie dem Oxidations-Signaltransduktionsweg und der Zellantwort auf oxidativen Stress) beteiligt ist (Shiloh et al., 2013).

Bei der Gruppe 3 der ECVAM-Substanzen handelt es sich um nicht-DNA-reaktive Chemikalien (beinhaltet nicht-genotoxische Kanzerogene), metabolische Gifte und andere Substanzen, die negative Ergebnisse in *in vitro* Genotoxizitätstests an Säugerzellen liefern

sollten, von welchen aber berichtet worden ist, dass diese Chromosomenabberationen oder T<sub>k</sub> Mutationen in Maus-Lymphoma-Zellen, oftmals bei hohen Konzentrationen oder hohen Zytotoxizitätsniveaus, induzieren (Kirkland et al., 2008). Aus der Gruppe 3 generierten insgesamt vier Substanzen ein falsch positives Resultat. Die falsch positiv getesteten Substanzen Propylgallat (PG), *p*-Nitrophenol (NPH), Eugenol (EUG) und 2,4-Dichlorophenol (DP) gehören der Subgruppe von Substanzen an deren Prädiktion durch *in vitro* Genotoxizitätstests eingeschränkt ist, da unklare oder kontroverse Kanzerogenitäts- oder Genotoxizitätsbefunde für diese Subgruppe vorliegen (Kirkland et al., 2008). Diverse Studien, unter anderem der GreenScreen<sup>®</sup> (Birrell et al., 2010), haben bei Testung von Substanzen dieser Subgruppe falsch positive Ergebnisse aufgezeigt. Aufgrund der korrekt negativen Klassifizierung von 15 der insgesamt 19 geprüften Substanzen konnte für die Gruppe 3 der ECVAM-Substanzen durch das vorliegende Testsystem eine Spezifität von 78,9 % ermittelt werden.

Während PG bei allen untersuchten Proteinen außer p21 und p-Chk1 (Ser345) bei der Testung ohne MAS ein positives Ergebnis aufzeigte, ist eine Reihe weiterer *in vitro* Tests bekannt, welche zu einem positiven Ergebnis geführt hat. PG gehört zu den meist verwendeten antioxidativ wirkenden Lebensmittelzusatzstoffen (Shahidi, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Antioxidantien in der Lage ist unter bestimmten Bedingungen eine pro-oxidative Wirkung zu entfalten (Devasagayam et al., 2004; Halliwell, 2008). In Übereinstimmung mit der Vermutung von Fowler et al. könnten die folglich gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einem positiven Resultat geführt haben, wohingegen ROS *in vivo* vermutlich besser kompensiert werden, beispielsweise durch katabolisierende Stoffwechselwege und eine puffernde Wirkung in den Geweben (Fowler et al., 2012a). Diese Annahme würde die negativen Ergebnisse *in vivo* und positiven Befunde durch eine Testung *in vitro* von PG erklären.

*P*-Nitrophenol (NPH) erzielte für p-Chk1 (Ser345) wie auch p-ATM (Ser1981) und Eugenol (EUG) für p-H2AX (Ser139) bei Konzentrationen, welche mit einer Zytotoxizität von etwa 40 % nur knapp unterhalb der Zytotoxizitätsgrenze lagen, Regulationen oberhalb der definierten Schwellenwerte. Infolgedessen könnte eine Unterschätzung der Zytotoxizität durch die gewählten Zytotoxizitätsparameter vermutet werden.

2,4-Dichlorophenol (DP) wurde hingegen aufgrund einer dosisabhängigen Hochregulation von p-ATM (Ser1981) positiv klassifiziert. Da p-ATM (Ser1981) nicht nur bei DP zu einem

falsch positiven Ereignis geführt hat, wird die Eignung dieses Proteins zur Ermittlung von Genotoxizität im folgenden Abschnitt diskutiert.

NPH, EUG und DP erzielten in vielen weiteren Studien positive Resultate *in vitro*. Eine Ursache für die falsch positive Detektion *in vitro* und die damit verbundenen Diskrepanz des negativen Resultats *in vivo* kann nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht ermittelt werden.

Zusammenfassend konnte für das vorliegende Testsystem durch Testung der Gruppe 1 eine Sensitivität von 80 % und durch Testung der Gruppe 2 und 3 eine Spezifität von 86 % ermittelt werden, infolgedessen eine Prädiktivität von 84 % kalkuliert werden konnte.

#### **4.2.2.2 Charakterisierung der (pro-)genotoxischen Substanzen**

Die analysierten Proteine können einen Hinweis auf die Wirkweise der (pro-)genotoxischen Substanzen geben. Während ATM hauptsächlich durch Doppelstrangbrüche (DSB) aktiviert wird, erfolgt die Aktivierung von ATR vorzugsweise durch eine blockierte Replikationsgabel (Roos und Kaina et al., 2013). Infolge von DSB und blockierten Replikationsgabeln bewirken ATM und ATR die Phosphorylierung von H2AX an Ser139 (Roos und Kaina, 2013). Die Phosphorylierung von H2AX folgt einer Kinetik, bei welcher bereits wenige Minuten nach einer Schädigung der DNA p-H2AX (Ser139) im Bereich der Schadenstellen akkumuliert (Garcia-Canton et al., 2012). Die Vielzahl von unverzüglich nach einem DSB gebildeten p-H2AX (Ser139)-Foki wächst mit fortschreitender Reparatur individuell in ihrer Größe, wobei ihre Anzahl gleichzeitig vermindert wird (Dellaire et al., 2009). Nach etwa 30 Minuten wird ein Plateau erreicht, welches daraufhin wieder abflacht (Garcia-Canton et al., 2012). Da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Endpunktmessung und demnach keine Kinetik handelt, ist es möglich, dass eine Phosphorylierung von H2AX zwar vorlag jedoch zum Zeitpunkt der Fixierung bzw. Messung bereits abgesunken war. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür ein, dass nicht alle DSB-induzierenden Substanzen korrekt klassifiziert werden konnten. Demnach ist die Sensitivität der Charakterisierung DSB-induzierender Substanzen durch die Endpunktdetektion von p-H2AX (Ser139) limitiert. In den vergangenen Jahren wurde H2AX vermehrt zur Detektion von DSB-induzierenden Substanzen, mitunter auch integriert in mechanistischen Studien, eingesetzt (Garcia-Canton et al., 2012). Kim et al. konnten 2011 den Zusammenhang zwischen der Fokianzahl von phosphoryliertem H2AX und der vorhandenen DNA-Schädigung mittels der Entwicklung und Durchführung eines quantitativen, Zell-basierten HCI-Testsystems zeigen (Kim et al., 2011). Eine kinetische

Messung wie auch die Detektion der Fokianzahl könnte folglich im Gegensatz zu der durchgeführten Methode eine höhere Sensitivität erzielen.

Das Protein p-ATM (Ser1981) hat in der vorliegenden Arbeit durch seine alleinige Regulation zu einer korrekt positiven Detektion von insgesamt drei Substanzen geführt. Allerdings führte p-ATM (Ser1981) auch zur falsch positiven Klassifizierung von drei nicht-genotoxischen Substanzen. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass ATM neben seiner hauptsächlichsten Funktion in der DNA-Schadensantwort weitere Funktionen zukommen: ATM ist in den Reduktions-Oxidations-Signaltransduktionsweg und in die Zellantwort auf oxidativen Stress involviert (Shiloh et al., 2013). Basierend auf den vorliegenden Daten und vor dem Hintergrund, dass ATM neben der DNA-Schadensantwort in weitere Signaltransduktionswege involviert ist, eignet sich p-H2AX (Ser139) zur Detektion von DSB besser als p-ATM (Ser1981).

Mechanistische Rückschlüsse basierend auf der Regulation von Proteinen der DNA-Schadensantwort neben p-ATM (Ser1981) sind aufgrund der Verflechtung und Komplexität des Signaltransduktionsweges kritisch zu betrachten, wohingegen p-H2AX (Ser139) mechanistische Hinweise auf die genotoxische Wirkung der Testsubstanz liefern kann.

#### **4.2.2.3 Limitierung der Detektion von Aneugenen**

Eine Detektion von aneugen wirkenden Substanzen durch das vorliegende Testsystem ist eingeschränkt möglich. Die beiden aneugen wirkenden Substanzen Hydroquinon (HQ) und Taxol (T) konnten mitunter durch Induktion von p-H2AX (Ser139) positiv detektiert werden, was eine DSB-induzierende Wirkung vermuten lässt. Die Induktion von p-H2AX (Ser139) in HepG2-Zellen durch HQ und T wurde ebenfalls in einer Studie von Khoury et al. ermittelt (Khoury et al., 2013). Branham et al. haben eine Induktion von Einzelstrangbrüchen durch T im Rahmen eines alkalischen Comet-Tests ermittelt (Branham et al., 2004) und somit einen Hinweis auf einen anderen als aneugenen Wirkmechanismus aufzeigen können. Darüber hinaus wurde für die aneugen wirkende Substanz HQ von weiteren Eigenschaften, wie der oxidativ DNA-schädigenden Wirkung und der Induktion der Fokianzahl von phosphoryliertem H2AX, berichtet (Peng et al., 2013). In Übereinstimmung mit der vorliegenden Arbeit haben Peng et al. eine Induktion von H2AX durch HQ ermittelt (Peng et al., 2013), was eine DSB-induzierende Eigenschaft der Substanz vermuten lässt.

Zusammenfassend konnten die Aneugene T und HQ durch das vorliegende Testsystem vermutlich aufgrund von sekundären Wirkmechanismen ermittelt werden. Demnach ist die

Detektion von weiteren Aneugenen durch deren etwaige Sekundärmechanismen prinzipiell möglich.

#### **4.2.2.4 Vergleich des etablierten Testsystems mit weiteren Genotoxizitätstests der frühen Phase der Arzneimittelenwicklung**

Das etablierte Testsystem wurde ebenso wie eine Reihe weiterer Genotoxizitätstests zur Beurteilung der Prädiktivität mit Substanzen, welche von der ECVAM zur Beurteilung der Leistung neuer oder modifizierter *in vitro* Genotoxizitätstests empfohlen sind (Kirkland et al., 2008), getestet (Tabelle 4-3).

Während das etablierte Testsystem eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 86 % erzielte, wurde bei drei weiteren Testsystemen, dem GreenScreen<sup>®</sup> (Birrell et al., 2010), dem HCI-basierten Mikrokerntest an CHO-k1-Zellen (Westerink et al., 2011) und den *RAD51C*-, *Cystatin A*- und *p53*-Reportergerntests an HepG2-Zellen (Westerink et al., 2010), sowohl für Sensitivität als auch Spezifität Werte von mindestens 80 % erreicht.

Der GreenScreen<sup>®</sup> HC, ein *Green Fluorescent Protein*-basierter *GADD45A*-Reportergerntest der Firma Gentrionix, erzielte unter den aufgezeigten Genotoxizitätstests mit 90 % die höchste Sensitivität und eine Spezifität von 88 % (Birrell et al., 2010). Anzumerken ist, dass bei dieser Testung 10 mM als maximale Testkonzentration verwendet wurde (Birrell et al., 2010). Die Annahme der nach ICH S2(R1) geltenden höchsten Konzentration von 1 mM würde in einer niedrigeren Sensitivität von 85 % und einer erhöhten Spezifität von 93 % resultieren, wodurch sich ebenfalls die Prädiktivität um 2 % auf 90 % erhöhen würde. Es ist allerdings nicht möglich gewesen die von Birrell et al. ermittelten Werte im Zuge einer internen Studie unter Verwendung des BlueScreen<sup>™</sup>, einem Luciferase-basierten *GADD45A*-Reportergerntest der Firma Gentrionix, zu bestätigen. Die ermittelte Sensitivität war mit 65 % deutlich niedriger, während eine gesteigerte Spezifität von 98 % ermittelt werden konnte (Henger, 2011). Aufgrund der niedrigen Sensitivität ist von der Verwendung dieses Tests zur Prädiktion von Genotoxizität abzusehen.

Die Durchführung eines HCI-basierten Mikrokerntests hat an CHO-k1- und HepG2-Zellen zu einer Spezifität von 88 % geführt (Westerink et al., 2011). Hingegen war die Sensitivität bei HepG2-Zellen mit 60 % gegenüber CHO-k1-Zellen deutlich niedriger, was Westerink et al. mit einer möglichen Detoxifizierung im Falle der HepG2-Zellen begründeten (Westerink et al., 2011). Da im Gegensatz zu CHO-k1-Zellen bei HepG2-Zellen nicht alle Substanzen unter Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems (in Form eines Rattenleber-S9-Mixes)

**Tabelle 4-3: Vergleich des etablierten Testsystems mit weiteren Genotoxizitätstests der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung.**

Informationen zu den Testsystemen sind aufgezeigt. In Klammern ist die Anzahl korrekt\* klassifizierter Substanzen der genotoxischen bzw. nicht-genotoxischen Substanzen und der insgesamt getesteten Substanzen zur Kalkulation der Sensitivität bzw. Spezifität und Prädiktivität dargestellt.

Testsystem	Sensitivität	Spezifität	Prädiktivität	Zeit pro Experiment	Durchsatz pro Woche	MAS	mechanistische Aussage
etabliertes Testsystem	80 % (16/20)	86 % (36/42)	84% (52/62)	5 Tage	~25 Substanzen je +/-MAS	ja	Detektion von p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981)
Anthem's Genotoxicity screen (Rajakrishna et al., 2013)	100 % (20/20)	67 % (28/42)	77 % (48/62)	3 Tage**	~25 Substanzen je +/-MAS	ja	<i>p21</i> -, <i>GADD153</i> - und <i>p53</i> -Reportertest
BlueScreen <sup>TM</sup> (Henger, 2011)	65 % (13/20)	98 % (41/42)	87 % (54/62)	3 Tage	~24 Substanzen je +/-MAS	ja	<i>GADD45A</i> -Reportertest
GreenScreen <sup>®</sup> (Birrell et al., 2010)	90 % (18/20)	88 % (35/40)	88 % (53/60)	3 Tage	-	ja	<i>GADD45A</i> -Reportertest
HCI-basierter Mikrokerntest (HepG2-Zellen) (Westerink et al., 2011)	60 % (12/20)	88 % (37/42)	79 % (49/62)	5 Tage	-	ja	Detektion und Diskriminierung clastogener und aneugener Substanzen
HCI-basierter Mikrokerntest (CHO-k1-Zellen) (Westerink et al., 2011)	80 % (16/20)	88 % (37/42)	85 % (53/62)	3/4 Tage (3 h-/ 24 h- Behandlung)	-	ja	Detektion und Diskriminierung clastogener und aneugener Substanzen
p-H2AX (Ser139) <i>In-Cell</i> <i>Western Assay</i> (Khoury et al., 2013)	75 % (15/20)	90 % (37/41)	85 % (52/61)	3 Tage	-	nein	Detektion von p-H2AX (Ser139)
<i>RAD51C</i> -, <i>Cystatin A</i> - und <i>p53</i> -Reportertest (Westerink et al., 2010)	85 % (17/20)	81 % (34/42)	82 % (51/62)	4 Tage** (pro Reporter- test)	-	nein	<i>RAD51C</i> -, <i>Cystatin A</i> - und <i>p53</i> -Reportertest
RadarScreen (Westerink et al., 2009)	70 % (14/20)	83 % (35/42)	79 % (49/62)	1 Tag	-	ja	<i>RAD54</i> -Reportertest an Hefen
VITOTOX <sup>TM</sup> (Westerink et al., 2009)	70 % (14/20)	93 % (39/42)	85 % (53/62)	1 Tag	-	ja	Echtzeit-Detektion der SOS-Schadensantwort in <i>Salmonella typhimurium</i>

\* nach Angaben der ECVAM (Kirkland et al., 2008); \*\* Zytotoxizitätsbestimmung erfolgt separat und ist nicht inbegriffen; MAS: metabolisches Aktivierungssystem.

getestet worden sind, ist dies als Ursache für eine geringere Sensitivität äußerst wahrscheinlich. Eine höhere Sensitivität kann folglich bei Zugabe eines metabolischen Aktivierungssystems erwartet werden. Die Integration eines Mikrokerntests in das bereits etablierte Testsystem könnte eine gesteigerte Sensitivität bewirken. Westerink et al. haben gezeigt, dass der HCI-basierte Mikrokerntest obendrein die Diskriminierung von aneugen und clastogen wirkenden Substanzen anhand der Größe des Mikrokerns offeriert (Westerink et al., 2011).

Die Luciferase-basierten Reportergerntests an HepG2-Zellen zur Untersuchung von *RAD51C*, *Cystatin A* und *p53* führten zu einer Sensitivität und Spezifität von 85 % und 81 % (Westerink et al., 2010). Da die Zytotoxizitätstestung nicht simultan zu dem Reportergerntest durchgeführt werden kann, ist diese Testbatterie mit einem gegenüber den anderen bereits erwähnten Tests erhöhten Zeitaufwand verbunden, weshalb diese Tests zum Screening in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung nur bedingt taugen.

Bei dem Anthem's Genotoxicity screen handelt es sich um einen weiteren Reportergerntest, welcher ebenfalls an einer p53-kompetenten humanen Zelllinie, der Kolonkarzinomzelllinie HCT116, durchgeführt wird (Rajakrishna et al., 2013). Die stabil transduzierte Zelllinie enthält drei Reportergene unter der transkriptionellen Kontrolle von Promotoren der Gene *p21*, *DNA damage-inducible transcript 3 protein (GADD153)* und *p53* (Rajakrishna et al., 2013). Dieser Genotoxizitätstest erreichte unter den aufgeführten Testsystemen mit einer Sensitivität von 100 % sowohl die beste Sensitivität als auch mit einem Wert von 67 % die schlechteste Spezifität, was folglich in einer Prädiktivität von 77 % resultierte (Rajakrishna et al., 2013).

Die beiden Reportergerntests an einzelligen Lebewesen, der RadarScreen-Test an Hefen und der VITOTOX<sup>TM</sup> an *Salmonella typhimurium*, erzielten mit 83 % und 93 % eine hohe Spezifität, jedoch wurde eine Sensitivität von lediglich 70 % ermittelt (Westerink et al., 2009). Aufgrund der geringen Sensitivität ist von der Verwendung dieser Reportergerntests abzusehen.

Der p-H2AX (Ser139) *In-Cell Western Assay* von Khoury et al. zeigte mit 75 % eine geringere Sensitivität als das in dieser Arbeit etablierte Testsystem auf, während die Spezifität mit 90 % höher gewesen ist (Khoury et al., 2013). Ursächlich für die geringere Sensitivität könnte im Gegensatz zum vorliegenden Testsystem die Detektion von nur einem Protein sein,

was den synergetischen Effekt der fünf detektierten Proteine im etablierten Testsystem verdeutlicht.

Zusammenfassend konnte verglichen mit weiteren Testsystemen der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung ein sensitives und zugleich spezifisches Testsystem entwickelt werden. Die gute Spezifität des Testsystems ist vermutlich durch die Wahl der Zelllinie HepG2 in Kombination mit einem adäquaten Zytotoxizitätsparameter begründet. Der Einsatz p53- und DNA-Reparatur-kompetenter Zellsysteme mit einer charakterisierten fremdstoffmetabolisierenden Kapazität kann bei Anpassung der Zytotoxizitätsgrenzen und Verwendung einer geeigneten Methode zur Detektion der Zytotoxizität zur Reduktion falsch positiver Ereignisse beitragen (Fowler et al., 2012a; Fowler et al., 2012b; Kirkland et al., 2007). Obwohl das etablierte Testsystem mit fünf Tagen eine vergleichsweise lange Durchführungszeit hat, stellt dieses dennoch aufgrund der mechanistischen Aussage, welche die Detektion der Proteine der DNA-Schadensantwort liefert, wie auch aufgrund des möglichen wöchentlichen Durchsatzes und der verglichen mit weiteren Testsystemen guten Prädiktivität ein geeignetes Testsystem für die Verwendung in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung dar.

Da ein Testsystem mit einer hohen Rate falsch positiver Ergebnisse in einer sehr frühen Phase der Arzneimittelentwicklung, wie der Leistrukturfindung, zu einer nicht effizienten Deselektion pharmakologisch wichtiger Substanzen führen kann, ist ein Testsystem mit hoher Spezifität von besonderem Interesse. Die Eliminierung von p-ATM (Ser1981), welches bei der vorliegenden Testung vorzugsweise zur Generierung falsch positiver Resultate beigetragen hat, würde zu einer erhöhten Spezifität von 93% führen, was jedoch auch mit einer Reduktion der Sensitivität auf 65% einhergehen würde. Das resultierende Testsystem könnte nach einer Erhöhung des Durchsatzes möglicherweise durch eine Roboter-gestützte Vollautomatisierung und eine Adaptation auf ein 384-Loch-Format in der Phase Leistrukturfindung eingesetzt werden. Eine drauffolgende Testung in der Phase der Leistrukturoptimierung sollte sich insbesondere durch eine hohe Sensitivität auszeichnen. Die Verwendung des etablierten Testsystems zu diesem Zeitpunkt könnte einen Ansatz zur verbesserten Entscheidungsfindung darstellen, wobei die Integration eines Mikrokerntests zur Erhöhung der Sensitivität beitragen könnte. Des Weiteren offeriert das etablierte Testsystem die Möglichkeit mechanistische Informationen in späteren Phasen ergänzend zur Standardtestbatterie beizutragen.



## 5 Schlussfolgerung und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte ein neues, spezifisches und sensitives HCI-basiertes Testsystem auf Genotoxizität entwickelt werden, welches auf dem synergetischen Effekt der Detektion von p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) in der humanen Zelllinie HepG2 beruht. Die Testung der von dem *European Centre for the Validation of Alternative Methods* (ECVAM) empfohlenen Substanzen ergab eine Sensitivität von 80 % und eine Spezifität von 86 %, was in einer Prädiktivität von 84 % resultierte.

Um eine umfassendere Beurteilung der Leistungsfähigkeit des etablierten Testsystems zu erhalten, sollte zukünftig die Analyse einer größeren Anzahl von Testsubstanzen vorgenommen werden. Da vorzugsweise das Protein p-ATM (Ser1981) zu falsch positiven Ergebnissen geführt hat, könnte die Testung einer umfangreicheren Anzahl von Substanzen zudem weitere Hinweise liefern, inwieweit sich dieser Marker zur Detektion von genotoxischen Substanzen eignet. Die Eliminierung von p-ATM (Ser1981) aus der Gruppe zu testender Proteine würde auf Basis der aktuellen Datenlage zu einer erhöhten Spezifität von 93 % führen, was jedoch auch mit einer Reduktion der Sensitivität auf 65 % bei einer gleichbleibenden Prädiktivität von 84 % einhergehen würde.

Eine Reihe weiterer Modifizierungen des Testsystems könnte zu einer Erhöhung der Sensitivität beitragen. Die Zählung der durch p-H2AX (Ser139) gebildeten Foki wie auch die Messung einer Kinetik von p-H2AX (Ser139) könnte zu einer verbesserten Sensitivität führen, da die unverzüglich nach einem Doppelstrangbruch durch p-H2AX (Ser139) gebildeten Foki mit fortschreitender Reparatur individuell in ihrer Größe wachsen, wobei ihre Anzahl gleichzeitig vermindert wird (Dellaire et al., 2009).

Westerink et al. haben gezeigt, dass es sich bei einem HCI-basierten Mikrokerntest um einen prädiktiven Test zur Ermittlung genotoxischer Substanzen handelt (Westerink et al., 2011). Die Integration der Detektion von Mikrokernen in das Testsystem könnte zusätzlich die Ermittlung aneugen wirkender Substanzen ermöglichen und infolgedessen eine gesteigerte Sensitivität bewirken.

Aufgrund des gewählten zu testenden Konzentrationsbereiches ist es möglich, dass Substanzen mit einer steilen Dosis-Wirkungs-Kurve für Zytotoxizität durch Detektion der analysierten Proteine nicht korrekt klassifiziert werden können. Im Falle einer solchen lückenhaften Abbildung der Dosis-Wirkungs-Beziehung könnte in Zukunft ein enger

gestaffelter Konzentrationsbereich getestet werden, sodass eine höhere Sensitivität des etablierten Testsystems erzielt werden könnte. Allerdings geht eine solche Vorgehensweise mit einem geringeren Durchsatz bzw. höheren Zeitaufwand einher, was bei einem Testsystem, welches in der frühen Phase der Arzneimittelentwicklung Einsatz finden soll, kritisch zu betrachten ist.

Darüber hinaus würden zwei Modifikationen zu einer möglichen korrekt genotoxischen Klassifizierung zweier Substanzen bzw. Substanzgruppen beitragen. Als mögliche Ursache für eine fehlende genotoxische Detektion von Ethylnitrosourea wurde die Detoxifizierung von O6-Ethylguanin durch die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) angenommen. Die Inhibition der MGMT auf Proteinebene oder die Verwendung genetisch modifizierter MGMT-defizienter Zellen könnte eine korrekte Klassifizierung bewirken.

Hingegen wurde als Grund für die ausbleibende genotoxische Detektion des Nitrosamins Dimethylnitrosamin die fehlende Expression von CYP2E1 und CYP2A6 in der Zelllinie HepG2 vermutet, welche durch die Zugabe eines  $\beta$ -Naphthoflavon- und Phenobarbital-behandelten und somit CYP1A- und CYP2B-induzierten Ratten-S9 nicht kompensiert werden konnte. Die Verwendung eines CYP2E1- und CYP2A6-induzierten S9 oder Mikrosomen, welche im Gegensatz zu S9 keine zytosolische Fraktion mit dem Großteil von Phase II-Enzymen enthalten (Croom, 2012), könnte in Zukunft die metabolische Aktivierung und korrekte Detektion des Nitrosamins ermöglichen.

Der Empfehlung der Verwendung eines p53- und DNA-Reparatur-kompetenten Zellsystems zur Erhöhung der Spezifität wurde durch Einsatz der Zelllinie HepG2 Rechnung getragen (Fowler et al., 2012a; Kirkland et al., 2007). Dennoch hat das vorliegende Testsystem falsch positive Ergebnisse hervorgebracht, welche teilweise im moderat zytotoxischen Bereich von 40-50 % lagen. Fowler et al. haben berichtet, dass die Ermittlung der relativen Zellzahl und des Replikationsindex die tatsächlich vorherrschende Zytotoxizität unterschätzen kann (Fowler et al., 2012b). Um einer Unterschätzung der Zytotoxizität vorzubeugen, wurde neben der Zellzahlbestimmung der Farbstoff CellTracker Green<sup>TM</sup> 5-Chloromethylfluoresceindiacetat (CMFDA) als Zytotoxizitätsparameter verwendet. Die zukünftige Testung weiterer Zytotoxizitätsparameter und deren Implementierung in das Testsystem könnten die Spezifität weiterhin erhöhen.

Aufgrund des hohen Durchsatzes, des geringen Zeitaufwandes (durch eine Durchführung innerhalb von fünf Tagen) und der darüber hinaus geringen Menge benötigter Substanz eignet

sich dieses Testsystem zur Substanzpriorisierung und -selektion in der Phase der Leitstrukturoptimierung und liefert darüber hinaus mechanistische Hinweise über die genotoxische Wirkung der Testsubstanz. Eine weitere Erhöhung des Durchsatzes wäre in Zukunft durch eine Roboter-gestützte Vollautomatisierung und eine Adaptation auf ein 384-Loch-Format möglich, wodurch die Anwendung des Tests bereits in einer früheren Phase zur Identifizierung erfolgversprechender Leitstrukturen denkbar wäre. Darüber hinaus würde die Eliminierung von p-ATM (Ser1981), welches vorzugsweise falsch positive Resultate generiert hat, zu einer höheren Spezifität führen und somit eine ineffiziente Deselektion pharmakologisch wichtiger Substanzen vermindern.

Von besonderem Vorteil ist, dass die Detektion der Proteine des etablierten Testsystems nicht zwingend an die Technologie des *high content imaging* gebunden ist, sodass verschiedenste Laboratorien von diesem Test unter Verwendung einer alternativen Methode Gebrauch machen können. Beispielsweise würde die Luminex-Technologie eine ebenfalls schnelle Detektion gewährleisten und obendrein die Analyse einer Vielzahl weiterer Proteine offerieren.

Im Gegensatz zu den meisten anderen Systemen bietet das etablierte Testsystem sowohl einen hohen Durchsatz als auch eine gute Sensitivität und Spezifität von über 80 %. Darüber hinaus ist das System in der Lage mechanistische Hinweise über die genotoxische Wirkung der Substanz zu liefern. Im Hinblick auf neue Forschungsansätze, die eine mechanistische Aufklärung der Substanz forcieren, ist die Etablierung dieses Testsystems von besonderem Stellenwert.

Abschließend kann festgehalten werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit etablierte HCI-basierte Genotoxizitätstest in der Lage ist die Entwicklung eines Pharmazeutikums bereits in der Phase der Leitstrukturoptimierung durch Priorisierung und Selektion zu unterstützen und die darauffolgende Standardtestbatterie nach der Richtlinie ICH S2(R1) zu ergänzen, um folglich eine umfassende Risikobeurteilung des genotoxischen Potentials der Entwicklungssubstanz zu gewährleisten.



## 6 Literaturverzeichnis

**Affymetrix** (2010). QuantiGene<sup>®</sup> Plex 2.0 Assay User Manual Plex 2.0.

**Affymetrix** (2012). QuantiGene<sup>®</sup> Plex 2.0 Reagent System Plex Set 11563 human Package Insert.

**Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. und Starke, K.** (2013). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier GmbH München.

**ATCC** (2012). <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HB-8065&Template=cellBiology>. Abgerufen am 20.12.12.

**Austin, C. A. und Marsh, K. L.** (1998). Eukaryotic DNA topoisomerase II beta. *Bioessays* 20(3): 215-226.

**Baer, A., Austin, D., Narayanan, A., Popova, T., Kainulainen, M., Bailey, C., Kashanchi, F., Weber, F. und Kehn-Hall, K.** (2012). Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication. *J Biol Chem* 287(10): 7399-7410.

**Bal, W., Protas, A. M. und Kasprzak, K. S.** (2011). Genotoxicity of metal ions: chemical insights. *Met Ions Life Sci* 8: 319-373.

**Bedard, L. L. und Massey, T. E.** (2006). Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Lett* 241(2): 174-183.

**Berenblum, I. und Shubik, P.** (1947a). A new, quantitative, approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse's skin. *Br J Cancer* 1(4): 383-391.

**Berenblum, I. und Shubik, P.** (1947b). The role of croton oil applications, associated with a single painting of a carcinogen, in tumour induction of the mouse's skin. *Br J Cancer* 1(4): 379-382.

**Biran, A., Yagur-Kroll, S., Pedahzur, R., Buchinger, S., Reifferscheid, G., Ben-Yoav, H., Shacham-Diamand, Y. und Belkin, S.** (2010). Bacterial genotoxicity bioreporters. *Microb Biotechnol* 3(4): 412-427.

- Birrell, L., Cahill, P., Hughes, C., Tate, M. und Walmsley, R. M.** (2010). GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests. *Mutat Res* 695(1-2): 87-95.
- Bock, K. W. und Bock-Hennig, B. S.** (2010). UDP-glucuronosyltransferases (UGTs): from purification of Ah-receptor-inducible UGT1A6 to coordinate regulation of subsets of CYPs, UGTs, and ABC transporters by nuclear receptors. *Drug Metab Rev* 42(1): 6-13.
- Boehme, K., Dietz, Y., Hewitt, P. und Mueller, S. O.** (2010). Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol Lett* 198(2): 272-281.
- Boehme, K., Dietz, Y., Hewitt, P. und Mueller, S. O.** (2011). Genomic profiling uncovers a molecular pattern for toxicological characterization of mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol Sci* 122(1): 185-197.
- Bolt, H. M., Foth, H., Hengstler, J. G. und Degen, G. H.** (2004). Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a European perspective. *Toxicol Lett* 151(1): 29-41.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Branchini, B. R., Magyar, R. A., Murtiashaw, M. H., Anderson, S. M. und Zimmer, M.** (1998). Site-directed mutagenesis of histidine 245 in firefly luciferase: a proposed model of the active site. *Biochemistry* 37(44): 15311-15319.
- Branham, M. T., Nadin, S. B., Vargas-Roig, L. M. und Ciocca, D. R.** (2004). DNA damage induced by paclitaxel and DNA repair capability of peripheral blood lymphocytes as evaluated by the alkaline comet assay. *Mutat Res* 560(1): 11-17.
- Burke, M. D. und Mayer, R. T.** (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2(6): 583-588.
- Burke, M. D., Murray, G. I. und Lees, G. M.** (1983). Fluorescence-microscopic measurement of intracellular cytochrome P-450 enzyme activity (ethoxyresorufin O-deethylation) in unfixed liver section. *Biochem J* 212(1): 15-24.

- Burke, M. D., Thompson, S., Weaver, R. J., Wolf, C. R. und Mayer, R. T.** (1994). Cytochrome P450 specificities of alkoxyresorufin O-dealkylation in human and rat liver. *Biochem Pharmacol* 48(5): 923-936.
- Burma, S., Chen, B. P., Murphy, M., Kurimasa, A. und Chen, D. J.** (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 276(45): 42462-42467.
- Cadet, J., Mouret, S., Ravanat, J. L. und Douki, T.** (2012). Photoinduced damage to cellular DNA: direct and photosensitized reactions. *Photochem Photobiol* 88(5): 1048-1065.
- Candéias, S., Pons, B., Viau, M., Caillat, S. und Sauvaigo, S.** (2010). Direct inhibition of excision/synthesis DNA repair activities by cadmium: analysis on dedicated biochips. *Mutat Res* 694(1-2): 53-59.
- Cazzalini, O., Scovassi, A. I., Savio, M., Stivala, L. A. und Prospero, E.** (2010). Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat Res* 704(1-3): 12-20.
- Chapman, J. R., Taylor, M. R. und Boulton, S. J.** (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* 47(4): 497-510.
- Cheung, Y. L., Snelling, J., Mohammed, N. N., Gray, T. J. und Ioannides, C.** (1996). Interaction with the aromatic hydrocarbon receptor, CYP1A induction, and mutagenicity of a series of diaminotoluenes: implications for their carcinogenicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 139(1): 203-211.
- Chikan, N. A., Shabir, N., Shaff, S., Mir, M. R. und Patel, T. N.** (2012). N-nitrosodimethylamine in the Kashmiri diet and possible roles in the high incidence of gastrointestinal cancers. *Asian Pac J Cancer Prev* 13(3): 1077-1079.
- Chowdhury, G., Calcutt, M. W., Nagy, L. D. und Guengerich, F. P.** (2012). Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry* 51(50): 9995-10007.
- Cogliano, V. J., Baan, R. A., Straif, K., Grosse, Y., Secretan, B. und El Ghissassi, F.** (2008). Use of mechanistic data in IARC evaluations. *Environ Mol Mutagen* 49(2): 100-109.
- Cohen, S. M. und Arnold, L. L.** (2011). Chemical carcinogenesis. *Toxicol Sci* 120 Suppl 1: S76-92.45

- Croom, E.** (2012). Metabolism of xenobiotics of human environments. *Prog Mol Biol Transl Sci* 112: 31-88.
- Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A. D., Murray, C. J., Ezzati, M. und the Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers)** (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366(9499): 1784-1793.
- Dearfield, K. L., Jacobson-Kram, D., Brown, N. A. und Williams, J. R.** (1983). Evaluation of a human hepatoma cell line as a target cell in genetic toxicology. *Mutat Res* 108(1-3): 437-449.
- Dellaire, G., Kepkay, R. und Bazett-Jones, D. P.** (2009). High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin, gamma-H2A.X and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci. *Cell Cycle* 8(22): 3750-3769.
- Devasagayam, T. P., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S. und Lele, R. D.** (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52: 794-804.
- Diaz, D., Scott, A., Carmichael, P., Shi, W. und Costales, C.** (2007). Evaluation of an automated in vitro micronucleus assay in CHO-K1 cells. *Mutat Res* 630(1-2): 1-13.
- Dickinson, D. A. und Forman, H. J.** (2002). Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochem Pharmacol* 64(5-6): 1019-1026.
- Diderich, K., Alanazi, M. und Hoeijmakers, J. H.** (2011). Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair (Amst)* 10(7): 772-780.
- Dietz, Y.** (2009). Diplomarbeit: Nachweis der Genotoxizität in vitro- Die Rolle der metabolischen Aktivierung, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Doll, R. und Peto, R.** (1981). The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J Natl Cancer Inst* 66(6): 1191-1308.
- Eisenbrand, G., Metzler, M. und Hennecke, F. J.** (2005). Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner; Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

- EMA** (2006). Guideline on the limits of genotoxic impurities. [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2009/09/WC500002903.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002903.pdf). Abgerufen am 28.07.2013.
- Europäische Kommission** (2013). [http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_en.htm). Abgerufen am 18.11.2013.
- Ezoe, S.** (2012). Secondary leukemia associated with the anti-cancer agent, etoposide, a topoisomerase II inhibitor. *Int J Environ Res Public Health* 9(7): 2444-2453.
- Faqi, A. S.** (2013). *A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development*, Academic Press, London, Waltham, San Diego.
- Fatur, T., Lah, T. T. und Filipic, M.** (2003). Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 529(1-2): 109-116.
- FDA** (2012). Drug Interaction Studies- Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations Draft Guidance. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf>. Abgerufen am 25.12.2012.
- Fioravanzo, E., Bassan, A., Pavan, M., Mostrag-Szlichtyng, A. und Worth, A. P.** (2012). Role of in silico genotoxicity tools in the regulatory assessment of pharmaceutical impurities. *SAR QSAR Environ Res* 23(3-4): 257-277.
- Fischer, S. J., Benson, L. M., Fauq, A., Naylor, S. und Windebank, A. J.** (2008). Cisplatin and dimethyl sulfoxide react to form an adducted compound with reduced cytotoxicity and neurotoxicity. *Neurotoxicology* 29(3): 444-452.
- Flatt, P. M. und Pietenpol, J. A.** (2000). Mechanisms of cell-cycle checkpoints: at the crossroads of carcinogenesis and drug discovery. *Drug Metab Rev* 32(3-4): 283-305.
- Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S. und Carmichael, P.** (2012a). Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutat Res* 742(1-2): 11-25.

- Fowler, P., Smith, R., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S. und Carmichael, P.** (2012b). Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. II. Importance of accurate toxicity measurement. *Mutat Res* 747(1): 104-117.
- Freissmuth, M., Offermanns, S. und Böhm, S.** (2012). *Pharmakologie & Toxikologie*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Fu, S., Yang, Y., Das, T. K., Yen, Y., Zhou, B. S., Zhou, M. M., Ohlmeyer, M., Ko, E. C., Cagan, R., Rosenstein, B. S., Chen, S. H. und Kao, J.** (2012). gamma-H2AX kinetics as a novel approach to high content screening for small molecule radiosensitizers. *PLoS One* 7(6): e38465.
- Garcia-Canton, C., Anadon, A. und Meredith, C.** (2012). gammaH2AX as a novel endpoint to detect DNA damage: applications for the assessment of the in vitro genotoxicity of cigarette smoke. *Toxicol In Vitro* 26(7): 1075-1086.
- Gates, K. S.** (2009). An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol* 22(11): 1747-1760.
- Gor, P. P., Su, H. I., Gray, R. J., Gimotty, P. A., Horn, M., Aplenc, R., Vaughan, W. P., Tallman, M. S., Rebbeck, T. R. und DeMichele, A.** (2010). Cyclophosphamide-metabolizing enzyme polymorphisms and survival outcomes after adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: a retrospective cohort study. *Breast Cancer Res* 12(3): R26.
- Graefe, K. H., Lutz, W. und Bönisch, H.** (2011). *Pharmakologie und Toxikologie*, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Gross-Steinmeyer, K. und Eaton, D. L.** (2012). Dietary modulation of the biotransformation and genotoxicity of aflatoxin B(1). *Toxicology* 299(2-3): 69-79.
- Halliwell, B.** (2008). Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? *Arch Biochem Biophys* 476(2): 107-112.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.

**Haney, S. A.** (2008). High Content Screening: Science, Techniques and Applications, John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.

**Henger, S.** (2011). Bachelorarbeit: Nachweis der Genotoxizität in vitro mittels eines GADD45 $\alpha$ -Reportergenassays, Hochschule Mannheim.

**Hewitt, N. J. und Hewitt, P.** (2004). Phase I and II enzyme characterization of two sources of HepG2 cell lines. *Xenobiotica* 34(3): 243-256.

**Hewitt, N. J., Lechon, M. J., Houston, J. B., Hallifax, D., Brown, H. S., Maurel, P., Kenna, J. G., Gustavsson, L., Lohmann, C., Skonberg, C., Guillouzo, A., Tuschl, G., Li, A. P., LeCluyse, E., Groothuis, G. M. und Hengstler, J. G.** (2007a). Primary hepatocytes: current understanding of the regulation of metabolic enzymes and transporter proteins, and pharmaceutical practice for the use of hepatocytes in metabolism, enzyme induction, transporter, clearance, and hepatotoxicity studies. *Drug Metab Rev* 39(1): 159-234.

**Hewitt, N. J., Lecluyse, E. L. und Ferguson, S. S.** (2007b). Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations. *Xenobiotica* 37(10-11): 1196-1224.

**Hou, Y. N., Lavaf, A., Huang, D., Peters, S., Huq, R., Friedrich, V., Rosenstein, B. S. und Kao, J.** (2009). Development of an automated gamma-H2AX immunocytochemistry assay. *Radiat Res* 171(3): 360-367.

**Hukkanen, J.** (2012). Induction of cytochrome P450 enzymes: a view on human in vivo findings. *Expert Rev Clin Pharmacol* 5(5): 569-585.

**IARC** (2006). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans PREAMBLE. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>. Abgerufen am 18.01.2013.

**ICH** (1996). Specific Aspects of Regulatory Genotoxicity Tests for Pharmaceuticals S2A. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074925.pdf>. Abgerufen am 08.09.2013.

**ICH** (1997). Genotoxicity: A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals S2B. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm074929.pdf>. Abgerufen am 08.09.2013.

- ICH** (2006). Impurities In New Drug Substances Q3A(R2). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3A\\_R2/Step4/Q3A\\_R2\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2__Guideline.pdf). Abgerufen am 07.08.2013.
- ICH** (2009a). Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and marketing authorisation for Pharmaceuticals M3(R2). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3\\_R2/Step4/M3\\_R2\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Multidisciplinary/M3_R2/Step4/M3_R2__Guideline.pdf). Abgerufen am 06.05.2013.
- ICH** (2009b). Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals S9. [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9\\_Step4\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S9/Step4/S9_Step4_Guideline.pdf). Abgerufen am 06.08.2013.
- ICH** (2011a). Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use S2(R1). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S2\\_R1/Step4/S2R1\\_Step4.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf). Abgerufen am 24.02.2013.
- ICH** (2011b). Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals S6(R1). [http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S6\\_R1/Step4/S6\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf). Abgerufen am 06.08.2013.
- Ivashkevich, A., Redon, C. E., Nakamura, A. J., Martin, R. F. und Martin, O. A.** (2012). Use of the gamma-H2AX assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Lett* 327(1-2): 123-133.
- Jamieson, E. R. und Lippard, S. J.** (1999). Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem Rev* 99(9): 2467-2498.
- Jannig, W. und Knust, E.** (2004). *Genetik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Jennings, P., Limonciel, A., Felice, L. und Leonard, M. O.** (2013). An overview of transcriptional regulation in response to toxicological insult. *Arch Toxicol* 87(1): 49-72.
- Kaina, B., Christmann, M., Naumann, S. und Roos, W. P.** (2007). MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst)* 6(8): 1079-1099.
- Kamileri, I., Karakasilioti, I. und Garinis, G. A.** (2012). Nucleotide excision repair: new tricks with old bricks. *Trends Genet* 28(11): 566-573.

- Khoury, L., Zalko, D. und Audebert, M.** (2013). Validation of high-throughput genotoxicity assay screening using gammaH2AX in-cell western assay on HepG2 cells. *Environ Mol Mutagen*.
- Kim, S., Jun, D. H., Kim, H. J., Jeong, K. C. und Lee, C. H.** (2011). Development of a high-content screening method for chemicals modulating DNA damage response. *J Biomol Screen* 16(2): 259-265.
- Kirkland, D., Aardema, M., Muller, L. und Makoto, H.** (2006). Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mutat Res* 608(1): 29-42.
- Kirkland, D., Kasper, P., Muller, L., Corvi, R. und Speit, G.** (2008). Recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of the performance of new or improved genotoxicity tests: a follow-up to an ECVAM workshop. *Mutat Res* 653(1-2): 99-108.
- Kirkland, D., Pfuhler, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J. R., Muller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., van Benthem, J., Vanparrys, P. und White, P.** (2007). How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutat Res* 628(1): 31-55.
- Knippers, R.** (2006). *Molekulare Genetik*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 9.
- Köhler, W., Schachtel, G. und Voleske, P.** (2007). *Biostatistik*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Li, F., Patterson, A. D., Hofer, C. C., Krausz, K. W., Gonzalez, F. J. und Idle, J. R.** (2010). Comparative metabolism of cyclophosphamide and ifosfamide in the mouse using UPLC-ESI-QTOFMS-based metabolomics. *Biochem Pharmacol* 80(7): 1063-1074.
- Life Technologies** (2008). CellTracker™ Probes for Long-Term Tracing of Living Cells. <http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/mp02925.pdf>. Abgerufen am 25.03.2013.
- Lützen, A., Liberti, S. E. und Rasmussen, L. J.** (2004). Cadmium inhibits human DNA mismatch repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 321(1): 21-25.

- Luzy, A. P., Orsini, N., Linget, J. M. und Bouvier, G.** (2012). Evaluation of the GADD45alpha-GFP GreenScreen HC assay for rapid and reliable in vitro early genotoxicity screening. *J Appl Toxicol*.
- Mailhes, J. B., Marchetti, F., Young, D. und London, S. N.** (1996). Numerical and structural chromosome aberrations induced by etoposide (VP16) during oocyte maturation of mice: transmission to one-cell zygotes and damage to dictyate oocytes. *Mutagenesis* 11(4): 357-361.
- Malayappan, B., Johnson, L., Nie, B., Panchal, D., Matter, B., Jacobson, P. und Tretyakova, N.** (2010). Quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry analysis of bis-N7-guanine DNA-DNA cross-links in white blood cells of cancer patients receiving cyclophosphamide therapy. *Anal Chem* 82(9): 3650-3658.
- Marquardt, H., Schäfer, S. und Barth, B.** (2013). *Toxikologie*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F. und Kassie, F.** (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology* 198(1-3): 329-340.
- Mondal, N. K., Mukherjee, B., Das, D. und Ray, M. R.** (2010). Micronucleus formation, DNA damage and repair in premenopausal women chronically exposed to high level of indoor air pollution from biomass fuel use in rural India. *Mutat Res* 697(1-2): 47-54.
- Nam, E. A., Zhao, R., Glick, G. G., Bansbach, C. E., Friedman, D. B. und Cortez, D.** (2011). Thr-1989 phosphorylation is a marker of active ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) kinase. *J Biol Chem* 286(33): 28707-28714.
- Neumann, H. G.** (2009). Risk assessment of chemical carcinogens and thresholds. *Crit Rev Toxicol* 39(6): 449-461.
- Oda, Y., Nakamura, S., Oki, I., Kato, T. und Shinagawa, H.** (1985). Evaluation of the new system (umu-test) for the detection of environmental mutagens and carcinogens. *Mutat Res* 147(5): 219-229.

**OECD** (2009). OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS 451 Carcinogenicity Studies. <http://www.oecd-ilibrary.org/docserver/download/9745101e.pdf?expires=1375913705&id=id&accname=guest&checksum=5BFC203B9936DEBB0834998E118A9231>. Abgerufen am 07.08.2013.

**Papadopoulos, N. G., Dedoussis, G. V., Spanakos, G., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N. und Papamichail, M.** (1994). An improved fluorescence assay for the determination of lymphocyte-mediated cytotoxicity using flow cytometry. *J Immunol Methods* 177(1-2): 101-111.

**Paramanathan, T., Vladescu, I., McCauley, M. J., Rouzina, I. und Williams, M. C.** (2012). Force spectroscopy reveals the DNA structural dynamics that govern the slow binding of Actinomycin D. *Nucleic Acids Res* 40(11): 4925-4932.

