



# MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Aufreinigung von Alkyltoxigenen, Untersuchung zum Einfluss auf intrazelluläre Glutathionspiegel und Vorstudien zur Bildung von DNA-Addukten“

„Isolation of Alkyltoxigenen, research on the impact on intracellular glutathione levels and preliminary studies on the formation of DNA-adducts“

verfasst von / submitted by

Victoria Dostal, BSc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of  
Master of Science (MSc.)

Wien, 2015; Vienna, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt /  
degree programme code as it appears on  
the student record sheet:

A 066 862

Studienrichtung lt. Studienblatt /  
degree programme as it appears on  
the student record sheet:

Masterstudium Chemie

Betreut von / Supervisor:

Prof. Dr. Doris Marko

## Inhaltsverzeichnis:

Danksagung.....	5
1 Einleitung.....	6
2 Theorie.....	7
2.1 Schimmelpilze.....	7
2.1.1 Mykotoxine.....	7
2.1.2 <i>Alternaria</i> .....	9
2.1.3 Toxine von <i>Alternaria alternata</i> .....	10
2.1.4 Alvertoxin II.....	11
2.2 Glutathion.....	12
2.2.1 Nrf2/ARE-Signalweg .....	12
2.2.2 Glutathion.....	13
2.2.3 GSH-Assay nach Ellman .....	14
2.2.4 tGSH-Assay nach Tietze .....	