**Pena-Diaz, J. und Jiricny, J.** (2012). Mammalian mismatch repair: error-free or error-prone? *Trends Biochem Sci* 37(5): 206-214.

**Peng, C., Arthur, D., Liu, F., Lee, J., Xia, Q., Lavin, M. F. und Ng, J. C.** (2013). Genotoxicity of hydroquinone in A549 cells. *Cell Biol Toxicol* 29(4): 213-227.

**Pérez-Pastén, R., Martínez-Galero, E., Garduno-Siciliano, L., Lara, I. C. und Cevallos, G. C.** (2006). Effects of dimethylsulphoxide on mice arsenite-induced dysmorphogenesis in embryo culture and cytotoxicity in embryo cells. *Toxicol Lett* 161(3): 167-173.

**Pratt, I., Barlow, S., Kleiner, J. und Larsen, J. C.** (2009). The influence of thresholds on the risk assessment of carcinogens in food. *Mutat Res* 678(2): 113-117.

**Promega** (2011). Technical Bulletin CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay.

**Promega** (2012). Technical Bulletin P450-Glo<sup>™</sup> Assays.

**Quillardet, P., Huisman, O., D'Ari, R. und Hofnung, M.** (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(19): 5971-5975.

**Rajakrishna, L., Krishnan Unni, S., Subbiah, M., Sadagopan, S., Nair, A. R., Chandrappa, R., Sambasivam, G. und Sukumaran, S. K.** (2013). Validation of a human cell based high-throughput genotoxicity assay 'Anthem's Genotoxicity screen' using ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals. *Toxicol In Vitro*.

- Reinhardt, H. C. und Schumacher, B.** (2012). The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* 28(3): 128-136.
- Rendic, S. und Guengerich, F. P.** (2012). Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism. *Chem Res Toxicol* 25(7): 1316-1383.
- Robert Koch-Institut** (2012). Krebs in Deutschland 2007/2008. [http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2012.pdf?__blob=publicationFile). Abgerufen am 25.12.2012.
- Rodriguez-Antona, C. und Ingelman-Sundberg, M.** (2006). Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer. *Oncogene* 25(11): 1679-1691.
- Roos, W. P. und Kaina, B.** (2013). DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett* 332(2): 237-248.
- Russell, W. M. S. und Burch, R. L.** (1959). The Principles of Humane Experimental Technique. [http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane\\_exp/het-toc](http://altweb.jhsph.edu/pubs/books/humane_exp/het-toc). Abgerufen am 25.03.2013.
- Sahu, R. P., Epperly, M. W. und Srivastava, S. K.** (2009). Benzyl isothiocyanate sensitizes human pancreatic cancer cells to radiation therapy. *Front Biosci (Elite Ed)* 1: 568-576.
- Schärfe System** (2003). CASY<sup>®</sup> Model TCC Bedienungsanleitung, Reutlingen.
- Schorr, S., Schneider, S., Lammens, K., Hopfner, K. P. und Carell, T.** (2010). Mechanism of replication blocking and bypass of Y-family polymerase {eta} by bulky acetylaminofluorene DNA adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(48): 20720-20725.
- Serafimova, R., Gatnik, M. F. und Worth, A.** (2010). Review of QSAR Models and Software Tools for Predicting Genotoxicity and Carcinogenicity. [http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our\\_labs/predictive\\_toxicology/doc/EUR\\_24427\\_EN.pdf](http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/predictive_toxicology/doc/EUR_24427_EN.pdf). Abgerufen am 11.08.2013.
- Seripa, D., Pilotto, A., Panza, F., Matera, M. G. und Pilotto, A.** (2010). Pharmacogenetics of cytochrome P450 (CYP) in the elderly. *Ageing Res Rev* 9(4): 457-474.
- Séverin, I., Jondeau, A., Dahbi, L. und Chagnon, M. C.** (2005). 2,4-Diaminotoluene (2,4-DAT)-induced DNA damage, DNA repair and micronucleus formation in the human hepatoma cell line HepG2. *Toxicology* 213(1-2): 138-146.

- Seviour, D. K., Pelkonen, O. und Ahokas, J. T.** (2012). Hepatocytes: the powerhouse of biotransformation. *Int J Biochem Cell Biol* 44(2): 257-261.
- Shahidi, F.** (2000). Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung* 44(3): 158-163.
- Shibuya, T. und Morimoto, K.** (1993). A review of the genotoxicity of 1-ethyl-1-nitrosourea. *Mutat Res* 297(1): 3-38.
- Shiloh, Y. und Ziv, Y.** (2013). The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14(4): 197-210.
- Sigel, A., Sigel, H. und Sigel, R. K.** (2011). Metal ions in toxicology: effects, interactions, interdependencies. *Met Ions Life Sci* 8: vii-viii.
- Simpson, K., Bevan, N., Hastwell, P., Eidam, P., Shah, P., Gogo, E., Rees, S. und Brown, A.** (2013). The BlueScreen-384 assay as an indicator of genotoxic hazard potential in early-stage drug discovery. *J Biomol Screen* 18(4): 441-452.
- Sirbu, B. M. und Cortez, D.** (2013). DNA damage response: three levels of DNA repair regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(8).
- Statistisches Bundesamt** (2012). Todesfälle 2011 leicht rückläufig – häufigste Todesursache Herz-/Kreislaufkrankungen, Pressemitteilung vom 6. Dezember 2012 – 425/12. [https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/12/PD12\\_425\\_232.pdf.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2012/12/PD12_425_232.pdf.pdf?__blob=publicationFile). Abgerufen am 25.12.2012.
- Storm, R.** (1995). Wahrscheinlichkeitsrechnung mathematische Statistik und statistische Qualitätskontrolle, Fachbuchverlag, Leipzig-Köln.
- Streffler, C., Bolt, H. M., Føllesdal, D., Hall, P., Hengstler, J. G., Jacob, P., Oughton, D., Priess, K., Rehbinder, E. und Swaton, E.** (2004). Environmental Standards—Dose-Effect Relations in the Low Dose Range and Risk Evaluation, Springer-Verlag, Berlin.
- Sutter, A., Amberg, A., Boyer, S., Brigo, A., Contrera, J. F., Custer, L. L., Dobo, K. L., Gervais, V., Glowienke, S., Gompel, J. V., Greene, N., Muster, W., Nicolette, J., Reddy, M. V., Thybaud, V., Vock, E., White, A. T. und Muller, L.** (2013). Use of in silico systems and expert knowledge for structure-based assessment of potentially mutagenic impurities. *Regul Toxicol Pharmacol*.

**Taylor, D. L., Haskins, J. R. und Giuliano, K. A.** (2007). High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.

**Thermo Scientific** (2010). Thermo Scientific Cellomics® BioApplication Guide.

**Tubbs, J. L., Pegg, A. E. und Tainer, J. A.** (2007). DNA binding, nucleotide flipping, and the helix-turn-helix motif in base repair by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase and its implications for cancer chemotherapy. *DNA Repair (Amst)* 6(8): 1100-1115.

**Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J. C., Le Bon, A. M. und Chagnon, M. C.** (2003). Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutat Res* 536(1-2): 79-90.

**van der Lelie, D., Regniers, L., Borremans, B., Provoost, A. und Verschaeve, L.** (1997). The VITOTOX test, an SOS bioluminescence *Salmonella typhimurium* test to measure genotoxicity kinetics. *Mutat Res* 389(2-3): 279-290.

**Verma, N., Pink, M., Rettenmeier, A. W. und Schmitz-Spanke, S.** (2012). Review on proteomic analyses of benzo[a]pyrene toxicity. *Proteomics* 12(11): 1731-1755.

**Verna, L., Whysner, J. und Williams, G. M.** (1996). 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71(1-2): 83-105.

**Wain, H. M., Bruford, E. A., Lovering, R. C., Lush, M. J., Wright, M. W. und Povey, S.** (2002). Guidelines for human gene nomenclature. *Genomics* 79(4): 464-470.

**Wang, Y. M., Ong, S. S., Chai, S. C. und Chen, T.** (2012). Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 8(7): 803-817.

**Westerink, W. M., Schirris, T. J., Horbach, G. J. und Schoonen, W. G.** (2011). Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. *Mutat Res* 724(1-2): 7-21.

**Westerink, W. M. und Schoonen, W. G.** (2007). Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol In Vitro* 21(8): 1581-1591.

- Westerink, W. M., Stevenson, J. C., Horbach, G. J. und Schoonen, W. G.** (2010). The development of RAD51C, Cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. *Mutat Res* 696(1): 21-40.
- Westerink, W. M., Stevenson, J. C., Lauwers, A., Griffioen, G., Horbach, G. J. und Schoonen, W. G.** (2009). Evaluation of the Vitotox and RadarScreen assays for the rapid assessment of genotoxicity in the early research phase of drug development. *Mutat Res* 676(1-2): 113-130.
- Westphal, G. A., Bunger, J., Schulz, T. G., Muller, M. M. und Hallier, E.** (2000). Mutagenicity of N-nitrosodiethylamine in the Ames test with *S. typhimurium* TA1535 is due to volatile metabolites and is not dependent on cytochrome P4502E1 induction. *Arch Toxicol* 74(10): 638-641.
- Wu, X., Yalowich, J. C. und Hasinoff, B. B.** (2011). Cadmium is a catalytic inhibitor of DNA topoisomerase II. *J Inorg Biochem* 105(6): 833-838.
- Yang, W.** (2011). Surviving the sun: repair and bypass of DNA UV lesions. *Protein Sci* 20(11): 1781-1789.
- Yoshinari, K., Yoda, N., Toriyabe, T. und Yamazoe, Y.** (2010). Constitutive androstane receptor transcriptionally activates human CYP1A1 and CYP1A2 genes through a common regulatory element in the 5'-flanking region. *Biochem Pharmacol* 79(2): 261-269.
- Zanger, U. M. und Schwab, M.** (2013). Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther* 138(1): 103-141.
- Zhan, Q.** (2005). Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage. *Mutat Res* 569(1-2): 133-143.
- Zhou, B. B. und Bartek, J.** (2004). Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat Rev Cancer* 4(3): 216-225.
- Ziech, D., Franco, R., Pappa, A., Malamou-Mitsi, V., Georgakila, S., Georgakilas, A. G. und Panayiotidis, M. I.** (2010). The role of epigenetics in environmental and occupational carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 188(2): 340-349.



## **7 Lebenslauf**







## 8 Anhang

### 8.1 Protokolle zur Bildaufnahme und -analyse der Genotoxizitätsexperimente

Dargestellt sind die verwendeten Protokolle zur Bildaufnahme und -analyse mit der Software ArrayScan® V<sup>TI</sup> Scan (iDev and classic) Version 7.6.2.4. Die Belichtungszeiten wurden in jedem Versuch angepasst, sodass eine konstante Sättigung der Belichtung über alle Experimente eingehalten wurde.

Protokollparameter	Experiment zur Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker		Experiment zur Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker	
	Immunofluoreszenzfärbung	Zytotoxizitätsbestimmung	Färbung A	Färbung B
<b>Image Acquisition</b>				
<i>Objective</i>	20x	10x	20x	20x
<i>Camera Name</i>	ORCA-ER;1.00	ORCA-ER;1.00	ORCA-ER;1.00	ORCA-ER;1.00
<i>Acquisition Camera Mode</i>	Standard (1024x1024;2x2)	Standard (1024x1024;2x2)	Standard (1024x1024;2x2)	Standard (1024x1024;2x2)
<i>AutoFocus Camera Mode</i>	<i>AutoFocus</i> (1024x1024;4x4)	<i>AutoFocus</i> (1024x1024;4x4)	<i>AutoFocus</i> (1024x1024;4x4)	<i>AutoFocus</i> (1024x1024;4x4)
<i>AutoFocus Field Interval</i>	2	2	2	2
<b>AutoFocus Parameters</b>				
<i>Fine Focus Step Size</i>	9,9	17,6	9,9	9,9
<i>Fine Focus Plane Count</i>	9	9	9	9
<i>Coarse Focus Step Size</i>	39,6	70,4	39,6	39,6
<i>Coarse Focus Plane Count</i>	16	9	16	16
<i>Smart Focus Plane Count</i>	21	21	21	21
<i>Use Extended Range Focusing</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>Apply Backlash Correction</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>AutoFocus Method</i>	STANDARD	STANDARD	STANDARD	STANDARD
<i>Use Relaxed Pass/Fail Criteria</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>Focus Edge Threshold</i>	0	0	0	0
<i>Focus Adjustment</i>	0	0	0	0
<i>Focus Score Min Ratio</i>	0,25	0,2	0,25	0,25
<i>Focus Score Mid Ratio</i>	0,4	0,4	0,4	0,4
<i>Focus Score Max Ratio</i>	0,5	0,5	0,5	0,5
<i>Focus Exposure Time for AutoExpose (seconds)</i>	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Scan Limits</b>				
<i>Max Fields for Well</i>	30	20	50	50
<i>Min Objects for Well</i>	500	No Limit	No Limit	No Limit
<i>Max Sparse Fields for Well</i>	20	5	10	10
<i>Min Objects for Field</i>	1	1	1	1
<i>Max Sparse Wells for Plate</i>	<i>No Limit</i>	<i>No Limit</i>	<i>No Limit</i>	<i>No Limit</i>
<b>Channel 1: nucleus</b>				
<i>Dye</i>	XF93 - Hoechst	XF93 - Hoechst	XF93 - Hoechst	XF93 - Hoechst
<i>Apply Illumination Correction</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>

Protokollparameter	Experiment zur Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker		Experiment zur Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker	
	Immunofluoreszenzfärbung	Zytotoxizitätsbestimmung	Färbung A	Färbung B
<i>Apply Background Correction</i>	<i>True</i>	<i>True</i>	<i>True</i>	<i>True</i>
<i>Gain</i>	25	25	25	25
<i>Use Apotome</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>Z Offset</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>Exposure Parameters</b>				
<i>Method</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>
<i>Exposure Time (seconds)</i>	-	-	-	-
<i>Method</i>	<i>IsodataThreshold</i>	<i>IsodataThreshold</i>	<i>IsodataThreshold</i>	<i>IsodataThreshold</i>
<i>IsodataThreshold</i>	-0,469	-0,392	-0,469	-0,469
<b>Object Selection Parameter (Min/Max)</b>				
<i>NucAreaCh1</i>	130/-1519	34/1030	130/-1519	130/-1519
<i>NucShapeP2Ach1</i>	0,1/1,369	0,1/1,415	0,1/1,369	0,1/1,369
<i>NucShapeLWRCh1</i>	0,1/2,115	0,1/2	0,1/2,115	0,1/2,115
<i>NucVarIntenCh1</i>	0/799	0/32767	0/799	0/799
<i>NucAvgIntenCh1</i>	1/222	1/2384,703	1/222	1/222
<i>NucTotalIntenCh1</i>	1/111147166,637	1/111147166,637	1/111147166,637	1/111147166,637
<b>Channel 2-4: Target</b>				
<i>Channel 2 Dye</i>	XF93 - FITC	XF93 - FITC	XF93 - FITC	XF93 - FITC
<i>Channel 3 Dye</i>	-	-	XF93 - TRITC	XF93 - TRITC
<i>Channel 4 Dye</i>	-	-	XF110 - Cy5 (sensitive)	XF110 - Cy5 (sensitive)
<i>Apply Illumination Correction</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>Apply Background Correction</i>	<i>True</i>	<i>True</i>	<i>True</i>	<i>True</i>
<i>Gain</i>	25	25	25	25
<i>Use Apotome</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>	<i>False</i>
<i>Z Offset</i>	0,00	-1,3	0,00	0,00
<b>Exposure Parameters</b>				
<i>Method</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>	<i>Fixed</i>
<i>Exposure Time (seconds)</i>	-	-	-	-
<b>Object Identification (Min/Max)</b>				
<i>AvgIntenCh2-4</i>	1/4095	1/4095	1/4095	1/4095
<i>TotalIntenCh2-4</i>	1/111147166,637	1/111147166,637	1/111147166,637	1/111147166,637
<b>Assay</b>				
<i>Assay Algorithm</i>	<i>Molecular Translocation.V4</i>	<i>Molecular Translocation.V4</i>	<i>Molecular Translocation.V4</i>	<i>Molecular Translocation.V4</i>
<i>Assay Version</i>	6.0 (Locally Installed Version: 6.0.0.4003)	6.0 (Locally Installed Version: 6.0.0.4003)	6.0 (Locally Installed Version: 6.0.0.4003)	6.0 (Locally Installed Version: 6.0.0.4003)
<i>Focus Channel</i>	1	1	1	1
<i>#Channels</i>	2	2	4	4
<b>Assay Parameters</b>				
<i>BackgroundCorrectionCh1</i>	66	7	66	66
<i>BackgroundCorrection Ch2-4</i>	-255	-255	-255	-255

Protokollparameter	Experiment zur Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker		Experiment zur Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker	
	Immunofluoreszenzfärbung	Zytotoxizitätsbestimmung	Färbung A	Färbung B
<i>CircModifier</i>	0	0	0	0
<i>MaskModifierCh2-4</i>	0	0	0	0
<i>NucSegmentationCh1</i>	7	1	7	7
<i>NucSmoothFactorCh1</i>	4	2	4	4
<i>NucTypeCh1</i>	0	0	0	0
<i>RejectBorderNucsCh1</i>	0	0	0	0
<i>RingDistance</i>	0	0	0	0
<i>RingWidth</i>	5	5	5	5
<i>TargetTypeCh2-4</i>	0	0	0	0
<i>UseReferenceWells</i>	0	0	0	0



## 8.2 Viabilitätsbestimmung von 3-Methylcholanthren, Omeprazol, Phenobarbital und Rifampicin

Zur Dosisfindung der Induktoren 3-Methylcholanthren (3-MC), Omeprazol (OMEP), Phenobarbital (PB) und Rifampicin (RIF) wurde ein Viabilitätstest durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Viabilität zur Kontrolle aus den vierfachen Bestimmungen bei verschiedenen Induktorkonzentrationen wie auch die zugehörige Standardabweichung und der mittels Student's T-Test bestimmte p-Wert. Ist eine Ermittlung des EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub> und EC<sub>80</sub> anhand der Dosis-Wirkungskurve mit der Software Origin Lab Version 8.1 möglich gewesen, so sind diese aufgezeigt.

### Viabilitätsbestimmung von 3-Methylcholanthren

Konzentration 3-MC [ $\mu\text{M}$ ]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
Viabilität zur Kontrolle	1,057	1,052	1,012	1,021	0,235	0,200
Standardabweichung	0,060	0,025	0,029	0,029	0,024	0,021
p-Wert	0,1503	0,0352	0,1761	0,2295	0,0005	0,0005

### Viabilitätsbestimmung von Omeprazol

Konzentration OMEP [ $\mu\text{M}$ ]	0,01	0,1	1	10	100	1000
Viabilität zur Kontrolle	1,053	1,028	0,981	1,017	0,979	0,001
Standardabweichung	0,020	0,017	0,026	0,024	0,045	0,001
p-Wert	0,0110	0,0395	0,0605	0,2327	0,3619	0,0002

### Viabilitätsbestimmung von Rifampicin

Konzentration RIF [ $\mu\text{M}$ ]	0,001	0,01	0,1	1	10	100
Viabilität zur Kontrolle	1,033	1,031	1,072	1,062	1,044	0,895
Standardabweichung	0,015	0,022	0,026	0,049	0,016	0,035
p-Wert	0,0361	0,0565	0,0005	0,0618	0,0033	0,0085

### Viabilitätsbestimmung von Phenobarbital

Konzentration PB [ $\mu\text{M}$ ]	0,01	0,1	1	10	100	1000
Viabilität zur Kontrolle	1,022	1,080	1,043	1,040	1,036	0,914
Standardabweichung	0,027	0,027	0,022	0,045	0,027	0,038
p-Wert	0,1847	0,0055	0,0107	0,1620	0,0648	0,0244

### Bestimmung des EC<sub>20</sub>, EC<sub>50</sub> und EC<sub>80</sub> von 3-Methylcholanthren und Omeprazol

Induktor	3-MC	OMEP
EC <sub>20</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	2,21	131,88
EC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	3,52	163,57
EC <sub>80</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	5,60	202,87



### 8.3 Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker

Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der neun Antikörper gegen p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14), p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thr68), GADD45A, p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15) nach Immunofluoreszenzfärbung ohne und mit Zugabe des zugehörigen Blockpeptids (-/+BP). Die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenzintensitäten  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Actinomycin D (ACT).

Parameter		-BP			+BP		
		DMSO 1 %	unbehandelt	ACT 0,01 $\mu$ M	DMSO 1 %	unbehandelt	ACT 0,01 $\mu$ M
p-ATM (Ser1981)	MW	311,833	330,347	351,923	27,495	27,075	28,245
	SD	49,570	13,759	85,265	2,172	0,229	1,344
p-ATR (Ser428)	MW	166,465	125,617	355,518	32,845	30,813	34,608
	SD	13,538	6,760	22,834	2,504	1,348	1,762
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	MW	150,285	164,420	192,095	34,960	34,903	35,363
	SD	23,708	28,455	51,192	2,465	2,852	0,872
p-Chk1 (Ser345)	MW	152,473	188,755	195,028	38,178	37,365	41,407
	SD	52,691	76,111	37,204	2,601	1,785	4,899
p-Chk2 (Thr68)	MW	94,442	100,855	109,147	46,267	38,835	41,643
	SD	8,808	6,595	7,524	7,694	1,421	1,778
GADD45A	MW	141,295	128,765	162,965	30,330	28,718	28,065
	SD	4,404	8,348	18,805	1,274	1,519	1,294
p-H2AX (Ser139)	MW	84,168	106,083	64,683	38,045	33,035	32,987
	SD	4,979	4,982	1,470	4,937	3,292	1,621
p21	MW	164,460	103,268	371,282	30,410	31,795	28,917
	SD	8,173	17,170	47,670	1,047	3,080	0,968
p-p53 (Ser15)	MW	178,253	189,553	239,802	22,718	23,112	23,158
	SD	25,645	20,307	32,813	0,360	0,319	0,629



#### **8.4 Genotoxizitätsbestimmung der Auswahl der putativen Genotoxizitätsmarker**

Dargestellt sind die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle der neun Proteine p-ATM (Ser1981), p-ATR (Ser428), p-CDC2 (Tyr15/Thr14), p-Chk1 (Ser345), p-Chk2 (Thr68), GADD45A, p-H2AX (Ser139), p21 und p-p53 (Ser15) wie auch der beiden Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA). Die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF)  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus vier Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die ermittelten p-Werte (p-W) aus dem Student's T-Test für die jeweiligen getesteten Konzentrationen (Konz) sind aufgezeigt. Progenotoxische Substanzen wurden im Gegensatz zu direkt genotoxischen Substanzen mit metabolischem Aktivierungssystem (MAS) getestet.

Substanz		Methylmethansulfonat (MMS) –MAS [ $\mu$ M]						
		15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000
Parameter								
SSC	XF	1,173	1,124	1,031	0,776	0,629	0,324	0,070
	SD	0,301	0,253	0,258	0,144	0,170	0,081	0,063
	p-W	0,3600	0,4328	0,8758	0,0780	0,0393	0,0055	0,0024
CMFDA	XF	0,911	0,869	0,795	0,742	0,655	0,587	0,199
	SD	0,050	0,020	0,031	0,045	0,040	0,026	0,123
	p-W	0,0377	0,0015	0,0004	0,0015	0,0010	0,0001	0,0009
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,060	-1,236	-1,037	1,035	1,244	1,948	1,597
	SD	0,243	0,060	0,215	0,187	0,103	0,202	0,559
	p-W	0,7074	0,0039	0,8037	0,7478	0,0161	0,0026	0,0999
p-ATR (Ser428)	XF	-1,203	-1,245	-1,124	-1,190	1,231	1,731	3,281
	SD	0,104	0,173	0,083	0,063	0,051	0,089	0,263
	p-W	0,0227	0,0674	0,0572	0,0109	0,0051	0,0006	0,0026
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,018	1,047	-1,087	-1,060	1,111	1,618	1,642
	SD	0,152	0,255	0,097	0,072	0,052	0,167	0,272
	p-W	0,8639	0,7215	0,1597	0,2066	0,0220	0,0036	0,0234
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,289	-1,230	-1,082	-1,063	1,460	2,987	5,066
	SD	0,250	0,509	0,187	0,245	0,247	0,600	1,707
	p-W	0,1248	0,4019	0,3937	0,5385	0,0338	0,0025	0,0218
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,037	-1,325	-1,214	-1,079	1,059	1,711	1,343
	SD	0,196	0,509	0,284	0,195	0,450	0,286	0,790
	p-W	0,7526	0,1948	0,1943	0,5414	0,6681	0,0118	0,2926
GADD45A	XF	-1,206	-1,103	-1,369	-1,208	1,164	1,361	-1,664
	SD	0,108	0,461	0,235	0,261	0,162	0,240	0,818
	p-W	0,0257	0,8163	0,0460	0,2264	0,0992	0,0429	0,1607
p-H2AX (Ser139)	XF	1,125	1,155	1,234	1,582	3,550	6,484	9,512
	SD	0,101	0,077	0,130	0,229	0,469	0,333	1,311
	p-W	0,0844	0,0259	0,0333	0,0115	0,0012	0,0001	0,0007
p21	XF	-1,005	1,107	1,380	1,986	2,940	2,459	-2,238
	SD	0,179	0,132	0,255	0,203	0,434	0,324	0,897
	p-W	0,9396	0,2219	0,0293	0,0006	0,0030	0,0002	0,0430
p-p53 (Ser15)	XF	-1,048	-1,048	1,020	1,264	1,894	2,958	4,319
	SD	0,117	0,184	0,068	0,158	0,326	0,449	0,756
	p-W	0,4771	0,6598	0,6305	0,0376	0,0070	0,0010	0,0022

<b>Substanz</b>		<b>Actinomycin D (ACT) –MAS [µM]</b>						
<b>Parameter</b>		<b>0,0031</b>	<b>0,0063</b>	<b>0,0125</b>	<b>0,025</b>	<b>0,050</b>	<b>0,100</b>	<b>0,200</b>
SSC	XF	0,656	0,607	0,520	0,253	0,281	0,307	0,376
	SD	0,121	0,132	0,107	0,041	0,038	0,046	0,067
	p-W	0,0181	0,0181	0,0117	0,0035	0,0032	0,0036	0,0038
CMFDA	XF	0,728	0,804	0,791	0,830	0,845	0,855	0,792
	SD	0,017	0,020	0,030	0,023	0,023	0,048	0,013
	p-W	2E-06	0,0006	0,0015	0,0010	0,0010	0,0111	0,0002
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,083	1,056	1,225	1,630	1,419	1,332	1,550
	SD	0,143	0,171	0,270	0,202	0,481	0,202	0,221
	p-W	0,2822	0,5868	0,1504	0,0011	0,1531	0,0363	0,0042
p-ATR (Ser428)	XF	1,144	1,348	1,514	1,893	2,172	2,378	2,013
	SD	0,082	0,160	0,242	0,423	0,187	0,175	0,312
	p-W	0,0127	0,0053	0,0054	0,0072	5E-06	0,0008	0,0075
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,203	1,014	1,223	1,518	1,387	1,376	1,460
	SD	0,111	0,092	0,191	0,263	0,158	0,098	0,175
	p-W	0,0239	0,8525	0,0860	0,0136	0,0069	0,0003	0,0136
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,441	-1,151	1,004	1,582	2,668	2,609	2,537
	SD	0,125	0,341	0,150	0,198	0,661	0,740	0,309
	p-W	0,0039	0,4764	0,9316	0,0064	0,0106	0,0223	0,0026
p-Chk2 (Thr68)	XF	1,587	1,685	1,053	1,624	2,441	2,090	3,000
	SD	0,708	0,597	0,269	0,279	0,979	0,585	1,388
	p-W	0,0670	0,0296	0,9688	0,0078	0,0016	0,0280	0,0023
GADD45A	XF	1,072	1,144	1,095	1,198	-1,150	-1,311	-1,318
	SD	0,152	0,248	0,254	0,378	0,184	0,175	0,219
	p-W	0,4208	0,3070	0,4813	0,3464	0,1759	0,0378	0,0624
p-H2AX (Ser139)	XF	-2,546	-2,239	-1,660	-1,049	2,983	3,931	4,700
	SD	0,372	0,380	0,314	0,198	0,434	0,151	0,358
	p-W	0,0007	0,0017	0,0063	0,7298	0,0037	0,0003	0,0003
p21	XF	4,756	8,340	9,597	7,735	2,620	-1,650	-3,062
	SD	1,116	2,044	2,102	1,267	0,813	0,705	1,156
	p-W	0,0006	0,0009	4E-05	0,0009	0,0333	0,1202	0,0113
p-p53 (Ser15)	XF	-1,190	-1,045	1,011	1,112	2,849	3,436	3,867
	SD	0,103	0,217	0,058	0,174	0,293	0,357	0,269
	p-W	-1,1902	-1,0448	1,0113	1,1117	2,8490	3,4363	3,8670

Substanz		Etoposid (ETO) –MAS [µM]						
		0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2
Parameter								
SSC	XF	1,133	1,177	1,044	0,821	0,677	0,641	0,601
	SD	0,130	0,169	0,151	0,127	0,057	0,063	0,018
	p-W	0,1303	0,1052	0,5408	0,0655	0,0022	0,0009	0,0027
CMFDA	XF	1,133	1,102	1,215	1,232	1,191	1,220	1,175
	SD	0,435	0,331	0,376	0,391	0,330	0,385	0,403
	p-W	0,7404	0,7399	0,2992	0,2851	0,3085	0,3076	0,5086
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,061	-1,053	-1,049	1,003	1,052	1,027	1,100
	SD	0,028	0,064	0,025	0,122	0,072	0,026	0,043
	p-W	0,0222	0,2251	0,0282	0,9346	0,2126	0,1396	0,0255
p-ATR (Ser428)	XF	-1,061	1,039	-1,041	1,089	1,138	1,230	1,309
	SD	0,102	0,070	0,186	0,069	0,124	0,127	0,152
	p-W	0,3170	0,3487	0,7158	0,0833	0,1157	0,0370	0,0166
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	1,043	-1,041	1,069	-1,002	1,114	1,039	-1,097
	SD	0,211	0,143	0,224	0,226	0,183	0,179	0,101
	p-W	0,7104	0,5733	0,6254	0,9503	0,3197	0,7475	0,1539
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,020	1,001	1,144	1,111	1,614	1,941	2,303
	SD	0,232	0,057	0,196	0,152	0,163	0,310	0,287
	p-W	0,9062	0,9444	0,2543	0,2553	0,0060	0,0055	0,0025
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,193	-1,208	-1,026	1,788	2,367	2,187	2,625
	SD	0,185	0,625	0,540	0,744	0,640	0,756	0,610
	p-W	0,1324	0,5469	0,9428	0,1032	0,0033	0,0497	0,0008
GADD45A	XF	1,226	1,006	1,281	1,201	1,236	1,573	1,435
	SD	0,508	0,192	0,513	0,258	0,190	0,654	0,644
	p-W	0,4338	0,8994	0,3326	0,1231	0,0351	0,0684	0,1720
p-H2AX (Ser139)	XF	1,085	1,151	1,360	1,599	2,855	4,234	5,667
	SD	0,208	0,143	0,166	0,251	0,266	0,691	0,431
	p-W	0,4942	0,1122	0,0158	0,0096	0,0001	0,0004	1E-05
p21	XF	1,028	1,255	1,765	3,007	5,447	6,474	6,735
	SD	0,107	0,301	0,406	0,460	1,073	0,891	0,592
	p-W	0,5858	0,1968	0,0268	0,0006	0,0026	0,0021	0,0015
p-p53 (Ser15)	XF	1,038	1,064	1,206	1,495	2,083	2,498	2,671
	SD	0,097	0,102	0,134	0,106	0,139	0,287	0,190
	p-W	0,4858	0,2914	0,0561	0,0011	0,0001	0,0004	0,0001

Substanz		Cyclophosphamid (CPA) +MAS [ $\mu$ M]						
		3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Parameter								
SSC	XF	1,456	1,357	1,457	1,621	1,409	0,880	0,182
	SD	0,439	0,247	0,578	0,645	0,500	0,190	0,075
	p-W	0,1926	0,0220	0,1014	0,1447	0,3289	0,2399	0,0539
CMFDA	XF	1,016	0,920	0,743	0,693	0,621	0,421	0,449
	SD	0,042	0,019	0,122	0,065	0,074	0,155	0,411
	p-W	0,4932	0,0050	0,0234	0,0044	0,0007	0,0063	0,0804
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,197	-1,329	-1,256	1,023	1,130	2,438	1,131
	SD	0,113	0,156	0,243	0,111	0,146	0,051	0,222
	p-W	0,0255	0,0112	0,0930	0,6862	0,1755	0,0002	0,2712
p-ATR (Ser428)	XF	-1,027	-1,124	-1,094	1,161	1,193	2,763	-2,396
	SD	0,079	0,093	0,077	0,100	0,096	0,584	0,445
	p-W	0,5241	0,0744	0,0907	0,0485	0,0313	0,0130	0,0028
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,316	-1,339	-1,302	1,049	-1,193	1,044	-1,056
	SD	0,318	0,294	0,338	0,793	0,169	0,155	0,704
	p-W	0,1326	0,0955	0,1633	0,7810	0,1222	0,7235	0,8016
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,103	-1,026	1,092	1,257	1,873	4,362	1,064
	SD	0,206	0,211	0,118	0,101	0,375	1,640	0,397
	p-W	0,4230	0,7591	0,2335	0,0045	0,0181	0,0150	0,7269
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,225	-1,750	-1,114	-1,318	1,076	-1,603	-4,862
	SD	0,148	0,203	0,173	0,412	0,224	1,496	0,611
	p-W	0,0558	5E-05	0,2380	0,2105	0,5933	0,8768	0,0015
GADD45A	XF	1,020	-1,031	-1,158	-1,126	-1,091	1,014	-1,907
	SD	0,145	0,163	0,126	0,151	0,199	0,223	0,225
	p-W	0,8664	0,6706	0,0643	0,2007	0,4448	0,8797	0,0009
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,085	-1,179	-1,067	1,103	2,200	2,918	1,069
	SD	0,121	0,184	0,160	0,187	0,386	0,341	0,481
	p-W	0,2534	0,1291	0,4724	0,3677	0,0024	0,0001	0,7084
p21	XF	-1,004	1,039	1,218	1,424	2,133	1,809	-5,217
	SD	0,099	0,024	0,078	0,135	0,171	0,205	1,347
	p-W	0,9614	0,0475	0,0073	0,0073	0,0004	0,0047	0,0003
p-p53 (Ser15)	XF	1,036	1,080	1,075	1,334	1,638	2,091	-1,663
	SD	0,064	0,093	0,031	0,067	0,104	0,294	1,235
	p-W	0,3424	0,1865	0,0189	0,0025	0,0008	0,0046	0,4159

<b>Substanz</b>		<b>7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA) +MAS [<math>\mu</math>M]</b>						
<b>Parameter</b>		<b>6,25</b>	<b>12,5</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>
SSC	XF	1,972	1,630	1,417	1,422	1,501	1,361	1,490
	SD	0,702	0,734	0,702	0,713	0,951	0,690	0,873
	p-W	0,1668	0,1421	0,3078	0,3077	0,3441	0,3645	0,4567
CMFDA	XF	1,198	1,055	0,874	0,803	0,721	0,665	1,120
	SD	0,076	0,070	0,106	0,091	0,072	0,105	0,154
	p-W	0,0122	0,0226	0,0347	0,3186	0,0175	0,3602	0,0029
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,118	-1,165	-1,028	1,739	2,237	2,284	2,517
	SD	0,244	0,140	0,166	0,220	0,126	0,164	0,088
	p-W	0,4301	0,0568	0,8753	0,0089	0,0008	0,0015	0,0002
p-ATR (Ser428)	XF	1,017	1,042	1,115	1,773	2,356	1,945	2,030
	SD	0,145	0,071	0,100	0,203	0,419	0,300	0,625
	p-W	0,8487	0,3241	0,0979	0,0061	0,0066	0,0072	0,0368
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,303	-1,467	-1,291	1,089	1,354	1,353	1,400
	SD	0,324	0,372	0,348	0,390	0,242	0,245	0,285
	p-W	0,1518	0,0704	0,2267	0,6754	0,0616	0,1076	0,1152
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,323	1,158	1,375	2,628	3,838	3,809	5,116
	SD	0,614	0,211	0,208	0,533	0,793	0,605	1,048
	p-W	0,3811	0,2478	0,0176	0,0032	0,0029	0,0014	0,0015
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,393	-2,047	-1,670	-1,152	1,083	1,156	1,320
	SD	0,268	0,518	0,420	0,180	0,110	0,166	0,150
	p-W	0,0482	0,0036	0,0020	0,1119	0,2523	0,1113	0,0093
GADD45A	XF	-1,022	-1,089	-1,027	-1,088	1,083	1,163	1,169
	SD	0,101	0,124	0,177	0,151	0,069	0,197	0,121
	p-W	0,6241	0,1998	0,7551	0,3792	0,1017	0,1638	0,0422
p-H2AX (Ser139)	XF	1,107	1,057	1,330	2,338	3,540	3,390	3,155
	SD	0,107	0,141	0,211	0,209	0,505	0,452	0,475
	p-W	0,1268	0,5140	0,0461	0,0001	0,0004	0,0002	0,0004
p21	XF	1,075	1,116	1,499	1,851	1,964	1,745	1,687
	SD	0,122	0,124	0,147	0,327	0,165	0,144	0,127
	p-W	0,2915	0,1564	0,0046	0,0123	0,0013	0,0017	0,0007
p-p53 (Ser15)	XF	1,088	1,258	1,860	2,730	3,087	3,225	2,913
	SD	0,070	0,049	0,166	0,093	0,200	0,559	0,145
	p-W	0,0807	0,0012	0,0012	2E-06	0,0001	0,0025	2E-05

Substanz		Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB1) +MAS [µM]						
		3,125	5,25	12,5	25	50	100	200
Parameter								
SSC	XF	1,265	1,445	1,452	1,261	1,148	1,045	1,284
	SD	0,110	0,122	0,190	0,166	0,040	0,141	0,066
	p-W	0,0293	0,0205	0,0353	0,0784	0,0174	0,4780	0,0162
CMFDA	XF	0,953	0,779	0,827	0,812	0,811	0,730	0,768
	SD	0,133	0,086	0,100	0,065	0,103	0,125	0,080
	p-W	0,0984	0,0310	0,3967	0,4971	0,0261	0,7387	0,1228
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,081	1,046	1,234	1,408	1,596	2,150	2,698
	SD	0,170	0,214	0,207	0,256	0,219	0,377	0,575
	p-W	0,4059	0,7461	0,0985	0,0316	0,0040	0,0035	0,0028
p-ATR (Ser428)	XF	-1,036	-1,054	1,038	1,112	1,096	1,720	1,972
	SD	0,075	0,072	0,073	0,052	0,129	0,111	0,400
	p-W	0,4382	0,2277	0,3641	0,0199	0,2240	0,0009	0,0149
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,171	-1,122	-1,167	-1,104	-1,110	1,302	1,858
	SD	0,144	0,044	0,070	0,185	0,125	0,258	0,433
	p-W	0,0834	0,0068	0,0124	0,4073	0,1904	0,1002	0,0244
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,151	1,083	-1,005	1,449	2,044	3,793	7,391
	SD	0,125	0,080	0,034	0,146	0,353	0,786	0,311
	p-W	0,0893	0,1338	0,8052	0,0083	0,0092	0,0054	0,0001
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,467	1,006	-1,255	1,102	-1,309	1,143	1,441
	SD	0,974	0,308	0,887	0,571	0,734	0,182	0,427
	p-W	0,3982	0,7347	0,5876	0,9147	0,4712	0,1579	0,1670
GADD45A	XF	-1,082	-1,044	-1,050	1,141	1,260	1,296	1,133
	SD	0,159	0,100	0,129	0,070	0,164	0,145	0,062
	p-W	0,3631	0,3969	0,4586	0,0269	0,0365	0,0138	0,0093
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,035	-1,107	-1,114	1,168	1,559	2,266	4,410
	SD	0,018	0,202	0,026	0,153	0,218	0,407	0,587
	p-W	0,0325	0,4396	0,0012	0,1172	0,0170	0,0079	0,0011
p21	XF	1,126	1,384	1,779	2,161	2,419	1,980	-1,635
	SD	0,114	0,102	0,116	0,150	0,160	0,102	0,330
	p-W	0,1271	0,0033	0,0006	0,0003	4E-05	4E-05	0,0202
p-p53 (Ser15)	XF	1,082	1,174	1,237	1,496	1,758	2,275	4,103
	SD	0,101	0,139	0,033	0,118	0,232	0,226	0,397
	p-W	0,2043	0,0845	0,0011	0,0033	0,0057	0,0010	0,0009

<b>Substanz</b>		<b>2-Acetylaminofluoren (AAF) +MAS [<math>\mu</math>M]</b>						
<b>Parameter</b>		<b>15,625</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,660	1,743	1,730	1,536	1,409	1,368	1,172
	SD	0,321	0,401	0,319	0,213	0,245	0,186	0,150
	p-W	0,0312	0,0454	0,0318	0,0194	0,0670	0,0499	0,1591
CMFDA	XF	0,905	0,917	0,955	0,950	1,104	1,028	1,117
	SD	0,082	0,041	0,087	0,136	0,055	0,139	0,115
	p-W	0,0984	0,0310	0,3967	0,4971	0,0261	0,7387	0,1228
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,116	-1,116	1,014	1,210	1,297	1,422	2,153
	SD	0,336	0,247	0,313	0,300	0,310	0,481	0,507
	p-W	0,6740	0,4740	0,8040	0,2284	0,1562	0,1809	0,0170
p-ATR (Ser428)	XF	-1,180	-1,103	-1,033	1,110	-1,059	1,030	1,529
	SD	0,138	0,088	0,154	0,183	0,467	0,308	0,324
	p-W	0,0646	0,0943	0,7528	0,3078	0,9710	0,7454	0,0407
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,140	-1,118	-1,040	1,035	1,018	1,071	1,666
	SD	0,154	0,155	0,158	0,118	0,098	0,113	0,096
	p-W	0,1790	0,2466	0,6983	0,5795	0,6986	0,2862	0,0005
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,085	1,043	-1,014	-1,003	1,214	1,293	3,889
	SD	0,162	0,144	0,113	0,085	0,256	0,214	0,460
	p-W	0,3575	0,5785	0,9111	0,9904	0,1854	0,0732	0,0006
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,316	-1,258	-1,470	1,037	-1,136	-1,342	-1,125
	SD	0,804	0,257	0,864	0,546	0,918	0,990	0,636
	p-W	0,4288	0,1180	0,3290	0,8465	0,6970	0,5060	0,5918
GADD45A	XF	-1,100	-1,201	-1,330	1,097	1,034	1,117	1,198
	SD	0,229	0,125	0,273	0,079	0,087	0,195	0,062
	p-W	0,4927	0,0220	0,0655	0,1010	0,5112	0,2950	0,0094
p-H2AX (Ser139)	XF	1,042	1,011	-1,024	1,112	1,006	1,116	1,285
	SD	0,101	0,072	0,036	0,071	0,086	0,091	0,047
	p-W	0,4670	0,7260	0,2856	0,0538	0,8775	0,0887	0,0013
p21	XF	-1,015	-1,131	-1,131	1,116	1,015	1,171	1,097
	SD	0,082	0,128	0,114	0,071	0,144	0,108	0,070
	p-W	0,7330	0,1388	0,1123	0,0398	0,8216	0,0409	0,0700
p-p53 (Ser15)	XF	1,064	1,010	1,107	1,381	1,288	1,248	1,713
	SD	0,080	0,055	0,061	0,297	0,184	0,104	0,114
	p-W	0,2112	0,7174	0,0395	0,0738	0,0564	0,0177	0,0015

Substanz		D-Mannitol (MAN) –MAS [ $\mu$ M]						
		15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,963	1,083	1,022	1,101	1,135	1,048	1,091
	SD	0,203	0,314	0,293	0,293	0,249	0,348	0,266
	p-W	0,5544	0,2120	0,2851	0,2677	0,8123	0,0524	0,1228
CMFDA	XF	1,016	1,123	1,119	1,164	1,103	1,117	1,131
	SD	0,207	0,288	0,284	0,306	0,302	0,267	0,298
	p-W	0,8850	0,5290	0,5558	0,3652	0,6883	0,4965	0,5030
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,215	-1,088	-1,201	-1,185	-1,311	-1,356	-1,258
	SD	0,093	0,241	0,343	0,193	0,176	0,146	0,064
	p-W	0,0105	0,6556	0,2944	0,1596	0,0048	0,0078	0,0017
p-ATR (Ser428)	XF	-1,097	-1,186	-1,238	-1,095	-1,156	-1,123	1,015
	SD	0,104	0,209	0,121	0,049	0,091	0,132	0,082
	p-W	0,1297	0,1608	0,0203	0,0281	0,0253	0,1529	0,7530
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	1,084	-1,202	-1,058	-1,088	-1,102	-1,087	-1,007
	SD	0,137	0,244	0,253	0,166	0,192	0,163	0,187
	p-W	0,3382	0,1891	0,6747	0,3627	0,3619	0,3564	0,9236
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,098	-1,102	1,029	1,511	1,252	-1,083	-1,106
	SD	0,073	0,042	0,236	0,445	0,604	0,198	0,157
	p-W	0,0831	0,0120	0,8641	0,2059	0,4468	0,4498	0,2793
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,112	-1,602	-1,480	-1,122	1,183	1,042	1,335
	SD	0,268	0,407	1,097	0,667	0,662	0,334	0,307
	p-W	0,4220	0,0557	0,5469	0,8395	0,5518	0,6785	0,0747
GADD45A	XF	-1,021	1,026	1,001	1,016	1,053	1,179	1,111
	SD	0,486	0,312	0,420	0,362	0,445	0,538	0,442
	p-W	0,6674	0,9334	0,7515	0,9054	0,9434	0,6536	0,7775
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,001	-1,123	-1,033	-1,072	1,053	1,047	1,017
	SD	0,154	0,116	0,119	0,145	0,127	0,111	0,207
	p-W	0,9614	0,1170	0,5964	0,4132	0,5009	0,4957	0,8634
p21	XF	-1,064	-1,127	-1,159	-1,108	-1,036	-1,012	1,105
	SD	0,091	0,216	0,156	0,090	0,090	0,136	0,148
	p-W	0,2421	0,3306	0,1172	0,0838	0,5254	0,9035	0,2507
p-p53 (Ser15)	XF	-1,065	1,028	-1,043	-1,043	-1,054	-1,098	-1,084
	SD	0,077	0,062	0,139	0,084	0,083	0,084	0,107
	p-W	0,1750	0,4464	0,5769	0,3967	0,2680	0,0928	0,2128

Substanz		Progesteron (PRO) –MAS [ $\mu$ M]						
		15,625	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,723	0,480	0,300	0,133	0,025	0,034	0,016
	SD	0,145	0,074	0,061	0,052	0,006	0,012	0,009
	p-W	0,1387	0,0170	0,0073	0,0034	0,0020	0,0023	0,0020
CMFDA	XF	0,871	0,669	0,454	0,278	0,196	0,187	0,123
	SD	0,058	0,031	0,018	0,063	0,065	0,031	0,018
	p-W	0,0246	0,0003	5E-05	0,0014	2E-05	0,0001	0,0006
p-ATM (Ser1981)	XF	1,082	1,360	1,487	2,130	-6,832	-5,231	1,585
	SD	0,100	0,053	0,060	0,211	2,796	1,614	0,649
	p-W	0,2021	0,0002	0,0002	0,0007	0,0013	0,0014	0,1223
p-ATR (Ser428)	XF	1,129	1,560	1,713	1,594	-1,928	-3,414	-3,894
	SD	0,035	0,118	0,167	0,678	0,347	3,504	1,159
	p-W	0,0083	0,0066	0,0097	0,1610	0,0070	0,0069	0,0038
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	-1,598	-1,567	-1,462	-1,363	-1,380	-1,315	1,196
	SD	0,231	0,209	0,183	0,154	0,117	0,115	0,144
	p-W	0,0138	0,0129	0,0164	0,0213	0,0122	0,0183	0,0549
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,064	1,294	2,004	2,421	-1,222	-1,607	-1,937
	SD	0,169	0,212	0,311	0,673	0,225	0,340	0,730
	p-W	0,5652	0,0597	0,0095	0,0284	0,1443	0,0250	0,0481
p-Chk2 (Thr68)	XF	1,624	2,242	2,217	2,852	-1,466	-1,187	-1,492
	SD	0,762	0,929	0,844	1,324	1,037	0,227	0,622
	p-W	0,1476	0,0115	0,0041	0,0060	0,3737	0,1648	0,1758
GADD45A	XF	-1,099	-1,097	1,061	1,040	-1,945	1,054	1,121
	SD	0,175	0,086	0,046	0,240	0,840	0,260	0,268
	p-W	0,2827	0,1044	0,0426	0,8228	0,0017	0,7722	0,4583
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,254	-1,516	-1,152	1,719	2,146	1,842	1,375
	SD	0,206	0,230	0,110	0,180	0,857	0,190	0,133
	p-W	0,0579	0,0088	0,0494	0,0030	0,0713	0,0028	0,0105
p21	XF	-1,089	1,170	1,192	-1,810	-1,453	-1,222	-1,235
	SD	0,248	0,248	0,206	1,504	1,566	0,430	0,241
	p-W	0,5517	0,2645	0,1436	0,3665	0,9605	0,5085	0,1362
p-p53 (Ser15)	XF	-1,076	-1,231	-1,025	-1,142	-2,049	1,309	1,016
	SD	0,153	0,142	0,074	0,435	1,050	0,322	0,171
	p-W	0,4771	0,6598	0,6305	0,0376	0,0070	0,0010	0,0022

<b>Substanz</b>		<b>Phenforminhydrochlorid (PHC) –MAS [µM]</b>						
<b>Parameter</b>		<b>15,625</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	0,964	0,848	0,534	0,522	0,497	0,421	0,388
	SD	0,244	0,144	0,070	0,049	0,120	0,110	0,062
	p-W	0,6763	0,1008	0,0339	0,0283	0,0533	0,0435	0,0275
CMFDA	XF	0,893	0,904	0,681	0,618	0,567	0,553	0,521
	SD	0,097	0,083	0,030	0,073	0,076	0,059	0,049
	p-W	0,1210	0,1071	0,0018	0,0181	0,0158	0,0106	0,0075
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,166	-1,178	1,162	1,427	1,506	1,637	1,614
	SD	0,234	0,209	0,218	0,091	0,071	0,191	0,077
	p-W	0,2822	0,1726	0,2375	0,0031	0,0011	0,0095	0,0007
p-ATR (Ser428)	XF	-1,208	-1,136	1,216	1,478	1,716	1,766	1,681
	SD	0,075	0,104	0,220	0,014	0,160	0,297	0,134
	p-W	0,0151	0,0672	0,1425	0,0010	0,0027	0,0123	0,0010
p-CDC2 (Tyr15/Thr14)	XF	1,135	1,018	-1,016	1,176	1,154	1,290	1,337
	SD	0,071	0,057	0,090	0,096	0,091	0,091	0,099
	p-W	0,0285	0,5390	0,7947	0,0308	0,0468	0,0068	0,0072
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,136	-1,206	1,032	1,156	1,479	1,491	1,636
	SD	0,366	0,349	0,125	0,227	0,377	0,279	0,256
	p-W	0,5027	0,3262	0,8680	0,3832	0,0895	0,0213	0,0022
p-Chk2 (Thr68)	XF	-1,271	-1,247	-1,153	-1,118	-2,204	-1,491	-1,010
	SD	0,347	0,296	0,165	0,165	0,767	0,597	0,505
	p-W	0,2111	0,1663	0,1660	0,2781	0,0186	0,1873	0,9014
GADD45A	XF	-1,101	-1,130	-1,589	-1,221	1,092	1,176	1,258
	SD	0,168	0,297	0,708	0,248	0,279	0,287	0,307
	p-W	0,2950	0,4900	0,2035	0,1688	0,5955	0,3115	0,1796
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,013	1,027	-1,192	-1,376	-1,043	1,051	1,355
	SD	0,044	0,123	0,063	0,056	0,096	0,023	0,061
	p-W	0,6267	0,6721	0,0077	0,0005	0,4580	0,0192	0,0018
p21	XF	-1,093	-1,088	-1,115	-1,048	-1,414	-1,281	-1,350
	SD	0,197	0,356	0,323	0,347	0,427	0,482	0,319
	p-W	0,4044	0,6909	0,5500	0,7941	0,1807	0,3121	0,1240
p-p53 (Ser15)	XF	-1,107	-1,146	-1,212	-1,174	-1,134	-1,109	1,032
	SD	0,140	0,142	0,102	0,128	0,106	0,049	0,130
	p-W	0,2227	0,1341	0,0278	0,0773	0,0872	0,0246	0,6541



### 8.5 Spezifität der verwendeten Antikörper bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker

Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der fünf Antikörper gegen p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) nach Immunofluoreszenzfärbung ohne und mit Zugabe des zugehörigen Blockpeptids (-/+BP). Die Mittelwerte (XF) der Fluoreszenzintensitäten  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Etoposid (ETO).

Parameter		-BP			+BP		
		DMSO 1 %	unbehandelt	ETO 2,5 $\mu$ M	DMSO 1 %	unbehandelt	ETO 2,5 $\mu$ M
p-p53 (Ser15)	MW	262,765	290,962	571,648	26,410	26,487	27,170
	SD	53,278	77,798	29,641	0,595	0,558	1,248
p21	MW	224,787	191,565	368,793	34,285	34,805	35,365
	SD	38,746	20,604	89,995	0,547	2,675	3,877
p-H2AX (Ser139)	MW	107,642	126,993	283,077	43,553	43,607	44,445
	SD	5,179	6,962	9,354	0,976	1,660	0,834
p-Chk1 (Ser345)	MW	332,458	412,213	519,952	35,788	37,850	39,148
	SD	80,015	92,290	191,225	1,367	3,099	3,081
p-ATM (Ser1981)	MW	290,833	216,713	294,092	24,657	24,000	24,255
	SD	23,577	32,390	26,629	1,075	0,937	0,242



## **8.6 Testung auf Kreuzreaktionen zwischen den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern bei der Testung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker**

Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitäten der fünf Primärantikörper gegen p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) nach Immunofluoreszenzfärbung mit jeweils den Sekundärantikörpern anti-Kaninchen Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, anti-Ziege Alexa Fluor<sup>®</sup> 555 und anti-Maus Alexa Fluor<sup>®</sup> 647. Die Mittelwerte (MW) der Fluoreszenzintensitäten  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Getestet wurden die unbehandelte und DMSO-Kontrolle wie auch Etoposid (ETO).

		anti Kaninchen Alexa Fluor® 488			anti Ziege Alexa Fluor® 555			anti Maus Alexa Fluor® 647		
		DMSO 1 %	un-behandelt	ETO 2,5 µM	DMSO 1 %	un-behandelt	ETO 2,5 µM	DMSO 1 %	un-behandelt	ETO 2,5 µM
Kaninchen anti-p-p53 (Ser15)	MW	262,765	290,962	571,648	37,005	34,748	38,247	39,323	39,680	39,142
	SD	53,278	77,798	29,641	3,455	0,766	2,727	0,685	1,254	0,512
Ziege anti-p21	MW	24,013	24,517	24,500	224,787	191,565	368,793	36,760	39,255	37,978
	SD	0,166	0,337	0,304	38,746	20,604	89,995	2,249	1,354	2,076
Maus anti-p-H2AX (Ser139)	MW	23,560	23,878	23,872	38,537	39,965	43,342	107,642	126,993	283,077
	SD	0,528	0,814	0,258	0,794	0,928	0,865	5,179	6,962	9,354
Ziege anti-p-Chk1 (Ser345)	MW	-	-	-	332,458	412,213	519,952	20,823	20,287	20,715
	SD	-	-	-	80,015	92,290	191,225	0,693	0,519	0,633
Maus anti-p-ATM (Ser1981)	MW	-	-	-	44,615	46,372	44,193	290,833	216,713	294,092
	SD	-	-	-	1,587	2,196	0,657	23,577	32,390	26,629

### **8.7 Genotoxizitätsbestimmung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker (Gruppe 1 ECVAM-Substanzen)**

Dargestellt sind die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle der fünf Proteine p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) wie auch der Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA). Die Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF)  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die ermittelten p-Werte (p-W) aus dem Student's T-Test für die jeweiligen getesteten Konzentrationen (Konz) sind aufgezeigt. Alle Substanzen wurden mit und ohne metabolischem Aktivierungssystem (+/- MAS) getestet.

<b>Substanz</b>		<b>Cyclophosphamid (CPA) –MAS [µM]</b>									<b>Cyclophosphamid (CPA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,081	1,178	1,188	1,156	1,160	1,072	1,026	0,928	0,733	1,234	1,339	1,246	1,328	0,915	1,121	1,167	0,725	0,651
	SD	0,060	0,064	0,058	0,037	0,088	0,041	0,052	0,070	0,052	0,093	0,060	0,084	0,146	0,079	0,068	0,031	0,128	0,103
	p-W	0,1480	0,0590	0,0191	0,0201	0,0993	0,1122	0,4785	0,2085	0,0201	0,0296	0,0177	0,0236	0,0435	0,1885	0,0689	0,0183	0,0866	0,0370
CMFDA	XF	1,078	1,131	1,168	1,090	1,077	1,005	1,038	0,994	0,940	1,105	1,089	1,082	0,897	0,584	0,097	0,103	0,117	0,130
	SD	0,035	0,058	0,034	0,049	0,090	0,077	0,069	0,055	0,029	0,043	0,089	0,042	0,048	0,035	0,009	0,011	0,012	0,011
	p-W	0,0723	0,0705	0,0144	0,0935	0,2828	0,8872	0,4271	0,8891	0,0776	0,0621	0,2382	0,0834	0,0705	0,0077	0,0025	0,0025	0,0026	0,0026
p-p53 (Ser15)	XF	-1,054	-1,008	1,054	1,100	1,088	1,197	1,180	1,278	1,518	1,012	1,016	1,102	1,037	-1,194	-3,048	-2,601	-2,120	-1,467
	SD	0,170	0,136	0,202	0,064	0,066	0,127	0,130	0,263	0,219	0,041	0,093	0,063	0,060	0,118	0,353	0,320	0,190	0,087
	p-W	0,6269	0,8589	0,7573	0,0891	0,1265	0,1050	0,1258	0,2210	0,0382	0,6649	0,7601	0,1112	0,3929	0,0883	0,0030	0,0047	0,0030	0,0074
p21	XF	1,004	-1,050	-1,040	-1,044	1,013	1,013	1,028	1,124	1,134	1,031	-1,065	-1,056	-1,054	1,078	-1,139	-1,067	1,183	1,327
	SD	0,059	0,025	0,025	0,047	0,027	0,018	0,040	0,043	0,038	0,059	0,074	0,121	0,073	0,109	0,099	0,133	0,025	0,085
	p-W	0,9089	0,0720	0,1143	0,2438	0,4919	0,3350	0,3485	0,0411	0,0231	0,4558	0,2800	0,5507	0,3112	0,3462	0,1266	0,4872	0,0089	0,0174
p-H2AX (Ser139)	XF	1,025	1,013	1,025	1,059	1,137	1,121	1,196	1,349	1,415	1,066	-1,061	1,275	1,449	2,164	-2,710	-2,530	-2,262	-2,171
	SD	0,025	0,027	0,033	0,004	0,033	0,073	0,033	0,030	0,099	0,271	0,231	0,161	0,058	0,058	0,715	0,590	0,365	0,373
	p-W	0,2418	0,5159	0,3029	0,0013	0,0123	0,0958	0,0074	0,0002	0,0142	0,8145	0,6010	0,0668	0,0075	0,0219	0,0454	0,0129	0,0074	0,0385
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,008	1,118	1,198	-1,009	-1,001	1,034	1,086	1,004	1,218	-1,088	-1,072	-1,049	-1,029	1,247	1,112	1,137	1,093	1,096
	SD	0,101	0,115	0,110	0,106	0,146	0,049	0,036	0,022	0,056	0,131	0,064	0,061	0,091	0,067	0,101	0,066	0,029	0,090
	p-W	0,9840	0,2095	0,1029	0,9916	0,8901	0,3670	0,0672	0,8159	0,0104	0,3931	0,1746	0,3071	0,6810	0,0281	0,1926	0,0606	0,0328	0,1975
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,236	-1,088	-1,096	-1,137	-1,180	-1,112	-1,151	-1,107	1,147	-1,223	-1,099	1,031	-1,034	1,080	-2,277	-2,047	-1,718	-1,672
	SD	0,063	0,085	0,065	0,054	0,119	0,085	0,245	0,116	0,143	0,202	0,123	0,224	0,338	0,270	0,553	0,500	0,246	0,227
	p-W	0,0367	0,1806	0,1385	0,0198	0,1364	0,1697	0,3974	0,2667	0,2263	0,1848	0,2746	0,9395	0,8171	0,6534	0,0495	0,0601	0,0004	0,0284

<b>Substanz</b>		<b>Ethylnitrosourea (ENU) –MAS [µM]</b>									<b>Ethylnitrosourea (ENU) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	0,995	0,983	0,992	1,005	1,030	1,007	0,965	0,944	0,722	1,007	1,108	1,124	1,189	0,991	1,166	1,184	1,147	1,035
	SD	0,016	0,020	0,020	0,011	0,038	0,059	0,017	0,009	0,031	0,123	0,130	0,170	0,143	0,081	0,153	0,114	0,138	0,174
	p-W	0,6246	0,2788	0,5286	0,5751	0,3097	0,8303	0,0619	0,0056	0,0088	0,9784	0,2988	0,4241	0,1394	0,7209	0,1629	0,0525	0,1857	0,9559
CMFDA	XF	1,100	1,075	1,068	1,066	1,087	1,057	1,021	0,969	0,833	1,009	0,964	1,063	1,085	0,959	1,047	1,000	1,021	0,952
	SD	0,023	0,012	0,046	0,012	0,083	0,066	0,035	0,030	0,023	0,042	0,021	0,024	0,066	0,044	0,104	0,053	0,087	0,135
	p-W	0,0208	0,0071	0,1190	0,0132	0,2094	0,2808	0,3977	0,2120	0,0076	0,8003	0,0877	0,0281	0,1710	0,2512	0,5582	0,9563	0,7957	0,5524
p-p53 (Ser15)	XF	1,113	1,025	1,190	1,067	1,068	1,169	1,145	1,314	1,362	1,066	1,020	1,136	1,232	1,206	1,149	1,146	1,160	1,085
	SD	0,060	0,004	0,085	0,039	0,062	0,124	0,057	0,069	0,173	0,081	0,035	0,039	0,114	0,139	0,049	0,068	0,040	0,097
	p-W	0,0800	0,0080	0,0682	0,0912	0,1964	0,1397	0,0441	0,0171	0,0642	0,2932	0,4451	0,0298	0,0818	0,1352	0,0433	0,0593	0,0160	0,2719
p21	XF	-1,006	1,002	-1,003	1,070	1,074	1,100	1,059	1,081	1,390	1,060	-1,015	-1,004	1,018	-1,022	1,032	1,020	1,011	1,117
	SD	0,012	0,014	0,060	0,065	0,063	0,045	0,072	0,114	0,169	0,040	0,072	0,041	0,063	0,156	0,097	0,109	0,115	0,164
	p-W	0,4591	0,8652	0,9812	0,2017	0,1816	0,0589	0,2914	0,3362	0,0553	0,1157	0,7803	0,9299	0,6345	0,9141	0,5834	0,7318	0,8162	0,3284
p-H2AX (Ser139)	XF	1,032	1,035	1,112	1,110	1,145	1,197	1,160	1,150	1,181	1,047	1,023	-1,027	-1,068	1,131	1,020	-1,045	1,050	1,329
	SD	0,077	0,041	0,044	0,125	0,109	0,042	0,094	0,068	0,054	0,296	0,082	0,189	0,027	0,253	0,133	0,133	0,126	0,357
	p-W	0,5453	0,2794	0,0434	0,2712	0,1454	0,0113	0,0934	0,0582	0,0238	0,8013	0,7214	0,8500	0,0665	0,4725	0,8367	0,6176	0,5922	0,2578
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,364	1,267	1,499	1,369	1,680	1,355	1,238	1,089	1,217	-1,009	1,039	1,066	-1,041	1,026	-1,077	-1,143	-1,055	1,011
	SD	0,292	0,202	0,512	0,318	0,552	0,063	0,157	0,228	0,146	0,053	0,007	0,133	0,036	0,111	0,091	0,078	0,161	0,054
	p-W	0,1382	0,1292	0,1989	0,1611	0,1425	0,0244	0,1922	0,6310	0,0984	0,8749	0,0090	0,4506	0,1885	0,7109	0,2948	0,0819	0,6181	0,7769
p-ATM (Ser1981)	XF	1,005	1,019	-1,109	1,191	1,328	1,125	-1,024	-1,139	1,197	1,010	-1,050	-1,126	-1,293	-1,070	-1,197	-1,443	-1,320	-1,173
	SD	0,131	0,217	0,286	0,361	0,383	0,171	0,026	0,416	0,321	0,082	0,070	0,072	0,149	0,157	0,024	0,108	0,419	0,039
	p-W	0,9534	0,9575	0,5929	0,3820	0,2608	0,3327	0,3022	0,6797	0,4347	0,9677	0,2839	0,0882	0,0746	0,5637	0,0129	0,0392	0,2831	0,0561

<b>Substanz</b>		<b>Methylmethansulfonat (MMS) –MAS [µM]</b>									<b>Methylmethansulfonat (MMS) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,233	1,258	1,287	1,228	1,106	0,870	0,647	0,494	0,252	1,132	1,106	1,181	1,138	1,166	1,100	0,982	0,716	0,285
	SD	0,089	0,067	0,100	0,021	0,021	0,031	0,050	0,024	0,046	0,059	0,037	0,029	0,038	0,089	0,052	0,067	0,101	0,113
	p-W	0,0428	0,0198	0,0298	0,0037	0,0052	0,0186	0,0083	0,0020	0,0034	0,0619	0,0479	0,0017	0,0304	0,0603	0,0952	0,6739	0,0537	0,0053
CMFDA	XF	1,157	1,149	1,123	1,170	1,090	1,022	0,902	0,761	0,362	1,028	0,969	1,043	1,038	0,906	0,879	0,700	0,470	0,344
	SD	0,092	0,059	0,086	0,090	0,046	0,059	0,037	0,017	0,017	0,068	0,036	0,056	0,032	0,093	0,051	0,027	0,013	0,056
	p-W	0,0839	0,0389	0,1346	0,0745	0,0766	0,5876	0,0496	0,0033	0,0002	0,5784	0,2805	0,2956	0,1789	0,2048	0,0385	0,0001	0,0029	0,0073
p-p53 (Ser15)	XF	1,159	1,039	1,346	1,189	1,276	1,642	2,342	3,450	5,375	-1,020	-1,027	1,109	1,197	1,233	1,343	1,594	2,019	4,624
	SD	0,072	0,030	0,212	0,143	0,097	0,192	0,266	0,403	0,351	0,022	0,045	0,075	0,114	0,083	0,127	0,439	0,100	0,528
	p-W	0,0725	0,1389	0,0887	0,1499	0,0439	0,0236	0,0063	0,0044	0,0050	0,1983	0,3950	0,1067	0,0928	0,0171	0,0243	0,1746	0,0041	0,0001
p21	XF	-1,089	-1,094	-1,230	-1,111	-1,067	1,007	1,254	1,659	1,414	-1,011	-1,059	-1,265	-1,127	-1,148	-1,214	-1,112	-1,012	1,178
	SD	0,099	0,039	0,117	0,015	0,059	0,043	0,024	0,090	0,016	0,046	0,061	0,093	0,157	0,118	0,146	0,103	0,087	0,154
	p-W	0,2736	0,0504	0,0647	0,0074	0,1730	0,7769	0,0016	0,0068	0,0003	0,6613	0,2333	0,0304	0,3004	0,1433	0,0971	0,1862	0,8183	0,1570
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,013	-1,018	1,005	1,108	1,178	1,467	2,695	6,937	26,671	1,175	1,095	-1,040	1,199	1,211	1,273	2,162	5,289	9,742
	SD	0,070	0,040	0,033	0,043	0,083	0,163	0,307	0,218	2,903	0,115	0,147	0,114	0,121	0,178	0,102	0,673	1,195	0,610
	p-W	0,770	0,501	0,820	0,042	0,058	0,033	0,010	0,001	0,006	0,1356	0,3761	0,7170	0,1304	0,2023	0,0233	0,0671	0,0098	0,0006
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,175	1,059	1,229	1,298	1,335	1,376	1,702	2,318	3,747	-1,008	-1,113	-1,004	1,046	-1,007	-1,015	1,185	1,296	1,822
	SD	0,251	0,126	0,298	0,159	0,326	0,197	0,185	0,124	0,477	0,069	0,153	0,099	0,048	0,194	0,121	0,124	0,240	0,147
	p-W	0,3404	0,5317	0,3259	0,0872	0,2337	0,0793	0,0132	0,0005	0,0025	0,9106	0,3183	0,9761	0,2517	0,9856	0,8421	0,1145	0,1491	0,0070
p-ATM (Ser1981)	XF	1,036	-1,125	-1,012	1,074	1,132	1,224	1,876	3,136	6,088	1,116	1,024	1,148	1,094	1,079	1,028	1,264	1,603	2,654
	SD	0,178	0,124	0,197	0,101	0,145	0,092	0,120	0,421	0,953	0,137	0,049	0,157	0,183	0,180	0,090	0,189	0,292	0,451
	p-W	0,7892	0,2388	0,9785	0,3176	0,2751	0,0668	0,0040	0,0032	0,0049	0,2785	0,4867	0,2258	0,4732	0,5068	0,6358	0,1290	0,0521	0,0135

Substanz		Benzo[a]pyren (BaP) –MAS [µM]									Benzo[a]pyren (BaP) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,563	0,332	0,300	0,323	0,348	0,357	0,317	0,090	0,102	1,198	1,269	1,328	1,390	1,401	1,254	1,332	1,202	0,948
	SD	0,097	0,041	0,038	0,020	0,024	0,030	0,046	0,041	0,012	0,175	0,101	0,130	0,116	0,143	0,120	0,121	0,121	0,168
	p-W	0,0151	0,0027	0,0023	0,0019	0,0024	0,0025	0,0004	0,0014	0,0014	0,1572	0,0190	0,0328	0,0081	0,0144	0,0423	0,0197	0,0790	0,5915
CMFDA	XF	0,738	0,622	0,567	0,578	0,608	0,590	0,4999	0,482	0,344	1,087	1,052	0,988	0,886	0,696	0,623	0,599	0,575	0,593
	SD	0,092	0,086	0,140	0,114	0,122	0,103	0,096	0,057	0,058	0,076	0,090	0,091	0,100	0,037	0,067	0,050	0,029	0,073
	p-W	0,0991	0,0641	0,0913	0,0770	0,0866	0,0709	0,0560	0,0359	0,0326	0,1552	0,4580	0,7273	0,2208	0,0278	0,0389	0,0273	0,0186	0,0304
p-p53 (Ser15)	XF	2,170	2,250	2,268	2,353	2,668	2,506	2,559	2,175	2,053	1,134	1,226	1,350	1,531	1,816	1,928	2,139	2,322	2,685
	SD	0,207	0,089	0,186	0,185	0,265	0,269	0,247	0,118	0,285	0,051	0,208	0,240	0,260	0,267	0,194	0,279	0,466	0,388
	p-W	0,0060	0,0003	0,0036	0,0048	0,0052	0,0125	0,0076	4E-06	0,0093	0,0280	0,1899	0,1024	0,0477	0,0170	0,0038	0,0070	0,0204	0,0054
p21	XF	4,064	3,549	3,678	4,009	3,970	3,748	3,978	3,236	2,726	-1,018	-1,213	-1,303	-1,337	-1,244	-1,122	-1,095	1,022	1,353
	SD	0,432	0,259	0,221	0,324	0,149	0,070	0,249	0,268	0,357	0,071	0,040	0,023	0,109	0,063	0,079	0,047	0,007	0,092
	p-W	0,0012	0,0030	0,0017	0,0003	0,0006	0,0020	0,0014	0,0007	0,0056	0,7396	0,0074	0,0008	0,0201	0,0137	0,1038	0,0661	0,0319	0,0203
p-H2AX (Ser139)	XF	3,506	5,807	5,888	6,089	5,710	5,365	4,316	1,263	-1,035	-1,074	-1,050	1,112	1,343	2,029	2,137	1,849	1,683	1,512
	SD	0,637	0,731	0,667	0,436	0,153	0,292	0,277	0,062	0,057	0,095	0,036	0,143	0,162	0,275	0,439	0,300	0,395	0,326
	p-W	0,0168	0,0039	0,0029	0,0006	0,0002	0,0007	0,0009	0,0145	0,3914	0,2911	0,1305	0,2900	0,0426	0,0082	0,0298	0,0218	0,0777	0,0880
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,377	1,686	1,898	2,024	2,307	2,391	2,598	2,437	2,218	-1,083	-1,158	-1,221	-1,083	1,170	1,385	1,415	1,350	1,501
	SD	0,159	0,132	0,167	0,261	0,577	0,470	0,628	0,395	0,145	0,094	0,072	0,038	0,034	0,069	0,159	0,337	0,072	0,043
	p-W	0,0266	0,0026	0,0030	0,0109	0,0423	0,0148	0,0335	0,0065	0,0066	0,2606	0,0502	0,0071	0,0495	0,0539	0,0554	0,1720	0,0152	0,0013
p-ATM (Ser1981)	XF	1,906	3,205	3,540	3,770	3,461	3,711	2,923	-1,339	-2,917	1,018	-1,020	1,099	1,180	1,447	1,635	1,480	1,544	1,387
	SD	0,389	0,072	0,261	0,054	0,478	0,302	0,093	0,910	0,140	0,083	0,103	0,039	0,048	0,045	0,088	0,175	0,094	0,219
	p-W	0,0487	0,0003	0,0041	0,0013	0,0084	0,0024	0,0003	0,8536	0,0021	0,7125	0,8342	0,0559	0,0293	0,0010	0,0105	0,0360	0,0051	0,0763

Substanz		7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA) –MAS [µM]									7,12-Dimethylbenz[a]-anthracen (DMBA) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,812	0,802	0,777	0,798	0,718	0,649	0,458	0,107	0,037	1,198	1,149	1,153	1,250	1,139	1,100	1,044	0,822	0,491
	SD	0,023	0,014	0,044	0,034	0,054	0,018	0,035	0,038	0,003	0,050	0,029	0,014	0,075	0,069	0,026	0,022	0,072	0,036
	p-W	0,0056	0,0043	0,0120	0,0068	0,0120	0,0028	0,0011	5E-05	0,0006	0,0126	0,0230	0,0013	0,0271	0,0740	0,0418	0,0719	0,0675	0,0050
CMFDA	XF	0,903	0,906	0,902	0,914	0,859	0,856	0,785	0,122	0,107	1,085	1,176	1,244	1,293	1,178	1,102	1,078	1,046	0,979
	SD	0,040	0,033	0,044	0,034	0,034	0,066	0,024	0,013	0,013	0,067	0,025	0,097	0,057	0,067	0,074	0,055	0,053	0,069
	p-W	0,0482	0,0558	0,0806	0,0429	0,0214	0,0565	0,0115	0,0024	0,0026	0,1495	0,0063	0,0525	0,0097	0,0480	0,1449	0,1367	0,2592	0,6353
p-p53 (Ser15)	XF	1,429	1,425	1,524	1,553	1,645	1,883	2,101	-2,257	-2,157	1,116	1,372	1,514	1,859	1,882	1,945	2,079	2,059	1,521
	SD	0,064	0,064	0,055	0,099	0,173	0,089	0,157	0,176	0,442	0,068	0,197	0,078	0,056	0,078	0,131	0,150	0,136	0,005
	p-W	0,0140	0,0131	0,0163	0,0136	0,0474	0,0004	0,0221	0,0111	0,0317	0,1013	0,0802	0,0062	0,0013	0,0025	0,0061	0,0056	0,0053	0,0001
p21	XF	1,409	1,353	1,296	1,335	1,260	1,352	1,352	1,326	1,170	-1,022	-1,120	-1,200	-1,136	-1,200	-1,278	-1,182	-1,099	-1,044
	SD	0,215	0,145	0,201	0,075	0,193	0,177	0,173	0,084	0,173	0,049	0,096	0,087	0,117	0,057	0,167	0,149	0,093	0,037
	p-W	0,0865	0,0576	0,1303	0,0195	0,1489	0,0702	0,0780	0,0235	0,2338	0,5396	0,1530	0,0316	0,1789	0,0158	0,0677	0,1510	0,1882	0,1700
p-H2AX (Ser139)	XF	1,474	1,419	1,473	1,569	1,695	1,810	1,957	1,002	-1,265	1,239	-1,064	-1,209	1,108	1,680	1,771	1,914	1,982	2,476
	SD	0,084	0,052	0,071	0,020	0,034	0,107	0,065	0,049	0,183	0,097	0,176	0,263	0,153	0,286	0,293	0,346	0,253	0,534
	p-W	0,0180	0,0108	0,0150	0,0013	0,0018	0,0041	0,0006	0,9679	0,1021	0,0229	0,5998	0,3154	0,3247	0,0233	0,0176	0,0170	0,0064	0,0165
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,221	-1,110	1,042	-1,251	-1,102	-1,039	1,053	1,620	1,533	-1,159	-1,022	-1,129	-1,132	-1,030	-1,080	1,062	1,110	1,291
	SD	0,117	0,300	0,245	0,278	0,081	0,107	0,171	0,262	0,429	0,134	0,116	0,142	0,087	0,045	0,043	0,057	0,052	0,105
	p-W	0,1020	0,6202	0,8640	0,2479	0,1485	0,7499	0,7046	0,0226	0,1243	0,1660	0,7401	0,2480	0,1250	0,3404	0,0925	0,2078	0,0384	0,0221
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,020	1,090	1,024	1,028	1,080	1,292	1,753	1,088	-1,248	-1,074	1,037	1,041	1,189	1,470	1,513	1,822	1,909	2,037
	SD	0,193	0,133	0,159	0,186	0,140	0,230	0,515	0,308	0,305	0,091	0,079	0,080	0,021	0,063	0,055	0,068	0,104	0,260
	p-W	0,8629	0,3758	0,8492	0,8255	0,4182	0,1703	0,0990	0,6634	0,3212	0,2668	0,4884	0,4501	0,0229	0,0021	0,0222	0,0141	0,0006	0,0036

<b>Substanz</b>		<b>Dimethylnitrosamin (DMN) –MAS [µM]</b>									<b>Dimethylnitrosamin (DMN) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,113	1,157	1,153	1,097	1,151	1,242	1,163	1,071	0,970	1,069	1,093	1,119	1,048	1,163	1,185	1,011	1,150	1,078
	SD	0,086	0,102	0,140	0,031	0,047	0,133	0,050	0,106	0,105	0,118	0,047	0,016	0,045	0,112	0,103	0,080	0,130	0,179
	p-W	0,0117	0,3250	0,1983	0,0562	0,0676	0,1434	0,0486	0,3767	0,4804	0,4507	0,0947	0,0043	0,1986	0,1179	0,0788	0,7866	0,1829	0,5720
CMFDA	XF	1,012	1,046	0,977	1,015	1,015	1,089	1,046	1,052	0,958	0,982	0,986	0,964	0,951	0,994	0,993	0,994	0,969	1,014
	SD	0,031	0,122	0,109	0,083	0,073	0,091	0,165	0,152	0,064	0,018	0,033	0,021	0,113	0,108	0,046	0,034	0,072	0,025
	p-W	0,5434	0,5998	0,9120	0,4192	0,0336	0,0734	0,5951	0,6191	0,0068	0,2220	0,5288	0,0943	0,5050	0,8934	0,8271	0,8076	0,5363	0,4457
p-p53 (Ser15)	XF	1,046	1,065	1,057	1,069	-1,020	-1,127	1,058	1,023	-1,002	1,273	1,340	1,241	1,247	1,023	-1,048	1,323	1,094	1,245
	SD	0,166	0,122	0,115	0,110	0,079	0,099	0,129	0,086	0,063	0,159	0,229	0,110	0,082	0,173	0,152	0,193	0,131	0,091
	p-W	0,6886	0,4771	0,5015	0,4119	0,6446	0,1579	0,5452	0,7398	0,9303	0,0810	0,1274	0,0479	0,0237	0,8820	0,6367	0,1311	0,3231	0,0530
p21	XF	-1,052	-1,099	-1,043	-1,065	1,017	-1,001	-1,068	-1,090	-1,097	-1,003	-1,019	-1,029	-1,044	1,103	1,077	1,026	-1,012	-1,041
	SD	0,004	0,039	0,018	0,026	0,055	0,096	0,030	0,077	0,037	0,052	0,050	0,046	0,063	0,089	0,048	0,071	0,039	0,027
	p-W	0,0021	0,0483	0,0496	0,0527	0,6359	0,9695	0,0619	0,1751	0,0385	0,9539	0,5858	0,3948	0,3457	0,1830	0,1108	0,5826	0,6662	0,1179
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,064	-1,075	-1,013	-1,023	-1,001	1,013	-1,084	-1,076	-1,168	1,009	-1,121	-1,138	-1,172	1,019	-1,002	-1,069	-1,212	-1,262
	SD	0,049	0,075	0,105	0,079	0,069	0,105	0,078	0,134	0,018	0,112	0,083	0,066	0,075	0,022	0,058	0,227	0,087	0,200
	p-W	0,1554	0,2234	0,8566	0,6547	0,9720	0,8291	0,2022	0,4305	0,0082	0,8659	0,1176	0,0516	0,0454	0,2755	0,9916	0,7415	0,0365	0,1386
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,058	-1,049	-1,303	-1,126	-1,289	-1,146	-1,246	-1,193	-1,222	-1,048	1,060	-1,063	-1,053	-1,008	-1,042	-1,035	-1,155	-1,042
	SD	0,117	0,164	0,283	0,392	0,364	0,300	0,457	0,212	0,276	0,120	0,126	0,037	0,110	0,188	0,095	0,155	0,133	0,172
	p-W	0,4898	0,6418	0,2010	0,6558	0,2959	0,4926	0,5086	0,2734	0,3119	0,5615	0,5012	0,1074	0,4840	0,9998	0,5140	0,7606	0,1837	0,7369
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,112	-1,091	-1,254	1,036	-1,183	-1,153	-1,152	-1,016	1,020	1,019	-1,052	-1,065	1,026	-1,069	-1,067	-1,019	-1,194	-1,036
	SD	0,275	0,188	0,261	0,254	0,274	0,316	0,370	0,076	0,266	0,175	0,150	0,039	0,213	0,240	0,169	0,176	0,116	0,196
	p-W	0,5647	0,4882	0,2067	0,8031	0,3538	0,5122	0,6500	0,7944	0,8707	0,9036	0,6193	0,1074	0,8823	0,6924	0,5537	0,9096	0,0941	0,7783

<b>Substanz</b>		<b>2-Acetylaminofluoren (AAF) –MAS [µM]</b>									<b>2-Acetylaminofluoren (AAF) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,043	1,171	1,134	1,035	0,982	0,800	0,504	0,502	0,497	1,091	1,251	1,362	1,563	1,483	1,417	1,297	1,202	0,981
	SD	0,040	0,073	0,058	0,105	0,080	0,040	0,086	0,083	0,042	0,041	0,149	0,051	0,324	0,118	0,190	0,205	0,231	0,201
	p-W	0,2029	0,0566	0,0313	0,6517	0,7038	0,0022	0,0243	0,0214	0,0114	0,0628	0,0700	0,0015	0,0726	0,0043	0,0321	0,1177	0,2425	0,7751
CMFDA	XF	1,045	1,106	1,049	0,984	0,934	0,917	0,959	0,922	0,810	1,145	1,254	1,515	1,544	1,512	1,395	1,162	1,108	0,810
	SD	0,022	0,040	0,059	0,032	0,035	0,021	0,011	0,060	0,060	0,054	0,182	0,146	0,081	0,137	0,210	0,186	0,133	0,058
	p-W	0,0758	0,0312	0,2797	0,4563	0,0851	0,0163	0,0169	0,1571	0,0413	0,0253	0,1153	0,0128	0,0008	0,0093	0,0622	0,2668	0,2956	0,0385
p-p53 (Ser15)	XF	1,041	-1,008	-1,060	-1,047	-1,025	-1,069	1,266	-1,029	1,146	1,237	1,151	1,240	1,260	1,147	-1,085	1,071	1,197	1,364
	SD	0,147	0,209	0,083	0,085	0,057	0,226	0,235	0,176	0,296	0,252	0,144	0,182	0,215	0,320	0,081	0,087	0,191	0,420
	p-W	0,7479	0,9245	0,3452	0,4293	0,4984	0,6512	0,1904	0,7643	0,5180	0,2613	0,2144	0,1599	0,2182	0,4813	0,2327	0,3155	0,1934	0,2843
p21	XF	1,082	-1,006	1,042	1,045	1,083	1,320	1,662	1,875	1,648	-1,058	1,010	-1,202	-1,235	-1,139	-1,233	-1,313	-1,019	1,186
	SD	0,071	0,048	0,087	0,122	0,026	0,088	0,045	0,202	0,128	0,069	0,104	0,124	0,050	0,049	0,035	0,171	0,099	0,073
	p-W	0,1799	0,9236	0,4658	0,5528	0,0229	0,0209	0,0038	0,0118	0,0081	0,2734	0,8809	0,0855	0,0099	0,0341	0,0063	0,0627	0,8243	0,0492
p-H2AX (Ser139)	XF	1,109	1,034	1,118	1,137	1,184	1,336	1,676	1,872	1,640	-1,159	-1,096	-1,528	-1,446	-1,372	-1,342	-1,378	1,030	1,286
	SD	0,100	0,064	0,125	0,095	0,123	0,139	0,116	0,113	0,006	0,063	0,147	0,134	0,196	0,155	0,156	0,132	0,160	0,093
	p-W	0,1937	0,4596	0,2412	0,1305	0,1215	0,0473	0,0073	0,0039	0,0003	0,0515	0,4011	0,0226	0,0455	0,0416	0,0609	0,0335	0,7742	0,0172
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,094	-1,002	-1,093	1,008	1,006	1,154	2,049	2,254	1,941	1,049	1,101	-1,083	-1,308	-1,312	-1,110	-1,308	-1,041	1,086
	SD	0,159	0,119	0,088	0,046	0,063	0,087	0,292	0,291	0,301	0,093	0,119	0,078	0,137	0,098	0,227	0,102	0,037	0,052
	p-W	0,4102	0,9535	0,2202	0,8372	0,8723	0,0844	0,0360	0,0076	0,0268	0,4435	0,2905	0,2039	0,0435	0,0313	0,5308	0,0302	0,2073	0,0948
p-ATM (Ser1981)	XF	1,002	-1,091	-1,126	1,042	1,110	1,532	3,597	3,696	3,211	1,075	-1,035	-1,163	-1,289	-1,455	-1,152	1,022	1,258	1,678
	SD	0,104	0,089	0,076	0,053	0,061	0,117	0,715	0,447	0,380	0,039	0,104	0,161	0,236	0,131	0,120	0,149	0,129	0,142
	p-W	0,9267	0,2205	0,0896	0,3034	0,0820	0,0202	0,0214	0,0114	0,0111	0,0812	0,5881	0,1913	0,1302	0,0314	0,1609	0,8645	0,0599	0,0055

<b>Substanz</b>		<b>2,4-Diaminotoluol (DAT) –MAS [µM]</b>									<b>2,4-Diaminotoluol (DAT) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,122	1,144	1,107	1,140	1,108	1,099	1,026	0,884	0,693	1,074	1,181	1,121	1,087	1,231	1,309	1,285	1,308	1,262
	SD	0,050	0,173	0,087	0,156	0,164	0,070	0,067	0,041	0,018	0,068	0,075	0,128	0,101	0,064	0,157	0,089	0,054	0,145
	p-W	0,0723	0,3180	0,1720	0,2785	0,3644	0,1161	0,5327	0,0240	0,0111	0,2179	0,0303	0,2221	0,2786	0,0250	0,0688	0,0169	0,0015	0,0937
CMFDA	XF	1,086	1,127	1,007	1,019	0,951	1,022	0,961	0,915	0,938	1,120	1,098	1,028	0,998	0,986	0,950	1,038	1,156	1,132
	SD	0,046	0,111	0,126	0,161	0,108	0,086	0,085	0,083	0,112	0,111	0,140	0,072	0,051	0,108	0,071	0,094	0,076	0,171
	p-W	0,0649	0,1673	0,9866	0,9062	0,4740	0,7148	0,4759	0,2148	0,4071	0,2060	0,3512	0,5962	0,9085	0,8070	0,3361	0,5613	0,0762	0,3048
p-p53 (Ser15)	XF	1,050	1,058	1,152	1,021	-1,422	-1,340	-1,079	-1,120	1,207	1,195	1,128	1,067	1,280	-1,258	-1,311	1,090	1,164	1,371
	SD	0,046	0,042	0,066	0,196	0,141	0,276	0,168	0,226	0,244	0,156	0,243	0,278	0,286	0,305	0,465	0,162	0,409	0,336
	p-W	0,2128	0,1107	0,0554	0,9176	0,0401	0,1614	0,4887	0,4532	0,2537	0,1547	0,5209	0,7716	0,2403	0,2760	0,3547	0,5167	0,5922	0,2005
p21	XF	1,052	1,029	1,025	1,087	1,244	1,221	1,306	1,414	1,508	1,034	-1,009	-1,019	-1,051	1,092	1,009	-1,118	-1,116	-1,156
	SD	0,068	0,035	0,079	0,168	0,198	0,188	0,192	0,234	0,299	0,042	0,065	0,139	0,098	0,065	0,047	0,061	0,078	0,075
	p-W	0,2977	0,2612	0,6885	0,4721	0,1165	0,1322	0,0639	0,0491	0,0560	0,2933	0,7994	0,8309	0,4697	0,1253	0,7613	0,0869	0,1209	0,0759
p-H2AX (Ser139)	XF	1,066	1,000	1,069	1,080	1,216	1,242	1,242	1,447	1,555	1,088	1,085	1,014	1,120	1,267	1,251	-1,154	-1,358	-1,638
	SD	0,022	0,028	0,015	0,014	0,081	0,030	0,021	0,073	0,166	0,082	0,119	0,127	0,082	0,072	0,099	0,028	0,179	0,182
	p-W	0,0314	0,9841	0,0139	0,0127	0,0486	0,0062	0,0014	0,0084	0,0309	0,1885	0,3579	0,8807	0,1019	0,0098	0,0334	0,0197	0,0675	0,0248
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,007	1,187	-1,176	-1,213	-1,504	-1,424	-1,177	1,060	1,068	1,159	1,182	1,037	1,097	1,016	1,012	1,027	-1,059	-1,105
	SD	0,109	0,058	0,194	0,229	0,269	0,198	0,188	0,101	0,048	0,032	0,029	0,050	0,113	0,054	0,121	0,072	0,036	0,076
	p-W	0,8977	0,0081	0,2602	0,2419	0,0699	0,0619	0,2474	0,4550	0,1025	0,0161	0,0132	0,3429	0,2870	0,6790	0,8711	0,5660	0,0954	0,1301
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,179	1,043	-1,206	-1,268	-1,530	-1,527	-1,191	-1,014	1,242	1,190	1,099	1,060	1,173	1,028	1,043	1,033	-1,002	-1,031
	SD	0,175	0,142	0,081	0,293	0,198	0,231	0,181	0,068	0,054	0,078	0,078	0,062	0,092	0,058	0,167	0,083	0,011	0,139
	p-W	0,2112	0,6659	0,0329	0,2059	0,0235	0,0414	0,2195	0,7334	0,0235	0,0441	0,1509	0,2378	0,0968	0,5064	0,6879	0,5495	0,7705	0,7811

Substanz		2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin (IQ) –MAS [µM]									2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin (IQ) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,038	1,145	1,162	1,109	1,143	1,114	0,877	0,631	0,612	0,968	0,933	0,880	1,130	1,274	1,329	0,361	0,150	0,144
	SD	0,058	0,147	0,126	0,215	0,222	0,135	0,155	0,130	0,127	0,016	0,116	0,121	0,148	0,115	0,113	0,106	0,006	0,016
	p-W	0,4002	0,2565	0,1208	0,5321	0,3578	0,2233	0,2716	0,0760	0,0708	0,1034	0,4371	0,2240	0,3001	0,0478	0,0128	0,0227	0,0072	0,0094
CMFDA	XF	1,075	1,096	1,059	1,039	1,021	0,961	0,823	0,736	0,749	0,855	0,765	0,778	0,908	0,975	1,152	0,357	0,167	0,179
	SD	0,038	0,026	0,024	0,046	0,045	0,063	0,067	0,055	0,058	0,020	0,030	0,084	0,083	0,082	0,092	0,083	0,028	0,030
	p-W	0,0902	0,0300	0,0296	0,2817	0,5058	0,4123	0,0524	0,0202	0,0256	0,0235	0,0071	0,0191	0,1831	0,6004	0,0682	0,0214	0,0088	0,0093
p-p53 (Ser15)	XF	-1,018	-1,105	-1,087	-1,141	-1,450	-1,441	-1,413	-1,566	-1,648	1,330	1,092	1,366	1,149	1,032	1,167	-1,306	-2,048	-1,425
	SD	0,144	0,096	0,197	0,271	0,315	0,128	0,465	0,520	0,337	0,317	0,206	0,301	0,195	0,041	0,210	0,246	0,187	0,236
	p-W	0,6681	0,2077	0,4118	0,3825	0,1026	0,0675	0,2015	0,1290	0,0927	0,1967	0,5304	0,1491	0,3157	0,3107	0,3060	0,1070	0,0090	0,0676
p21	XF	1,078	1,094	1,149	1,174	1,218	1,253	1,273	1,621	1,574	1,125	1,154	1,165	-1,019	1,041	-1,051	1,513	2,722	2,706
	SD	0,162	0,137	0,158	0,257	0,151	0,326	0,171	0,258	0,296	0,128	0,050	0,149	0,059	0,085	0,092	0,377	0,508	0,440
	p-W	0,5175	0,3717	0,2142	0,3397	0,0840	0,3014	0,0659	0,0214	0,0396	0,2186	0,0251	0,1837	0,6172	0,4977	0,4430	0,1261	0,0183	0,0132
p-H2AX (Ser139)	XF	1,086	1,129	1,216	1,225	1,215	1,179	-1,030	1,122	1,251	1,363	1,498	2,009	1,450	1,271	1,295	2,634	-1,511	-1,538
	SD	0,100	0,085	0,088	0,101	0,065	0,175	0,115	0,141	0,154	0,133	0,176	0,176	0,147	0,086	0,259	0,102	0,400	0,285
	p-W	0,3040	0,0873	0,0276	0,0590	0,0207	0,2315	0,6830	0,2981	0,0781	0,0333	0,0243	0,0053	0,0199	0,0192	0,1812	0,0053	0,1270	0,0618
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,151	1,092	-1,012	-1,019	-1,635	-1,298	-1,118	-1,171	-1,277	1,125	1,111	1,133	-1,015	-1,378	-1,378	1,426	2,258	2,147
	SD	0,045	0,035	0,027	0,367	0,542	0,358	0,628	0,447	0,348	0,078	0,053	0,111	0,080	0,091	0,130	0,174	0,275	0,269
	p-W	0,0557	0,0229	0,4932	0,9574	0,1476	0,3087	0,8916	0,6167	0,3133	0,0922	0,0365	0,1736	0,7679	0,0239	0,0142	0,0463	0,0187	0,0197
p-ATM (Ser1981)	XF	1,159	1,070	1,009	1,021	-1,311	-1,033	1,300	1,934	2,326	1,069	1,053	1,161	1,072	-1,181	-1,138	1,136	-1,371	-1,599
	SD	0,058	0,044	0,062	0,338	0,160	0,300	0,402	0,313	0,421	0,047	0,089	0,176	0,130	0,133	0,042	0,058	0,241	0,142
	p-W	0,0286	0,1171	0,8067	0,9194	0,0588	0,8791	0,3113	0,0175	0,0183	0,1380	0,4481	0,2424	0,4676	0,1419	0,0030	0,0533	0,1132	0,0187

<b>Substanz</b>		<b>2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) –MAS [µM]</b>									<b>2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,056	1,151	1,131	1,080	1,092	1,074	0,921	0,739	0,327	1,027	0,998	0,928	0,878	1,128	1,163	1,298	1,139	1,160
	SD	0,118	0,057	0,030	0,060	0,139	0,149	0,008	0,034	0,023	0,102	0,154	0,104	0,175	0,051	0,054	0,073	0,082	0,061
	p-W	0,4547	0,0431	0,0275	0,1703	0,3448	0,4916	0,0118	0,0167	0,0048	0,6712	0,9406	0,3407	0,3382	0,0489	0,0324	0,0152	0,1007	0,0485
CMFDA	XF	1,073	1,089	1,059	1,037	1,127	1,071	1,048	1,032	0,077	0,998	0,873	0,890	0,782	0,773	0,825	0,814	0,757	0,764
	SD	0,093	0,057	0,042	0,073	0,128	0,022	0,029	0,027	0,002	0,052	0,080	0,107	0,038	0,051	0,031	0,048	0,030	0,089
	p-W	0,3109	0,1157	0,1260	0,4755	0,2348	0,0286	0,0947	0,1735	0,0004	0,8676	0,1321	0,2293	0,0212	0,0262	0,0200	0,0289	0,0079	0,0572
p-p53 (Ser15)	XF	1,024	1,302	1,073	-1,070	-1,244	-1,153	-1,019	1,004	-3,194	-1,015	-1,180	1,080	1,941	1,943	2,301	2,811	2,756	2,870
	SD	0,037	0,075	0,122	0,067	0,252	0,253	0,057	0,175	0,499	0,239	0,193	0,151	0,480	0,256	0,319	0,453	0,099	0,286
	p-W	0,385	0,014	0,403	0,210	0,186	0,475	0,603	0,965	0,005	0,9676	0,2307	0,4861	0,0503	0,0136	0,0102	0,0064	0,0032	0,0057
p21	XF	-1,010	-1,216	-1,022	1,007	-1,033	-1,078	-1,003	1,415	1,733	1,053	1,050	1,053	-1,105	1,063	1,243	1,301	1,477	1,548
	SD	0,075	0,106	0,003	0,044	0,071	0,079	0,039	0,125	0,115	0,095	0,096	0,124	0,044	0,118	0,111	0,172	0,167	0,124
	p-W	0,8807	0,0573	0,0081	0,7596	0,5408	0,2391	0,9604	0,0316	0,0112	0,4372	0,4760	0,5607	0,0578	0,4760	0,0453	0,0845	0,0297	0,0063
p-H2AX (Ser139)	XF	1,098	1,000	1,160	1,176	1,268	1,291	1,372	1,509	-1,848	1,180	1,254	1,286	3,382	7,055	8,125	8,075	7,932	7,704
	SD	0,065	0,052	0,055	0,009	0,020	0,097	0,034	0,070	0,268	0,105	0,180	0,147	0,504	1,259	1,439	1,518	1,457	1,494
	p-W	0,119	0,991	0,035	0,001	0,000	0,029	0,001	0,004	0,013	0,1030	0,0892	0,0389	0,0005	0,0003	0,0001	0,0005	0,0004	0,0008
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,060	1,055	-1,128	-1,240	-1,101	-1,096	1,023	1,342	1,915	1,049	-1,036	1,064	1,241	1,099	1,214	1,326	1,464	1,317
	SD	0,119	0,172	0,102	0,122	0,268	0,195	0,107	0,101	0,271	0,036	0,155	0,144	0,145	0,050	0,120	0,059	0,116	0,095
	p-W	0,4699	0,6375	0,1584	0,0728	0,6097	0,4965	0,7851	0,0170	0,0147	0,1600	0,6802	0,5266	0,0653	0,0393	0,1033	0,0144	0,0290	0,0190
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,116	-1,060	-1,310	-1,305	-1,222	-1,139	1,144	1,725	-2,229	-1,008	1,093	1,633	2,402	2,309	2,499	2,567	2,656	2,552
	SD	0,279	0,193	0,199	0,239	0,445	0,212	0,119	0,194	0,514	0,124	0,117	0,056	0,127	0,176	0,255	0,130	0,062	0,124
	p-W	0,5897	0,6461	0,0927	0,1411	0,5581	0,3820	0,1757	0,0119	0,0288	0,9808	0,3133	0,0057	3E-06	0,0053	0,0080	0,0032	0,0056	0,0001

Substanz		Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB1) –MAS [µM]									Aflatoxin B <sub>1</sub> (AFB1) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,813	0,734	0,637	0,550	0,484	0,397	0,359	0,422	0,635	1,154	1,204	1,191	1,379	1,369	1,305	1,237	1,221	0,398
	SD	0,097	0,101	0,039	0,077	0,055	0,065	0,094	0,044	0,048	0,045	0,081	0,077	0,051	0,045	0,097	0,098	0,093	0,079
	p-W	0,1062	0,0790	0,0188	0,0331	0,0213	0,0217	0,0291	0,0150	0,0241	0,0332	0,0517	0,0635	0,0019	0,0104	0,0173	0,0340	0,0345	0,0136
CMFDA	XF	1,048	1,077	1,090	1,067	1,042	0,961	0,842	0,756	0,093	0,922	0,958	0,896	0,837	0,783	0,749	0,679	0,591	0,439
	SD	0,031	0,032	0,004	0,023	0,055	0,019	0,048	0,023	0,006	0,086	0,068	0,063	0,074	0,071	0,045	0,066	0,047	0,057
	p-W	0,1144	0,0385	0,0049	0,0208	0,3387	0,0886	0,0490	0,0114	0,0039	0,2460	0,3967	0,1221	0,0772	0,0447	0,0177	0,0223	0,0098	0,0059
p-p53 (Ser15)	XF	1,284	1,474	1,723	1,919	2,169	2,187	2,290	2,075	-2,011	1,103	1,205	1,294	1,529	1,866	1,848	2,131	2,808	1,381
	SD	0,304	0,300	0,153	0,466	0,661	0,366	0,157	0,405	0,400	0,057	0,033	0,105	0,232	0,149	0,170	0,110	0,148	0,246
	p-W	0,2278	0,0940	0,0020	0,0300	0,0406	0,0047	0,0049	0,0092	0,0576	0,0767	0,0116	0,0309	0,0509	0,0068	0,0118	0,0063	0,0068	0,1329
p21	XF	1,445	1,654	1,834	1,942	1,721	1,388	1,105	-1,080	-1,204	1,056	1,040	-1,168	-1,246	-1,170	-1,143	1,073	1,068	1,048
	SD	0,085	0,093	0,136	0,148	0,131	0,089	0,089	0,148	0,175	0,043	0,064	0,051	0,195	0,122	0,096	0,025	0,094	0,129
	p-W	0,0077	0,0013	0,0101	0,0026	0,0040	0,0072	0,1600	0,4533	0,1801	0,1462	0,3971	0,0378	0,1428	0,1327	0,1262	0,0266	0,3244	0,5587
p-H2AX (Ser139)	XF	1,553	2,295	3,695	6,095	8,736	11,848	14,184	14,545	1,632	1,482	1,860	2,660	3,791	4,875	6,442	11,295	12,155	4,239
	SD	0,050	0,032	0,148	0,550	0,393	0,566	1,475	1,622	0,052	0,089	0,183	0,165	0,955	0,836	0,729	0,586	0,973	0,861
	p-W	0,0055	0,0014	0,0002	0,0018	0,0006	0,0002	0,0035	0,0034	0,0038	0,0063	0,0150	0,0029	0,0350	0,0151	0,0063	0,0040	0,0009	0,0234
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,068	1,169	1,371	1,531	1,843	1,889	1,894	1,940	1,390	-1,006	1,057	1,142	1,162	1,134	1,173	1,207	1,262	1,382
	SD	0,068	0,119	0,200	0,178	0,183	0,238	0,378	0,322	0,250	0,014	0,030	0,040	0,080	0,011	0,083	0,055	0,019	0,057
	p-W	0,2137	0,1214	0,0657	0,0210	0,0300	0,0063	0,0269	0,0142	0,0782	0,5797	0,0695	0,0304	0,0869	0,0003	0,0663	0,0180	0,0005	0,0030
p-ATM (Ser1981)	XF	1,175	1,348	1,780	2,330	3,174	4,247	4,610	4,918	-2,102	1,097	1,193	1,446	1,469	1,579	1,666	1,676	1,782	1,868
	SD	0,031	0,127	0,151	0,293	0,344	0,689	1,031	0,665	0,342	0,012	0,062	0,062	0,157	0,092	0,178	0,083	0,130	0,217
	p-W	0,0015	0,0235	0,0072	0,0039	0,0031	0,0042	0,0083	0,0010	0,0234	0,003	0,024	0,008	0,027	0,004	0,016	0,001	0,005	0,013

<b>Substanz</b>		<b>Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) -MAS [µM]</b>									<b>Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,046	1,038	0,907	0,756	0,254	0,208	0,402	0,516	0,514	1,230	1,252	1,319	1,346	1,304	0,880	0,483	0,385	0,311
	SD	0,236	0,223	0,243	0,177	0,065	0,046	0,141	0,144	0,102	0,162	0,237	0,176	0,151	0,225	0,019	0,074	0,108	0,094
	p-W	0,8695	0,9362	0,5150	0,1866	0,0193	0,0163	0,0524	0,0601	0,0458	0,1277	0,2133	0,0910	0,0464	0,1477	0,0060	0,0117	0,0162	0,0120
CMFDA	XF	1,102	1,210	1,238	1,080	0,723	0,160	0,162	0,174	0,157	0,968	1,005	0,996	0,978	0,656	0,453	0,329	0,299	0,265
	SD	0,296	0,232	0,324	0,322	0,216	0,040	0,027	0,043	0,032	0,092	0,187	0,245	0,372	0,124	0,093	0,038	0,038	0,047
	p-W	0,7246	0,2492	0,3238	0,8124	0,1668	0,0167	0,0149	0,0176	0,0160	0,5985	0,9853	0,9200	0,8648	0,0496	0,0186	0,0096	0,0093	0,0109
p-p53 (Ser15)	XF	1,064	1,149	1,349	1,064	1,047	-1,943	-3,114	-2,429	-2,605	1,167	-1,024	1,231	1,047	-1,322	-1,285	-2,121	-2,184	-2,420
	SD	0,167	0,248	0,154	0,226	0,271	0,453	0,687	0,988	0,602	0,128	0,145	0,364	0,040	0,201	0,244	0,087	0,186	0,041
	p-W	0,6905	0,4309	0,0582	0,8391	0,8714	0,0869	0,0496	0,1164	0,0517	0,1530	0,8149	0,3829	0,1756	0,0918	0,1483	0,0019	0,0014	0,0015
p21	XF	1,080	1,271	1,153	1,261	1,975	3,249	2,509	2,492	2,159	1,030	1,114	-1,086	-1,076	1,123	1,222	1,339	1,510	1,393
	SD	0,046	0,155	0,170	0,114	0,231	0,584	0,395	0,418	0,255	0,048	0,135	0,225	0,080	0,107	0,056	0,249	0,287	0,250
	p-W	0,0597	0,0972	0,2320	0,0303	0,0035	0,0074	0,0059	0,0084	0,0080	0,3914	0,2955	0,5679	0,2340	0,1604	0,0052	0,1060	0,0635	0,0732
p-H2AX (Ser139)	XF	1,149	1,396	1,350	1,438	2,695	3,910	3,301	4,369	2,760	1,143	1,153	1,253	1,469	2,074	1,206	1,308	2,893	2,036
	SD	0,029	0,240	0,136	0,059	0,183	0,838	0,880	1,131	0,330	0,077	0,147	0,428	0,307	0,565	0,121	0,367	1,225	0,524
	p-W	0,0253	0,0969	0,0467	0,0013	0,0008	0,0175	0,0395	0,0249	0,0199	0,1087	0,1766	0,4138	0,0833	0,0644	0,0862	0,2614	0,1079	0,0463
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,412	1,089	1,488	1,675	2,243	3,240	2,576	2,452	2,015	-1,025	1,010	1,043	1,016	-1,034	1,089	1,356	1,439	1,299
	SD	0,465	0,172	0,315	0,432	0,589	0,579	0,381	0,953	0,464	0,079	0,129	0,242	0,215	0,086	0,154	0,277	0,125	0,213
	p-W	0,2833	0,4936	0,0844	0,1029	0,0371	0,0077	0,0029	0,0754	0,0290	0,7279	0,9132	0,7332	0,8687	0,5427	0,4038	0,1349	0,0131	0,1196
p-ATM (Ser1981)	XF	1,211	1,030	1,349	1,418	3,350	3,327	2,031	2,375	1,896	-1,016	-1,136	1,039	1,057	-1,073	-1,103	-1,199	1,128	-1,078
	SD	0,338	0,130	0,176	0,281	1,192	1,112	0,373	1,152	0,579	0,080	0,197	0,307	0,113	0,129	0,342	0,381	0,221	0,366
	p-W	0,3797	0,7847	0,0549	0,0799	0,0341	0,0268	0,0118	0,1181	0,0777	0,8733	0,3563	0,8638	0,4794	0,4120	0,6852	0,4924	0,4203	0,7753

<b>Substanz</b>		<b>Cisplatin (CP) –MAS [µM]</b>									<b>Cisplatin (CP) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,021	0,954	0,774	0,721	0,621	0,606	0,560	0,599	0,578	1,188	1,073	1,041	1,146	1,018	1,109	1,104	1,091	1,316
	SD	0,067	0,064	0,088	0,082	0,081	0,090	0,106	0,132	0,136	0,242	0,140	0,149	0,280	0,132	0,145	0,233	0,212	0,357
	p-W	0,6743	0,3405	0,0578	0,0375	0,0232	0,0260	0,0281	0,0445	0,0433	0,3511	0,4255	0,6400	0,4995	0,9656	0,3123	0,5960	0,5669	0,2803
CMFDA	XF	1,240	1,280	1,205	1,112	1,233	0,935	0,648	0,646	0,534	1,1300	1,1591	1,0167	1,1040	0,8664	1,0084	1,0236	0,9533	0,8238
	SD	0,064	0,039	0,181	0,086	0,066	0,050	0,078	0,037	0,063	0,1588	0,1449	0,0664	0,1602	0,0948	0,2032	0,2943	0,1617	0,1484
	p-W	0,0061	0,0164	0,1968	0,1278	0,0080	0,1636	0,0310	0,0146	0,0145	0,2727	0,1614	0,7768	0,3676	0,1477	0,9616	0,9944	0,5921	0,1801
p-p53 (Ser15)	XF	1,227	1,229	1,617	2,224	3,079	3,051	1,288	1,141	1,100	1,130	1,026	1,172	1,218	1,257	1,580	1,528	1,507	1,634
	SD	0,208	0,109	0,152	0,038	0,358	0,306	0,207	0,172	0,326	0,156	0,076	0,036	0,244	0,242	0,265	0,172	0,162	0,481
	p-W	0,1963	0,0438	0,0302	0,0063	0,0268	0,0078	0,0879	0,2747	0,6724	0,2629	0,5524	0,0039	0,2781	0,1946	0,0420	0,0381	0,0134	0,1223
p21	XF	1,087	1,176	1,066	1,191	1,771	2,556	1,754	-1,079	-1,300	1,066	1,068	1,001	-1,196	1,039	1,263	1,099	1,202	-1,048
	SD	0,120	0,183	0,083	0,075	0,270	0,162	0,365	0,283	0,274	0,078	0,134	0,094	0,125	0,084	0,147	0,120	0,119	0,047
	p-W	0,3052	0,1953	0,3405	0,0320	0,0523	0,0225	0,0270	0,6554	0,1846	0,2641	0,4620	0,9444	0,1214	0,5608	0,0878	0,2605	0,0578	0,2114
p-H2AX (Ser139)	XF	1,174	1,331	1,446	2,006	4,052	5,568	4,416	5,850	2,532	1,159	1,197	1,627	-1,087	1,309	2,238	1,437	1,946	1,535
	SD	0,169	0,174	0,182	0,176	0,488	0,459	0,234	1,013	0,652	0,081	0,146	0,748	0,232	0,306	0,911	0,162	0,288	0,152
	p-W	0,2380	0,1001	0,0957	0,0357	0,0272	0,0229	0,0053	0,0205	0,0223	0,0583	0,1115	0,2896	0,6027	0,2442	0,1452	0,0283	0,0103	0,0181
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,239	1,235	1,310	1,256	1,487	1,583	1,633	1,674	1,608	-1,059	-1,040	-1,113	-1,103	-1,119	-1,010	1,022	1,140	-1,015
	SD	0,059	0,073	0,228	0,179	0,033	0,223	0,173	0,217	0,167	0,181	0,160	0,174	0,229	0,114	0,228	0,215	0,191	0,078
	p-W	0,0049	0,0117	0,1465	0,1035	0,0012	0,0594	0,0075	0,0137	0,0286	0,6445	0,6719	0,3753	0,5148	0,2098	0,9087	0,9229	0,3259	0,7548
p-ATM (Ser1981)	XF	1,295	1,245	1,390	1,308	1,771	1,956	2,784	3,236	2,839	-1,077	-1,089	-1,097	-1,021	-1,111	1,092	1,153	1,423	1,228
	SD	0,141	0,067	0,222	0,219	0,151	0,222	0,449	0,509	0,173	0,441	0,323	0,368	0,470	0,312	0,414	0,358	0,293	0,229
	p-W	0,0346	0,0136	0,0814	0,1167	0,0020	0,0353	0,0179	0,0091	0,0142	0,8678	0,6817	0,7045	0,9812	0,6217	0,7650	0,5665	0,0951	0,1955

<b>Substanz</b>		<b><i>p</i>-Chloranilin (CA) –MAS [μM]</b>									<b><i>p</i>-Chloranilin (CA) +MAS [μM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,244	1,155	1,083	1,023	1,001	1,049	0,980	0,931	0,733	1,089	1,076	1,071	1,314	1,171	1,221	1,209	1,101	1,201
	SD	0,119	0,134	0,036	0,164	0,108	0,063	0,062	0,112	0,026	0,158	0,179	0,146	0,161	0,217	0,167	0,172	0,279	0,455
	p-W	0,0707	0,1705	0,0590	0,8421	0,9885	0,3154	0,6453	0,4049	0,0012	0,4407	0,5498	0,4998	0,0775	0,3110	0,1506	0,1714	0,6016	0,5271
CMFDA	XF	0,978	0,952	0,981	0,990	1,016	0,904	0,954	0,831	0,787	1,054	1,050	1,105	1,383	1,214	1,308	1,297	1,231	1,410
	SD	0,108	0,134	0,156	0,124	0,050	0,135	0,059	0,064	0,113	0,063	0,113	0,138	0,145	0,158	0,234	0,125	0,148	0,256
	p-W	0,8508	0,5421	0,8888	0,9627	0,6866	0,3630	0,2839	0,0415	0,0972	0,2951	0,5267	0,2792	0,0048	0,0669	0,0816	0,0285	0,0398	0,0368
p-p53 (Ser15)	XF	1,087	1,232	1,086	1,007	1,142	1,021	1,126	1,255	1,039	1,056	1,124	1,278	1,312	1,449	1,758	1,701	1,711	1,389
	SD	0,051	0,266	0,295	0,102	0,256	0,077	0,228	0,289	0,227	0,072	0,170	0,147	0,147	0,222	0,357	0,307	0,322	0,251
	p-W	0,0567	0,2819	0,7047	0,9979	0,4494	0,7475	0,4455	0,2385	0,8055	0,3242	0,3069	0,0425	0,0286	0,0321	0,0636	0,0233	0,0296	0,0716
p21	XF	-1,141	-1,145	-1,158	-1,294	-1,205	-1,154	-1,300	-1,040	-1,252	-1,050	1,042	-1,065	-1,274	-1,044	-1,179	-1,302	-1,050	-1,276
	SD	0,213	0,331	0,294	0,167	0,145	0,198	0,190	0,296	0,202	0,077	0,086	0,100	0,143	0,082	0,236	0,314	0,229	0,119
	p-W	0,3680	0,5961	0,5010	0,0751	0,1296	0,3260	0,0957	0,8946	0,1599	0,3778	0,4781	0,3696	0,0541	0,4478	0,3366	0,2361	0,7764	0,0524
p-H2AX (Ser139)	XF	1,057	1,110	1,042	-1,085	-1,010	1,029	-1,084	1,169	-1,101	1,293	1,297	1,220	-1,183	-1,112	-1,292	-1,517	1,109	-1,628
	SD	0,158	0,249	0,278	0,137	0,115	0,229	0,161	0,269	0,230	0,252	0,152	0,154	0,131	0,049	0,096	0,201	0,664	0,016
	p-W	0,6022	0,5285	0,8303	0,3942	0,8937	0,8610	0,4671	0,3819	0,5521	0,2001	0,0950	0,1337	0,0963	0,0353	0,0176	0,0113	0,6947	0,0015
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,076	-1,067	-1,052	-1,002	1,023	-1,115	-1,058	-1,107	-1,109	1,065	1,145	1,127	1,030	-1,041	-1,022	1,024	-1,011	1,161
	SD	0,166	0,189	0,179	0,169	0,136	0,118	0,059	0,150	0,137	0,047	0,070	0,145	0,039	0,048	0,152	0,054	0,069	0,033
	p-W	0,5526	0,6039	0,7021	0,9886	0,8376	0,2029	0,2103	0,3707	0,2931	0,1554	0,0527	0,2557	0,3244	0,2816	0,8640	0,4576	0,8548	0,0033
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,200	-1,137	-1,109	-1,015	1,030	-1,162	-1,102	-1,042	1,116	1,183	1,250	1,436	1,228	1,337	1,438	1,413	1,428	1,808
	SD	0,226	0,289	0,250	0,244	0,160	0,163	0,080	0,171	0,194	0,127	0,109	0,205	0,054	0,068	0,187	0,067	0,168	0,236
	p-W	0,218	0,512	0,543	0,943	0,805	0,164	0,121	0,711	0,432	0,171	0,034	0,050	0,023	0,008	0,058	0,036	0,072	0,063

Substanz		Etoposid (ETO) –MAS [µM]									Etoposid (ETO) +MAS [µM]								
Parameter		0,0195	0,0391	0,0781	0,1563	0,3125	0,625	1,3	2,5	5,0	0,0195	0,0391	0,0781	0,1563	0,3125	0,625	1,3	2,5	5,0
SSC	XF	1,020	1,024	0,828	0,709	0,628	0,571	0,583	0,560	0,471	1,087	1,164	1,180	1,156	1,121	1,156	1,160	1,064	0,911
	SD	0,048	0,063	0,079	0,147	0,104	0,116	0,083	0,104	0,080	0,033	0,051	0,050	0,095	0,106	0,071	0,075	0,127	0,069
	p-W	0,5871	0,6461	0,1089	0,1261	0,0716	0,0631	0,0524	0,0550	0,0423	0,0490	0,0478	0,0351	0,1093	0,1851	0,0712	0,0724	0,4521	0,1587
CMFDA	XF	1,028	1,080	1,058	1,109	1,104	1,093	1,066	1,082	1,072	1,013	1,017	1,004	1,033	1,034	1,036	1,023	1,069	1,041
	SD	0,032	0,032	0,034	0,063	0,081	0,098	0,102	0,085	0,096	0,049	0,108	0,130	0,077	0,068	0,052	0,004	0,058	0,091
	p-W	0,2411	0,0478	0,0838	0,0694	0,1270	0,2239	0,3718	0,2147	0,3134	0,7239	0,8575	0,9881	0,5703	0,5085	0,3725	0,0054	0,1717	0,5387
p-p53 (Ser15)	XF	-1,010	1,127	1,328	1,613	1,915	2,241	2,651	2,911	3,293	-1,033	1,095	1,140	1,104	1,091	1,042	1,085	1,149	1,389
	SD	0,113	0,137	0,142	0,171	0,244	0,399	0,349	0,313	0,261	0,092	0,027	0,032	0,068	0,029	0,092	0,050	0,073	0,129
	p-W	0,8067	0,2718	0,0319	0,0064	0,0045	0,0091	0,0003	0,0006	0,0018	0,6593	0,0175	0,0249	0,1299	0,0314	0,5244	0,0959	0,0683	0,0337
p21	XF	1,083	1,100	1,187	1,384	1,582	1,806	2,051	2,430	2,599	-1,059	-1,033	-1,049	-1,096	-1,106	-1,138	-1,036	1,032	1,172
	SD	0,069	0,017	0,033	0,101	0,132	0,199	0,221	0,234	0,150	0,041	0,056	0,141	0,092	0,112	0,136	0,066	0,092	0,156
	p-W	0,1794	0,0120	0,0132	0,0216	0,0152	0,0192	0,0134	0,0086	0,0028	0,1112	0,4243	0,6309	0,2196	0,2397	0,2124	0,4457	0,6429	0,1840
p-H2AX (Ser139)	XF	1,058	1,129	1,279	1,576	2,070	2,599	3,277	4,363	5,427	-1,105	-1,054	-1,066	-1,078	-1,150	-1,192	-1,107	-1,005	1,264
	SD	0,064	0,021	0,043	0,055	0,064	0,255	0,340	0,405	0,356	0,173	0,154	0,215	0,168	0,253	0,251	0,063	0,189	0,226
	p-W	0,2501	0,0100	0,0065	0,0041	0,0021	0,0090	0,0086	0,0062	0,0035	0,3796	0,5415	0,6495	0,4919	0,4011	0,3106	0,1380	0,8882	0,1896
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,008	1,182	1,572	1,591	1,580	2,154	1,620	1,750	1,569	-1,042	-1,048	-1,101	-1,137	-1,157	-1,176	-1,244	-1,220	-1,170
	SD	0,042	0,006	0,408	0,307	0,477	0,457	0,408	0,550	0,218	0,025	0,080	0,053	0,085	0,078	0,112	0,046	0,029	0,066
	p-W	0,8347	0,0078	0,1655	0,1135	0,2010	0,0789	0,1500	0,1784	0,0753	0,0958	0,4187	0,0677	0,0882	0,0553	0,0971	0,0070	0,0038	0,0374
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,017	-1,013	1,347	1,230	1,287	1,596	1,434	1,606	1,790	-1,068	-1,148	-1,196	-1,200	-1,139	-1,242	-1,324	-1,300	-1,200
	SD	0,091	0,047	0,223	0,104	0,178	0,191	0,330	0,215	0,060	0,034	0,158	0,165	0,150	0,068	0,097	0,081	0,035	0,029
	p-W	0,8709	0,7814	0,1527	0,1147	0,1620	0,0356	0,1879	0,0833	0,0121	0,0635	0,2065	0,1379	0,1073	0,0546	0,0302	0,0113	0,0027	0,0022

<b>Substanz</b>		<b>Etoposid (ETO) –MAS [µM]</b>								<b>Etoposid (ETO) +MAS [µM]</b>									
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	0,477	0,524	0,482	0,461	0,418	0,384	0,325	0,277	0,239	1,173	1,210	1,201	1,285	1,208	1,106	1,068	0,901	0,775
	SD	0,088	0,138	0,078	0,053	0,038	0,081	0,061	0,052	0,041	0,109	0,181	0,189	0,171	0,122	0,039	0,063	0,052	0,066
	p-W	0,0194	0,0489	0,0222	0,0173	0,0090	0,0227	0,0160	0,0133	0,0108	0,1168	0,1940	0,2190	0,1124	0,1094	0,0319	0,2152	0,0682	0,0188
CMFDA	XF	0,976	1,021	0,966	0,943	0,929	0,882	0,818	0,733	0,645	1,105	1,096	1,160	1,162	1,242	1,242	1,187	1,034	0,900
	SD	0,060	0,087	0,041	0,005	0,045	0,028	0,035	0,039	0,048	0,097	0,145	0,188	0,219	0,210	0,065	0,121	0,120	0,089
	p-W	0,5621	0,7451	0,2826	0,0053	0,1042	0,0265	0,0199	0,0131	0,0113	0,1850	0,3665	0,2693	0,3203	0,1654	0,0148	0,1008	0,6998	0,1941
p-p53 (Ser15)	XF	2,694	2,805	3,399	3,002	2,846	3,213	3,096	2,456	2,165	1,191	1,320	1,545	1,790	1,770	2,061	2,146	2,386	2,517
	SD	0,495	0,347	0,563	0,466	0,351	0,392	0,448	0,057	0,211	0,157	0,049	0,082	0,151	0,199	0,310	0,467	0,522	1,151
	p-W	0,0120	0,0009	0,0011	0,0015	4E-05	1E-05	0,0086	0,0066	0,0179	0,1729	0,0211	0,0094	0,0016	0,0066	0,0093	0,0270	0,0198	0,1104
p21	XF	2,331	2,754	2,563	2,726	3,051	3,011	3,060	3,295	2,589	1,119	1,215	1,302	1,476	1,586	1,821	1,645	1,911	1,784
	SD	0,296	0,382	0,218	0,239	0,464	0,496	0,200	0,301	0,290	0,150	0,066	0,165	0,082	0,105	0,175	0,382	0,243	0,162
	p-W	0,0177	0,0157	0,0016	0,0041	0,0114	0,0134	0,0007	0,0027	0,0077	0,3165	0,0264	0,0691	0,0040	0,0087	0,0043	0,0844	0,0110	0,0026
p-H2AX (Ser139)	XF	3,549	4,397	4,722	4,708	4,214	3,759	4,534	6,302	6,717	1,131	1,268	1,409	1,718	1,868	2,438	2,837	3,600	3,941
	SD	0,471	0,736	0,531	0,727	0,697	0,777	0,852	0,943	1,581	0,094	0,120	0,233	0,096	0,190	0,360	0,803	0,625	0,617
	p-W	0,0087	0,0111	0,0022	0,0063	0,0081	0,0168	0,0109	0,0055	0,0159	0,1021	0,0942	0,0724	0,0004	0,0021	0,0099	0,0457	0,0126	0,0030
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,175	1,261	1,332	1,337	1,331	1,426	1,647	1,756	1,614	-1,097	-1,101	-1,177	-1,110	-1,042	1,046	1,140	1,434	1,404
	SD	0,089	0,171	0,095	0,034	0,057	0,073	0,202	0,174	0,099	0,093	0,063	0,194	0,168	0,050	0,041	0,056	0,262	0,071
	p-W	0,0870	0,1225	0,0396	0,0058	0,0051	0,0001	0,0072	0,0067	0,0022	0,2122	0,0842	0,2048	0,3533	0,2602	0,1813	0,0727	0,1269	0,0086
p-ATM (Ser1981)	XF	1,459	1,605	1,769	1,821	2,130	2,424	3,259	3,882	3,836	-1,278	-1,386	-1,681	-1,766	-1,497	-1,277	1,041	1,391	1,641
	SD	0,063	0,091	0,106	0,170	0,050	0,271	0,277	0,365	0,447	0,080	0,099	0,265	0,226	0,162	0,040	0,068	0,042	0,060
	p-W	0,0007	0,0010	0,0073	0,0098	0,0044	0,0076	0,0029	0,0027	0,0053	0,0363	0,0127	0,0071	0,0020	0,0077	0,0125	0,3828	0,0160	0,0001

<b>Substanz</b>		<b>Hydroquinon (HQ) –MAS [µM]</b>									<b>Hydroquinon HQ +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,227	1,229	1,170	1,094	0,971	0,802	0,624	0,279	0,208	1,098	1,161	1,115	1,129	1,178	1,136	1,136	1,056	0,970
	SD	0,102	0,149	0,158	0,202	0,140	0,142	0,077	0,071	0,043	0,136	0,173	0,118	0,115	0,138	0,076	0,058	0,157	0,128
	p-W	0,0090	0,0387	0,1173	0,5594	0,5437	0,1591	0,0543	0,0268	0,0274	0,3551	0,2574	0,2209	0,1834	0,1495	0,0825	0,0543	0,6017	0,7007
CMFDA	XF	1,093	1,107	1,053	1,031	0,981	0,984	0,838	0,168	0,079	1,019	1,029	1,057	1,052	1,026	0,991	0,951	0,877	0,784
	SD	0,072	0,010	0,038	0,030	0,027	0,067	0,039	0,139	0,007	0,057	0,050	0,113	0,072	0,097	0,082	0,066	0,065	0,057
	p-W	0,1872	0,0081	0,1320	0,1891	0,3102	0,6354	0,0376	0,0046	0,0057	0,6783	0,4702	0,5162	0,3703	0,7400	0,8160	0,3466	0,1139	0,0407
p-p53 (Ser15)	XF	-1,192	1,122	1,233	1,045	-1,198	1,043	1,319	-1,946	-2,411	-1,071	-1,021	-1,036	1,012	1,047	-1,012	1,145	1,075	-1,021
	SD	0,226	0,356	0,364	0,255	0,388	0,393	0,346	0,732	0,798	0,273	0,213	0,187	0,151	0,288	0,306	0,462	0,383	0,331
	p-W	0,2910	0,6807	0,4381	0,7793	0,4687	0,9075	0,2576	0,1518	0,0714	0,6568	0,7806	0,6903	0,9720	0,8942	0,8703	0,7135	0,8483	0,8580
p21	XF	1,033	-1,041	-1,088	1,021	1,172	1,350	1,394	-1,167	-1,323	1,018	-1,027	-1,073	-1,065	-1,025	-1,009	1,008	-1,017	-1,053
	SD	0,126	0,120	0,106	0,059	0,115	0,138	0,089	0,127	0,047	0,162	0,057	0,052	0,069	0,090	0,043	0,080	0,092	0,120
	p-W	0,7036	0,6193	0,2854	0,6182	0,1118	0,0363	0,0121	0,1346	0,0092	0,8840	0,5450	0,1151	0,2631	0,6434	0,6780	0,9532	0,7178	0,4962
p-H2AX (Ser139)	XF	1,010	1,083	1,083	1,217	1,321	1,860	3,014	3,453	1,095	1,057	-1,051	-1,128	-1,120	-1,138	-1,157	-1,026	1,056	1,258
	SD	0,066	0,083	0,107	0,194	0,155	0,228	0,814	3,331	0,327	0,231	0,012	0,039	0,053	0,088	0,109	0,128	0,098	0,249
	p-W	0,8679	0,2145	0,3002	0,1701	0,0491	0,0112	0,0332	0,3382	0,6095	0,7420	0,0329	0,0069	0,0778	0,1241	0,1371	0,6671	0,4200	0,1617
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,026	1,040	1,125	1,401	1,363	1,385	1,442	2,278	2,450	1,014	-1,023	-1,116	1,017	-1,046	-1,108	-1,148	-1,031	-1,119
	SD	0,068	0,042	0,105	0,272	0,150	0,171	0,081	0,100	0,269	0,127	0,191	0,207	0,160	0,090	0,156	0,211	0,219	0,226
	p-W	0,5563	0,2197	0,1911	0,1361	0,0679	0,0758	0,0204	0,0079	0,0035	0,8086	0,8029	0,4273	0,9153	0,4518	0,3460	0,3502	0,7884	0,4585
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,089	-1,155	-1,075	1,050	1,098	1,220	1,454	3,700	3,178	-1,095	-1,248	-1,227	-1,200	-1,257	-1,336	-1,421	-1,068	-1,058
	SD	0,021	0,083	0,073	0,109	0,047	0,059	0,156	0,430	0,723	0,112	0,097	0,212	0,157	0,135	0,171	0,186	0,213	0,190
	p-W	0,0273	0,0835	0,2138	0,5504	0,0714	0,0054	0,0435	0,0067	0,0101	0,2511	0,0371	0,1980	0,1506	0,0810	0,0746	0,0569	0,6389	0,6439

<b>Substanz</b>		<b>Azidothymidin (AZT) –MAS [µM]</b>								<b>Azidothymidin (AZT) +MAS [µM]</b>									
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,054	0,978	0,875	0,904	0,871	0,795	0,660	0,584	0,531	1,105	1,100	1,094	1,021	1,161	1,018	0,952	0,848	0,859
	SD	0,082	0,111	0,122	0,104	0,127	0,089	0,061	0,068	0,076	0,053	0,061	0,139	0,049	0,164	0,030	0,143	0,111	0,082
	p-W	0,3733	0,6968	0,2128	0,2473	0,2151	0,0772	0,0246	0,0222	0,0220	0,0493	0,0856	0,3630	0,5742	0,2259	0,4208	0,5556	0,1470	0,0932
CMFDA	XF	1,159	1,116	1,053	1,114	1,107	1,036	1,014	1,088	1,177	1,160	1,125	1,172	1,150	1,109	1,114	1,046	1,040	0,991
	SD	0,103	0,098	0,143	0,153	0,117	0,084	0,104	0,083	0,139	0,060	0,047	0,068	0,065	0,008	0,045	0,041	0,008	0,068
	p-W	0,0973	0,1503	0,6080	0,3092	0,2359	0,5422	0,9032	0,2072	0,1311	0,0290	0,0302	0,0362	0,0647	0,0061	0,0306	0,1894	0,0104	0,8415
p-p53 (Ser15)	XF	1,191	1,257	1,099	1,107	1,228	1,322	1,595	1,806	2,304	-1,032	-1,090	-1,059	-1,009	1,135	1,232	1,300	1,113	1,135
	SD	0,332	0,221	0,257	0,228	0,131	0,281	0,393	0,306	0,391	0,078	0,104	0,040	0,041	0,175	0,104	0,104	0,137	0,109
	p-W	0,4277	0,1864	0,5764	0,5171	0,0802	0,1747	0,0905	0,0221	0,0112	0,6105	0,2759	0,1367	0,7330	0,3280	0,0544	0,0295	0,2932	0,1665
p21	XF	-1,028	-1,039	1,014	-1,007	1,001	1,050	1,303	1,512	1,634	1,090	1,044	1,040	1,065	1,039	1,043	1,138	1,147	1,118
	SD	0,325	0,233	0,194	0,188	0,203	0,199	0,311	0,332	0,232	0,078	0,039	0,079	0,086	0,030	0,126	0,140	0,120	0,113
	p-W	0,9169	0,8137	0,9641	0,9095	0,9553	0,7503	0,2150	0,0854	0,0171	0,1676	0,1944	0,4716	0,3064	0,1377	0,6224	0,2167	0,1485	0,1962
p-H2AX (Ser139)	XF	1,070	1,080	1,012	1,031	1,117	1,153	1,521	2,320	3,284	-1,078	-1,145	-1,122	-1,101	-1,180	-1,215	-1,022	1,277	1,263
	SD	0,095	0,099	0,065	0,075	0,014	0,077	0,095	0,119	0,295	0,121	0,091	0,098	0,100	0,132	0,145	0,053	0,237	0,147
	p-W	0,3263	0,3011	0,7635	0,5524	0,0067	0,0680	0,0102	0,0033	0,0033	0,3679	0,0800	0,1775	0,1856	0,1001	0,1285	0,5265	0,2159	0,0685
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,060	-1,147	-1,187	-1,105	-1,108	1,018	1,041	1,118	1,136	-1,073	-1,141	-1,104	-1,104	-1,127	1,062	1,165	1,150	1,133
	SD	0,045	0,063	0,169	0,194	0,116	0,053	0,117	0,166	0,062	0,040	0,070	0,105	0,089	0,088	0,051	0,178	0,085	0,048
	p-W	0,1583	0,0702	0,1895	0,4983	0,2396	0,6737	0,6583	0,3420	0,0735	0,0815	0,0567	0,2349	0,1790	0,1208	0,1711	0,2484	0,0928	0,0409
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,267	-1,238	-1,236	-1,257	-1,147	-1,133	-1,011	1,073	1,155	-1,245	-1,230	-1,204	-1,141	-1,139	1,072	1,111	1,270	1,230
	SD	0,195	0,223	0,144	0,357	0,098	0,127	0,111	0,118	0,263	0,151	0,125	0,236	0,160	0,212	0,146	0,221	0,161	0,088
	p-W	0,1191	0,1841	0,1106	0,3951	0,1317	0,2033	0,8375	0,3969	0,4346	0,1005	0,0752	0,2850	0,2499	0,3753	0,4478	0,4678	0,1131	0,0611

Substanz		Natriumarsenit (SA) –MAS [μM]								Natriumarsenit (SA) +MAS [μM]									
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,758	0,645	0,473	0,353	0,182	0,081	0,058	0,040	0,035	1,070	1,196	1,300	1,152	1,141	0,537	0,144	0,129	0,258
	SD	0,013	0,018	0,052	0,020	0,019	0,014	0,011	0,005	0,007	0,032	0,082	0,111	0,075	0,050	0,029	0,013	0,036	0,078
	p-W	0,0009	0,0016	0,0050	0,0012	2E-05	0,0005	0,0003	0,0004	0,0003	0,0933	0,0354	0,0386	0,0598	0,0368	0,0064	0,0049	0,0022	0,0005
CMFDA	XF	0,708	0,677	0,671	0,669	0,660	0,285	0,174	0,171	0,077	0,932	0,989	1,072	0,957	0,815	0,751	0,361	0,149	0,125
	SD	0,027	0,025	0,041	0,037	0,042	0,050	0,016	0,008	0,006	0,037	0,043	0,038	0,036	0,032	0,027	0,051	0,019	0,003
	p-W	0,0050	0,0041	0,0082	0,0067	0,0065	0,0022	0,0003	0,0004	0,0005	0,0837	0,7035	0,0779	0,1740	0,0084	0,0061	0,0036	0,0008	0,0003
p-p53 (Ser15)	XF	1,107	1,208	1,406	1,699	2,126	1,941	3,381	4,359	2,639	-1,002	1,080	1,009	1,078	1,242	1,303	1,276	1,020	-1,224
	SD	0,074	0,098	0,041	0,278	0,446	0,304	1,057	0,644	0,387	0,040	0,112	0,070	0,021	0,160	0,043	0,187	0,062	0,046
	p-W	0,1391	0,0573	0,0042	0,0390	0,0515	0,0279	0,0492	0,0099	0,0180	0,9250	0,3414	0,8416	0,0182	0,1313	0,0073	0,1218	0,6366	0,0131
p21	XF	1,230	1,362	1,465	1,652	2,106	2,244	2,316	2,576	2,883	-1,013	-1,039	-1,118	-1,046	-1,057	-1,106	1,386	1,843	1,972
	SD	0,068	0,083	0,166	0,055	0,139	0,129	0,052	0,030	0,200	0,125	0,064	0,120	0,117	0,174	0,088	0,198	0,309	0,146
	p-W	0,0164	0,0093	0,0259	0,0001	0,0123	0,0035	0,0007	0,0014	0,0004	0,8794	0,3990	0,2305	0,5856	0,6506	0,1497	0,0677	0,0309	0,0027
p-H2AX (Ser139)	XF	1,083	1,108	1,274	2,007	3,804	8,406	13,173	20,671	23,198	-1,062	-1,146	-1,111	1,009	1,531	3,284	6,410	7,022	8,474
	SD	0,014	0,098	0,092	0,087	0,566	0,704	1,583	2,105	2,865	0,097	0,071	0,106	0,110	0,137	0,347	0,187	1,194	2,109
	p-W	0,0156	0,1949	0,0275	0,0005	0,0084	0,0008	0,0027	0,0012	0,0023	0,4042	0,0646	0,2133	0,8911	0,0140	0,0040	0,0004	0,0127	0,0225
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,098	1,047	1,072	1,128	1,956	2,888	3,130	3,308	3,006	1,066	1,088	1,176	1,296	1,324	1,942	2,837	2,993	2,687
	SD	0,056	0,223	0,104	0,091	0,274	0,146	0,163	0,450	0,156	0,055	0,119	0,207	0,170	0,140	0,042	0,119	0,354	0,209
	p-W	0,0719	0,6699	0,3618	0,1316	0,0281	0,0037	0,0011	0,0082	0,0029	0,1698	0,3313	0,2831	0,0942	0,0487	0,0006	0,0012	0,0101	0,0032
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,023	1,116	1,273	1,560	4,079	4,691	5,238	6,167	4,682	1,115	1,033	1,029	1,228	1,460	2,630	2,725	2,467	2,056
	SD	0,184	0,201	0,225	0,187	0,310	0,521	0,261	0,468	0,792	0,160	0,183	0,280	0,244	0,209	0,347	0,328	0,141	0,193
	p-W	0,8961	0,3961	0,1586	0,0253	0,0064	0,0095	0,0032	0,0028	0,0092	0,3414	0,7372	0,7873	0,2352	0,0447	0,0063	0,0050	0,0001	0,0043

<b>Substanz</b>		<b>Taxol (T) –MAS [µM]</b>									<b>Taxol (T) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	0,698	0,694	0,741	0,750	0,775	0,714	0,662	0,633	0,536	1,080	1,069	1,100	1,076	1,100	0,941	0,892	0,737	0,458
	SD	0,049	0,065	0,062	0,042	0,044	0,068	0,096	0,044	0,058	0,027	0,117	0,019	0,020	0,041	0,075	0,097	0,146	0,085
	p-W	0,0198	0,0287	0,0350	0,0217	0,0240	0,0320	0,0379	0,0154	0,0164	0,0450	0,4186	0,0086	0,0231	0,0632	0,3193	0,1909	0,0942	0,0119
CMFDA	XF	0,964	0,934	0,977	0,947	0,826	0,830	0,823	0,790	0,697	1,291	1,203	1,242	1,111	0,986	1,024	0,879	0,727	0,547
	SD	0,053	0,063	0,056	0,066	0,079	0,110	0,093	0,109	0,088	0,028	0,075	0,030	0,006	0,072	0,076	0,018	0,068	0,061
	p-W	0,3330	0,2162	0,4990	0,2913	0,0813	0,1327	0,1020	0,0996	0,0418	0,0048	0,0365	0,0090	0,0024	0,7546	0,6225	0,0110	0,0161	0,0029
p-p53 (Ser15)	XF	1,121	1,215	1,304	1,223	1,282	1,106	1,583	1,585	1,739	-1,031	-1,155	-1,075	1,042	1,078	1,004	1,243	1,673	1,239
	SD	0,078	0,143	0,211	0,076	0,106	0,205	0,172	0,207	0,165	0,321	0,269	0,215	0,395	0,147	0,260	0,146	0,236	0,065
	p-W	0,1188	0,1225	0,1365	0,0328	0,0397	0,4309	0,0320	0,0386	0,0177	0,8550	0,4253	0,6114	0,8789	0,4671	0,9979	0,0573	0,0244	0,0044
p21	XF	-1,410	-1,463	-1,542	-1,498	-1,132	1,008	-1,051	1,592	5,410	-1,010	1,025	1,004	-1,043	-1,035	-1,045	1,332	5,511	4,498
	SD	0,031	0,063	0,044	0,118	0,024	0,025	0,031	0,362	1,030	0,126	0,097	0,108	0,135	0,111	0,130	0,248	2,573	0,318
	p-W	0,0006	0,0046	0,0019	0,0069	0,0067	0,5990	0,0978	0,1028	0,0146	0,9070	0,7312	0,9711	0,6455	0,6448	0,6203	0,1408	0,0803	0,0035
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,058	-1,047	-1,111	-1,094	1,098	1,091	1,196	2,270	6,222	-1,161	-1,139	-1,096	1,088	-1,047	-1,117	1,453	4,214	4,016
	SD	0,086	0,036	0,058	0,078	0,035	0,065	0,025	0,675	1,018	0,095	0,079	0,153	0,151	0,129	0,104	0,055	1,075	0,484
	p-W	0,3704	0,1481	0,0725	0,1593	0,0414	0,1364	0,0058	0,0815	0,0126	0,0857	0,0742	0,4307	0,4098	0,6537	0,1926	0,0063	0,0337	0,0076
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,274	1,068	1,319	1,357	1,207	1,463	1,498	1,658	3,589	1,058	1,032	-1,025	1,024	-1,074	1,086	1,440	1,617	2,452
	SD	0,121	0,117	0,343	0,280	0,178	0,303	0,280	0,191	1,272	0,177	0,151	0,023	0,101	0,059	0,134	0,139	0,082	0,553
	p-W	0,0274	0,4707	0,2112	0,1178	0,1575	0,0773	0,0579	0,0065	0,0591	0,6211	0,6956	0,2012	0,6935	0,1597	0,3800	0,0265	0,0107	0,0345
p-ATM (Ser1981)	XF	1,563	1,385	1,562	1,738	1,887	2,385	2,505	2,462	2,516	-1,045	1,002	-1,123	1,040	-1,054	1,194	1,453	1,592	1,610
	SD	0,075	0,189	0,341	0,251	0,321	0,199	0,375	0,142	0,481	0,141	0,174	0,070	0,144	0,065	0,225	0,175	0,094	0,306
	p-W	0,0010	0,0543	0,0941	0,0258	0,0261	0,0008	0,0087	3E-06	0,0221	0,632	0,938	0,065	0,659	0,295	0,256	0,033	0,004	0,057

<b>Substanz</b>		<b>Chloramphenicol (CAP) –MAS [µM]</b>									<b>Chloramphenicol (CAP) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	0,943	1,091	1,094	1,078	1,054	0,945	0,892	0,689	0,506	1,184	1,183	1,317	1,147	1,293	1,291	1,236	1,140	0,973
	SD	0,059	0,090	0,027	0,079	0,065	0,107	0,073	0,068	0,154	0,044	0,126	0,056	0,127	0,160	0,121	0,168	0,068	0,134
	p-W	0,2502	0,2071	0,0161	0,2194	0,3009	0,4507	0,1237	0,0131	0,0294	0,018	0,129	0,008	0,181	0,086	0,049	0,133	0,073	0,759
CMFDA	XF	1,014	0,991	0,991	0,931	0,937	0,932	0,940	0,981	0,795	0,989	1,127	1,093	1,054	1,059	1,144	1,100	1,076	0,938
	SD	0,091	0,080	0,043	0,055	0,055	0,113	0,133	0,126	0,104	0,064	0,036	0,066	0,095	0,017	0,080	0,077	0,096	0,055
	p-W	0,8386	0,8423	0,7062	0,1675	0,2010	0,3943	0,4930	0,7988	0,0747	0,7768	0,0169	0,1163	0,4327	0,0170	0,0885	0,1356	0,2926	0,1904
p-p53 (Ser15)	XF	1,034	1,118	1,151	-1,016	1,013	-1,010	1,078	1,128	1,117	1,090	1,010	1,127	1,024	1,057	1,098	1,171	1,079	1,022
	SD	0,095	0,295	0,243	0,142	0,173	0,108	0,155	0,266	0,240	0,221	0,196	0,210	0,174	0,210	0,266	0,314	0,265	0,209
	p-W	0,5830	0,5061	0,3744	0,9236	0,7819	0,9761	0,4724	0,4241	0,4800	0,5534	0,9942	0,4599	0,8921	0,7599	0,6117	0,4345	0,6837	0,9595
p21	XF	1,205	-1,093	-1,155	-1,154	-1,154	-1,134	-1,116	-1,109	-1,116	1,008	1,089	1,053	1,029	1,100	-1,048	1,059	1,079	1,055
	SD	0,055	0,039	0,107	0,060	0,049	0,050	0,028	0,046	0,040	0,014	0,016	0,074	0,032	0,046	0,049	0,021	0,047	0,055
	p-W	0,0253	0,0468	0,1046	0,0346	0,0211	0,0292	0,0177	0,0410	0,0306	0,4626	0,0089	0,3481	0,2697	0,0570	0,2205	0,0363	0,1109	0,2256
p-H2AX (Ser139)	XF	1,135	1,005	-1,012	-1,070	-1,066	-1,061	-1,036	1,011	1,080	-1,085	1,001	-1,128	-1,258	1,056	-1,273	-1,212	-1,059	-1,201
	SD	0,033	0,076	0,057	0,027	0,010	0,035	0,050	0,040	0,125	0,141	0,073	0,049	0,078	0,140	0,110	0,181	0,196	0,178
	p-W	0,018	0,914	0,754	0,048	0,009	0,095	0,347	0,685	0,386	0,3926	0,9386	0,0411	0,0462	0,5410	0,0550	0,1707	0,7315	0,1750
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,117	-1,065	-1,044	1,025	-1,022	1,048	1,093	1,314	1,329	-1,105	-1,182	-1,207	-1,133	-1,229	-1,138	-1,173	-1,117	-1,042
	SD	0,035	0,233	0,152	0,075	0,168	0,098	0,143	0,028	0,055	0,086	0,106	0,060	0,104	0,095	0,070	0,158	0,108	0,092
	p-W	0,0256	0,7938	0,7458	0,5975	0,9410	0,4949	0,3559	0,0001	0,0041	0,1638	0,0900	0,0293	0,1524	0,0508	0,0601	0,2009	0,1948	0,5083
p-ATM (Ser1981)	XF	1,077	-1,241	-1,304	-1,181	-1,184	-1,265	-1,019	1,414	2,065	-1,171	-1,270	-1,289	-1,192	-1,283	-1,191	-1,265	-1,083	1,087
	SD	0,102	0,217	0,189	0,136	0,254	0,226	0,225	0,047	0,256	0,149	0,205	0,077	0,294	0,144	0,111	0,150	0,121	0,077
	p-W	0,3498	0,1611	0,0900	0,1544	0,3126	0,1846	0,9365	0,0131	0,0193	0,1731	0,1373	0,0192	0,4544	0,0631	0,0886	0,0822	0,3781	0,1932

### **8.8 Genotoxizitätsbestimmung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker (Gruppe 2 ECVAM-Substanzen)**

Dargestellt sind die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle der fünf Proteine p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) wie auch der Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA). Die Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF)  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die ermittelten p-Werte (p-W) aus dem Student's T-Test für die jeweiligen getesteten Konzentrationen (Konz) sind aufgezeigt. Alle Substanzen wurden mit und ohne metabolischem Aktivierungssystem (+/- MAS) getestet.

<b>Substanz</b>		<b>Ampicillintrihydrat (APT) –MAS [µM]</b>									<b>Ampicillintrihydrat (APT) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,063	1,077	1,084	1,072	1,053	1,129	1,094	1,110	1,003	1,083	1,130	1,139	1,208	1,206	1,164	1,139	1,076	1,046
	SD	0,085	0,158	0,110	0,149	0,116	0,092	0,200	0,124	0,109	0,059	0,054	0,100	0,132	0,088	0,031	0,022	0,088	0,034
	p-W	0,3589	0,5195	0,3484	0,5374	0,5875	0,0940	0,4994	0,2450	0,9112	0,1745	0,0304	0,1180	0,0942	0,0340	0,0316	0,0229	0,2677	0,1213
CMFDA	XF	1,058	1,032	1,045	1,046	0,993	1,038	0,998	1,058	0,948	1,027	1,022	1,030	1,035	1,013	1,030	1,001	1,030	0,930
	SD	0,032	0,027	0,026	0,038	0,036	0,059	0,088	0,025	0,027	0,103	0,084	0,091	0,062	0,103	0,100	0,093	0,105	0,086
	p-W	0,0718	0,1680	0,0963	0,1491	0,8256	0,3731	0,9335	0,0589	0,0842	0,721	0,698	0,652	0,446	0,868	0,661	1,000	0,685	0,301
p-p53 (Ser15)	XF	1,015	-1,004	1,109	1,058	1,011	1,042	1,146	1,149	-1,004	1,076	1,093	1,210	1,227	1,277	1,285	1,400	1,415	1,193
	SD	0,052	0,020	0,043	0,034	0,050	0,039	0,040	0,080	0,062	0,064	0,025	0,030	0,020	0,111	0,119	0,133	0,116	0,146
	p-W	0,6895	0,7792	0,0605	0,0900	0,7674	0,2130	0,0173	0,0758	0,8950	0,1795	0,0280	0,0129	0,0039	0,0585	0,0631	0,0451	0,0295	0,1508
p21	XF	-1,051	-1,042	-1,075	-1,070	-1,070	-1,024	-1,031	-1,150	-1,056	1,069	1,017	-1,024	1,029	1,009	-1,013	1,027	-1,007	1,030
	SD	0,069	0,067	0,036	0,037	0,085	0,030	0,029	0,043	0,049	0,078	0,062	0,167	0,100	0,080	0,154	0,067	0,076	0,061
	p-W	0,3420	0,3911	0,0612	0,0853	0,3071	0,3160	0,1944	0,0298	0,1876	0,2593	0,7053	0,8741	0,6252	0,8803	0,9016	0,5774	0,8720	0,5141
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,037	-1,024	-1,037	-1,036	-1,037	1,015	1,039	-1,039	-1,055	-1,262	-1,175	-1,164	-1,372	-1,371	-1,254	-1,293	-1,307	-1,284
	SD	0,020	0,061	0,038	0,026	0,051	0,026	0,022	0,045	0,038	0,169	0,181	0,095	0,067	0,239	0,128	0,296	0,319	0,409
	p-W	0,0811	0,5611	0,2348	0,1181	0,3561	0,4372	0,0919	0,2682	0,1315	0,1228	0,2486	0,0564	0,0128	0,0776	0,0789	0,2182	0,2382	0,4009
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,043	1,129	1,131	1,170	1,211	1,125	1,069	1,298	1,191	1,140	-1,084	-1,149	-1,131	-1,104	-1,202	-1,167	-1,079	-1,041
	SD	0,093	0,038	0,041	0,171	0,275	0,097	0,154	0,041	0,090	0,150	0,012	0,034	0,113	0,126	0,050	0,144	0,085	0,145
	p-W	0,4728	0,0256	0,0355	0,2214	0,3145	0,1534	0,5122	0,0030	0,0626	0,2541	0,0019	0,0208	0,1714	0,2840	0,0190	0,1630	0,2481	0,6947
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,153	-1,067	-1,125	-1,012	1,020	-1,106	-1,128	1,002	-1,014	-1,077	-1,307	-1,418	-1,290	-1,328	-1,452	-1,296	-1,297	-1,139
	SD	0,125	0,071	0,145	0,152	0,221	0,216	0,122	0,080	0,099	0,065	0,061	0,084	0,152	0,100	0,212	0,148	0,363	0,183
	p-W	0,1692	0,2484	0,2780	0,9048	0,9126	0,5002	0,2065	0,9738	0,9194	0,1545	0,0094	0,0052	0,0483	0,0204	0,0313	0,0473	0,2353	0,3112

<b>Substanz</b>		<b>D-Mannitol (MAN) –MAS [µM]</b>									<b>D-Mannitol (MAN) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,011	1,059	1,047	1,044	1,076	1,028	1,050	1,003	0,991	1,107	1,191	1,164	1,218	1,224	1,310	1,254	1,193	1,033
	SD	0,046	0,060	0,029	0,096	0,064	0,066	0,083	0,124	0,114	0,134	0,180	0,200	0,153	0,184	0,153	0,033	0,134	0,130
	p-W	0,7404	0,2373	0,0912	0,5367	0,1683	0,5661	0,4261	0,9809	0,8534	0,3264	0,1964	0,3152	0,1230	0,1613	0,0500	0,0047	0,1191	0,7575
CMFDA	XF	1,013	1,049	1,052	1,035	1,012	0,970	1,015	1,007	1,029	0,997	1,010	0,969	0,990	0,967	1,036	0,985	1,009	0,950
	SD	0,071	0,025	0,065	0,108	0,114	0,047	0,124	0,120	0,141	0,074	0,067	0,108	0,072	0,031	0,106	0,044	0,051	0,078
	p-W	0,8165	0,0680	0,3063	0,6396	0,9085	0,3797	0,8698	0,9348	0,7694	0,8781	0,8719	0,6098	0,7666	0,2151	0,6551	0,5677	0,8542	0,3681
p-p53 (Ser15)	XF	1,040	1,127	1,304	1,277	1,234	1,277	1,396	1,410	1,352	1,096	1,360	1,470	1,520	1,508	1,590	1,524	1,456	1,305
	SD	0,039	0,018	0,067	0,081	0,044	0,069	0,092	0,231	0,144	0,112	0,046	0,124	0,213	0,177	0,328	0,155	0,006	0,103
	p-W	0,2114	0,0020	0,0103	0,0413	0,0119	0,0191	0,0105	0,0810	0,0434	0,2866	0,0047	0,0138	0,0397	0,0329	0,0829	0,0194	0,0011	0,0238
p21	XF	-1,018	-1,041	-1,074	-1,011	-1,039	-1,020	-1,098	-1,295	-1,172	1,094	1,087	-1,005	1,052	1,069	1,031	1,024	1,027	1,107
	SD	0,027	0,021	0,081	0,055	0,026	0,041	0,017	0,100	0,026	0,072	0,166	0,178	0,134	0,203	0,044	0,102	0,168	0,173
	p-W	0,3664	0,0695	0,2318	0,7704	0,1286	0,4922	0,0073	0,0284	0,0061	0,1436	0,4739	0,9735	0,5800	0,6305	0,3300	0,7562	0,7564	0,4066
p-H2AX (Ser139)	XF	1,030	-1,020	-1,015	1,045	1,045	1,021	-1,028	-1,138	-1,059	-1,044	-1,123	-1,112	-1,287	-1,211	-1,322	-1,233	-1,417	1,032
	SD	0,026	0,056	0,075	0,037	0,024	0,005	0,021	0,066	0,091	0,160	0,127	0,136	0,132	0,155	0,332	0,222	0,401	0,077
	p-W	0,1838	0,6124	0,7905	0,1720	0,0812	0,0168	0,1421	0,0531	0,4037	0,6612	0,2433	0,2950	0,0640	0,1435	0,2402	0,1992	0,2290	0,6054
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,058	1,322	1,126	1,250	1,183	1,124	1,155	1,073	1,049	-1,090	1,016	-1,195	-1,174	-1,212	-1,136	-1,152	-1,019	-1,136
	SD	0,204	0,199	0,079	0,097	0,149	0,089	0,179	0,232	0,252	0,053	0,147	0,132	0,162	0,227	0,162	0,211	0,275	0,122
	p-W	0,6488	0,0947	0,1035	0,0376	0,1657	0,1328	0,2669	0,6235	0,7396	0,1194	0,9142	0,1316	0,1903	0,2416	0,2749	0,3225	0,9016	0,1984
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,061	1,117	-1,055	-1,115	1,012	-1,096	-1,150	-1,211	-1,101	1,027	-1,021	-1,259	-1,138	-1,164	-1,104	-1,256	-1,152	-1,115
	SD	0,042	0,190	0,075	0,231	0,049	0,071	0,137	0,144	0,092	0,196	0,182	0,153	0,189	0,116	0,139	0,194	0,083	0,104
	p-W	0,1163	0,4022	0,3124	0,5170	0,7630	0,1490	0,1729	0,0852	0,2020	0,7906	0,8494	0,0947	0,3564	0,1356	0,3423	0,1403	0,0663	0,1996

<b>Substanz</b>		<b>Phenforminhydrochlorid (PHC) –MAS [µM]</b>									<b>Phenforminhydrochlorid (PHC) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,072	1,108	1,058	1,028	0,905	0,858	0,709	0,568	0,443	1,040	1,115	1,079	1,071	1,135	1,139	1,187	0,867	0,719
	SD	0,177	0,202	0,086	0,223	0,161	0,180	0,185	0,094	0,059	0,005	0,059	0,030	0,119	0,059	0,131	0,148	0,169	0,111
	p-W	0,6186	0,5397	0,3987	0,8703	0,4275	0,3168	0,1139	0,0410	0,0260	0,0085	0,0851	0,0458	0,4188	0,0645	0,2046	0,1614	0,3138	0,0467
CMFDA	XF	1,040	1,022	1,036	1,088	1,021	0,952	0,858	0,818	0,756	1,060	1,048	1,087	1,079	1,071	1,160	1,151	0,990	0,927
	SD	0,084	0,066	0,041	0,124	0,022	0,013	0,008	0,014	0,004	0,013	0,019	0,051	0,062	0,021	0,112	0,086	0,150	0,085
	p-W	0,4981	0,6299	0,2700	0,3408	0,2560	0,0276	0,0015	0,0008	0,0004	0,0105	0,0631	0,0946	0,1714	0,0357	0,1236	0,0849	0,9024	0,2592
p-p53 (Ser15)	XF	-1,082	-1,060	1,020	-1,246	-1,173	-1,224	-1,254	-1,564	-1,605	-1,039	-1,007	1,004	1,002	-1,114	-1,101	-1,112	-1,074	-1,048
	SD	0,282	0,235	0,489	0,247	0,181	0,205	0,201	0,249	0,323	0,128	0,038	0,191	0,129	0,183	0,158	0,144	0,201	0,202
	p-W	0,6530	0,6660	0,9470	0,2408	0,2622	0,2211	0,1850	0,0820	0,0959	0,6068	0,7468	0,9738	0,9845	0,3847	0,4027	0,3057	0,5728	0,6946
p21	XF	-1,086	-1,101	-1,248	-1,255	-1,393	-1,463	-1,413	-1,308	-1,285	1,058	1,037	1,014	1,146	1,104	1,151	1,127	1,094	-1,023
	SD	0,053	0,066	0,134	0,079	0,024	0,095	0,068	0,086	0,154	0,106	0,025	0,053	0,035	0,114	0,027	0,071	0,074	0,063
	p-W	0,1183	0,0842	0,0692	0,0197	0,0055	0,0180	0,0145	0,0300	0,0777	0,4498	0,1041	0,7153	0,0063	0,2301	0,0171	0,0805	0,1284	0,5620
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,003	1,044	1,033	1,038	-1,012	-1,002	-1,053	-1,016	1,001	1,025	-1,033	-1,031	-1,118	-1,348	-1,314	-1,350	-1,124	1,131
	SD	0,051	0,021	0,016	0,096	0,089	0,068	0,024	0,010	0,082	0,266	0,084	0,129	0,129	0,255	0,075	0,229	0,245	0,236
	p-W	0,9298	0,0534	0,0640	0,5751	0,8388	0,9521	0,0691	0,1183	0,9963	0,9357	0,5233	0,6462	0,2487	0,1387	0,0316	0,1106	0,4673	0,4456
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,057	1,062	1,134	1,153	1,053	1,107	1,141	1,311	1,319	-1,020	1,022	1,044	1,104	1,101	1,192	1,096	1,354	1,454
	SD	0,138	0,066	0,205	0,062	0,056	0,117	0,084	0,072	0,037	0,084	0,072	0,112	0,042	0,186	0,122	0,142	0,128	0,100
	p-W	0,5291	0,2465	0,3688	0,0416	0,2285	0,2398	0,0828	0,0241	0,0017	0,6590	0,7448	0,6339	0,0911	0,4923	0,1161	0,3990	0,0754	0,0177
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,002	-1,050	1,014	-1,012	1,064	1,201	1,363	1,736	2,119	-1,027	-1,044	-1,082	-1,111	-1,151	-1,130	-1,195	1,334	1,683
	SD	0,106	0,038	0,121	0,045	0,092	0,189	0,138	0,088	0,074	0,028	0,131	0,250	0,062	0,259	0,182	0,175	0,112	0,200
	p-W	0,9746	0,1425	0,8235	0,7514	0,3331	0,2139	0,0516	0,0070	0,0009	0,2624	0,6030	0,6411	0,1158	0,4282	0,3488	0,2082	0,0745	0,0216

<b>Substanz</b>		<b><i>n</i>-Butylchlorid (BC) –MAS [µM]</b>									<b><i>n</i>-Butylchlorid (BC) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,005	1,014	1,015	1,031	0,935	1,019	1,011	0,999	1,041	1,074	1,170	1,087	1,170	1,226	1,205	1,081	1,064	0,913
	SD	0,070	0,084	0,086	0,074	0,055	0,057	0,031	0,060	0,029	0,070	0,053	0,044	0,103	0,032	0,057	0,042	0,007	0,040
	p-W	0,9128	0,8409	0,7751	0,5280	0,1693	0,6561	0,5756	0,9392	0,1306	0,2180	0,0189	0,1159	0,0878	0,0171	0,0082	0,0704	0,0206	0,1067
CMFDA	XF	1,103	1,111	0,965	1,081	1,095	1,044	1,043	1,033	0,944	0,989	0,973	0,941	0,941	0,937	0,934	0,894	0,927	0,847
	SD	0,068	0,103	0,094	0,062	0,058	0,046	0,104	0,099	0,119	0,052	0,067	0,070	0,077	0,018	0,076	0,021	0,046	0,011
	p-W	0,0991	0,1889	0,5384	0,1382	0,0982	0,2418	0,6027	0,6769	0,4561	0,6937	0,5314	0,2934	0,3160	0,0328	0,2538	0,0298	0,1198	0,0105
p-p53 (Ser15)	XF	1,151	1,152	1,029	-1,021	1,080	1,227	1,187	1,166	1,414	1,001	-1,027	-1,063	-1,233	-1,285	-1,444	-1,356	-1,493	-1,498
	SD	0,229	0,132	0,009	0,041	0,103	0,170	0,091	0,085	0,401	0,047	0,026	0,156	0,192	0,377	0,551	0,620	0,600	0,472
	p-W	0,3752	0,1984	0,0288	0,4576	0,3017	0,1452	0,0716	0,0772	0,2183	0,7048	0,2562	0,5870	0,1703	0,3065	0,2978	0,4336	0,3017	0,2100
p21	XF	-1,031	1,003	1,013	1,021	1,034	-1,002	1,065	1,039	-1,002	1,014	1,118	1,072	-1,008	1,078	1,014	1,088	1,060	1,077
	SD	0,089	0,064	0,022	0,044	0,066	0,055	0,106	0,056	0,036	0,091	0,098	0,094	0,148	0,107	0,092	0,138	0,135	0,131
	p-W	0,6486	0,9306	0,4026	0,4934	0,4723	0,9767	0,4015	0,3521	0,9200	0,832	0,169	0,323	0,957	0,346	0,833	0,397	0,530	0,430
p-H2AX (Ser139)	XF	1,065	1,078	1,020	1,025	1,030	1,035	1,046	1,029	1,075	1,038	-1,008	1,036	-1,101	-1,148	-1,124	-1,057	1,053	1,155
	SD	0,130	0,095	0,087	0,072	0,138	0,047	0,001	0,016	0,109	0,108	0,063	0,065	0,143	0,234	0,057	0,072	0,142	0,364
	p-W	0,5078	0,2825	0,7891	0,6640	0,7741	0,3660	0,0039	0,0648	0,3659	0,5817	0,8689	0,4336	0,3527	0,3805	0,0636	0,3003	0,5857	0,5376
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,148	1,165	1,136	1,252	1,284	1,179	1,271	1,107	-1,036	-1,084	-1,015	-1,090	-1,056	1,001	-1,023	1,144	1,063	1,144
	SD	0,045	0,180	0,165	0,193	0,255	0,220	0,349	0,274	0,183	0,063	0,066	0,061	0,072	0,061	0,105	0,060	0,053	0,058
	p-W	0,0202	0,2467	0,2941	0,1409	0,1875	0,2888	0,3112	0,5502	0,7994	0,1443	0,7129	0,1233	0,3101	0,9861	0,7423	0,0537	0,1914	0,0613
p-ATM (Ser1981)	XF	1,030	1,004	1,042	1,042	-1,017	1,036	-1,065	-1,127	-1,074	-1,078	-1,058	-1,087	-1,082	-1,085	-1,106	1,026	1,001	-1,007
	SD	0,144	0,040	0,166	0,109	0,064	0,101	0,035	0,068	0,155	0,118	0,078	0,134	0,142	0,095	0,167	0,065	0,053	0,122
	p-W	0,7481	0,8488	0,6829	0,5678	0,7253	0,5908	0,0704	0,0814	0,5249	0,3744	0,3190	0,3655	0,4305	0,2646	0,3822	0,5881	0,9838	0,9801

Substanz		(2-Chloroethyl)-trimethylammoniumchlorid (TAC) -MAS [ $\mu$ M]									(2-Chloroethyl)-trimethylammoniumchlorid (TAC) +MAS [ $\mu$ M]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,028	1,044	1,046	1,037	1,050	1,088	1,074	1,034	1,007	1,081	1,143	1,232	1,280	1,306	1,198	1,072	0,933	0,849
	SD	0,044	0,086	0,070	0,080	0,097	0,127	0,049	0,094	0,030	0,098	0,070	0,191	0,056	0,057	0,027	0,089	0,085	0,037
	p-W	0,4076	0,4860	0,3844	0,5125	0,5054	0,3668	0,1065	0,6215	0,7531	0,2958	0,0775	0,1704	0,0088	0,0103	0,0061	0,3039	0,3142	0,0138
CMFDA	XF	1,033	1,083	1,136	1,091	1,100	1,050	1,061	1,001	0,814	1,032	1,052	1,175	1,168	1,095	1,107	1,038	0,941	0,871
	SD	0,062	0,135	0,079	0,114	0,118	0,136	0,149	0,111	0,070	0,062	0,064	0,096	0,104	0,105	0,087	0,091	0,099	0,040
	p-W	0,4584	0,4150	0,0624	0,3186	0,2672	0,6396	0,5961	0,9288	0,0643	0,4865	0,2888	0,0930	0,0934	0,2500	0,1533	0,5646	0,4106	0,0385
p-p53 (Ser15)	XF	1,024	1,179	1,488	1,146	1,333	1,412	1,406	1,552	1,669	1,002	1,102	1,044	1,034	1,163	1,142	1,131	1,141	1,018
	SD	0,099	0,115	0,335	0,151	0,098	0,145	0,273	0,278	0,188	0,037	0,067	0,076	0,228	0,251	0,202	0,303	0,402	0,203
	p-W	0,7442	0,1013	0,1161	0,2420	0,0195	0,0274	0,1140	0,0630	0,0162	0,9081	0,1215	0,4126	0,7713	0,3695	0,3430	0,5303	0,5994	0,8692
p21	XF	1,000	1,072	1,006	1,070	-1,034	-1,008	-1,037	-1,067	-1,296	1,049	-1,020	1,039	1,076	-1,003	1,021	1,105	1,178	1,085
	SD	0,045	0,021	0,045	0,123	0,030	0,115	0,034	0,071	0,165	0,063	0,068	0,039	0,076	0,023	0,106	0,045	0,168	0,093
	p-W	0,9795	0,0303	0,8416	0,4279	0,1844	0,9485	0,1994	0,2311	0,0548	0,3012	0,6491	0,2311	0,2218	0,9304	0,7235	0,0560	0,1871	0,2374
p-H2AX (Ser139)	XF	1,022	1,113	1,137	1,082	1,101	1,065	1,064	1,065	-1,039	-1,284	-1,301	-1,325	-1,191	-1,378	-1,237	-1,098	-1,062	1,241
	SD	0,066	0,099	0,176	0,103	0,086	0,202	0,099	0,269	0,170	0,170	0,056	0,052	0,158	0,132	0,045	0,152	0,245	0,272
	p-W	0,6445	0,1752	0,3145	0,3144	0,1787	0,6366	0,3973	0,7077	0,7465	0,0867	0,0017	0,0008	0,1465	0,0315	0,0183	0,3905	0,7712	0,2638
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,053	1,065	1,248	1,134	1,023	-1,016	1,147	1,071	-1,143	-1,028	-1,003	-1,084	-1,067	-1,058	1,016	1,015	1,008	1,082
	SD	0,095	0,266	0,178	0,455	0,617	0,657	0,472	0,574	0,581	0,052	0,130	0,198	0,139	0,230	0,045	0,114	0,044	0,024
	p-W	0,6019	0,9643	0,0594	0,7678	0,8891	0,9285	0,8056	0,9971	0,5784	0,4672	0,9832	0,5799	0,5160	0,7880	0,6155	0,8166	0,7568	0,0186
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,114	-1,056	1,040	-1,001	-1,173	-1,343	-1,134	-1,129	-1,113	1,005	-1,057	-1,190	-1,189	-1,180	-1,076	1,011	1,033	1,094
	SD	0,044	0,137	0,069	0,384	0,475	0,729	0,182	0,317	0,447	0,070	0,108	0,283	0,126	0,156	0,078	0,111	0,128	0,104
	p-W	0,0796	0,4314	0,4839	0,8341	0,5156	0,5160	0,2928	0,4624	0,5838	0,9350	0,4554	0,3561	0,1096	0,1654	0,2310	0,9199	0,6822	0,2410

Substanz		Cyclohexanon (CH) -MAS [ $\mu\text{M}$ ]									Cyclohexanon (CH) +MAS [ $\mu\text{M}$ ]								
		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,090	1,273	1,154	1,196	1,232	1,271	1,274	1,183	1,034	1,064	0,918	1,048	1,001	1,030	0,996	0,930	0,945	0,876
	SD	0,027	0,118	0,127	0,146	0,073	0,187	0,067	0,138	0,201	0,032	0,042	0,115	0,080	0,063	0,117	0,067	0,114	0,112
	p-W	0,0148	0,0245	0,1755	0,1359	0,0136	0,0961	0,0170	0,1220	0,8999	0,0790	0,0760	0,5191	0,9786	0,4867	0,9632	0,2150	0,4716	0,2044
CMFDA	XF	1,072	1,107	1,105	1,083	1,048	1,111	1,108	1,069	0,918	1,013	1,008	1,058	1,036	0,978	0,970	0,986	0,976	0,942
	SD	0,062	0,076	0,096	0,131	0,123	0,154	0,084	0,137	0,098	0,050	0,091	0,106	0,080	0,124	0,108	0,069	0,076	0,082
	p-W	0,1951	0,1289	0,2142	0,4028	0,6242	0,3321	0,1148	0,5237	0,2640	0,7115	0,9442	0,4714	0,5246	0,7343	0,6369	0,7054	0,6077	0,3521
p-p53 (Ser15)	XF	1,232	1,143	1,267	1,128	1,029	-1,131	1,275	1,023	1,124	1,192	1,184	1,400	1,448	1,056	1,119	1,242	1,289	1,294
	SD	0,101	0,087	0,088	0,251	0,086	0,208	0,271	0,273	0,283	0,202	0,028	0,246	0,278	0,174	0,257	0,007	0,259	0,208
	p-W	0,0935	0,0733	0,0093	0,5173	0,7434	0,3979	0,1610	0,9910	0,5903	0,2417	0,0114	0,1112	0,1123	0,6251	0,4421	0,0015	0,1933	0,1384
p21	XF	1,003	1,001	1,029	1,020	1,044	1,011	1,007	1,082	1,025	1,037	1,022	-1,038	-1,158	1,061	1,041	1,095	1,063	1,063
	SD	0,039	0,050	0,099	0,012	0,059	0,080	0,116	0,162	0,113	0,043	0,054	0,019	0,044	0,095	0,055	0,069	0,123	0,083
	p-W	0,9491	0,9973	0,6766	0,0945	0,3196	0,8679	0,9527	0,4786	0,7576	0,2820	0,5615	0,0810	0,0256	0,3819	0,3169	0,1518	0,4365	0,3338
p-H2AX (Ser139)	XF	1,078	1,095	1,171	1,121	1,163	1,194	1,107	1,137	1,019	-1,034	-1,079	-1,201	-1,070	1,132	1,114	1,034	1,065	1,117
	SD	0,089	0,043	0,066	0,059	0,099	0,045	0,110	0,099	0,101	0,181	0,070	0,045	0,022	0,072	0,023	0,101	0,082	0,127
	p-W	0,2770	0,0527	0,0338	0,0573	0,0878	0,0083	0,2192	0,1201	0,8090	0,8532	0,1892	0,0129	0,0350	0,0957	0,0167	0,5964	0,3073	0,2616
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,004	1,029	1,070	1,280	1,274	-1,068	1,079	1,044	-1,185	1,044	1,055	-1,013	-1,027	-1,034	-1,049	1,001	-1,005	1,024
	SD	0,263	0,333	0,251	0,369	0,062	0,321	0,277	0,194	0,261	0,053	0,021	0,077	0,058	0,096	0,104	0,101	0,116	0,105
	p-W	0,8785	0,8275	0,6204	0,2766	0,0426	0,8164	0,6287	0,7540	0,3441	0,2913	0,0328	0,7926	0,5609	0,5823	0,4925	0,9806	0,9134	0,7317
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,016	-1,141	-1,149	1,006	-1,302	-1,289	-1,410	-1,086	-1,377	1,082	1,194	1,103	1,131	1,136	1,079	1,147	1,180	1,135
	SD	0,336	0,318	0,120	0,159	0,291	0,388	0,407	0,112	0,038	0,091	0,059	0,099	0,164	0,025	0,109	0,075	0,133	0,237
	p-W	0,8878	0,5771	0,1432	0,8681	0,2078	0,3120	0,1871	0,2965	0,0077	0,2695	0,0330	0,2174	0,3020	0,0089	0,3370	0,0720	0,1265	0,4185

<b>Substanz</b>		<b>N,N-Dicyclohexylthiourea (DCHT) –MAS [µM]</b>									<b>N,N-Dicyclohexylthiourea (DCHT) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,018	1,006	1,016	0,997	0,980	0,918	0,873	0,599	0,368	1,015	1,009	0,957	0,991	0,947	0,922	0,772	0,832	0,517
	SD	0,061	0,019	0,059	0,094	0,050	0,013	0,048	0,007	0,024	0,039	0,041	0,101	0,052	0,049	0,111	0,021	0,063	0,039
	p-W	0,7491	0,6325	0,7206	0,8871	0,5501	0,0190	0,0617	0,0047	0,0075	0,5815	0,8028	0,4878	0,7308	0,2004	0,3360	0,0009	0,0583	0,0099
CMFDA	XF	1,013	1,034	1,020	0,912	0,823	0,791	0,782	0,686	0,600	0,987	0,995	0,983	0,945	0,909	0,803	0,698	0,741	0,477
	SD	0,082	0,075	0,108	0,090	0,070	0,070	0,080	0,102	0,055	0,019	0,068	0,078	0,056	0,107	0,075	0,060	0,044	0,045
	p-W	0,8807	0,5653	0,8412	0,2512	0,0697	0,0545	0,0619	0,0520	0,0160	0,3350	0,8662	0,6958	0,2242	0,2759	0,0570	0,0233	0,0180	0,0082
p-p53 (Ser15)	XF	1,154	1,183	1,237	1,038	1,144	1,042	1,214	1,250	1,318	-1,087	-1,057	-1,006	-1,075	-1,063	-1,127	-1,025	-1,024	-1,030
	SD	0,025	0,096	0,151	0,196	0,053	0,048	0,242	0,090	0,023	0,095	0,060	0,070	0,158	0,161	0,106	0,133	0,246	0,220
	p-W	0,0338	0,0290	0,1271	0,6934	0,0769	0,2245	0,2145	0,0318	0,0053	0,2614	0,2187	0,8413	0,4825	0,5579	0,1429	0,7453	0,9000	0,8624
p21	XF	1,027	-1,039	-1,054	-1,194	-1,089	-1,117	1,086	1,336	1,531	1,084	1,044	-1,015	1,020	1,012	-1,025	1,016	1,032	1,108
	SD	0,033	0,073	0,117	0,074	0,090	0,094	0,090	0,177	0,047	0,013	0,052	0,043	0,044	0,060	0,068	0,031	0,040	0,127
	p-W	0,2955	0,4465	0,5327	0,0333	0,2345	0,1375	0,2343	0,0813	0,0014	0,0035	0,2893	0,5950	0,5393	0,7723	0,5868	0,4922	0,3091	0,2764
p-H2AX (Ser139)	XF	1,119	1,014	1,065	-1,040	-1,017	-1,108	1,056	1,077	1,261	1,040	-1,123	-1,146	1,063	1,254	1,398	1,562	1,707	1,765
	SD	0,018	0,076	0,182	0,116	0,064	0,049	0,078	0,078	0,123	0,073	0,074	0,006	0,011	0,043	0,204	0,143	0,199	0,008
	p-W	0,0149	0,7390	0,5854	0,6748	0,7373	0,0574	0,3489	0,2447	0,0742	0,4312	0,1017	0,0026	0,0145	0,0187	0,0586	0,0174	0,0369	0,0030
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,020	1,251	1,339	1,122	1,321	1,335	1,323	1,452	1,632	-1,019	1,036	1,074	1,012	1,090	1,148	1,219	1,234	1,424
	SD	0,095	0,093	0,222	0,170	0,136	0,130	0,336	0,284	0,227	0,031	0,096	0,046	0,079	0,131	0,091	0,092	0,085	0,080
	p-W	0,8103	0,0519	0,1080	0,3418	0,0389	0,0569	0,2261	0,0942	0,0458	0,4240	0,5692	0,1143	0,7856	0,3609	0,1071	0,0587	0,0498	0,0129
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,144	-1,031	1,125	1,031	1,120	1,217	1,199	1,459	1,634	1,023	1,049	1,120	1,067	1,094	1,073	1,191	1,196	1,069
	SD	0,163	0,050	0,126	0,191	0,059	0,111	0,068	0,241	0,503	0,055	0,043	0,048	0,014	0,050	0,054	0,070	0,010	0,182
	p-W	0,2145	0,3838	0,2089	0,7646	0,0817	0,0766	0,0305	0,0930	0,1754	0,5263	0,2083	0,0363	0,0214	0,1032	0,1376	0,0310	0,0011	0,5746

Substanz		Trinatriumhydrogenethylendiamintetraacetat (TET) –MAS [µM]									Trinatriumhydrogenethylendiamintetraacetat (TET) +MAS [µM]								
		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,007	1,079	1,060	1,087	1,139	1,104	0,985	0,745	0,479	1,090	1,278	1,236	1,304	1,359	1,416	1,463	1,403	1,187
	SD	0,024	0,015	0,021	0,052	0,067	0,093	0,059	0,037	0,015	0,100	0,124	0,052	0,105	0,169	0,068	0,178	0,112	0,143
	p-W	0,6697	0,0245	0,0369	0,0889	0,0781	0,1805	0,7468	0,0031	0,0037	0,2556	0,0778	0,0260	0,0511	0,0850	0,0049	0,0351	0,0355	0,1292
CMFDA	XF	1,023	1,092	1,118	1,090	1,107	1,066	1,024	0,859	0,605	1,105	1,167	1,128	1,107	1,088	1,174	1,123	1,063	0,981
	SD	0,025	0,045	0,039	0,021	0,059	0,041	0,056	0,057	0,018	0,068	0,047	0,023	0,032	0,065	0,047	0,061	0,178	0,098
	p-W	0,2549	0,0868	0,0507	0,0094	0,1093	0,1301	0,5075	0,0387	0,0049	0,0881	0,0316	0,0224	0,0392	0,1271	0,0098	0,0952	0,6080	0,6969
p-p53 (Ser15)	XF	-1,024	-1,001	1,089	1,081	1,055	1,099	1,111	1,112	1,472	1,143	1,203	1,310	1,201	1,155	1,260	1,341	1,246	1,435
	SD	0,017	0,057	0,072	0,078	0,062	0,058	0,077	0,077	0,126	0,049	0,076	0,072	0,113	0,071	0,083	0,127	0,110	0,240
	p-W	0,1459	0,9776	0,1557	0,2301	0,2597	0,0672	0,1081	0,1191	0,0144	0,0595	0,0296	0,0074	0,0767	0,0522	0,0237	0,0283	0,0465	0,0756
p21	XF	-1,005	1,008	-1,053	1,062	1,043	1,067	1,041	1,360	1,290	-1,011	-1,035	-1,020	1,007	-1,019	-1,001	-1,054	-1,116	-1,259
	SD	0,004	0,117	0,068	0,138	0,076	0,103	0,102	0,125	0,201	0,044	0,062	0,141	0,058	0,084	0,130	0,093	0,133	0,145
	p-W	0,1668	0,9661	0,2971	0,5277	0,4373	0,3684	0,5810	0,0191	0,0997	0,7305	0,4330	0,8667	0,8742	0,7445	0,9833	0,4152	0,2586	0,0768
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,049	-1,008	-1,053	1,053	1,045	1,009	-1,084	1,271	2,627	-1,102	-1,057	-1,096	-1,053	1,020	-1,174	-1,347	-1,465	-1,299
	SD	0,056	0,108	0,085	0,175	0,077	0,113	0,090	0,060	0,284	0,181	0,105	0,041	0,153	0,157	0,170	0,223	0,112	0,018
	p-W	0,2576	0,8948	0,3862	0,6553	0,4248	0,9209	0,2506	0,0092	0,0052	0,4333	0,4617	0,0657	0,6023	0,7758	0,2342	0,0666	0,0114	0,0010
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,014	1,020	1,063	-1,042	1,011	1,023	1,020	1,060	1,103	-1,036	1,025	-1,012	-1,052	-1,089	1,007	1,042	-1,142	-1,048
	SD	0,025	0,019	0,054	0,042	0,105	0,040	0,011	0,085	0,066	0,021	0,020	0,115	0,131	0,096	0,134	0,129	0,185	0,116
	p-W	0,4633	0,2127	0,1997	0,2211	0,9037	0,4194	0,0670	0,3521	0,0849	0,1016	0,1696	0,8578	0,5567	0,2493	0,9639	0,6327	0,3031	0,5378
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,044	-1,114	-1,098	-1,219	-1,165	-1,135	-1,050	1,137	1,714	-1,081	-1,133	-1,098	-1,173	-1,172	-1,124	-1,130	-1,121	1,077
	SD	0,059	0,061	0,060	0,109	0,127	0,027	0,077	0,071	0,082	0,021	0,062	0,076	0,141	0,078	0,163	0,143	0,121	0,090
	p-W	0,3164	0,0765	0,1132	0,0735	0,1391	0,0170	0,3675	0,0647	0,0012	0,0132	0,0522	0,1628	0,1621	0,0719	0,3065	0,2556	0,2224	0,2972

Substanz		Ephedrinsulfat (EPS) –MAS [µM]									Ephedrinsulfat (EPS) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,961	1,090	1,079	1,026	1,103	1,028	1,034	0,998	0,754	0,980	1,113	1,047	1,054	1,137	1,044	1,016	0,938	0,881
	SD	0,127	0,072	0,052	0,107	0,081	0,122	0,065	0,137	0,160	0,191	0,051	0,097	0,197	0,080	0,138	0,188	0,169	0,071
	p-W	0,6009	0,1489	0,1464	0,7223	0,1405	0,7716	0,5120	0,9180	0,1340	0,8011	0,0394	0,5175	0,7382	0,0825	0,6649	0,9521	0,5334	0,1228
CMFDA	XF	1,013	1,095	1,123	1,120	1,141	1,084	1,083	1,117	1,267	1,063	1,072	1,062	1,052	1,159	1,081	1,009	0,940	0,875
	SD	0,074	0,087	0,073	0,039	0,025	0,119	0,100	0,143	0,073	0,113	0,039	0,062	0,070	0,029	0,076	0,031	0,015	0,048
	p-W	0,8499	0,1995	0,0937	0,0278	0,0129	0,3448	0,2735	0,3004	0,0216	0,4174	0,1006	0,2363	0,3171	0,0056	0,2129	0,6379	0,0222	0,0501
p-p53 (Ser15)	XF	1,021	1,019	1,011	-1,044	-1,275	-1,319	-1,080	-1,297	-1,166	1,213	1,210	1,061	1,093	-1,306	-1,441	-1,093	-1,109	-1,233
	SD	0,089	0,075	0,043	0,058	0,185	0,094	0,038	0,040	0,133	0,107	0,096	0,156	0,086	0,124	0,179	0,192	0,266	0,228
	p-W	0,7017	0,8043	0,7949	0,2918	0,1388	0,0277	0,1088	0,0221	0,1842	0,0719	0,0620	0,5506	0,1992	0,0366	0,0290	0,5501	0,6415	0,2082
p21	XF	-1,029	-1,067	-1,047	-1,012	1,055	1,057	-1,039	-1,069	-1,050	-1,060	-1,017	-1,030	-1,034	1,051	1,072	1,040	1,019	1,018
	SD	0,029	0,055	0,074	0,073	0,073	0,086	0,086	0,119	0,083	0,009	0,049	0,053	0,068	0,049	0,043	0,027	0,026	0,080
	p-W	0,2432	0,1669	0,3742	0,8003	0,3206	0,3590	0,5043	0,4166	0,3960	0,0078	0,6381	0,4332	0,4992	0,2108	0,0909	0,1118	0,3401	0,7436
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,017	-1,030	-1,007	1,030	1,058	1,044	-1,012	1,006	1,026	-1,132	-1,090	-1,089	-1,083	-1,000	1,011	1,095	1,115	1,285
	SD	0,032	0,022	0,059	0,069	0,098	0,088	0,100	0,103	0,067	0,053	0,066	0,013	0,057	0,068	0,059	0,085	0,133	0,095
	p-W	0,4422	0,1489	0,8546	0,5402	0,4082	0,4738	0,8616	0,9272	0,5688	0,0629	0,1453	0,0165	0,1405	0,9626	0,7392	0,1803	0,2545	0,0553
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,019	1,101	1,259	-1,129	-1,012	-1,170	-1,100	-1,017	1,219	-1,077	1,006	-1,071	-1,075	-1,114	-1,104	-1,163	-1,153	-1,096
	SD	0,201	0,163	0,160	0,331	0,208	0,093	0,132	0,196	0,145	0,084	0,038	0,098	0,018	0,107	0,015	0,068	0,074	0,073
	p-W	0,8841	0,3983	0,1033	0,6280	0,9430	0,0962	0,3881	0,9539	0,1287	0,2425	0,8098	0,3600	0,0172	0,2019	0,0029	0,0336	0,0554	0,1408
p-ATM (Ser1981)	XF	1,085	1,003	1,121	-1,119	-1,083	-1,124	-1,141	1,005	1,363	-1,049	-1,114	-1,198	-1,103	-1,146	-1,120	-1,206	-1,136	-1,018
	SD	0,233	0,253	0,213	0,297	0,184	0,054	0,129	0,177	0,232	0,021	0,092	0,136	0,080	0,113	0,080	0,174	0,158	0,092
	p-W	0,5859	0,9884	0,4381	0,5817	0,5147	0,0674	0,1695	0,8712	0,1017	0,0486	0,1478	0,0917	0,1250	0,1169	0,1120	0,1747	0,2514	0,8120

Substanz		Erythromycinstearat (EYS) –MAS [µM]									Erythromycinstearat (EYS) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,009	1,121	1,019	1,084	0,475	0,047	0,072	0,114	0,115	1,011	1,081	1,010	1,017	1,029	0,688	0,344	0,209	0,197
	SD	0,032	0,179	0,064	0,158	0,006	0,008	0,009	0,013	0,018	0,044	0,047	0,080	0,075	0,203	0,006	0,061	0,028	0,017
	p-W	0,6299	0,3532	0,7081	0,4643	0,0059	0,0053	0,0047	0,0058	0,0036	0,7638	0,0875	0,9161	0,7960	0,8091	0,0041	0,0049	0,0026	0,0021
CMFDA	XF	1,012	1,022	1,074	1,101	1,074	0,420	0,110	0,087	0,082	1,015	0,954	0,970	0,983	1,039	0,822	0,489	0,176	0,119
	SD	0,032	0,097	0,020	0,069	0,079	0,149	0,024	0,006	0,005	0,048	0,106	0,119	0,140	0,194	0,096	0,087	0,011	0,020
	p-W	0,5943	0,7650	0,0199	0,1078	0,2564	0,0221	0,0024	0,0015	0,0013	0,6525	0,4637	0,6118	0,7495	0,8221	0,1060	0,0289	0,0063	0,0080
p-p53 (Ser15)	XF	1,092	1,334	1,119	-1,033	-1,053	-1,928	-1,848	-2,348	-2,539	1,327	1,288	1,167	1,021	-1,216	-1,458	-1,597	-2,614	-2,334
	SD	0,070	0,294	0,208	0,151	0,037	0,137	0,274	0,528	0,220	0,169	0,055	0,254	0,109	0,173	0,316	0,370	0,837	0,793
	p-W	0,1999	0,1687	0,3946	0,7023	0,1627	0,0157	0,0352	0,0332	0,0082	0,0825	4E-05	0,3782	0,8653	0,1716	0,1180	0,0912	0,0478	0,0624
p21	XF	-1,073	-1,072	-1,051	-1,115	1,123	1,089	1,038	1,055	1,044	-1,022	1,135	1,160	1,040	1,309	1,461	1,499	1,316	1,245
	SD	0,083	0,072	0,051	0,070	0,026	0,075	0,061	0,079	0,090	0,064	0,020	0,049	0,031	0,039	0,068	0,094	0,057	0,069
	p-W	0,2956	0,1945	0,2180	0,1339	0,0116	0,1775	0,4223	0,4030	0,4135	0,5864	0,0029	0,0387	0,1348	0,0041	0,0209	0,0181	0,0122	0,0357
p-H2AX (Ser139)	XF	1,056	1,037	1,061	1,105	1,474	1,641	-1,413	-1,557	-1,141	-1,150	-1,002	1,059	-1,104	1,144	1,934	2,293	1,397	-1,631
	SD	0,075	0,080	0,093	0,090	0,103	0,263	0,072	0,048	0,150	0,118	0,086	0,124	0,181	0,227	0,419	0,561	0,432	0,805
	p-W	0,3140	0,5732	0,4128	0,1784	0,0054	0,0537	0,0181	0,0122	0,2525	0,1714	0,8729	0,5653	0,4150	0,4262	0,0374	0,0281	0,2100	0,2399
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,017	1,176	1,270	1,159	1,769	2,055	1,960	1,926	1,940	1,028	1,053	1,153	1,113	1,075	1,378	1,709	1,723	1,685
	SD	0,173	0,112	0,244	0,333	0,247	0,136	0,294	0,199	0,252	0,059	0,140	0,101	0,021	0,147	0,090	0,148	0,074	0,101
	p-W	0,9077	0,0803	0,1847	0,5138	0,0183	0,0028	0,0120	0,0044	0,0064	0,5012	0,5658	0,1057	0,0065	0,4611	0,0133	0,0121	0,0007	0,0022
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,010	1,078	1,314	1,121	2,281	1,657	-1,512	-1,774	-2,174	1,011	-1,106	1,108	1,060	-1,089	1,163	1,007	-2,110	-3,507
	SD	0,222	0,068	0,339	0,269	0,236	0,106	0,507	0,332	0,538	0,093	0,164	0,167	0,054	0,201	0,081	0,119	0,179	0,736
	p-W	0,9363	0,1849	0,2567	0,5417	0,0014	0,0308	0,1684	0,0455	0,0387	0,8119	0,3731	0,3740	0,1638	0,5472	0,0506	0,9229	0,0059	0,0074

<b>Substanz</b>		<b>Fluometuron (FM) –MAS [µM]</b>									<b>Fluometuron (FM) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,137	1,152	1,176	1,245	1,201	1,218	1,124	0,887	0,496	1,118	1,178	1,178	1,315	1,244	1,511	1,572	1,545	1,189
	SD	0,008	0,047	0,022	0,035	0,102	0,027	0,081	0,013	0,002	0,168	0,082	0,130	0,035	0,093	0,250	0,098	0,075	0,122
	p-W	0,0061	0,0456	0,0169	0,0168	0,1066	0,0070	0,1290	0,0017	0,0043	0,3944	0,0407	0,1160	0,0231	0,0670	0,0493	0,0169	0,0022	0,0897
CMFDA	XF	1,107	1,126	1,168	1,186	1,127	1,127	1,085	1,047	0,677	1,092	1,126	1,118	1,112	1,131	1,166	1,214	1,101	0,995
	SD	0,028	0,031	0,036	0,045	0,036	0,038	0,039	0,019	0,007	0,074	0,054	0,034	0,034	0,112	0,138	0,148	0,084	0,065
	p-W	0,0231	0,0285	0,0224	0,0315	0,0357	0,0365	0,0804	0,0486	0,0018	0,1488	0,0473	0,0119	0,0239	0,1716	0,1620	0,1165	0,1602	0,8510
p-p53 (Ser15)	XF	1,010	1,163	1,111	1,035	1,108	1,103	1,160	1,198	1,413	1,011	1,011	1,039	1,099	1,066	1,232	1,231	1,179	1,186
	SD	0,012	0,137	0,057	0,043	0,050	0,087	0,025	0,056	0,080	0,042	0,047	0,022	0,064	0,108	0,050	0,066	0,059	0,036
	p-W	0,3086	0,1812	0,0563	0,3005	0,0705	0,1527	0,0097	0,0369	0,0224	0,6848	0,7142	0,0910	0,1202	0,3685	0,0100	0,0218	0,0485	0,0041
p21	XF	-1,019	-1,111	-1,102	-1,037	-1,147	-1,079	-1,190	-1,092	-1,050	1,085	1,069	1,073	1,092	1,047	1,153	1,119	1,291	1,201
	SD	0,038	0,078	0,105	0,056	0,084	0,040	0,052	0,075	0,033	0,122	0,116	0,105	0,034	0,118	0,130	0,156	0,098	0,094
	p-W	0,4828	0,1129	0,2094	0,3701	0,0726	0,0751	0,0150	0,1358	0,1214	0,3480	0,4002	0,3409	0,0521	0,5510	0,1733	0,3081	0,0248	0,0538
p-H2AX (Ser139)	XF	1,033	1,008	1,035	1,097	1,009	1,027	-1,076	-1,004	1,073	1,127	1,010	1,139	-1,009	-1,155	-1,363	-1,608	-1,462	-1,334
	SD	0,037	0,044	0,061	0,074	0,047	0,036	0,022	0,033	0,028	0,038	0,042	0,156	0,147	0,140	0,184	0,272	0,134	0,057
	p-W	0,2698	0,7303	0,4351	0,1586	0,7706	0,3426	0,0252	0,8657	0,0306	0,0397	0,6844	0,2476	0,9560	0,1946	0,0650	0,0193	0,0270	0,0001
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,026	-1,019	1,034	1,145	1,127	1,176	1,167	1,248	1,274	-1,062	1,035	1,049	-1,077	-1,036	1,020	1,099	-1,047	1,267
	SD	0,133	0,128	0,084	0,157	0,124	0,117	0,115	0,191	0,088	0,075	0,102	0,128	0,195	0,114	0,189	0,139	0,131	0,205
	p-W	0,7069	0,6301	0,7184	0,2234	0,2019	0,0558	0,0462	0,0856	0,0113	0,2848	0,6262	0,5874	0,6000	0,6639	0,8552	0,3453	0,6107	0,1373
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,110	-1,098	-1,172	-1,078	1,006	-1,086	-1,160	1,214	1,404	-1,081	-1,087	1,068	-1,132	-1,088	-1,172	-1,184	-1,101	1,104
	SD	0,154	0,167	0,395	0,171	0,102	0,115	0,170	0,143	0,085	0,064	0,119	0,059	0,159	0,088	0,064	0,037	0,083	0,066
	p-W	0,4018	0,4482	0,6632	0,6193	0,8712	0,3048	0,2248	0,0735	0,0321	0,1739	0,3462	0,1709	0,2970	0,1873	0,0196	0,0173	0,1311	0,1273

<b>Substanz</b>		<b>Phenanthracen (PA) –MAS [µM]</b>									<b>Phenanthracen (PA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,241	1,195	1,252	1,200	1,400	1,252	1,136	0,974	0,785	1,035	1,149	1,182	1,178	1,186	1,212	1,165	1,136	0,938
	SD	0,227	0,196	0,069	0,097	0,250	0,111	0,104	0,019	0,103	0,123	0,115	0,108	0,076	0,135	0,063	0,084	0,088	0,099
	p-W	0,1714	0,2000	0,0088	0,0428	0,0637	0,0308	0,1022	0,1526	0,0964	0,6488	0,1588	0,1103	0,0675	0,1449	0,0408	0,0883	0,1315	0,3582
CMFDA	XF	1,223	1,192	1,104	1,256	1,238	1,149	1,101	0,970	0,913	1,328	1,398	1,487	1,389	1,476	1,399	1,266	1,147	1,085
	SD	0,314	0,201	0,126	0,104	0,081	0,162	0,131	0,057	0,102	0,083	0,159	0,131	0,092	0,072	0,364	0,289	0,173	0,103
	p-W	0,3493	0,2521	0,3222	0,0503	0,0355	0,2699	0,3146	0,4680	0,3052	0,0285	0,0551	0,0334	0,0167	0,0128	0,1907	0,2448	0,2618	0,2675
p-p53 (Ser15)	XF	1,272	1,326	1,411	1,345	1,168	1,235	1,044	1,432	1,345	1,361	1,397	1,419	1,429	1,295	1,526	1,637	1,714	1,662
	SD	0,193	0,077	0,172	0,122	0,130	0,198	0,150	0,191	0,125	0,175	0,129	0,100	0,172	0,188	0,179	0,202	0,157	0,376
	p-W	0,1110	0,0321	0,0370	0,0227	0,1365	0,1805	0,6185	0,0402	0,0278	0,0549	0,0251	0,0089	0,0348	0,1000	0,0230	0,0193	0,0061	0,0778
p21	XF	1,052	1,167	1,021	-1,067	-1,039	-1,079	-1,131	1,067	1,172	1,004	-1,034	-1,213	-1,252	-1,130	-1,036	-1,113	1,152	1,010
	SD	0,101	0,142	0,099	0,080	0,021	0,056	0,130	0,260	0,124	0,114	0,058	0,114	0,332	0,193	0,151	0,026	0,177	0,078
	p-W	0,4734	0,1774	0,7362	0,2903	0,0718	0,1303	0,2025	0,6668	0,1358	0,9685	0,4164	0,0824	0,2929	0,3717	0,7338	0,0072	0,2761	0,7662
p-H2AX (Ser139)	XF	1,153	1,291	1,177	1,039	1,152	1,152	1,091	1,402	1,448	-1,457	-1,580	-2,014	-2,161	-2,050	-1,560	1,456	1,488	1,126
	SD	0,111	0,120	0,064	0,041	0,081	0,105	0,075	0,447	0,113	0,566	0,443	0,532	0,981	0,826	0,491	0,299	0,660	0,168
	p-W	0,1310	0,0452	0,0416	0,2359	0,0818	0,1229	0,1684	0,2527	0,0157	0,2755	0,1540	0,0880	0,1409	0,1402	0,1809	0,0495	0,3435	0,2789
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,328	1,101	1,175	1,332	1,340	1,225	1,267	1,565	1,691	1,074	-1,241	-1,304	-1,271	-1,271	-1,281	-1,184	-1,112	-1,072
	SD	0,280	0,094	0,199	0,164	0,219	0,176	0,247	0,167	0,161	0,085	0,143	0,165	0,146	0,217	0,363	0,285	0,156	0,206
	p-W	0,1420	0,1848	0,2746	0,0918	0,1506	0,1643	0,2357	0,0546	0,0344	0,2713	0,0908	0,0791	0,0769	0,1549	0,3505	0,3951	0,3445	0,6186
p-ATM (Ser1981)	XF	1,223	1,036	1,028	1,193	1,181	1,137	1,263	1,585	1,876	1,093	-1,247	-1,320	-1,246	-1,197	-1,208	1,043	1,140	1,306
	SD	0,287	0,106	0,250	0,067	0,269	0,141	0,175	0,183	0,433	0,098	0,206	0,194	0,137	0,193	0,313	0,327	0,234	0,165
	p-W	0,3123	0,6362	0,8439	0,0558	0,3673	0,2386	0,1447	0,0472	0,0790	0,2408	0,1437	0,0910	0,0792	0,1944	0,4248	0,7684	0,4097	0,1013

Substanz		D-Limonen (DL) -MAS [ $\mu$ M]									D-Limonen (DL) +MAS [ $\mu$ M]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,182	1,096	1,069	1,160	1,104	1,124	1,083	1,082	0,943	1,224	1,178	1,160	1,182	1,226	1,341	1,260	1,180	1,014
	SD	0,085	0,125	0,064	0,060	0,066	0,058	0,087	0,081	0,120	0,195	0,230	0,153	0,284	0,143	0,232	0,191	0,107	0,086
	p-W	0,0575	0,3071	0,2015	0,0394	0,1022	0,0600	0,2287	0,2267	0,4805	0,1719	0,3406	0,2100	0,4007	0,1042	0,1206	0,1340	0,0850	0,8984
CMFDA	XF	1,124	1,056	0,973	1,059	1,010	0,952	1,009	0,987	0,895	1,163	1,143	1,152	1,280	1,218	1,250	1,142	1,230	1,122
	SD	0,223	0,062	0,092	0,042	0,065	0,081	0,061	0,107	0,088	0,356	0,241	0,224	0,341	0,151	0,183	0,272	0,252	0,193
	p-W	0,4520	0,2159	0,5559	0,0831	0,8926	0,4036	0,8605	0,7180	0,1786	0,6038	0,4697	0,4188	0,2488	0,0571	0,1676	0,5307	0,1906	0,3673
p-p53 (Ser15)	XF	1,327	1,225	1,157	1,072	-1,074	1,159	-1,211	1,083	1,011	1,231	1,021	1,098	1,162	-1,180	1,001	-1,204	-1,028	-1,220
	SD	0,136	0,112	0,166	0,095	0,166	0,238	0,411	0,321	0,399	0,154	0,030	0,241	0,410	0,215	0,149	0,092	0,038	0,186
	p-W	0,0397	0,0626	0,2497	0,3323	0,5497	0,3758	0,5115	0,6730	0,8402	0,1263	0,3726	0,5764	0,5864	0,2701	0,8969	0,0707	0,3176	0,1670
p21	XF	1,083	1,153	1,234	1,083	1,244	1,187	1,228	1,313	1,066	-1,011	1,142	1,031	-1,009	-1,004	1,100	1,088	1,213	-1,063
	SD	0,042	0,026	0,099	0,114	0,123	0,173	0,138	0,161	0,193	0,091	0,062	0,130	0,245	0,132	0,086	0,121	0,100	0,148
	p-W	0,0597	0,0021	0,0414	0,3532	0,0607	0,1983	0,0882	0,0633	0,6313	0,9310	0,0529	0,7433	0,9642	0,9929	0,1786	0,3225	0,0790	0,5380
p-H2AX (Ser139)	XF	1,138	1,208	1,281	1,096	1,184	1,214	1,206	1,246	1,074	1,005	1,669	1,194	-1,015	1,180	1,204	1,272	1,261	-1,006
	SD	0,090	0,120	0,240	0,124	0,130	0,166	0,187	0,127	0,166	0,052	0,423	0,231	0,415	0,364	0,252	0,392	0,406	0,301
	p-W	0,1135	0,0948	0,1931	0,3000	0,1169	0,1477	0,1929	0,0636	0,5156	0,8315	0,1012	0,2766	0,9156	0,4416	0,2966	0,3456	0,3693	0,9373
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,216	1,013	1,124	1,087	-1,020	-1,017	-1,080	-1,058	1,017	1,015	-1,011	1,124	1,126	1,021	-1,012	-1,014	1,075	1,131
	SD	0,167	0,035	0,096	0,127	0,023	0,076	0,065	0,054	0,079	0,039	0,017	0,089	0,048	0,115	0,062	0,139	0,119	0,145
	p-W	0,1428	0,5544	0,1658	0,3737	0,2808	0,7487	0,1788	0,2172	0,7022	0,5652	0,3828	0,1445	0,0595	0,7599	0,8379	0,9516	0,3906	0,2640
p-ATM (Ser1981)	XF	1,195	-1,024	1,193	1,064	-1,019	-1,005	-1,122	-1,122	1,073	1,096	1,064	1,211	1,264	-1,057	-1,025	-1,144	1,167	1,275
	SD	0,190	0,015	0,167	0,138	0,045	0,131	0,105	0,058	0,040	0,053	0,109	0,113	0,088	0,019	0,159	0,244	0,237	0,156
	p-W	0,2222	0,1132	0,1943	0,5027	0,5075	0,9891	0,1807	0,0690	0,0980	0,0814	0,4001	0,0857	0,0513	0,0214	0,9202	0,4443	0,3457	0,0827

Substanz		Diethylhexylphthalat (DEP) –MAS [µM]									Diethylhexylphthalat (DEP) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,893	0,875	0,802	0,784	0,695	0,626	0,585	0,551	0,524	1,112	1,133	1,236	1,252	1,377	1,390	1,350	1,255	1,054
	SD	0,144	0,091	0,059	0,126	0,068	0,123	0,160	0,132	0,123	0,097	0,154	0,181	0,154	0,164	0,304	0,138	0,164	0,061
	p-W	0,3011	0,1034	0,0664	0,1112	0,0446	0,0624	0,0963	0,0749	0,0667	0,1861	0,2794	0,1511	0,1019	0,0518	0,1514	0,0410	0,1133	0,2740
CMFDA	XF	0,944	0,948	0,829	0,805	0,680	0,607	0,564	0,540	0,505	1,040	1,072	1,113	1,130	1,201	1,219	1,207	1,102	0,934
	SD	0,038	0,056	0,028	0,068	0,051	0,035	0,045	0,049	0,043	0,061	0,064	0,042	0,056	0,090	0,101	0,073	0,040	0,010
	p-W	0,1218	0,2483	0,0148	0,0456	0,0143	0,0052	0,0073	0,0080	0,0061	0,3830	0,1923	0,0439	0,0585	0,0581	0,0603	0,0374	0,0413	0,0104
p-p53 (Ser15)	XF	-1,031	1,056	-1,012	1,074	1,017	1,040	1,103	1,078	1,018	-1,052	1,049	-1,055	-1,078	-1,025	-1,095	-1,051	1,063	1,132
	SD	0,078	0,071	0,075	0,188	0,004	0,049	0,157	0,158	0,048	0,128	0,138	0,079	0,152	0,062	0,076	0,072	0,050	0,165
	p-W	0,5574	0,3274	0,7731	0,5852	0,0113	0,3096	0,3902	0,4670	0,6382	0,5726	0,6058	0,3566	0,4868	0,5568	0,1648	0,3432	0,1553	0,2929
p21	XF	-1,017	-1,122	-1,182	-1,316	-1,349	-1,314	-1,327	-1,283	-1,235	-1,058	1,006	-1,100	-1,118	-1,096	-1,043	1,002	1,050	1,012
	SD	0,021	0,033	0,019	0,039	0,048	0,086	0,111	0,073	0,087	0,051	0,132	0,133	0,182	0,131	0,060	0,081	0,126	0,105
	p-W	0,2942	0,0227	0,0043	0,0040	0,0052	0,0180	0,0252	0,0168	0,0345	0,2150	0,9759	0,3146	0,3671	0,3268	0,3255	0,9716	0,6052	0,9502
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,024	-1,035	-1,029	-1,016	1,017	1,058	1,107	1,124	1,146	-1,131	-1,089	-1,219	-1,208	-1,361	-1,281	-1,393	-1,327	-1,354
	SD	0,071	0,056	0,071	0,043	0,004	0,043	0,029	0,061	0,049	0,086	0,172	0,210	0,219	0,247	0,118	0,257	0,165	0,192
	p-W	0,6377	0,4010	0,5743	0,6059	0,0212	0,1408	0,0230	0,0686	0,0347	0,1360	0,4692	0,2079	0,2355	0,1187	0,0703	0,1090	0,0798	0,0893
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,028	-1,009	-1,105	-1,034	-1,020	-1,014	-1,056	-1,007	-1,013	-1,039	-1,056	-1,125	-1,052	-1,074	1,013	1,062	1,076	1,053
	SD	0,106	0,059	0,065	0,050	0,062	0,069	0,122	0,030	0,142	0,070	0,026	0,061	0,087	0,044	0,023	0,173	0,170	0,055
	p-W	0,6105	0,8263	0,1111	0,3385	0,7226	0,6864	0,5725	0,7636	0,9709	0,4557	0,0591	0,0572	0,4160	0,0929	0,4224	0,5661	0,4857	0,2385
p-ATM (Ser1981)	XF	1,046	-1,025	-1,046	-1,010	1,093	1,304	1,139	1,262	1,385	-1,022	-1,088	-1,231	-1,178	-1,255	-1,192	-1,182	-1,182	1,004
	SD	0,077	0,116	0,021	0,097	0,151	0,086	0,241	0,183	0,230	0,080	0,110	0,188	0,184	0,146	0,146	0,059	0,128	0,031
	p-W	0,333	0,891	0,091	0,966	0,409	0,020	0,432	0,078	0,116	0,6677	0,2906	0,1434	0,2049	0,0834	0,1340	0,0256	0,0814	0,8396

Substanz		Amitrol (AT) -MAS [ $\mu\text{M}$ ]										Amitrol (AT) +MAS [ $\mu\text{M}$ ]							
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,042	1,020	1,031	1,006	1,058	1,037	1,039	0,974	0,962	1,091	1,110	1,152	1,098	1,224	1,149	1,260	1,098	0,920
	SD	0,077	0,031	0,114	0,070	0,147	0,041	0,047	0,032	0,061	0,124	0,119	0,085	0,100	0,163	0,110	0,201	0,060	0,044
	p-W	0,4936	0,3382	0,5970	0,7903	0,5036	0,2379	0,3069	0,3022	0,3749	0,3185	0,2085	0,1174	0,2553	0,1388	0,0910	0,1536	0,1463	0,0455
CMFDA	XF	1,158	1,162	1,142	1,234	1,198	1,139	1,089	1,051	0,925	1,019	1,040	1,078	1,112	1,098	1,057	1,063	1,007	0,958
	SD	0,047	0,077	0,095	0,098	0,123	0,086	0,080	0,162	0,109	0,059	0,019	0,042	0,101	0,016	0,054	0,041	0,069	0,035
	p-W	0,0255	0,0555	0,1342	0,0552	0,1154	0,1113	0,1917	0,6325	0,3406	0,6159	0,0765	0,0939	0,1936	0,0112	0,2099	0,1250	0,8392	0,1763
p-p53 (Ser15)	XF	-1,024	1,085	1,366	1,322	1,543	1,399	1,366	1,483	1,529	1,117	1,135	1,216	1,076	1,123	1,203	1,202	1,195	1,133
	SD	0,072	0,030	0,021	0,068	0,148	0,288	0,164	0,213	0,270	0,088	0,105	0,257	0,142	0,128	0,111	0,105	0,080	0,092
	p-W	0,6464	0,0296	0,0010	0,0172	0,0173	0,1325	0,0515	0,0496	0,0700	0,1359	0,1283	0,2638	0,4576	0,2140	0,0792	0,0564	0,0320	0,1003
p21	XF	1,092	1,111	-1,020	1,128	-1,025	1,207	1,065	1,020	1,183	-1,000	1,010	1,033	-1,022	1,082	1,052	1,049	1,045	1,119
	SD	0,047	0,083	0,083	0,121	0,153	0,060	0,079	0,053	0,111	0,074	0,020	0,069	0,035	0,033	0,066	0,032	0,064	0,046
	p-W	0,0691	0,1414	0,7692	0,1972	0,8766	0,0259	0,2854	0,5667	0,1034	0,9890	0,4958	0,4855	0,3880	0,0564	0,3126	0,1204	0,3507	0,0412
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,025	-1,007	1,097	1,029	1,091	1,012	1,053	1,006	1,026	1,000	-1,131	-1,303	-1,200	-1,196	-1,205	-1,200	-1,014	1,186
	SD	0,021	0,030	0,067	0,029	0,064	0,063	0,068	0,075	0,133	0,118	0,081	0,186	0,222	0,253	0,038	0,336	0,158	0,147
	p-W	0,1779	0,7007	0,1395	0,2306	0,1288	0,7755	0,3174	0,8854	0,7640	0,9025	0,1272	0,1094	0,2485	0,3080	0,0264	0,4010	0,7936	0,1072
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,245	1,208	1,454	1,402	1,317	1,443	1,386	1,577	1,393	1,023	1,047	1,096	1,004	1,147	1,236	1,210	1,206	1,332
	SD	0,246	0,109	0,407	0,145	0,140	0,198	0,206	0,301	0,120	0,109	0,105	0,057	0,105	0,025	0,152	0,084	0,103	0,231
	p-W	0,2688	0,0979	0,2351	0,0814	0,0931	0,0704	0,1303	0,0669	0,0290	0,7612	0,5354	0,0971	0,9517	0,0183	0,1080	0,0490	0,0622	0,1295
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,059	1,022	1,137	1,098	1,022	1,130	1,062	1,331	1,364	-1,040	1,007	1,084	-1,012	1,126	1,119	-1,026	1,084	1,108
	SD	0,254	0,136	0,185	0,152	0,078	0,097	0,108	0,222	0,158	0,097	0,084	0,188	0,239	0,173	0,205	0,139	0,162	0,085
	p-W	0,9807	0,6872	0,3514	0,3505	0,5858	0,1387	0,3618	0,0890	0,0263	0,5412	0,9220	0,5126	0,9726	0,3210	0,4181	0,8344	0,4727	0,1481

<b>Substanz</b>		<b><i>tert</i>-Butylalkohol (TBA) –MAS [µM]</b>									<b><i>tert</i>-Butylalkohol (TBA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,056	1,123	1,086	1,198	1,168	1,149	1,052	1,076	1,055	1,132	1,155	1,167	1,083	1,199	1,194	1,129	1,137	0,928
	SD	0,045	0,055	0,090	0,054	0,087	0,082	0,113	0,095	0,065	0,138	0,065	0,264	0,117	0,237	0,141	0,130	0,118	0,071
	p-W	0,1592	0,0528	0,2388	0,0276	0,0841	0,0872	0,5044	0,3056	0,2787	0,2190	0,0331	0,4007	0,3634	0,2790	0,1352	0,2329	0,1833	0,2253
CMFDA	XF	1,017	1,007	1,048	1,084	1,036	1,063	1,039	1,032	1,067	1,001	1,009	0,988	0,984	0,985	1,060	1,006	0,995	0,967
	SD	0,032	0,045	0,021	0,051	0,054	0,054	0,082	0,057	0,111	0,121	0,067	0,112	0,080	0,173	0,077	0,094	0,071	0,089
	p-W	0,4777	0,8226	0,0567	0,0968	0,3612	0,1696	0,5055	0,4327	0,4025	0,9410	0,8919	0,8232	0,7046	0,8154	0,3044	0,9753	0,8416	0,5228
p-p53 (Ser15)	XF	1,095	1,158	1,172	1,212	1,376	1,217	1,381	1,149	1,156	1,119	-1,102	1,017	-1,031	1,139	1,160	1,507	1,258	1,101
	SD	0,074	0,120	0,188	0,208	0,085	0,027	0,230	0,179	0,215	0,148	0,084	0,092	0,119	0,195	0,202	0,372	0,240	0,157
	p-W	0,2216	0,1855	0,3252	0,2061	0,0114	0,0606	0,0490	0,2049	0,4058	0,2683	0,1722	0,9112	0,8327	0,3360	0,2781	0,1273	0,1768	0,4242
p21	XF	-1,049	-1,096	-1,069	-1,044	-1,104	-1,057	-1,067	1,031	1,061	1,000	1,048	1,033	1,039	1,014	1,020	1,068	1,101	1,063
	SD	0,041	0,111	0,092	0,093	0,163	0,092	0,045	0,040	0,139	0,044	0,071	0,074	0,080	0,077	0,088	0,150	0,120	0,072
	p-W	0,1673	0,2721	0,3312	0,5168	0,3740	0,4099	0,1163	0,3084	0,5298	0,9818	0,3668	0,5259	0,4945	0,7733	0,7286	0,5127	0,2889	0,2778
p-H2AX (Ser139)	XF	1,029	1,022	1,010	1,076	1,066	1,049	1,056	1,061	1,040	-1,043	-1,047	1,068	-1,016	-1,049	-1,120	1,076	1,084	-1,054
	SD	0,037	0,057	0,043	0,067	0,032	0,074	0,040	0,054	0,169	0,082	0,135	0,067	0,086	0,042	0,074	0,129	0,120	0,071
	p-W	0,2975	0,5310	0,7087	0,2118	0,0724	0,3632	0,1111	0,1954	0,7543	0,4398	0,5884	0,2513	0,7499	0,1698	0,1222	0,4476	0,3798	0,2851
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,115	-1,008	1,286	1,078	1,039	1,057	1,086	1,174	1,336	-1,100	-1,208	-1,093	-1,100	-1,164	-1,149	-1,051	-1,131	-1,068
	SD	0,178	0,115	0,336	0,146	0,133	0,109	0,123	0,175	0,085	0,112	0,110	0,190	0,119	0,047	0,127	0,171	0,105	0,108
	p-W	0,3801	0,9374	0,2727	0,4447	0,6296	0,4684	0,3544	0,2225	0,0312	0,2648	0,0712	0,5125	0,2954	0,0175	0,1754	0,7124	0,1521	0,4063
p-ATM (Ser1981)	XF	1,012	-1,096	1,230	-1,062	-1,039	-1,054	1,003	1,131	1,176	-1,123	-1,192	-1,102	-1,112	-1,107	-1,182	-1,099	-1,171	-1,045
	SD	0,109	0,062	0,224	0,164	0,084	0,071	0,182	0,107	0,140	0,168	0,143	0,360	0,107	0,097	0,169	0,199	0,116	0,111
	p-W	0,8469	0,1111	0,2136	0,6375	0,5324	0,3332	0,9398	0,1665	0,1763	0,3390	0,1339	0,7754	0,2091	0,1754	0,2087	0,4930	0,1176	0,5589

Substanz		Diethanolamin (DA) –MAS [µM]									Diethanolamin (DA) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	0,992	0,966	1,001	0,994	1,028	1,060	1,037	1,029	1,019	1,118	1,100	1,209	1,205	1,221	1,236	1,293	1,184	1,190
	SD	0,026	0,078	0,050	0,017	0,020	0,029	0,030	0,026	0,065	0,162	0,198	0,140	0,173	0,104	0,151	0,108	0,075	0,090
	p-W	0,6557	0,5276	0,9949	0,6449	0,1367	0,0774	0,1755	0,1861	0,6617	0,3086	0,4886	0,0760	0,1266	0,0480	0,0798	0,0227	0,0187	0,0277
CMFDA	XF	1,016	1,064	1,021	1,047	1,033	1,064	1,049	1,024	1,014	1,018	1,039	1,094	1,103	1,075	0,986	1,107	1,035	1,093
	SD	0,031	0,040	0,046	0,008	0,039	0,039	0,050	0,016	0,037	0,107	0,114	0,099	0,132	0,123	0,125	0,156	0,135	0,100
	p-W	0,4701	0,1173	0,4780	0,0069	0,2714	0,1108	0,2376	0,1160	0,5900	0,8485	0,6282	0,2458	0,3185	0,4258	0,8052	0,3759	0,7590	0,2523
p-p53 (Ser15)	XF	1,063	-1,007	1,222	-1,084	1,234	1,253	1,168	1,292	1,463	1,081	1,148	1,430	1,175	1,190	1,258	1,410	1,337	1,380
	SD	0,249	0,076	0,210	0,110	0,104	0,133	0,296	0,421	0,331	0,041	0,066	0,049	0,075	0,127	0,113	0,164	0,202	0,101
	p-W	0,6803	0,7982	0,2363	0,2926	0,0230	0,0368	0,4326	0,3297	0,0856	0,0760	0,0539	0,0016	0,0494	0,1184	0,0668	0,0573	0,1153	0,0314
p21	XF	1,064	1,063	1,033	-1,008	-1,004	1,009	1,004	-1,009	-1,007	1,026	1,064	1,004	1,094	1,127	1,169	1,200	1,151	1,073
	SD	0,105	0,043	0,049	0,072	0,022	0,109	0,071	0,079	0,158	0,059	0,120	0,134	0,156	0,087	0,095	0,114	0,177	0,113
	p-W	0,4100	0,1295	0,3675	0,8740	0,7835	0,8622	0,9416	0,8655	0,9651	0,5510	0,4626	0,9496	0,4101	0,1231	0,0752	0,0908	0,2839	0,3904
p-H2AX (Ser139)	XF	1,003	1,013	1,066	-1,012	1,042	1,070	1,025	1,035	1,034	1,025	-1,132	-1,226	-1,069	-1,288	-1,229	-1,156	-1,211	-1,220
	SD	0,111	0,065	0,103	0,075	0,073	0,064	0,083	0,037	0,103	0,055	0,157	0,197	0,044	0,324	0,105	0,127	0,225	0,241
	p-W	0,8926	0,7383	0,3737	0,8259	0,4124	0,1979	0,6333	0,2358	0,6143	0,6100	0,3101	0,2059	0,1664	0,2591	0,1011	0,2026	0,2561	0,2617
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,037	1,059	1,348	1,000	1,071	1,135	1,152	1,171	1,249	-1,074	-1,055	1,030	-1,012	1,066	1,063	1,242	1,227	1,315
	SD	0,313	0,354	0,290	0,152	0,323	0,182	0,233	0,305	0,265	0,010	0,016	0,098	0,075	0,098	0,019	0,175	0,200	0,136
	p-W	0,8567	0,8277	0,1308	0,9524	0,7489	0,3608	0,3946	0,4541	0,2183	0,0049	0,0226	0,6097	0,8511	0,3527	0,0281	0,1432	0,1832	0,0496
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,135	-1,137	1,160	-1,176	-1,213	-1,054	-1,089	-1,133	1,036	1,012	1,016	-1,093	-1,016	1,028	1,025	1,052	1,106	1,093
	SD	0,396	0,425	0,168	0,129	0,368	0,211	0,314	0,290	0,162	0,025	0,088	0,262	0,123	0,105	0,020	0,170	0,288	0,054
	p-W	0,6111	0,6172	0,1854	0,1524	0,4069	0,6389	0,6219	0,4788	0,8510	0,4921	0,7540	0,6829	0,9032	0,6783	0,1616	0,6272	0,5612	0,0898

Substanz		Melamin (MEL) –MAS [µM]										Melamin (MEL) +MAS [µM]							
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,098	1,168	1,265	1,227	1,275	1,167	1,187	1,157	1,106	1,019	1,003	1,008	0,939	1,119	1,030	0,973	1,018	0,894
	SD	0,052	0,047	0,072	0,043	0,115	0,126	0,105	0,155	0,118	0,093	0,099	0,154	0,053	0,081	0,145	0,124	0,071	0,084
	p-W	0,0949	0,0172	0,0289	0,0098	0,0379	0,1296	0,0720	0,1995	0,2618	0,7763	0,9775	0,9781	0,2255	0,1200	0,8850	0,7961	0,6749	0,2116
CMFDA	XF	1,038	1,034	1,096	1,078	1,016	1,044	1,061	1,067	1,046	1,059	1,104	1,056	1,050	1,109	1,055	1,068	1,083	1,048
	SD	0,050	0,030	0,046	0,043	0,011	0,056	0,045	0,095	0,083	0,092	0,078	0,044	0,073	0,098	0,036	0,107	0,134	0,059
	p-W	0,3158	0,1862	0,0677	0,0892	0,1296	0,3087	0,1407	0,3406	0,4436	0,3737	0,1541	0,1642	0,3416	0,1910	0,1215	0,3725	0,3923	0,2874
p-p53 (Ser15)	XF	-1,019	1,017	1,005	1,037	1,011	-1,041	-1,072	1,020	-1,086	1,003	-1,195	-1,064	1,062	1,143	1,310	1,329	1,084	-1,035
	SD	0,096	0,135	0,149	0,203	0,108	0,103	0,157	0,160	0,102	0,289	0,093	0,029	0,032	0,068	0,223	0,429	0,200	0,211
	p-W	0,7313	0,8197	0,9684	0,8057	0,9071	0,5501	0,5111	0,8146	0,2699	0,8785	0,0454	0,0522	0,0743	0,0710	0,1471	0,3115	0,5146	0,8641
p21	XF	-1,051	-1,084	-1,264	-1,066	-1,144	-1,267	-1,195	-1,098	-1,282	-1,059	-1,053	-1,047	-1,066	-1,022	-1,076	1,038	-1,018	1,002
	SD	0,087	0,125	0,180	0,115	0,080	0,214	0,176	0,038	0,234	0,015	0,037	0,067	0,073	0,074	0,028	0,041	0,072	0,087
	p-W	0,4246	0,3608	0,1083	0,4484	0,0790	0,1563	0,1553	0,0430	0,1669	0,0132	0,1208	0,3451	0,2627	0,6916	0,0360	0,2377	0,7066	0,9754
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,111	-1,064	1,009	-1,045	1,031	-1,025	-1,099	-1,088	-1,086	-1,261	-1,515	-1,413	-1,452	-1,427	-1,356	-1,308	-1,292	-1,246
	SD	0,094	0,175	0,375	0,180	0,207	0,266	0,127	0,099	0,180	0,026	0,045	0,063	0,134	0,198	0,095	0,163	0,095	0,095
	p-W	0,1738	0,5630	0,9857	0,6706	0,8771	0,8562	0,2973	0,2536	0,4757	0,0008	0,0066	0,0072	0,0227	0,0463	0,0242	0,0660	0,0106	0,0214
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,002	-1,069	1,016	-1,003	-1,122	-1,067	1,128	1,030	1,084	-1,077	-1,178	-1,115	-1,225	-1,389	-1,284	-1,092	-1,153	-1,202
	SD	0,033	0,039	0,011	0,070	0,015	0,028	0,227	0,107	0,103	0,063	0,086	0,265	0,133	0,205	0,141	0,217	0,201	0,203
	p-W	0,9069	0,0835	0,1258	0,9659	0,0027	0,0433	0,4223	0,6326	0,2878	0,1790	0,0812	0,5259	0,1004	0,0776	0,0792	0,5255	0,3167	0,2183
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,190	-1,309	-1,256	-1,312	-1,405	-1,332	-1,115	-1,147	-1,099	-1,146	-1,172	-1,223	-1,228	-1,503	-1,292	-1,349	-1,297	-1,342
	SD	0,195	0,148	0,171	0,087	0,157	0,226	0,402	0,213	0,096	0,042	0,058	0,195	0,076	0,205	0,106	0,253	0,112	0,157
	p-W	0,1839	0,0473	0,0760	0,0247	0,0412	0,1135	0,7579	0,3716	0,2217	0,0399	0,0569	0,1896	0,0404	0,0548	0,0557	0,0921	0,0568	0,0686

<b>Substanz</b>		<b>Methylcarbamat (METC) –MAS [µM]</b>									<b>Methylcarbamat (METC) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,021	1,079	1,117	1,298	1,237	1,140	1,036	1,208	0,880	1,035	1,129	1,175	1,376	1,272	1,252	1,168	1,084	0,876
	SD	0,221	0,133	0,197	0,151	0,192	0,197	0,184	0,190	0,052	0,083	0,045	0,099	0,194	0,151	0,143	0,040	0,099	0,088
	p-W	0,8996	0,4115	0,3967	0,0628	0,1576	0,3465	0,8185	0,1981	0,0660	0,5314	0,0316	0,0818	0,0642	0,0853	0,0883	0,0137	0,2891	0,1568
CMFDA	XF	1,027	1,077	1,114	1,169	1,150	1,138	1,054	1,150	0,977	1,003	1,017	1,073	1,108	1,072	1,105	1,045	1,030	0,976
	SD	0,079	0,063	0,088	0,062	0,097	0,109	0,068	0,124	0,048	0,065	0,089	0,079	0,049	0,078	0,065	0,047	0,044	0,041
	p-W	0,6134	0,1648	0,1494	0,0333	0,1126	0,1590	0,3266	0,1529	0,4791	0,9625	0,7925	0,2503	0,0565	0,2417	0,0894	0,2267	0,3561	0,4409
p-p53 (Ser15)	XF	-1,014	1,156	1,089	-1,225	-1,093	-1,188	-1,280	-1,252	-1,430	-1,020	1,004	-1,011	-1,013	1,043	1,105	1,086	1,070	1,104
	SD	0,125	0,083	0,331	0,495	0,313	0,347	0,713	0,560	0,513	0,126	0,210	0,162	0,063	0,128	0,144	0,097	0,154	0,201
	p-W	0,9402	0,1354	0,5867	0,5336	0,8598	0,4517	0,6421	0,5427	0,2465	0,8521	0,8865	0,9726	0,7762	0,5873	0,3299	0,2693	0,5074	0,4454
p21	XF	1,000	-1,032	-1,106	-1,046	1,026	1,049	1,026	1,052	1,084	-1,068	-1,103	-1,113	-1,104	1,009	1,034	1,027	-1,042	1,065
	SD	0,005	0,057	0,081	0,131	0,044	0,073	0,105	0,073	0,072	0,097	0,201	0,230	0,118	0,143	0,151	0,104	0,193	0,130
	p-W	0,9799	0,4419	0,1186	0,6430	0,4000	0,3795	0,7295	0,3628	0,1771	0,3386	0,4727	0,5584	0,2845	0,9237	0,7429	0,7091	0,8018	0,5030
p-H2AX (Ser139)	XF	1,020	1,024	-1,007	-1,055	1,053	1,031	-1,005	-1,009	-1,066	-1,104	-1,262	-1,186	-1,242	-1,084	-1,042	-1,022	-1,041	1,093
	SD	0,057	0,068	0,086	0,022	0,133	0,073	0,049	0,067	0,027	0,147	0,270	0,259	0,126	0,109	0,207	0,101	0,146	0,093
	p-W	0,5863	0,5730	0,9488	0,0401	0,5411	0,5365	0,8669	0,8438	0,0506	0,3269	0,2167	0,4075	0,0944	0,3074	0,7741	0,8464	0,7466	0,2654
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,004	1,081	1,100	1,030	1,137	1,297	1,137	1,163	1,042	-1,066	-1,145	-1,104	-1,104	-1,187	-1,128	-1,074	-1,088	1,021
	SD	0,070	0,109	0,119	0,043	0,150	0,279	0,177	0,274	0,052	0,062	0,057	0,229	0,173	0,074	0,072	0,066	0,096	0,114
	p-W	0,8200	0,2980	0,2792	0,3334	0,2514	0,2112	0,3247	0,4174	0,3075	0,1752	0,0656	0,5428	0,4166	0,0596	0,1075	0,2051	0,2638	0,8212
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,034	1,046	1,007	-1,133	1,064	1,061	1,135	1,091	1,194	-1,012	-1,139	-1,145	-1,201	-1,224	-1,195	-1,043	-1,006	1,117
	SD	0,055	0,105	0,177	0,118	0,250	0,016	0,202	0,321	0,131	0,026	0,022	0,250	0,309	0,107	0,079	0,016	0,090	0,124
	p-W	0,3948	0,4741	0,9363	0,1894	0,6630	0,0250	0,3703	0,6357	0,1325	0,5001	0,0259	0,4595	0,3929	0,0444	0,0688	0,0459	0,8703	0,2319

Substanz		Progesteron (PRO) –MAS [µM]									Progesteron (PRO) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,013	1,046	1,024	0,846	0,578	0,510	0,227	0,225	0,160	0,990	0,964	1,058	1,140	1,145	1,283	1,011	0,539	0,274
	SD	0,093	0,145	0,131	0,087	0,115	0,075	0,058	0,040	0,040	0,104	0,091	0,116	0,179	0,195	0,193	0,211	0,149	0,041
	p-W	0,8255	0,7216	0,8688	0,1206	0,0470	0,0227	0,0114	0,0081	0,0082	0,8021	0,5147	0,5129	0,2958	0,3652	0,0988	0,9738	0,0681	0,0161
CMFDA	XF	1,033	1,040	1,020	0,978	0,617	0,449	0,287	0,347	0,207	1,026	1,040	1,142	1,057	1,087	1,130	0,842	0,498	0,338
	SD	0,074	0,092	0,040	0,055	0,045	0,021	0,033	0,043	0,027	0,072	0,074	0,115	0,026	0,068	0,073	0,027	0,039	0,010
	p-W	0,5249	0,5853	0,5337	0,5450	0,0147	0,0051	0,0065	0,0082	0,0053	0,5869	0,4449	0,1666	0,0663	0,1608	0,0923	0,0097	0,0024	1E-05
p-p53 (Ser15)	XF	-1,026	-1,150	1,093	-1,116	1,025	-1,007	-1,119	1,079	-1,302	1,141	-1,048	-1,025	-1,089	-1,090	-1,116	-1,021	-1,396	-1,495
	SD	0,063	0,141	0,187	0,044	0,180	0,183	0,126	0,081	0,104	0,190	0,190	0,019	0,240	0,183	0,391	0,164	0,096	0,333
	p-W	0,6036	0,2205	0,3778	0,0856	0,8531	0,9139	0,2093	0,2132	0,0090	0,3203	0,7878	0,1535	0,6478	0,5072	0,7849	0,8858	0,0083	0,0672
p21	XF	-1,082	-1,062	-1,175	-1,263	-1,257	-1,238	1,201	1,071	1,718	1,083	1,080	-1,028	1,063	-1,006	-1,098	-1,041	-1,150	-1,016
	SD	0,056	0,053	0,042	0,072	0,100	0,072	0,054	0,025	0,049	0,071	0,058	0,053	0,016	0,006	0,015	0,044	0,102	0,086
	p-W	0,1146	0,1786	0,0129	0,0154	0,0352	0,0194	0,0214	0,0385	0,0012	0,1833	0,1369	0,4702	0,0191	0,2170	0,0072	0,2318	0,1134	0,8221
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,028	-1,013	-1,018	-1,044	1,162	1,507	2,562	1,892	1,781	1,043	1,013	-1,186	-1,032	-1,301	-1,741	-1,225	1,001	-1,033
	SD	0,015	0,054	0,047	0,043	0,041	0,133	0,185	0,122	0,159	0,061	0,060	0,041	0,083	0,214	0,175	0,209	0,169	0,142
	p-W	0,0834	0,7479	0,5781	0,2054	0,0150	0,0175	0,0021	0,0039	0,0093	0,3388	0,7737	0,0105	0,5614	0,1241	0,0171	0,1851	0,9864	0,7171
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,009	-1,103	-1,038	1,090	1,425	1,933	2,515	2,103	2,214	1,029	-1,013	-1,030	-1,049	-1,151	-1,257	-1,015	1,221	1,277
	SD	0,025	0,061	0,155	0,123	0,086	0,138	0,140	0,161	0,160	0,014	0,090	0,101	0,119	0,080	0,089	0,068	0,068	0,035
	p-W	0,6311	0,1082	0,6828	0,3408	0,0165	0,0267	0,0008	0,0010	0,0024	0,0683	0,8486	0,6780	0,5772	0,0635	0,0254	0,7794	0,0264	0,0069
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,027	-1,193	-1,079	1,166	2,693	4,095	5,236	4,848	3,651	-1,107	-1,018	-1,126	-1,245	-1,295	-1,508	-1,030	1,143	-1,050
	SD	0,028	0,144	0,240	0,084	0,727	0,409	0,510	0,343	0,384	0,065	0,110	0,097	0,205	0,215	0,283	0,124	0,071	0,071
	p-W	0,2573	0,1570	0,6052	0,0995	0,0513	0,0087	0,0009	0,0023	0,0003	0,0553	0,7602	0,1445	0,1445	0,1071	0,0539	0,7967	0,0444	0,3540

<b>Substanz</b>		<b>Pyridin (PYR) –MAS [µM]</b>									<b>Pyridin (PYR) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,001	0,988	0,997	1,040	1,020	1,012	1,025	0,990	0,979	0,997	1,064	1,012	1,172	1,049	1,008	1,070	1,030	1,088
	SD	0,037	0,086	0,029	0,034	0,076	0,022	0,057	0,063	0,059	0,095	0,145	0,087	0,145	0,123	0,155	0,094	0,121	0,243
	p-W	0,9430	0,8437	0,9153	0,1753	0,7117	0,4345	0,5234	0,7972	0,6146	0,7690	0,7209	0,8171	0,1360	0,7566	0,8761	0,3787	0,9269	0,7742
CMFDA	XF	1,010	1,021	1,006	1,077	0,972	0,969	0,966	0,925	0,911	1,081	1,057	1,069	1,146	1,083	1,080	1,027	1,037	1,036
	SD	0,079	0,139	0,102	0,134	0,050	0,088	0,104	0,088	0,066	0,130	0,080	0,050	0,097	0,095	0,093	0,058	0,116	0,116
	p-W	0,8697	0,8329	0,9471	0,4246	0,4210	0,5937	0,6050	0,2692	0,1480	0,3913	0,3260	0,1209	0,1063	0,2614	0,2441	0,5514	0,6506	0,7080
p-p53 (Ser15)	XF	-1,035	-1,040	1,017	-1,148	-1,221	-1,136	-1,034	1,011	-1,204	1,043	1,115	1,145	1,142	1,105	1,101	1,298	1,333	1,253
	SD	0,064	0,232	0,246	0,214	0,252	0,177	0,253	0,272	0,328	0,031	0,030	0,061	0,087	0,086	0,116	0,125	0,148	0,258
	p-W	0,3853	0,7288	0,9679	0,3536	0,2743	0,3219	0,7516	0,9800	0,3949	0,1703	0,0369	0,0314	0,0820	0,1717	0,2818	0,0486	0,0578	0,2311
p21	XF	-1,069	-1,007	-1,019	1,068	1,128	1,069	-1,013	1,063	1,078	1,035	-1,032	-1,047	1,005	1,081	1,005	1,011	1,003	1,050
	SD	0,115	0,059	0,130	0,079	0,058	0,081	0,068	0,076	0,081	0,025	0,042	0,081	0,022	0,068	0,113	0,071	0,057	0,074
	p-W	0,4229	0,8663	0,8656	0,2665	0,0582	0,2663	0,7847	0,2904	0,2430	0,1327	0,3204	0,4185	0,7497	0,1763	0,8834	0,7726	0,9246	0,3505
p-H2AX (Ser139)	XF	1,003	-1,036	-1,055	1,004	1,065	-1,015	-1,068	-1,026	-1,021	-1,130	-1,205	1,004	-1,291	-1,199	1,039	1,010	-1,203	1,062
	SD	0,082	0,054	0,096	0,096	0,086	0,124	0,108	0,063	0,053	0,034	0,086	0,129	0,086	0,186	0,199	0,221	0,179	0,212
	p-W	0,9909	0,3497	0,4155	0,9997	0,3091	0,8134	0,3787	0,5255	0,5274	0,0199	0,0429	0,9413	0,0213	0,2007	0,7499	0,8644	0,1741	0,6301
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,076	-1,030	1,293	-1,085	-1,055	-1,167	-1,134	1,038	-1,123	-1,083	-1,030	-1,143	-1,178	-1,125	-1,168	-1,131	-1,072	-1,073
	SD	0,109	0,165	0,106	0,133	0,194	0,114	0,242	0,314	0,147	0,026	0,073	0,012	0,112	0,021	0,120	0,012	0,080	0,061
	p-W	0,3555	0,8578	0,0448	0,4086	0,7524	0,1103	0,4974	0,7437	0,2819	0,0506	0,5986	0,0120	0,0951	0,0218	0,1400	0,0094	0,2390	0,1777
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,028	-1,147	1,167	-1,232	-1,250	-1,256	-1,261	-1,024	-1,097	-1,208	-1,154	-1,356	-1,338	-1,270	-1,213	-1,368	-1,287	-1,259
	SD	0,085	0,293	0,145	0,245	0,257	0,226	0,235	0,364	0,178	0,030	0,234	0,031	0,224	0,008	0,098	0,016	0,089	0,160
	p-W	0,6717	0,4952	0,1653	0,2287	0,2086	0,1661	0,1914	0,9827	0,4493	0,0140	0,3260	0,0247	0,1205	0,0262	0,0941	0,0281	0,0557	0,1257

<b>Substanz</b>		<b>Tris(2-ethylhexyl)phosphat (TEP) –MAS [µM]</b>									<b>Tris(2-ethylhexyl)phosphat (TEP) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,089	1,041	1,001	0,919	0,752	0,762	0,715	0,676	0,486	1,154	1,243	1,276	1,321	1,257	1,240	1,057	1,114	1,077
	SD	0,034	0,068	0,037	0,022	0,039	0,036	0,022	0,091	0,081	0,036	0,108	0,039	0,097	0,047	0,169	0,075	0,279	0,165
	p-W	0,0420	0,3975	0,9720	0,0244	0,0062	0,0053	0,0022	0,0293	0,0081	0,0367	0,0417	0,0040	0,0119	0,0233	0,1516	0,3241	0,5728	0,5182
CMFDA	XF	0,680	0,525	0,416	0,328	0,205	0,191	0,177	0,187	0,168	1,038	1,024	1,004	0,909	0,804	0,700	0,582	0,570	0,550
	SD	0,013	0,037	0,024	0,033	0,016	0,016	0,008	0,015	0,010	0,028	0,107	0,043	0,096	0,033	0,066	0,014	0,071	0,027
	p-W	0,0023	0,0026	0,0005	0,0001	0,0002	0,0002	0,0004	0,0003	0,0009	0,1602	0,7872	0,9206	0,2347	0,0192	0,0181	0,0042	0,0172	0,0063
p-p53 (Ser15)	XF	-1,119	-1,085	1,092	1,137	1,072	1,102	1,165	1,336	1,443	1,039	1,115	1,184	1,088	1,091	1,122	1,134	1,169	1,017
	SD	0,094	0,083	0,121	0,037	0,048	0,124	0,064	0,044	0,112	0,048	0,069	0,076	0,126	0,168	0,035	0,079	0,096	0,119
	p-W	0,1626	0,2215	0,3344	0,0128	0,1054	0,2996	0,0381	0,0097	0,0136	0,3052	0,0913	0,0371	0,3662	0,4600	0,0181	0,0846	0,0800	0,8334
p21	XF	-1,056	-1,112	-1,031	1,093	1,118	1,093	1,004	-1,136	-1,144	1,084	-1,021	-1,003	-1,028	-1,029	-1,155	-1,127	-1,218	-1,091
	SD	0,055	0,040	0,063	0,044	0,071	0,050	0,107	0,065	0,121	0,025	0,027	0,093	0,134	0,062	0,118	0,047	0,057	0,155
	p-W	0,2118	0,0410	0,4856	0,0614	0,0984	0,0806	0,9336	0,0652	0,1639	0,0181	0,3014	0,9341	0,7588	0,4896	0,1300	0,0465	0,0174	0,4261
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,027	-1,121	-1,026	1,033	1,062	1,092	1,060	-1,069	1,040	-1,170	-1,683	-1,538	-1,657	-1,691	-1,560	-1,234	-1,442	-1,251
	SD	0,046	0,043	0,057	0,082	0,018	0,024	0,144	0,037	0,052	0,024	0,199	0,106	0,076	0,231	0,106	0,148	0,361	0,207
	p-W	0,4333	0,0390	0,5233	0,5596	0,0280	0,0191	0,5396	0,0858	0,3024	0,0133	0,0018	0,0145	0,0028	0,0069	0,0005	0,0982	0,1610	0,1575
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,164	-1,098	-1,038	1,108	1,354	1,310	1,322	1,303	1,451	-1,145	-1,167	-1,145	-1,162	-1,113	-1,086	1,003	-1,011	-1,027
	SD	0,147	0,044	0,131	0,081	0,128	0,243	0,276	0,185	0,104	0,070	0,095	0,101	0,182	0,158	0,157	0,184	0,242	0,149
	p-W	0,1987	0,0524	0,7240	0,1431	0,0573	0,1636	0,1765	0,1052	0,0259	0,0821	0,1037	0,1401	0,2768	0,3387	0,4417	0,9914	0,9669	0,7786
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,175	-1,147	-1,212	1,190	1,423	1,570	1,634	1,568	2,203	-1,274	-1,274	-1,350	-1,348	-1,123	-1,001	1,234	1,111	1,098
	SD	0,261	0,205	0,293	0,053	0,110	0,311	0,389	0,154	0,171	0,026	0,040	0,107	0,191	0,153	0,267	0,283	0,510	0,308
	p-W	0,3921	0,3305	0,3145	0,0382	0,0165	0,0769	0,0799	0,0106	0,0002	0,0201	0,0377	0,0606	0,1129	0,3220	0,9493	0,3260	0,7637	0,6971

<b>Substanz</b>		<b>Hexachloroethan (HCE) –MAS [µM]</b>									<b>Hexachloroethan (HCE) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,103	1,142	1,163	1,249	1,211	1,266	1,179	1,014	0,579	1,227	1,270	1,488	1,699	1,513	1,651	1,316	1,016	0,639
	SD	0,051	0,058	0,062	0,114	0,113	0,097	0,049	0,086	0,034	0,106	0,291	0,279	0,145	0,307	0,338	0,130	0,184	0,101
	p-W	0,0545	0,0364	0,0393	0,0475	0,0664	0,0489	0,0199	0,8144	0,0001	0,0334	0,1855	0,0759	0,0124	0,0436	0,0859	0,0480	0,9627	0,0736
CMFDA	XF	1,146	1,163	1,226	1,282	1,203	1,221	1,153	1,085	0,793	1,187	1,203	1,247	1,300	1,191	1,280	1,062	0,898	0,730
	SD	0,056	0,066	0,094	0,056	0,082	0,121	0,079	0,043	0,054	0,050	0,052	0,110	0,179	0,102	0,143	0,103	0,087	0,071
	p-W	0,0387	0,0486	0,0442	0,0100	0,0423	0,0839	0,0732	0,0655	0,0277	0,0296	0,0146	0,0447	0,1075	0,0841	0,0701	0,4259	0,1937	0,0291
p-p53 (Ser15)	XF	1,066	1,051	1,157	1,136	1,220	1,282	1,293	1,292	1,474	1,078	1,097	1,129	1,149	1,061	1,096	1,170	1,161	-1,148
	SD	0,046	0,053	0,043	0,100	0,195	0,053	0,118	0,061	0,074	0,100	0,068	0,107	0,007	0,054	0,060	0,041	0,021	0,102
	p-W	0,1253	0,2312	0,0239	0,1379	0,1876	0,0129	0,0513	0,0117	0,0064	0,3032	0,1273	0,1654	0,0003	0,1818	0,1052	0,0161	0,0056	0,1074
p21	XF	-1,004	-1,040	-1,033	1,014	1,036	-1,026	-1,056	-1,080	-1,097	1,077	-1,029	-1,027	-1,001	-1,001	-1,023	-1,037	-1,065	1,065
	SD	0,042	0,021	0,050	0,065	0,051	0,123	0,080	0,085	0,201	0,037	0,064	0,040	0,074	0,066	0,129	0,053	0,070	0,035
	p-W	0,870	0,081	0,370	0,727	0,349	0,782	0,348	0,230	0,512	0,0766	0,5322	0,3664	0,9603	0,9892	0,8528	0,3677	0,2576	0,0928
p-H2AX (Ser139)	XF	1,120	1,068	1,160	1,214	1,240	1,249	1,183	1,120	1,070	-1,159	-1,468	-1,301	-1,659	-1,268	-1,604	-1,363	-1,169	1,068
	SD	0,006	0,036	0,113	0,073	0,048	0,168	0,118	0,066	0,129	0,108	0,217	0,188	0,216	0,140	0,295	0,207	0,175	0,039
	p-W	0,0011	0,0771	0,1305	0,0401	0,0179	0,1191	0,1118	0,0836	0,4267	0,1257	0,0462	0,0975	0,0203	0,0526	0,0462	0,0715	0,2169	0,1199
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,041	1,123	1,088	1,115	1,148	1,026	1,121	1,388	1,249	-1,029	1,048	-1,120	-1,237	-1,113	-1,296	-1,078	1,076	1,292
	SD	0,049	0,119	0,058	0,162	0,111	0,053	0,122	0,379	0,135	0,025	0,104	0,019	0,025	0,070	0,130	0,108	0,099	0,142
	p-W	0,2922	0,2031	0,1419	0,3539	0,1663	0,4788	0,2162	0,2052	0,0748	0,1720	0,4988	0,0084	0,0034	0,0998	0,0445	0,3286	0,3143	0,0678
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,020	-1,004	-1,045	-1,064	-1,033	-1,170	-1,017	1,226	1,507	-1,185	-1,190	-1,438	-1,978	-1,373	-1,724	-1,194	1,052	1,288
	SD	0,042	0,068	0,042	0,254	0,158	0,048	0,135	0,244	0,201	0,129	0,366	0,169	0,238	0,203	0,507	0,290	0,193	0,246
	p-W	0,5019	0,9773	0,2084	0,7885	0,8312	0,0214	0,8883	0,2435	0,0478	0,0708	0,5017	0,0288	0,0161	0,0699	0,0791	0,3284	0,6370	0,1571

### **8.9 Genotoxizitätsbestimmung der ausgewählten putativen Genotoxizitätsmarker (Gruppe 3 ECVAM-Substanzen)**

Dargestellt sind die gemittelten Werte der x-fachen Veränderung gegenüber der Kontrolle der fünf Proteine p-p53 (Ser15), p21, p-H2AX (Ser139), p-Chk1 (Ser345) und p-ATM (Ser1981) wie auch der Zytotoxizitätsparameter selektierte Zellzahl pro validem Feld (SCC) und mittlere Zytoplasmaintensität von CMFDA (CMFDA). Die Werte der x-fachen Veränderung über der Kontrolle (XF)  $\pm$  Standardabweichung (SD) ergaben sich aus drei Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Passagenzahl. Die ermittelten p-Werte (p-W) aus dem Student's T-Test für die jeweiligen getesteten Konzentrationen (Konz) sind aufgezeigt. Alle Substanzen wurden mit und ohne metabolischem Aktivierungssystem (+/- MAS) getestet.

<b>Substanz</b>		<b>D,L-Menthol (MEN) –MAS [µM]</b>									<b>D,L-Menthol (MEN) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,039	1,048	1,069	1,024	1,036	1,014	0,993	0,947	0,949	0,998	1,086	1,223	1,202	1,404	1,232	1,084	1,045	0,896
	SD	0,014	0,008	0,040	0,031	0,049	0,042	0,019	0,047	0,033	0,052	0,087	0,061	0,147	0,233	0,147	0,180	0,192	0,137
	p-W	0,0367	0,0059	0,0925	0,3178	0,3308	0,6355	0,5726	0,1872	0,1101	0,9724	0,2267	0,0122	0,1486	0,0834	0,0981	0,5457	0,7708	0,3338
CMFDA	XF	1,052	1,085	1,087	1,045	1,089	1,022	0,939	0,926	0,895	0,988	1,014	0,947	0,991	0,998	0,885	0,838	0,753	0,688
	SD	0,110	0,068	0,088	0,092	0,088	0,153	0,078	0,081	0,119	0,058	0,018	0,047	0,023	0,019	0,037	0,041	0,012	0,023
	p-W	0,5239	0,1549	0,2291	0,5270	0,2283	0,8758	0,3176	0,2667	0,2740	0,6950	0,2967	0,2078	0,5649	0,8485	0,0343	0,0227	0,0026	0,0005
p-p53 (Ser15)	XF	1,039	1,099	1,088	1,130	1,014	1,050	-1,007	1,006	1,278	1,015	1,064	1,115	1,174	1,160	1,195	1,214	1,316	1,292
	SD	0,047	0,036	0,032	0,057	0,095	0,088	0,105	0,081	0,170	0,029	0,088	0,127	0,203	0,165	0,103	0,097	0,187	0,208
	p-W	0,2836	0,0290	0,0454	0,0572	0,8422	0,4370	0,9001	0,9146	0,1122	0,4767	0,3333	0,2477	0,2683	0,2242	0,0673	0,0505	0,0903	0,1315
p21	XF	-1,047	-1,067	-1,088	-1,072	-1,082	-1,107	-1,105	-1,147	-1,342	-1,014	-1,039	-1,024	-1,069	1,039	-1,074	1,041	-1,033	-1,118
	SD	0,016	0,056	0,066	0,075	0,014	0,076	0,018	0,030	0,297	0,071	0,095	0,091	0,065	0,071	0,049	0,105	0,084	0,093
	p-W	0,0310	0,1722	0,1439	0,2358	0,0081	0,1236	0,0068	0,0102	0,1369	0,7123	0,5295	0,6442	0,2019	0,4401	0,1203	0,5867	0,5363	0,1418
p-H2AX (Ser139)	XF	1,033	1,052	1,051	1,067	1,059	1,000	1,015	1,026	-1,211	-1,104	-1,155	-1,254	-1,183	-1,220	-1,255	-1,136	-1,044	1,227
	SD	0,040	0,054	0,023	0,026	0,032	0,038	0,044	0,073	0,168	0,128	0,055	0,214	0,014	0,136	0,103	0,047	0,231	0,210
	p-W	0,2825	0,2469	0,0658	0,0609	0,0810	0,9226	0,6143	0,6092	0,1390	0,3045	0,0705	0,1777	0,0102	0,1252	0,0667	0,0519	0,7504	0,2092
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,019	-1,147	1,146	1,014	1,210	1,145	1,086	1,165	1,184	1,011	-1,025	1,022	1,059	1,026	1,047	1,214	1,211	1,383
	SD	0,176	0,081	0,228	0,160	0,062	0,234	0,121	0,178	0,175	0,082	0,035	0,078	0,106	0,131	0,151	0,176	0,132	0,193
	p-W	0,9713	0,0611	0,3695	0,8383	0,0271	0,3788	0,3318	0,2442	0,2082	0,7991	0,3516	0,6641	0,4426	0,7363	0,6363	0,1647	0,1029	0,0681
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,101	-1,257	1,051	-1,094	1,111	-1,019	1,141	1,161	1,249	1,072	1,055	1,063	1,086	-1,018	1,039	1,223	1,288	1,401
	SD	0,113	0,104	0,171	0,210	0,147	0,154	0,222	0,204	0,204	0,100	0,045	0,083	0,173	0,082	0,046	0,079	0,091	0,170
	p-W	0,2480	0,0390	0,5947	0,5967	0,3231	0,9528	0,3757	0,3073	0,1697	0,3365	0,1755	0,3301	0,4735	0,7826	0,2757	0,0394	0,0207	0,0365

Substanz		Phthalsäureanhydrid (PAH) –MAS [µM]									Phthalsäureanhydrid (PAH) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,061	1,064	1,061	1,104	1,099	1,085	1,031	1,046	0,984	1,082	1,214	1,202	1,226	1,379	1,298	1,240	1,289	1,178
	SD	0,065	0,108	0,074	0,102	0,089	0,119	0,105	0,089	0,065	0,065	0,196	0,073	0,198	0,221	0,127	0,092	0,161	0,213
	p-W	0,2021	0,4569	0,2761	0,2041	0,1609	0,3571	0,7716	0,5450	0,5932	0,1636	0,1902	0,0602	0,1913	0,0801	0,0176	0,0229	0,0822	0,3074
CMFDA	XF	1,162	1,228	1,215	1,257	1,184	1,092	1,030	1,056	0,937	1,023	1,097	1,105	1,076	1,132	1,083	1,039	1,042	1,008
	SD	0,038	0,128	0,136	0,070	0,090	0,127	0,151	0,097	0,105	0,124	0,048	0,097	0,095	0,095	0,098	0,120	0,101	0,073
	p-W	0,0103	0,0649	0,0666	0,0266	0,0258	0,3497	0,8567	0,4402	0,3563	0,8733	0,0498	0,1952	0,3262	0,1197	0,2962	0,7160	0,6234	0,9654
p-p53 (Ser15)	XF	1,022	1,090	1,070	1,145	1,256	1,128	1,242	1,094	1,170	1,040	1,046	1,047	1,094	1,080	1,120	1,160	1,168	1,233
	SD	0,046	0,089	0,032	0,056	0,207	0,022	0,280	0,055	0,088	0,080	0,042	0,092	0,077	0,085	0,106	0,138	0,167	0,154
	p-W	0,4711	0,2189	0,0509	0,0571	0,1530	0,0030	0,2591	0,0951	0,0750	0,4653	0,2175	0,4580	0,1628	0,2261	0,1679	0,1690	0,2053	0,0990
p21	XF	-1,005	1,005	1,023	-1,028	-1,060	-1,027	-1,077	-1,005	-1,254	1,002	1,023	1,003	-1,043	1,029	-1,067	-1,007	1,043	-1,066
	SD	0,024	0,075	0,008	0,027	0,067	0,071	0,074	0,035	0,234	0,055	0,042	0,065	0,096	0,047	0,025	0,049	0,040	0,010
	p-W	0,7883	0,8855	0,0434	0,2177	0,2443	0,5982	0,1934	0,8357	0,1715	0,9387	0,4409	0,9271	0,5373	0,3933	0,0419	0,8422	0,2084	0,0076
p-H2AX (Ser139)	XF	1,040	1,091	1,131	1,094	1,026	1,032	1,040	1,005	-1,224	1,054	1,061	-1,125	1,009	-1,151	-1,171	-1,059	-1,027	-1,025
	SD	0,037	0,050	0,008	0,015	0,057	0,027	0,036	0,054	0,189	0,123	0,187	0,195	0,271	0,083	0,142	0,038	0,083	0,132
	p-W	0,2011	0,0844	0,0073	0,0018	0,4974	0,1715	0,2046	0,9092	0,1643	0,5349	0,6205	0,3916	0,8788	0,0754	0,1521	0,1164	0,6247	0,7801
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,082	1,102	1,142	1,170	1,155	1,303	1,164	1,108	1,062	-1,019	-1,020	-1,001	1,045	1,029	-1,035	1,112	1,123	1,164
	SD	0,087	0,130	0,154	0,115	0,138	0,131	0,109	0,053	0,144	0,169	0,126	0,142	0,142	0,107	0,038	0,051	0,167	0,090
	p-W	0,2425	0,3357	0,2851	0,1434	0,1276	0,0823	0,1301	0,0601	0,5722	0,8585	0,7939	0,9755	0,6321	0,6743	0,2529	0,0498	0,3403	0,0954
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,280	-1,217	-1,231	-1,240	-1,194	1,040	-1,043	-1,208	-1,004	1,024	-1,038	1,032	1,050	-1,025	-1,035	1,065	1,050	1,065
	SD	0,053	0,058	0,071	0,092	0,011	0,276	0,219	0,139	0,121	0,126	0,196	0,129	0,132	0,136	0,052	0,043	0,091	0,056
	p-W	0,0157	0,0256	0,0173	0,0464	0,0028	0,7107	0,8655	0,1029	0,9892	0,8047	0,7672	0,7484	0,5759	0,8111	0,3385	0,0860	0,4418	0,1635

Substanz		<i>tert</i> -Butylhydroquinon (TBHQ) –MAS [µM]									<i>tert</i> -Butylhydroquinon (TBHQ) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,034	1,047	1,120	1,055	1,083	0,842	0,343	0,187	0,259	1,110	1,243	1,312	1,442	1,539	1,466	1,501	1,359	1,262
	SD	0,019	0,027	0,025	0,024	0,042	0,050	0,174	0,024	0,046	0,021	0,135	0,133	0,216	0,156	0,265	0,249	0,246	0,162
	p-W	0,0982	0,0822	0,0078	0,0626	0,0804	0,0269	0,0299	0,0012	0,0005	0,0371	0,1044	0,0237	0,0389	0,0019	0,0378	0,0340	0,0656	0,0460
CMFDA	XF	1,117	1,099	1,003	0,906	0,783	0,522	0,291	0,038	0,037	1,048	1,065	1,088	1,047	1,047	0,936	0,939	0,773	0,684
	SD	0,026	0,064	0,095	0,117	0,098	0,057	0,158	0,004	0,004	0,028	0,003	0,042	0,069	0,071	0,053	0,020	0,029	0,027
	p-W	0,0198	0,0809	0,9632	0,3224	0,0789	0,0111	0,0298	0,0047	0,0048	0,0995	0,0006	0,0680	0,3632	0,3749	0,1749	0,0340	0,0056	0,0023
p-p53 (Ser15)	XF	-1,088	1,029	1,101	1,020	1,103	1,420	1,213	-4,010	-4,797	1,033	1,164	1,278	1,297	1,232	1,242	1,460	1,602	1,636
	SD	0,118	0,130	0,117	0,098	0,083	0,120	0,195	0,488	0,818	0,065	0,140	0,302	0,193	0,148	0,279	0,195	0,215	0,239
	p-W	0,3145	0,8321	0,3028	0,6752	0,1424	0,0031	0,1496	0,0203	0,0213	0,4531	0,1693	0,2414	0,1052	0,1034	0,2634	0,0463	0,0406	0,0342
p21	XF	1,096	1,021	-1,063	1,040	1,173	-1,053	1,079	1,293	1,142	-1,013	-1,064	-1,262	-1,228	-1,193	-1,223	-1,178	-1,236	-1,242
	SD	0,153	0,016	0,068	0,174	0,109	0,032	0,265	0,138	0,257	0,023	0,021	0,252	0,153	0,108	0,128	0,227	0,209	0,250
	p-W	0,3778	0,1373	0,2576	0,6683	0,1045	0,0808	0,6522	0,0754	0,4163	0,4261	0,0278	0,1664	0,0978	0,0844	0,0789	0,2774	0,1496	0,1911
p-H2AX (Ser139)	XF	1,038	1,035	-1,045	1,004	-1,008	-1,038	6,473	2,518	4,456	-1,016	-1,145	-1,390	-1,470	-1,394	-1,573	-1,557	-1,701	-1,387
	SD	0,157	0,172	0,200	0,183	0,210	0,173	3,775	0,646	1,271	0,104	0,050	0,329	0,150	0,101	0,071	0,229	0,321	0,240
	p-W	0,7594	0,8012	0,6998	0,9966	0,9456	0,7099	0,0877	0,0482	0,0449	0,8243	0,0442	0,1365	0,0306	0,0234	0,0096	0,0397	0,0398	0,0849
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,099	1,260	1,289	1,299	1,261	1,176	1,510	1,614	1,280	1,012	1,055	1,076	1,059	1,006	-1,159	1,004	-1,055	1,322
	SD	0,041	0,338	0,253	0,224	0,252	0,313	0,299	0,320	0,175	0,107	0,095	0,101	0,015	0,049	0,087	0,233	0,148	0,070
	p-W	0,0283	0,3000	0,2093	0,0875	0,1534	0,4637	0,0792	0,0340	0,1132	0,8457	0,4264	0,3255	0,0154	0,8178	0,0786	0,9194	0,6250	0,0180
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,107	-1,125	-1,118	1,032	-1,078	1,076	2,459	1,545	1,202	-1,002	1,026	1,033	-1,062	-1,216	-1,236	-1,255	-1,001	1,172
	SD	0,171	0,340	0,433	0,211	0,157	0,387	0,805	0,379	0,254	0,121	0,084	0,113	0,086	0,111	0,081	0,301	0,012	0,111
	p-W	0,3874	0,5824	0,7317	0,8889	0,4584	0,7896	0,0643	0,1111	0,2602	0,9417	0,6134	0,6155	0,3236	0,0498	0,0218	0,2376	0,8260	0,1213

<b>Substanz</b>		<b>Anthranilsäure (AA) –MAS [µM]</b>									<b>Anthranilsäure (AA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,139	1,174	1,217	1,224	1,320	1,213	1,133	1,098	1,065	1,140	1,103	1,130	1,160	1,173	1,095	1,098	1,001	0,983
	SD	0,048	0,090	0,092	0,032	0,071	0,127	0,088	0,129	0,106	0,037	0,024	0,087	0,099	0,121	0,096	0,066	0,055	0,078
	p-W	0,0317	0,0573	0,0390	0,0026	0,0115	0,0782	0,1029	0,3076	0,4100	0,0246	0,0215	0,1156	0,0983	0,1340	0,2221	0,1176	0,9930	0,7279
CMFDA	XF	1,210	1,230	1,229	1,279	1,299	1,092	1,099	1,012	0,917	1,087	1,116	1,037	1,110	1,106	1,071	1,048	0,987	0,908
	SD	0,096	0,107	0,106	0,077	0,094	0,049	0,072	0,152	0,119	0,047	0,058	0,049	0,093	0,049	0,055	0,032	0,060	0,042
	p-W	0,0442	0,0460	0,0544	0,0105	0,0159	0,0774	0,1153	0,9609	0,3280	0,0763	0,0643	0,3274	0,1773	0,0616	0,1542	0,1151	0,7255	0,0638
p-p53 (Ser15)	XF	1,133	1,216	1,177	1,155	1,250	1,329	1,510	1,561	1,402	-1,031	1,072	1,125	1,101	1,087	1,126	1,333	1,441	1,407
	SD	0,050	0,098	0,116	0,124	0,038	0,087	0,107	0,103	0,022	0,053	0,086	0,055	0,127	0,136	0,091	0,161	0,081	0,066
	p-W	0,0403	0,0607	0,1221	0,1736	0,0117	0,0173	0,0109	0,0106	0,0001	0,4851	0,3032	0,0771	0,2790	0,3702	0,1558	0,0554	0,0159	0,0147
p21	XF	-1,038	-1,053	-1,117	-1,080	-1,115	-1,138	-1,176	-1,213	-1,455	1,002	-1,014	-1,070	-1,004	-1,045	-1,050	-1,038	1,020	-1,038
	SD	0,057	0,028	0,096	0,066	0,063	0,086	0,076	0,184	0,352	0,030	0,007	0,051	0,050	0,097	0,084	0,094	0,079	0,125
	p-W	0,3621	0,0820	0,1497	0,1685	0,0810	0,0987	0,0494	0,1532	0,1053	0,8784	0,0716	0,1545	0,8507	0,5011	0,4277	0,5522	0,7456	0,6541
p-H2AX (Ser139)	XF	1,030	1,084	1,023	1,094	1,037	1,026	1,014	1,017	-1,259	-1,063	-1,122	-1,218	-1,158	-1,277	-1,209	-1,143	1,039	-1,010
	SD	0,083	0,020	0,034	0,027	0,031	0,101	0,006	0,133	0,165	0,176	0,276	0,176	0,271	0,173	0,147	0,179	0,173	0,293
	p-W	0,5773	0,0205	0,3527	0,0299	0,1820	0,6820	0,0642	0,8116	0,0917	0,5999	0,5556	0,1596	0,4479	0,0940	0,1135	0,2783	0,7008	0,9777
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,206	1,202	1,326	1,399	1,213	1,363	1,453	1,214	1,184	-1,091	1,066	-1,033	1,012	1,068	1,003	1,082	1,091	1,083
	SD	0,195	0,103	0,154	0,378	0,258	0,151	0,379	0,115	0,043	0,036	0,070	0,081	0,048	0,034	0,113	0,201	0,184	0,229
	p-W	0,1873	0,0654	0,0570	0,1890	0,2725	0,0702	0,1534	0,0839	0,0120	0,0443	0,2522	0,5230	0,8001	0,0490	0,9694	0,5852	0,5124	0,6131
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,069	-1,079	-1,131	-1,052	-1,327	1,128	1,088	1,079	1,098	-1,042	1,028	-1,033	-1,020	1,037	-1,026	1,076	1,084	1,072
	SD	0,112	0,103	0,161	0,234	0,290	0,327	0,265	0,310	0,161	0,017	0,143	0,113	0,040	0,085	0,142	0,148	0,131	0,197
	p-W	0,3835	0,3023	0,3104	0,8466	0,1407	0,5863	0,6297	0,7177	0,3974	0,0744	0,8145	0,6116	0,4500	0,5581	0,7186	0,4819	0,4006	0,6147

<b>Substanz</b>		<b>1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin) (DB) –MAS [µM]</b>									<b>1,3-Dihydroxybenzol (Resorcin) (DB) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,052	1,056	1,118	1,136	1,161	1,162	1,206	1,180	1,091	1,111	1,243	1,215	1,215	1,361	1,402	1,315	1,231	0,702
	SD	0,010	0,050	0,108	0,089	0,057	0,114	0,104	0,084	0,114	0,099	0,055	0,214	0,197	0,247	0,288	0,003	0,116	0,115
	p-W	0,0146	0,2025	0,1926	0,0928	0,0182	0,1244	0,0539	0,0415	0,3209	0,1909	0,0285	0,2477	0,2224	0,1412	0,1547	0,0053	0,0447	0,0645
CMFDA	XF	1,078	1,134	1,152	1,161	1,120	1,064	1,059	0,997	0,882	1,016	1,062	1,052	1,053	1,060	1,021	1,005	0,877	0,489
	SD	0,097	0,038	0,118	0,105	0,052	0,145	0,099	0,078	0,078	0,026	0,019	0,048	0,062	0,029	0,094	0,053	0,044	0,101
	p-W	0,3132	0,0138	0,1362	0,0971	0,0431	0,5431	0,4194	0,9026	0,1291	0,3734	0,0293	0,1991	0,2717	0,0750	0,7087	0,8506	0,0329	0,0121
p-p53 (Ser15)	XF	1,120	1,115	1,339	1,280	1,345	1,321	1,443	1,547	1,886	1,131	1,031	1,076	1,044	1,274	1,218	1,148	1,141	1,391
	SD	0,068	0,035	0,217	0,054	0,049	0,008	0,040	0,170	0,018	0,174	0,050	0,114	0,068	0,262	0,017	0,117	0,127	0,241
	p-W	0,0828	0,0453	0,1050	0,0075	0,0118	0,0024	0,0066	0,0227	0,0026	0,3286	0,3853	0,3368	0,3498	0,2258	0,0012	0,1457	0,1828	0,0940
p21	XF	1,009	-1,030	-1,040	-1,056	-1,082	-1,044	-1,067	-1,153	-1,216	-1,022	1,084	-1,058	-1,015	-1,180	-1,099	1,013	1,056	1,289
	SD	0,030	0,038	0,087	0,018	0,068	0,054	0,103	0,105	0,164	0,218	0,148	0,052	0,196	0,036	0,172	0,189	0,105	0,214
	p-W	0,6608	0,2923	0,5165	0,0324	0,1561	0,3022	0,3768	0,0919	0,1336	0,8455	0,4508	0,1928	0,9025	0,0159	0,4177	0,9688	0,4642	0,1052
p-H2AX (Ser139)	XF	1,121	1,097	1,100	1,056	1,095	1,100	1,188	1,199	1,256	-1,155	-1,221	-1,358	-1,226	-1,468	-1,446	-1,078	1,182	5,790
	SD	0,065	0,012	0,041	0,081	0,048	0,072	0,135	0,129	0,097	0,227	0,058	0,083	0,151	0,158	0,020	0,044	0,168	0,559
	p-W	0,0778	0,0025	0,0428	0,3583	0,0726	0,1368	0,1344	0,1122	0,0371	0,4283	0,0155	0,0081	0,0735	0,0244	0,0011	0,0886	0,2068	0,0050
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,061	1,032	1,096	1,048	1,040	-1,133	-1,120	-1,023	1,107	-1,098	-1,154	-1,148	-1,143	-1,220	-1,242	-1,080	-1,061	1,412
	SD	0,095	0,164	0,171	0,180	0,155	0,280	0,280	0,427	0,450	0,051	0,156	0,103	0,082	0,026	0,094	0,068	0,070	0,132
	p-W	0,3748	0,8602	0,4403	0,7470	0,7922	0,4948	0,5374	0,9782	0,7091	0,0863	0,2142	0,1243	0,0971	0,0086	0,0438	0,1879	0,2884	0,0308
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,070	1,015	1,027	-1,072	-1,026	-1,231	-1,133	1,022	1,093	-1,122	-1,166	-1,116	-1,104	-1,170	-1,235	-1,125	-1,144	1,073
	SD	0,170	0,115	0,232	0,200	0,139	0,169	0,020	0,132	0,152	0,110	0,142	0,159	0,127	0,020	0,128	0,142	0,120	0,129
	p-W	0,6110	0,8041	0,7369	0,6506	0,8250	0,1119	0,0041	0,7440	0,4029	0,2010	0,1837	0,3367	0,2869	0,0114	0,0811	0,2901	0,1806	0,4482

<b>Substanz</b>		<b>2-Ethyl-1,3-hexandiol (EH) –MAS [µM]</b>									<b>2-Ethyl-1,3-hexandiol (EH) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,000	1,032	1,058	1,061	1,089	1,097	1,009	1,066	1,003	1,110	1,032	1,180	1,049	1,158	1,176	1,157	1,111	1,166
	SD	0,043	0,045	0,017	0,084	0,010	0,029	0,066	0,031	0,065	0,068	0,051	0,119	0,146	0,130	0,126	0,014	0,019	0,039
	p-W	0,9326	0,3319	0,0406	0,3263	0,0022	0,0149	0,8860	0,0449	0,9819	0,1169	0,3856	0,1159	0,6055	0,1651	0,1458	0,0044	0,0114	0,0223
CMFDA	XF	1,088	1,117	1,131	1,177	1,152	1,189	1,117	1,124	1,042	1,102	1,057	1,046	1,030	1,043	1,056	0,976	0,914	0,972
	SD	0,047	0,068	0,038	0,037	0,041	0,039	0,058	0,029	0,015	0,052	0,067	0,023	0,108	0,107	0,126	0,087	0,086	0,091
	p-W	0,0844	0,0738	0,0254	0,0095	0,0262	0,0098	0,0569	0,0075	0,0238	0,0750	0,2743	0,0713	0,6802	0,5562	0,5211	0,6827	0,2259	0,6505
p-p53 (Ser15)	XF	1,061	1,047	1,035	1,048	1,010	1,098	1,165	1,165	1,216	1,016	1,109	1,170	1,316	1,318	1,267	1,223	1,391	1,333
	SD	0,103	0,053	0,061	0,052	0,077	0,024	0,074	0,066	0,243	0,017	0,056	0,232	0,366	0,228	0,138	0,038	0,143	0,121
	p-W	0,4225	0,2458	0,4241	0,2610	0,8693	0,0107	0,0443	0,0337	0,2481	0,2367	0,0836	0,3259	0,2643	0,1397	0,0799	0,0075	0,0426	0,0464
p21	XF	1,010	1,049	1,048	1,001	1,051	1,014	-1,030	-1,016	-1,078	1,046	1,002	-1,025	-1,050	-1,059	-1,047	1,050	-1,050	-1,131
	SD	0,063	0,062	0,039	0,056	0,051	0,075	0,068	0,058	0,097	0,021	0,038	0,004	0,024	0,087	0,070	0,026	0,025	0,166
	p-W	0,8185	0,2985	0,1571	0,9749	0,2181	0,7797	0,5040	0,6517	0,2907	0,0582	0,9911	0,0015	0,0685	0,3465	0,3546	0,0583	0,0852	0,3088
p-H2AX (Ser139)	XF	1,073	1,086	1,098	1,062	1,071	1,027	1,039	1,062	1,018	-1,124	-1,243	-1,232	-1,207	-1,355	-1,214	-1,228	-1,411	-1,457
	SD	0,039	0,029	0,063	0,043	0,078	0,039	0,057	0,058	0,085	0,062	0,018	0,038	0,086	0,146	0,051	0,059	0,149	0,129
	p-W	0,0706	0,0300	0,1101	0,1292	0,2630	0,3551	0,3709	0,2084	0,7535	0,0652	0,0029	0,0030	0,0305	0,0321	0,0112	0,0099	0,0215	0,0153
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,107	-1,093	-1,048	-1,062	-1,010	1,021	-1,042	-1,064	-1,175	-1,057	-1,085	-1,136	-1,083	-1,095	-1,177	-1,107	-1,127	-1,066
	SD	0,141	0,130	0,064	0,066	0,049	0,062	0,057	0,022	0,089	0,117	0,078	0,150	0,050	0,167	0,143	0,120	0,132	0,032
	p-W	0,3230	0,3217	0,3107	0,2280	0,7174	0,5891	0,3425	0,0451	0,0983	0,4842	0,2117	0,2529	0,1147	0,4370	0,1623	0,2686	0,2424	0,0920
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,230	-1,271	-1,191	-1,270	-1,154	-1,156	-1,111	-1,152	-1,186	-1,016	-1,047	-1,048	-1,064	-1,030	-1,155	-1,102	-1,104	-1,040
	SD	0,153	0,090	0,140	0,196	0,117	0,083	0,164	0,066	0,110	0,188	0,177	0,215	0,178	0,281	0,297	0,372	0,364	0,208
	p-W	0,1564	0,0701	0,0854	0,0797	0,1200	0,0526	0,4952	0,0127	0,0601	0,8077	0,6267	0,6690	0,5429	0,8234	0,4474	0,6467	0,6356	0,6767

Substanz		Sulfisoxazol (SO) -MAS [ $\mu$ M]									Sulfisoxazol (SO) +MAS [ $\mu$ M]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,033	1,033	1,061	1,075	1,050	1,025	0,995	0,989	0,974	1,029	1,081	1,217	1,166	1,203	1,167	1,183	1,134	1,105
	SD	0,045	0,072	0,082	0,039	0,065	0,065	0,050	0,111	0,015	0,055	0,100	0,109	0,059	0,143	0,117	0,057	0,062	0,170
	p-W	0,3420	0,5261	0,3200	0,0603	0,3178	0,5852	0,8125	0,8438	0,1115	0,4695	0,3061	0,0519	0,0393	0,1397	0,1228	0,0094	0,0669	0,4142
CMFDA	XF	1,082	1,106	1,101	1,038	1,061	1,089	1,077	1,062	1,000	1,055	1,058	1,057	1,032	1,054	1,011	1,017	1,014	1,006
	SD	0,107	0,120	0,105	0,115	0,160	0,119	0,157	0,101	0,122	0,085	0,071	0,103	0,089	0,069	0,051	0,127	0,093	0,129
	p-W	0,3347	0,2838	0,2118	0,7218	0,6691	0,3105	0,5306	0,4208	0,8619	0,3879	0,2840	0,4361	0,6093	0,2952	0,7897	0,8731	0,8521	0,9882
p-p53 (Ser15)	XF	1,133	1,249	1,417	1,209	1,256	1,296	1,244	1,205	1,335	-1,048	-1,146	-1,128	-1,105	-1,080	-1,123	-1,061	-1,008	-1,162
	SD	0,089	0,280	0,295	0,223	0,147	0,137	0,223	0,107	0,212	0,087	0,181	0,198	0,207	0,262	0,275	0,338	0,214	0,264
	p-W	0,1351	0,2765	0,1093	0,2278	0,0732	0,0646	0,1777	0,0596	0,0902	0,3584	0,2707	0,3376	0,4135	0,5622	0,4586	0,7054	0,7964	0,3560
p21	XF	1,001	-1,077	-1,099	-1,087	-1,083	-1,115	-1,047	-1,137	-1,174	1,011	1,049	-1,075	-1,028	-1,014	-1,038	-1,069	-1,103	-1,074
	SD	0,019	0,134	0,107	0,094	0,125	0,197	0,089	0,329	0,239	0,077	0,056	0,067	0,040	0,027	0,052	0,093	0,135	0,060
	p-W	0,9768	0,4219	0,2518	0,2394	0,3701	0,4431	0,4637	0,5957	0,3137	0,8266	0,2645	0,1739	0,3476	0,4906	0,3255	0,3076	0,3126	0,1445
p-H2AX (Ser139)	XF	1,020	1,097	-1,001	-1,016	1,010	-1,020	1,059	-1,024	-1,039	-1,037	-1,064	-1,103	-1,154	-1,171	-1,141	-1,194	-1,156	-1,124
	SD	0,047	0,070	0,028	0,064	0,072	0,174	0,041	0,183	0,193	0,110	0,080	0,113	0,095	0,125	0,052	0,114	0,223	0,071
	p-W	0,5437	0,1308	0,9430	0,7394	0,8117	0,9300	0,1317	0,9530	0,8620	0,6395	0,3022	0,2572	0,0949	0,1197	0,0396	0,0868	0,3294	0,0883
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,073	-1,038	-1,032	-1,136	1,039	-1,158	-1,204	-1,133	-1,249	1,049	1,019	1,038	1,050	-1,011	-1,079	-1,081	-1,093	-1,038
	SD	0,118	0,312	0,199	0,210	0,055	0,259	0,544	0,197	0,379	0,062	0,084	0,068	0,112	0,101	0,070	0,166	0,114	0,127
	p-W	0,5297	0,6794	0,5220	0,2862	0,4138	0,3031	0,5445	0,2760	0,2964	0,2790	0,8089	0,4705	0,5329	0,9888	0,1873	0,4604	0,2725	0,6133
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,073	-1,070	-1,129	-1,195	-1,127	-1,252	-1,241	-1,329	-1,138	1,055	1,052	-1,004	1,029	-1,135	-1,069	-1,118	-1,072	-1,117
	SD	0,032	0,088	0,244	0,213	0,142	0,224	0,063	0,279	0,319	0,138	0,121	0,129	0,112	0,170	0,038	0,147	0,114	0,169
	p-W	0,0563	0,3137	0,5438	0,3035	0,2280	0,2025	0,0415	0,1712	0,5359	0,5863	0,5536	0,9259	0,7193	0,3103	0,0922	0,2791	0,3918	0,3593

<b>Substanz</b>		<b>Ethionamid (ETAM) –MAS [µM]</b>									<b>Ethionamid (ETAM) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,042	1,061	1,088	1,028	1,048	1,038	0,997	0,927	0,740	0,975	1,082	1,103	1,048	1,197	1,138	1,121	1,172	1,130
	SD	0,052	0,083	0,059	0,023	0,098	0,133	0,090	0,048	0,069	0,079	0,030	0,036	0,064	0,038	0,176	0,075	0,145	0,148
	p-W	0,2707	0,3379	0,1001	0,1421	0,5086	0,7264	0,8673	0,1281	0,0384	0,7154	0,0660	0,0649	0,3306	0,0052	0,2625	0,0471	0,1493	0,2196
CMFDA	XF	1,129	1,145	1,132	1,158	1,211	1,129	1,088	1,028	0,863	0,959	0,988	1,032	1,022	1,022	0,925	0,939	0,924	0,926
	SD	0,070	0,089	0,061	0,134	0,041	0,061	0,083	0,079	0,110	0,113	0,128	0,139	0,149	0,171	0,179	0,154	0,152	0,111
	p-W	0,0942	0,1109	0,0716	0,1761	0,0101	0,0555	0,1952	0,6407	0,1778	0,5533	0,7912	0,8525	0,9531	0,9728	0,4971	0,5055	0,4525	0,3633
p-p53 (Ser15)	XF	1,163	1,334	1,219	1,134	1,182	1,321	1,480	1,318	1,217	1,015	1,134	1,251	1,170	1,367	1,154	1,114	1,114	1,113
	SD	0,146	0,224	0,173	0,078	0,093	0,200	0,215	0,197	0,148	0,076	0,123	0,291	0,075	0,377	0,200	0,055	0,155	0,059
	p-W	0,2129	0,1325	0,1738	0,1042	0,0956	0,0944	0,0579	0,0923	0,1293	0,8174	0,1848	0,2502	0,0364	0,2103	0,2946	0,0430	0,3193	0,0558
p21	XF	-1,079	-1,128	-1,083	-1,103	-1,135	-1,228	-1,384	-1,331	-1,396	1,060	1,067	-1,039	1,023	-1,022	1,012	1,042	1,048	-1,029
	SD	0,050	0,067	0,013	0,015	0,010	0,106	0,150	0,081	0,124	0,020	0,044	0,131	0,040	0,145	0,027	0,021	0,045	0,023
	p-W	0,0988	0,0534	0,0132	0,0078	0,0012	0,0417	0,0244	0,0062	0,0137	0,0410	0,1204	0,7057	0,4386	0,8828	0,5142	0,0687	0,1976	0,1659
p-H2AX (Ser139)	XF	1,081	1,103	1,103	1,098	1,116	1,048	1,069	1,064	-1,183	1,029	-1,027	-1,209	-1,201	-1,253	-1,227	-1,111	-1,239	-1,256
	SD	0,021	0,026	0,027	0,058	0,018	0,132	0,047	0,062	0,048	0,127	0,105	0,017	0,084	0,033	0,134	0,097	0,163	0,203
	p-W	0,0201	0,0201	0,0208	0,0984	0,0085	0,5621	0,1245	0,2165	0,0152	0,7692	0,7164	0,0043	0,0369	0,0031	0,0844	0,1822	0,1312	0,1594
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,037	-1,115	-1,092	-1,078	1,193	1,200	1,027	1,076	-1,019	-1,116	-1,162	-1,108	-1,096	-1,181	-1,220	-1,042	-1,095	-1,024
	SD	0,171	0,056	0,139	0,113	0,170	0,153	0,105	0,234	0,117	0,161	0,142	0,119	0,176	0,235	0,122	0,191	0,196	0,146
	p-W	0,8182	0,0546	0,3602	0,3389	0,1893	0,1539	0,6706	0,6123	0,8620	0,3299	0,1755	0,2562	0,4529	0,3224	0,0809	0,7750	0,5048	0,8204
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,189	-1,320	-1,301	-1,310	-1,007	-1,055	-1,068	1,022	1,095	-1,022	-1,098	-1,088	-1,060	-1,164	-1,146	-1,109	-1,088	-1,034
	SD	0,088	0,074	0,197	0,085	0,064	0,310	0,049	0,357	0,265	0,153	0,209	0,158	0,190	0,197	0,122	0,131	0,181	0,157
	p-W	0,0667	0,0119	0,1074	0,0189	0,9526	0,8382	0,1455	0,9075	0,5878	0,8224	0,4986	0,4297	0,6390	0,2689	0,1679	0,2849	0,4842	0,7115

<b>Substanz</b>		<b>Curcumin (CU) –MAS [µM]</b>									<b>Curcumin (CU) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,077	1,135	1,142	0,546	0,022	0,040	0,266	0,175	0,131	1,198	1,296	1,510	1,530	1,517	0,744	0,330	0,858	1,119
	SD	0,093	0,074	0,102	0,048	0,004	0,007	0,007	0,008	0,024	0,089	0,194	0,170	0,224	0,249	0,119	0,065	0,199	0,314
	p-W	0,2971	0,0867	0,1379	0,0048	0,0005	0,0007	0,0007	0,0003	0,0006	0,0248	0,0701	0,0103	0,0210	0,0302	0,0962	0,0056	0,3016	0,6191
CMFDA	XF	1,133	1,091	1,071	0,675	0,249	0,104	0,101	0,111	0,115	1,090	1,058	1,111	1,034	0,932	1,200	0,146	0,149	0,201
	SD	0,047	0,051	0,045	0,052	0,009	0,004	0,004	0,005	0,013	0,034	0,039	0,078	0,084	0,061	0,094	0,003	0,002	0,008
	p-W	0,0274	0,0773	0,0914	0,0163	0,0015	0,0017	0,0017	0,0017	0,0022	0,0490	0,1254	0,1361	0,5301	0,1971	0,0555	0,0006	0,0006	0,0005
p-p53 (Ser15)	XF	1,036	1,052	1,123	1,311	1,973	1,445	2,221	2,713	3,215	-1,001	1,042	1,134	1,199	1,193	1,235	-2,171	-1,685	1,116
	SD	0,039	0,071	0,022	0,215	0,241	0,050	0,070	0,140	0,169	0,098	0,090	0,027	0,098	0,166	0,123	0,567	0,318	0,176
	p-W	0,2381	0,3482	0,0207	0,1233	0,0144	0,0036	0,0004	0,0001	0,0003	0,9554	0,5464	0,0155	0,0282	0,1404	0,0695	0,0611	0,0706	0,3779
p21	XF	-1,056	-1,053	-1,039	1,757	2,673	2,386	1,950	1,908	2,122	1,044	-1,021	-1,026	-1,197	-1,257	1,340	1,186	1,368	1,449
	SD	0,052	0,073	0,109	0,198	0,106	0,209	0,193	0,162	0,195	0,072	0,069	0,082	0,152	0,161	0,107	0,081	0,143	0,109
	p-W	0,2008	0,3318	0,6341	0,0150	0,0001	0,0036	0,0080	0,0055	0,0052	0,4296	0,6517	0,6131	0,1468	0,1063	0,0157	0,0605	0,0302	0,0113
p-H2AX (Ser139)	XF	1,065	1,111	1,073	1,982	4,301	1,426	1,399	1,559	1,947	-1,036	-1,075	-1,270	-1,494	-1,325	1,508	-3,310	-3,519	-2,892
	SD	0,028	0,059	0,103	0,393	0,162	0,006	0,055	0,081	0,032	0,075	0,057	0,169	0,093	0,088	0,160	0,892	0,411	0,345
	p-W	0,0745	0,0783	0,3527	0,0440	5E-05	0,0015	0,0046	0,0028	0,0004	0,5005	0,1233	0,1002	0,0129	0,0220	0,0247	0,0133	0,0048	0,0062
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,177	1,097	1,198	1,233	3,386	2,464	2,757	3,463	2,857	-1,043	-1,109	-1,141	-1,318	-1,340	1,414	1,081	1,287	1,514
	SD	0,121	0,058	0,045	0,233	0,280	0,206	0,125	0,275	0,149	0,034	0,043	0,134	0,063	0,260	0,226	0,174	0,213	0,235
	p-W	0,1211	0,0957	0,0165	0,2191	0,0040	0,0046	0,0009	0,0039	0,0022	0,1965	0,0771	0,2243	0,0278	0,1597	0,0585	0,5632	0,1139	0,0287
p-ATM (Ser1981)	XF	1,022	-1,135	-1,055	1,632	4,804	1,948	1,738	4,020	3,087	-1,016	-1,074	-1,139	-1,300	-1,161	1,510	-2,400	-2,960	-2,490
	SD	0,239	0,147	0,178	0,330	0,344	0,143	0,241	0,418	0,428	0,077	0,102	0,068	0,239	0,059	0,122	0,328	0,336	0,506
	p-W	0,8744	0,2692	0,6893	0,0688	0,0003	0,0074	0,0202	0,0028	0,0191	0,7604	0,4068	0,0660	0,1269	0,0714	0,0004	0,0250	0,0197	0,0351

<b>Substanz</b>		<b>Benzylalkohol (BA) –MAS [µM]</b>									<b>Benzylalkohol (BA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,014	1,056	1,068	1,053	1,036	1,004	0,997	1,061	1,030	1,061	1,104	1,189	1,162	1,231	1,115	1,277	1,099	1,115
	SD	0,037	0,052	0,019	0,022	0,020	0,056	0,053	0,049	0,043	0,090	0,091	0,197	0,014	0,052	0,070	0,104	0,025	0,021
	p-W	0,5980	0,2012	0,0321	0,0478	0,0997	0,9503	0,9014	0,1569	0,3464	0,3577	0,1855	0,2401	0,0027	0,0119	0,1103	0,0443	0,0171	0,0124
CMFDA	XF	1,110	1,154	1,224	1,185	1,222	1,118	1,161	1,164	1,130	0,992	1,022	1,060	1,046	1,049	1,033	1,023	0,989	0,969
	SD	0,060	0,047	0,068	0,036	0,044	0,078	0,139	0,049	0,028	0,053	0,024	0,023	0,057	0,043	0,051	0,043	0,069	0,071
	p-W	0,0797	0,0212	0,0246	0,0149	0,0092	0,1278	0,1841	0,0194	0,0160	0,7874	0,2553	0,0373	0,2958	0,1763	0,4089	0,4817	0,7688	0,5220
p-p53 (Ser15)	XF	1,161	1,131	1,308	1,098	1,217	1,168	1,294	1,262	1,274	1,127	1,003	1,059	1,069	1,106	1,059	1,108	1,026	-1,124
	SD	0,135	0,209	0,301	0,118	0,195	0,195	0,200	0,149	0,085	0,214	0,023	0,075	0,142	0,092	0,105	0,145	0,090	0,042
	p-W	0,1567	0,3977	0,2023	0,2673	0,1732	0,2832	0,1093	0,0720	0,0115	0,4079	0,7930	0,2958	0,4174	0,2079	0,4162	0,2970	0,6646	0,0129
p21	XF	-1,013	-1,040	-1,167	-1,035	-1,095	-1,131	-1,195	-1,264	-1,188	-1,055	1,041	-1,007	-1,007	-1,042	1,039	-1,029	1,018	1,051
	SD	0,025	0,117	0,193	0,027	0,050	0,106	0,139	0,128	0,148	0,084	0,091	0,044	0,018	0,038	0,017	0,093	0,069	0,079
	p-W	0,5061	0,6312	0,2702	0,1499	0,0601	0,1656	0,1202	0,0691	0,1319	0,3703	0,5077	0,8199	0,5668	0,1938	0,0546	0,6887	0,6956	0,3869
p-H2AX (Ser139)	XF	1,077	1,064	1,052	1,056	1,038	1,034	1,022	-1,056	-1,023	-1,070	-1,086	-1,259	-1,218	-1,233	-1,045	-1,104	-1,149	-1,173
	SD	0,065	0,058	0,068	0,096	0,017	0,102	0,105	0,074	0,110	0,144	0,208	0,286	0,172	0,197	0,178	0,134	0,129	0,266
	p-W	0,1820	0,1973	0,3085	0,3994	0,0650	0,6001	0,7377	0,3363	0,7852	0,4914	0,5775	0,2801	0,1590	0,1737	0,7412	0,3247	0,1842	0,3648
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,062	1,080	1,201	1,247	1,375	1,274	1,311	1,222	1,380	-1,085	-1,104	-1,111	1,039	-1,167	-1,134	-1,142	-1,114	-1,044
	SD	0,104	0,048	0,074	0,067	0,033	0,171	0,057	0,089	0,142	0,137	0,167	0,121	0,337	0,076	0,061	0,108	0,072	0,181
	p-W	0,4036	0,1021	0,0365	0,0224	0,0061	0,1154	0,0163	0,0453	0,0398	0,4271	0,4057	0,2590	0,8456	0,0609	0,0727	0,1574	0,1256	0,6955
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,181	-1,105	-1,105	-1,044	1,061	1,042	1,054	-1,034	1,094	-1,122	-1,121	-1,151	-1,156	-1,236	-1,232	-1,302	-1,224	-1,194
	SD	0,125	0,095	0,096	0,088	0,077	0,178	0,205	0,121	0,200	0,097	0,135	0,104	0,242	0,113	0,139	0,107	0,107	0,249
	p-W	0,1234	0,1980	0,1970	0,4757	0,2950	0,6881	0,7069	0,6715	0,5119	0,1603	0,2616	0,1432	0,3520	0,0557	0,0816	0,0504	0,0764	0,3220

Substanz		Urea (U) -MAS [ $\mu$ M]										Urea (U) +MAS [ $\mu$ M]							
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,126	1,207	1,224	1,269	1,246	1,169	1,225	1,260	1,191	1,009	1,236	1,091	1,183	1,234	1,284	1,453	1,356	1,112
	SD	0,104	0,112	0,046	0,209	0,065	0,080	0,079	0,023	0,060	0,086	0,177	0,150	0,110	0,055	0,151	0,113	0,206	0,022
	p-W	0,1831	0,0970	0,0217	0,1553	0,0319	0,0596	0,0395	0,0058	0,0351	0,9979	0,1354	0,4575	0,1008	0,0254	0,0411	0,0014	0,0531	0,0006
CMFDA	XF	1,071	1,147	1,128	1,120	1,055	1,047	1,071	1,040	0,985	1,002	1,041	0,964	0,972	0,966	0,954	0,990	0,966	0,857
	SD	0,085	0,054	0,058	0,095	0,064	0,104	0,052	0,099	0,032	0,028	0,061	0,056	0,089	0,084	0,099	0,072	0,092	0,018
	p-W	0,2714	0,0371	0,0545	0,1524	0,2624	0,5137	0,1367	0,5458	0,4978	0,8297	0,3737	0,3694	0,6047	0,5419	0,4967	0,7565	0,5458	0,0161
p-p53 (Ser15)	XF	1,251	1,136	1,227	1,204	1,362	1,393	1,515	1,471	1,568	1,122	1,017	-1,004	1,077	1,102	1,118	1,215	1,204	1,122
	SD	0,424	0,115	0,116	0,035	0,198	0,093	0,113	0,186	0,134	0,103	0,049	0,034	0,064	0,108	0,095	0,132	0,092	0,138
	p-W	0,4129	0,1572	0,0991	0,0214	0,1085	0,0329	0,0248	0,0535	0,0082	0,1874	0,4963	0,9931	0,2201	0,2863	0,2131	0,1561	0,0679	0,2211
p21	XF	-1,054	-1,027	-1,090	-1,096	-1,146	-1,086	-1,131	-1,241	-1,077	-1,057	-1,065	-1,102	-1,073	-1,095	-1,056	-1,042	1,013	-1,037
	SD	0,097	0,066	0,030	0,045	0,119	0,071	0,075	0,144	0,028	0,010	0,053	0,054	0,006	0,009	0,027	0,042	0,040	0,020
	p-W	0,4382	0,5457	0,0363	0,0634	0,1486	0,1639	0,0880	0,0832	0,0457	0,0100	0,1567	0,0737	0,0028	0,0020	0,0640	0,2187	0,6167	0,0790
p-H2AX (Ser139)	XF	1,069	1,039	1,033	1,040	1,030	1,050	1,034	-1,000	1,023	-1,034	-1,009	-1,069	-1,014	-1,145	-1,261	-1,047	-1,064	-1,136
	SD	0,145	0,063	0,067	0,068	0,048	0,060	0,073	0,029	0,042	0,149	0,093	0,018	0,071	0,121	0,127	0,066	0,173	0,057
	p-W	0,4923	0,3964	0,4887	0,4171	0,3846	0,2869	0,4964	0,9704	0,4526	0,7113	0,8403	0,0359	0,7571	0,1760	0,0698	0,3391	0,5685	0,0460
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,108	-1,103	-1,027	-1,039	-1,094	1,154	1,430	1,205	1,090	-1,063	-1,194	-1,205	-1,124	-1,198	-1,175	-1,253	-1,144	-1,117
	SD	0,098	0,090	0,143	0,091	0,079	0,220	0,477	0,189	0,136	0,131	0,051	0,090	0,055	0,056	0,101	0,010	0,144	0,027
	p-W	0,1987	0,1875	0,8317	0,5005	0,1806	0,3604	0,2272	0,1961	0,3956	0,5469	0,0143	0,0429	0,0583	0,0329	0,0927	0,0015	0,2348	0,0264
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,159	-1,207	-1,211	-1,198	-1,172	1,074	-1,028	-1,022	-1,040	-1,061	-1,150	-1,093	-1,024	-1,082	-1,035	-1,167	-1,102	-1,182
	SD	0,091	0,098	0,230	0,177	0,025	0,246	0,133	0,182	0,134	0,137	0,078	0,069	0,112	0,047	0,053	0,068	0,180	0,087
	p-W	0,0960	0,0745	0,2614	0,2040	0,0146	0,6899	0,7840	0,8688	0,6252	0,5395	0,0528	0,1367	0,7762	0,0724	0,3733	0,0307	0,4672	0,0541

Substanz		Natriumsaccharin (SSA) –MAS [ $\mu\text{M}$ ]									Natriumsaccharin (SSA) +MAS [ $\mu\text{M}$ ]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,153	1,264	1,274	1,281	1,285	1,330	1,286	1,273	1,215	1,111	1,174	1,252	1,211	1,269	1,247	1,248	1,211	0,901
	SD	0,055	0,116	0,158	0,121	0,189	0,113	0,130	0,183	0,130	0,182	0,190	0,243	0,168	0,220	0,076	0,138	0,087	0,215
	p-W	0,0417	0,0606	0,0886	0,0543	0,1186	0,0241	0,0592	0,1135	0,0866	0,4512	0,2757	0,2302	0,1585	0,1586	0,0074	0,0833	0,0727	0,5132
CMFDA	XF	1,143	1,180	1,212	1,210	1,160	1,102	1,098	1,095	0,991	1,084	1,101	1,078	1,069	1,031	0,999	1,063	0,944	0,881
	SD	0,083	0,053	0,085	0,043	0,094	0,082	0,034	0,109	0,082	0,034	0,084	0,090	0,031	0,048	0,065	0,038	0,031	0,061
	p-W	0,0907	0,0152	0,0283	0,0074	0,0743	0,1596	0,0199	0,2450	0,8029	0,0585	0,1566	0,2478	0,0518	0,4021	0,9639	0,1123	0,0897	0,0898
p-p53 (Ser15)	XF	1,355	1,357	1,228	1,242	1,233	1,106	1,183	1,030	1,218	1,036	1,133	1,254	1,107	1,173	1,136	1,233	1,234	1,183
	SD	0,304	0,450	0,376	0,378	0,379	0,414	0,275	0,198	0,148	0,171	0,101	0,165	0,187	0,138	0,215	0,120	0,260	0,160
	p-W	0,1663	0,2545	0,3972	0,4438	0,3786	0,7413	0,3991	0,9265	0,0742	0,7682	0,1084	0,1069	0,4324	0,1690	0,3800	0,0593	0,2371	0,1445
p21	XF	-1,181	-1,222	-1,193	-1,125	-1,183	-1,228	-1,119	-1,108	-1,147	1,008	1,017	-1,047	1,018	1,012	-1,046	1,023	1,089	-1,038
	SD	0,035	0,246	0,094	0,119	0,079	0,334	0,104	0,095	0,172	0,043	0,063	0,099	0,048	0,090	0,046	0,078	0,085	0,040
	p-W	0,0149	0,2401	0,0786	0,2088	0,0667	0,3337	0,1847	0,1879	0,2698	0,7974	0,6698	0,5188	0,5875	0,8327	0,2267	0,6569	0,2082	0,2406
p-H2AX (Ser139)	XF	1,067	1,109	1,020	1,046	1,054	-1,016	1,018	-1,007	-1,024	1,061	1,075	-1,109	1,065	1,128	1,143	1,152	1,399	-1,039
	SD	0,070	0,069	0,077	0,106	0,070	0,023	0,029	0,037	0,061	0,119	0,075	0,091	0,113	0,144	0,121	0,128	0,145	0,140
	p-W	0,2291	0,1177	0,6653	0,5272	0,3152	0,3600	0,3822	0,7617	0,5722	0,4588	0,2026	0,1765	0,3851	0,2933	0,2209	0,1596	0,0547	0,6725
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,017	1,185	1,569	1,162	1,030	1,157	1,086	1,258	1,356	-1,165	-1,242	-1,306	-1,257	-1,316	-1,270	-1,247	-1,191	-1,042
	SD	0,076	0,204	0,069	0,122	0,130	0,015	0,092	0,263	0,091	0,098	0,073	0,184	0,096	0,189	0,074	0,142	0,134	0,062
	p-W	0,6975	0,2366	0,0051	0,1315	0,7590	0,0134	0,2250	0,2572	0,0398	0,0921	0,0212	0,0676	0,0307	0,0852	0,0200	0,0830	0,1042	0,3548
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,157	-1,083	1,094	-1,036	-1,253	-1,098	-1,065	-1,032	1,044	-1,154	-1,234	-1,313	-1,273	-1,317	-1,284	-1,290	-1,200	-1,102
	SD	0,109	0,292	0,126	0,161	0,218	0,047	0,059	0,151	0,049	0,131	0,114	0,180	0,118	0,246	0,173	0,193	0,116	0,082
	p-W	0,1265	0,7417	0,3207	0,7489	0,1782	0,0635	0,2002	0,8709	0,2642	0,1747	0,0647	0,0760	0,0553	0,1497	0,0841	0,1134	0,0872	0,1612

Substanz		Propylgallat (PG)–MAS [µM]									Propylgallat (PG) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,036	1,138	1,110	1,143	1,275	1,169	0,793	0,578	0,230	1,155	1,299	1,267	1,404	1,687	1,775	1,747	1,637	1,335
	SD	0,124	0,117	0,036	0,153	0,086	0,173	0,114	0,063	0,029	0,172	0,072	0,068	0,044	0,067	0,107	0,249	0,162	0,080
	p-W	0,7138	0,1403	0,0523	0,1945	0,0046	0,1820	0,1095	0,0290	0,0125	0,3001	0,0472	0,0335	0,0043	0,0044	0,0023	0,0251	0,0006	0,0028
CMFDA	XF	1,000	1,030	1,037	1,006	1,116	1,045	0,851	0,635	0,584	0,966	1,016	1,029	1,079	1,166	1,197	1,157	1,147	1,058
	SD	0,052	0,065	0,058	0,063	0,068	0,129	0,107	0,074	0,065	0,019	0,045	0,061	0,049	0,083	0,084	0,078	0,034	0,054
	p-W	0,9466	0,5226	0,4071	0,9581	0,0717	0,6485	0,1484	0,0259	0,0168	0,0674	0,6507	0,4719	0,1214	0,0666	0,0356	0,0483	0,0046	0,2084
p-p53 (Ser15)	XF	1,091	1,182	1,542	2,016	2,013	1,792	2,210	1,802	1,131	-1,081	-1,057	-1,019	1,010	1,031	1,051	1,127	1,257	1,713
	SD	0,053	0,216	0,184	0,052	0,290	0,151	0,133	0,257	0,216	0,027	0,065	0,070	0,094	0,057	0,099	0,038	0,128	0,178
	p-W	0,1009	0,2759	0,0415	0,0027	0,0176	0,0087	0,0050	0,0291	0,3782	0,0302	0,2595	0,7201	0,8392	0,4435	0,4661	0,0184	0,0596	0,0172
p21	XF	-1,095	-1,017	1,287	1,721	1,376	-1,120	-1,243	-1,501	1,259	-1,024	-1,050	-1,202	-1,219	-1,204	-1,209	-1,183	-1,248	1,054
	SD	0,043	0,084	0,039	0,060	0,180	0,141	0,107	0,262	0,098	0,014	0,030	0,081	0,046	0,043	0,013	0,013	0,036	0,048
	p-W	0,0680	0,8804	0,0208	0,0038	0,0430	0,2788	0,0635	0,0708	0,0191	0,0875	0,0965	0,0361	0,0116	0,0107	0,0019	0,0003	0,0040	0,1958
p-H2AX (Ser139)	XF	1,079	1,366	3,426	7,530	8,118	8,922	8,419	3,709	2,192	1,049	1,037	-1,303	-1,588	-1,650	-1,726	-1,611	-1,628	1,566
	SD	0,058	0,030	0,241	0,724	0,623	1,062	0,972	0,460	0,123	0,092	0,179	0,119	0,228	0,249	0,218	0,060	0,130	0,096
	p-W	0,1334	0,0012	0,0054	0,0062	0,0041	0,0086	0,0083	0,0063	0,0020	0,4662	0,7545	0,0373	0,0324	0,0308	0,0195	0,0040	0,0119	0,0108
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,117	1,256	1,312	1,317	1,428	1,612	1,408	2,097	2,932	-1,168	-1,204	-1,105	-1,233	-1,293	-1,269	-1,194	-1,139	-1,100
	SD	0,231	0,135	0,091	0,051	0,294	0,289	0,234	0,214	0,348	0,096	0,128	0,139	0,147	0,242	0,190	0,234	0,096	0,084
	p-W	0,4650	0,0971	0,0258	0,0299	0,1735	0,0669	0,0516	0,0102	0,0062	0,0876	0,0817	0,3027	0,0829	0,1548	0,1235	0,3098	0,1260	0,1747
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,100	1,094	1,080	-1,038	-1,026	1,062	1,425	2,091	4,022	-1,147	-1,128	-1,029	-1,232	-1,361	-1,317	-1,136	-1,066	-1,019
	SD	0,033	0,153	0,058	0,124	0,056	0,095	0,138	0,494	0,577	0,152	0,175	0,207	0,099	0,073	0,208	0,202	0,147	0,098
	p-W	0,0312	0,3821	0,1398	0,7132	0,5167	0,3825	0,0255	0,0490	0,0081	0,2557	0,3312	0,8471	0,0515	0,0098	0,0939	0,3492	0,5190	0,7451

<b>Substanz</b>		<b><i>p</i>-Nitrophenol (NPH) –MAS [μM]</b>									<b><i>p</i>-Nitrophenol (NPH) +MAS [μM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,030	0,970	0,743	0,677	0,634	0,615	0,580	0,530	0,273	1,069	1,172	1,309	1,378	1,504	1,576	1,605	1,424	1,156
	SD	0,035	0,075	0,023	0,088	0,039	0,069	0,010	0,043	0,090	0,124	0,116	0,108	0,065	0,078	0,154	0,256	0,119	0,102
	p-W	0,2534	0,5640	0,0190	0,0430	0,0209	0,0260	0,0097	0,0191	0,0143	0,4604	0,1104	0,0211	0,0099	0,0033	0,0134	0,0382	0,0113	0,1042
CMFDA	XF	1,070	1,019	0,867	0,842	0,708	0,536	0,622	0,516	0,316	0,978	1,053	1,096	1,177	1,208	1,182	1,139	1,021	1,024
	SD	0,038	0,055	0,064	0,070	0,048	0,042	0,019	0,036	0,051	0,034	0,045	0,086	0,103	0,092	0,128	0,154	0,079	0,076
	p-W	0,0611	0,6883	0,0987	0,0869	0,0190	0,0080	0,0086	0,0095	0,0041	0,3794	0,1648	0,1641	0,0732	0,0482	0,1251	0,2654	0,7570	0,7139
p-p53 (Ser15)	XF	1,005	-1,001	-1,231	-1,462	-1,719	-1,830	-1,850	-1,620	1,009	1,068	1,126	1,053	1,095	1,130	1,225	1,212	1,329	1,333
	SD	0,057	0,192	0,178	0,413	0,563	0,688	0,667	0,690	0,574	0,031	0,068	0,016	0,039	0,021	0,055	0,192	0,359	0,293
	p-W	0,9477	0,8730	0,1652	0,1937	0,1511	0,1648	0,1540	0,2890	0,9549	0,0409	0,0660	0,0252	0,0500	0,0230	0,0055	0,1921	0,2542	0,1865
p21	XF	-1,049	-1,083	-1,064	-1,090	-1,181	-1,393	-1,533	-1,519	1,105	1,044	-1,029	-1,030	-1,003	-1,086	-1,213	-1,214	-1,263	-1,211
	SD	0,155	0,233	0,194	0,219	0,283	0,470	0,239	0,308	0,216	0,037	0,052	0,032	0,025	0,046	0,046	0,015	0,186	0,105
	p-W	0,6188	0,6101	0,6145	0,5533	0,3799	0,2473	0,0637	0,0890	0,5344	0,1767	0,4388	0,2521	0,8580	0,0765	0,0119	0,0011	0,0942	0,0534
p-H2AX (Ser139)	XF	-1,022	-1,025	-1,162	-1,259	-1,323	-1,404	-1,480	-1,043	1,571	1,341	1,362	1,249	1,341	-1,180	-1,496	-1,512	-1,773	-1,543
	SD	0,052	0,050	0,161	0,178	0,197	0,167	0,262	0,145	0,212	0,186	0,231	0,179	0,206	0,168	0,159	0,183	0,260	0,333
	p-W	0,5525	0,4550	0,2311	0,1359	0,1098	0,0643	0,0850	0,6334	0,0210	0,0734	0,0912	0,1221	0,0906	0,1739	0,0247	0,0327	0,0194	0,0776
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,148	1,180	1,855	1,579	1,497	1,453	1,623	2,275	2,710	-1,168	-1,276	-1,445	-1,485	-1,526	-1,620	-1,632	-1,366	-1,212
	SD	0,105	0,063	0,376	0,058	0,207	0,435	0,255	0,547	0,442	0,136	0,176	0,205	0,142	0,256	0,293	0,283	0,092	0,264
	p-W	0,1456	0,0138	0,0698	0,0139	0,0651	0,1758	0,0332	0,0361	0,0018	0,1543	0,0976	0,0514	0,0263	0,0493	0,0417	0,0384	0,0223	0,2865
p-ATM (Ser1981)	XF	1,087	1,131	1,376	1,789	1,601	1,600	2,233	1,835	2,791	-1,110	-1,166	-1,283	-1,352	-1,522	-1,606	-1,603	-1,269	-1,035
	SD	0,061	0,141	0,303	0,210	0,211	0,275	0,448	0,729	0,442	0,083	0,131	0,245	0,246	0,348	0,424	0,318	0,129	0,329
	p-W	0,1215	0,2410	0,1425	0,0072	0,0218	0,0494	0,0278	0,1587	0,0399	0,1610	0,1666	0,1864	0,1252	0,1097	0,0981	0,0667	0,0660	0,9126

<b>Substanz</b>		<b>Natriumxylolsulfonat (SXS) –MAS [µM]</b>									<b>Natriumxylolsulfonat (SXS) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,115	1,144	1,129	1,211	1,219	1,179	1,221	1,160	1,003	1,058	1,183	1,160	1,245	1,279	1,101	1,314	1,139	0,784
	SD	0,068	0,143	0,174	0,125	0,066	0,055	0,100	0,021	0,007	0,146	0,298	0,125	0,172	0,231	0,223	0,272	0,315	0,141
	p-W	0,0959	0,2197	0,3342	0,0962	0,0314	0,0347	0,0575	0,0052	0,5565	0,5959	0,3637	0,1476	0,1279	0,1700	0,5920	0,1806	0,5311	0,0987
CMFDA	XF	1,097	1,105	1,108	1,123	1,085	1,083	1,052	1,025	0,965	1,100	1,061	1,059	1,092	1,120	1,069	1,096	1,058	0,977
	SD	0,011	0,057	0,024	0,015	0,014	0,040	0,043	0,033	0,008	0,073	0,099	0,055	0,117	0,121	0,122	0,150	0,115	0,069
	p-W	0,0058	0,0905	0,0198	0,0087	0,0138	0,0752	0,1780	0,3047	0,0222	0,0988	0,3988	0,2305	0,2782	0,2126	0,4678	0,4038	0,5155	0,5904
p-p53 (Ser15)	XF	1,070	1,008	1,161	1,316	1,336	1,577	1,302	1,235	1,230	1,016	-1,012	-1,018	1,065	1,088	1,095	1,095	1,006	1,187
	SD	0,100	0,027	0,115	0,010	0,032	0,374	0,286	0,110	0,153	0,096	0,103	0,077	0,138	0,031	0,314	0,087	0,215	0,293
	p-W	0,3488	0,6739	0,1523	0,0005	0,0086	0,1268	0,2215	0,0756	0,1389	0,8058	0,9238	0,7638	0,4517	0,0356	0,6127	0,2105	0,8823	0,3859
p21	XF	-1,076	-1,077	-1,146	-1,165	-1,124	-1,200	-1,167	-1,084	-1,100	-1,029	-1,005	-1,020	-1,133	-1,150	-1,118	-1,016	-1,053	-1,098
	SD	0,054	0,054	0,046	0,071	0,091	0,071	0,235	0,064	0,098	0,063	0,036	0,023	0,052	0,077	0,028	0,053	0,091	0,027
	p-W	0,1101	0,1292	0,0272	0,0478	0,1324	0,0305	0,3161	0,1453	0,2075	0,5228	0,8530	0,2723	0,0384	0,0644	0,0177	0,6783	0,4257	0,0203
p-H2AX (Ser139)	XF	1,006	1,019	1,019	1,002	1,044	1,098	1,083	1,036	-1,020	-1,012	1,084	1,125	1,045	-1,028	-1,057	-1,016	-1,090	-1,144
	SD	0,014	0,051	0,032	0,048	0,031	0,047	0,009	0,022	0,030	0,197	0,095	0,139	0,253	0,168	0,228	0,151	0,185	0,322
	p-W	0,5650	0,5918	0,4068	0,9333	0,1353	0,0729	0,0056	0,0983	0,3547	0,9514	0,2554	0,2935	0,7486	0,8050	0,7920	0,9115	0,4817	0,5480
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,087	1,104	1,193	1,136	1,211	1,357	1,070	1,191	1,219	-1,007	-1,031	-1,039	-1,050	-1,100	-1,048	-1,086	-1,088	-1,077
	SD	0,115	0,131	0,100	0,160	0,244	0,136	0,102	0,174	0,209	0,109	0,059	0,079	0,116	0,117	0,095	0,119	0,078	0,161
	p-W	0,3127	0,2952	0,0764	0,2725	0,2646	0,0539	0,3425	0,1874	0,2001	0,9278	0,4421	0,4738	0,5355	0,2700	0,4714	0,3299	0,1784	0,5045
p-ATM (Ser1981)	XF	1,013	1,007	1,093	1,012	1,101	1,171	-1,013	1,069	1,111	1,018	1,018	1,002	-1,006	-1,074	-1,077	-1,126	-1,143	-1,106
	SD	0,154	0,118	0,198	0,167	0,181	0,107	0,073	0,154	0,075	0,081	0,077	0,090	0,110	0,184	0,126	0,172	0,078	0,046
	p-W	0,8504	0,9117	0,4897	0,8900	0,4327	0,1132	0,7867	0,4676	0,1291	0,7912	0,7795	0,9800	0,9132	0,5673	0,4081	0,3292	0,0800	0,0745

Substanz		Ethylacrylat (ETAC) –MAS [µM]									Ethylacrylat (ETAC) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,107	1,153	1,169	1,136	1,178	1,163	1,163	1,150	0,966	1,113	1,293	1,309	1,434	1,587	1,446	1,410	1,241	1,165
	SD	0,139	0,103	0,161	0,060	0,076	0,136	0,122	0,064	0,051	0,171	0,249	0,300	0,256	0,290	0,168	0,318	0,139	0,255
	p-W	0,3285	0,1303	0,2090	0,0687	0,0481	0,1833	0,1374	0,0403	0,3839	0,3761	0,1773	0,2060	0,0943	0,0767	0,0471	0,1534	0,0995	0,3849
CMFDA	XF	1,073	1,103	1,108	1,103	1,104	1,077	1,108	1,034	0,947	1,068	1,120	1,106	1,046	1,067	1,040	1,048	1,024	0,944
	SD	0,071	0,063	0,031	0,014	0,022	0,079	0,061	0,017	0,042	0,032	0,068	0,068	0,053	0,046	0,091	0,071	0,073	0,014
	p-W	0,2110	0,1010	0,0210	0,0084	0,0113	0,2508	0,0838	0,0591	0,1804	0,0611	0,0544	0,1181	0,2932	0,0937	0,5919	0,4118	0,6751	0,0436
p-p53 (Ser15)	XF	1,057	1,225	1,473	1,490	1,462	1,488	1,700	1,421	1,278	-1,041	-1,143	-1,205	-1,176	-1,010	1,034	1,008	1,166	1,316
	SD	0,137	0,172	0,211	0,255	0,251	0,264	0,107	0,245	0,227	0,096	0,091	0,166	0,265	0,182	0,262	0,063	0,149	0,192
	p-W	0,4977	0,1725	0,0870	0,1037	0,1115	0,1087	0,0087	0,1189	0,1941	0,5802	0,0872	0,1574	0,4484	0,9738	0,7617	0,8289	0,1936	0,1036
p21	XF	-1,014	-1,004	-1,146	-1,016	-1,111	-1,087	1,008	1,059	1,144	1,046	1,018	-1,018	-1,029	-1,072	-1,031	-1,016	1,014	1,031
	SD	0,079	0,085	0,148	0,048	0,210	0,097	0,067	0,081	0,106	0,058	0,087	0,048	0,031	0,034	0,087	0,054	0,046	0,056
	p-W	0,7501	0,8909	0,1654	0,6454	0,4740	0,2779	0,9171	0,3502	0,1276	0,3045	0,7382	0,5955	0,2466	0,0580	0,6321	0,6849	0,6331	0,4270
p-H2AX (Ser139)	XF	1,028	1,113	1,140	1,184	1,125	1,134	1,260	1,174	1,124	-1,023	1,031	-1,079	-1,200	-1,162	-1,148	-1,025	-1,061	-1,142
	SD	0,034	0,053	0,149	0,074	0,017	0,039	0,105	0,027	0,063	0,074	0,126	0,069	0,080	0,060	0,155	0,094	0,166	0,220
	p-W	0,2936	0,0733	0,2489	0,0651	0,0102	0,0303	0,0552	0,0059	0,0784	0,6594	0,6953	0,1883	0,0341	0,0262	0,2415	0,7042	0,6507	0,3770
p-Chk1 (Ser345)	XF	-1,042	-1,116	-1,196	-1,268	-1,142	-1,123	1,057	1,171	1,212	-1,163	-1,211	-1,189	-1,316	-1,365	-1,342	-1,367	-1,324	-1,191
	SD	0,123	0,132	0,150	0,129	0,077	0,130	0,124	0,238	0,240	0,092	0,130	0,139	0,031	0,241	0,177	0,263	0,114	0,200
	p-W	0,6500	0,2527	0,1209	0,0659	0,0396	0,2732	0,4310	0,3532	0,2815	0,0870	0,1002	0,1297	0,0071	0,0902	0,0642	0,1048	0,0360	0,2162
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,091	-1,270	-1,332	-1,507	-1,286	-1,195	-1,064	-1,196	-1,000	-1,012	-1,116	-1,113	-1,202	-1,297	-1,230	-1,215	-1,232	-1,182
	SD	0,061	0,230	0,315	0,294	0,141	0,014	0,213	0,068	0,063	0,035	0,151	0,075	0,050	0,141	0,140	0,120	0,183	0,195
	p-W	0,1159	0,1305	0,1640	0,0476	0,0495	0,0005	0,7521	0,0249	0,9955	0,5908	0,3303	0,1190	0,0191	0,0453	0,0853	0,0727	0,1294	0,2110

Substanz		Eugenol (EUG) –MAS [µM]									Eugenol (EUG) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,212	1,237	1,265	1,229	1,207	1,167	1,081	0,964	0,751	1,191	1,397	1,480	1,535	1,407	0,694	0,274	0,344	0,339
	SD	0,060	0,071	0,010	0,087	0,053	0,070	0,030	0,040	0,098	0,221	0,416	0,361	0,333	0,188	0,216	0,088	0,066	0,138
	p-W	0,0318	0,0338	4E-05	0,0481	0,0224	0,0606	0,0481	0,2697	0,0475	0,2755	0,2334	0,1499	0,1105	0,0601	0,1363	0,0088	0,0075	0,0224
CMFDA	XF	1,046	1,048	1,017	1,019	0,963	0,927	0,872	0,824	0,724	1,105	1,023	1,029	0,940	0,760	0,611	0,439	0,186	0,165
	SD	0,027	0,031	0,035	0,038	0,051	0,057	0,028	0,043	0,081	0,096	0,094	0,099	0,084	0,060	0,080	0,051	0,028	0,013
	p-W	0,0956	0,1193	0,5106	0,4739	0,3403	0,1631	0,0146	0,0231	0,0297	0,2056	0,7553	0,6928	0,3570	0,0372	0,0290	0,0117	0,0060	0,0043
p-p53 (Ser15)	XF	1,140	1,059	1,179	1,088	1,119	1,189	1,233	1,124	1,291	1,135	1,063	1,220	1,153	1,331	1,458	1,220	-1,820	-1,888
	SD	0,247	0,087	0,030	0,067	0,088	0,112	0,221	0,126	0,061	0,195	0,014	0,213	0,262	0,345	0,098	0,214	0,457	0,539
	p-W	0,4155	0,3318	0,0079	0,1677	0,1552	0,1218	0,2271	0,2468	0,0250	0,3041	0,0220	0,2128	0,3838	0,2420	0,0214	0,2322	0,0564	0,0674
p21	XF	-1,054	-1,067	-1,154	-1,096	-1,094	-1,135	-1,235	-1,271	-1,263	-1,100	1,056	-1,125	-1,052	-1,088	-1,092	1,177	1,535	1,539
	SD	0,141	0,099	0,160	0,115	0,062	0,175	0,176	0,131	0,102	0,055	0,096	0,054	0,062	0,050	0,148	0,175	0,217	0,173
	p-W	0,6022	0,3496	0,2049	0,2648	0,1163	0,2880	0,1164	0,0509	0,0368	0,0967	0,4313	0,0473	0,2758	0,1013	0,3839	0,1883	0,0226	0,0110
p-H2AX (Ser139)	XF	1,031	1,020	-1,006	1,014	1,069	1,092	1,114	1,119	1,110	1,121	1,492	1,050	-1,007	1,463	2,916	5,143	6,281	5,713
	SD	0,009	0,043	0,090	0,032	0,049	0,050	0,045	0,068	0,018	0,261	0,320	0,181	0,252	0,265	0,478	1,445	2,135	0,327
	p-W	0,0214	0,5252	0,9400	0,5386	0,1310	0,0838	0,0561	0,0913	0,0129	0,4854	0,1529	0,6444	0,9027	0,0635	0,0022	0,0171	0,0356	0,0041
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,179	-1,163	-1,249	-1,289	-1,296	-1,262	-1,118	-1,163	1,032	1,105	-1,215	-1,301	-1,263	-1,230	1,173	1,163	1,280	1,267
	SD	0,181	0,094	0,064	0,151	0,097	0,086	0,257	0,131	0,052	0,083	0,194	0,109	0,119	0,141	0,209	0,122	0,022	0,077
	p-W	0,2605	0,0596	0,0036	0,0380	0,0082	0,0235	0,5604	0,1562	0,3625	0,1602	0,1890	0,0228	0,0487	0,0755	0,2772	0,1540	0,0010	0,0259
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,168	-1,327	-1,360	-1,495	-1,455	-1,341	-1,069	-1,002	1,452	-1,056	-1,182	-1,181	-1,138	-1,000	1,454	1,158	-1,185	-1,286
	SD	0,115	0,177	0,149	0,297	0,152	0,098	0,154	0,143	0,027	0,134	0,208	0,202	0,127	0,149	0,288	0,121	0,057	0,035
	p-W	0,1198	0,0540	0,0258	0,0639	0,0121	0,0094	0,5408	0,9915	0,0022	0,5810	0,2798	0,2690	0,1717	0,9600	0,1067	0,1409	0,0193	0,0053

<b>Substanz</b>		<b>Isobutyraldehyd (IBA) –MAS [µM]</b>									<b>Isobutyraldehyd (IBA) +MAS [µM]</b>								
<b>Parameter</b>		<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>	<b>3,91</b>	<b>7,81</b>	<b>15,63</b>	<b>31,25</b>	<b>62,5</b>	<b>125</b>	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>1000</b>
SSC	XF	1,152	1,199	1,231	1,195	1,309	1,233	1,218	1,178	1,078	1,115	1,079	1,037	1,041	1,174	1,053	1,132	1,070	0,866
	SD	0,073	0,048	0,139	0,071	0,078	0,064	0,084	0,051	0,066	0,150	0,102	0,049	0,124	0,189	0,038	0,125	0,257	0,232
	p-W	0,0698	0,0272	0,0923	0,0353	0,0223	0,0245	0,0434	0,0195	0,1763	0,3299	0,3224	0,3122	0,6669	0,2558	0,1443	0,2042	0,7067	0,4362
CMFDA	XF	1,121	1,099	1,128	1,111	1,170	1,119	1,061	1,067	1,021	1,080	1,045	1,116	1,108	1,164	1,176	1,063	1,074	1,077
	SD	0,076	0,064	0,080	0,032	0,017	0,032	0,036	0,011	0,037	0,072	0,094	0,061	0,048	0,040	0,054	0,043	0,067	0,091
	p-W	0,1022	0,1078	0,1022	0,0209	0,0012	0,0178	0,0915	0,0057	0,4311	0,1931	0,5098	0,0957	0,0755	0,0303	0,0425	0,1254	0,1935	0,2685
p-p53 (Ser15)	XF	1,361	1,180	1,338	1,077	1,161	1,090	1,290	1,326	1,340	1,041	-1,010	1,051	1,063	1,185	1,079	1,232	1,157	1,278
	SD	0,522	0,204	0,524	0,177	0,265	0,175	0,398	0,429	0,226	0,096	0,058	0,231	0,189	0,046	0,033	0,082	0,019	0,232
	p-W	0,3597	0,2818	0,3865	0,5109	0,4072	0,4621	0,3458	0,3310	0,1418	0,5395	0,8012	0,7144	0,5803	0,0235	0,0470	0,0475	0,0053	0,1857
p21	XF	-1,169	-1,138	-1,188	-1,103	-1,104	-1,086	-1,181	-1,111	-1,167	-1,023	-1,051	-1,088	-1,009	-1,069	1,021	-1,043	1,060	-1,109
	SD	0,192	0,082	0,184	0,038	0,020	0,067	0,097	0,069	0,057	0,064	0,062	0,008	0,080	0,037	0,057	0,087	0,091	0,229
	p-W	0,2511	0,0938	0,1806	0,0352	0,0091	0,1542	0,0681	0,0958	0,0315	0,6234	0,2896	0,0055	0,8521	0,0821	0,5950	0,4851	0,3686	0,5192
p-H2AX (Ser139)	XF	1,033	1,040	1,081	1,017	1,089	1,047	1,127	1,064	1,011	1,063	-1,001	1,052	1,095	-1,018	1,101	1,029	1,150	-1,084
	SD	0,034	0,060	0,060	0,103	0,073	0,111	0,038	0,072	0,046	0,102	0,284	0,132	0,320	0,283	0,360	0,336	0,343	0,409
	p-W	0,2317	0,3609	0,1321	0,7680	0,1620	0,5280	0,0304	0,2725	0,7135	0,4145	0,9601	0,5984	0,7004	0,8857	0,7058	0,9361	0,5494	0,7715
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,109	1,101	1,518	1,138	1,330	1,361	1,152	1,186	1,267	-1,104	-1,152	-1,144	-1,129	-1,095	-1,078	-1,147	1,023	-1,046
	SD	0,147	0,210	0,544	0,358	0,352	0,602	0,545	0,160	0,254	0,109	0,163	0,113	0,160	0,140	0,102	0,144	0,168	0,116
	p-W	0,3316	0,4837	0,2408	0,5319	0,2476	0,4088	0,5969	0,1793	0,2037	0,2536	0,2660	0,1515	0,3273	0,3984	0,3113	0,2149	0,7912	0,5801
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,081	-1,125	-1,122	-1,131	-1,059	-1,205	-1,239	-1,117	1,026	1,006	-1,069	-1,053	-1,054	-1,023	-1,103	1,018	-1,155	1,002
	SD	0,129	0,211	0,254	0,340	0,261	0,146	0,175	0,147	0,059	0,046	0,125	0,043	0,140	0,079	0,187	0,067	0,096	0,100
	p-W	0,3890	0,4195	0,5170	0,6483	0,8151	0,1192	0,1272	0,2856	0,5339	0,8452	0,4862	0,1328	0,6206	0,7060	0,4616	0,6918	0,0906	0,9955

Substanz		2,4-Dichlorophenol (DP) –MAS [µM]									2,4-Dichlorophenol (DP) +MAS [µM]								
Parameter		3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000	3,91	7,81	15,63	31,25	62,5	125	250	500	1000
SSC	XF	1,244	1,280	1,246	1,238	1,269	1,139	0,722	0,489	0,047	1,237	1,407	1,580	1,692	1,675	1,677	1,622	1,423	0,207
	SD	0,100	0,166	0,150	0,205	0,167	0,087	0,077	0,044	0,015	0,229	0,131	0,194	0,131	0,132	0,160	0,140	0,122	0,017
	p-W	0,0515	0,1003	0,1053	0,1800	0,1057	0,1092	0,0204	0,0010	0,0002	0,2392	0,0075	0,0163	0,0023	0,0004	0,0020	0,0020	0,0065	0,0057
CMFDA	XF	1,114	1,122	1,112	1,101	1,085	1,010	0,828	0,685	0,649	1,128	1,196	1,292	1,316	1,301	1,179	1,136	0,915	0,848
	SD	0,059	0,086	0,109	0,151	0,123	0,047	0,075	0,046	0,198	0,094	0,111	0,173	0,110	0,202	0,135	0,178	0,161	0,144
	p-W	0,0817	0,1379	0,2189	0,3664	0,3532	0,7458	0,0558	0,0060	0,0884	0,1011	0,0600	0,0590	0,0126	0,0816	0,1102	0,2931	0,4141	0,2120
p-p53 (Ser15)	XF	1,203	1,097	1,168	1,316	1,484	1,664	1,444	1,819	2,009	-1,056	-1,044	1,026	1,124	1,190	1,075	1,685	1,338	1,221
	SD	0,258	0,124	0,032	0,218	0,002	0,105	0,229	0,148	0,201	0,197	0,107	0,112	0,284	0,023	0,266	0,202	0,374	0,315
	p-W	0,2952	0,2949	0,0142	0,1158	0,0012	0,0154	0,0839	0,0141	0,0071	0,6284	0,4959	0,8115	0,5521	0,0017	0,7249	0,0497	0,2390	0,3739
p21	XF	-1,081	-1,070	-1,105	-1,161	-1,240	-1,395	-1,451	-1,078	1,427	-1,055	-1,125	-1,281	-1,292	-1,308	-1,313	-1,175	-1,193	-1,058
	SD	0,069	0,007	0,028	0,022	0,060	0,081	0,096	0,038	0,097	0,089	0,048	0,034	0,153	0,072	0,118	0,154	0,174	0,041
	p-W	0,1666	0,0018	0,0211	0,0060	0,0135	0,0069	0,0051	0,0675	0,0145	0,4257	0,0507	0,0075	0,0715	0,0030	0,0447	0,1962	0,1847	0,1429
p-H2AX (Ser139)	XF	1,003	1,004	1,057	1,094	1,121	1,086	1,044	1,782	3,092	-1,286	-1,509	-1,681	-1,683	-1,467	-1,605	1,276	1,105	1,360
	SD	0,014	0,016	0,030	0,017	0,021	0,018	0,062	0,147	0,218	0,212	0,047	0,208	0,009	0,045	0,089	0,166	0,085	0,254
	p-W	0,7555	0,7087	0,0752	0,0092	0,0112	0,0180	0,3447	0,0114	0,0053	0,1366	0,0072	0,0218	0,0020	0,0041	0,0058	0,1112	0,1537	0,1246
p-Chk1 (Ser345)	XF	1,000	1,076	1,177	1,199	1,273	1,712	1,610	2,600	4,530	-1,057	-1,101	-1,161	-1,300	-1,250	-1,259	-1,406	-1,064	1,738
	SD	0,132	0,084	0,164	0,170	0,172	0,461	0,169	0,196	0,530	0,110	0,126	0,149	0,264	0,179	0,207	0,233	0,139	0,092
	p-W	0,9912	0,2370	0,1916	0,1572	0,0912	0,1181	0,0122	0,0109	0,0047	0,4906	0,2795	0,2052	0,1398	0,0926	0,1111	0,0482	0,5310	0,0051
p-ATM (Ser1981)	XF	-1,120	-1,051	-1,049	1,003	1,085	1,323	2,176	4,022	5,546	-1,053	-1,119	-1,138	-1,290	-1,279	-1,203	-1,253	1,235	1,896
	SD	0,215	0,120	0,137	0,163	0,210	0,162	0,321	0,223	2,107	0,173	0,087	0,060	0,106	0,156	0,086	0,092	0,069	0,059
	p-W	0,4501	0,5279	0,6008	0,9979	0,5619	0,0516	0,0117	0,0013	0,0463	0,7195	0,1188	0,0467	0,0272	0,0576	0,0382	0,0260	0,0251	0,0012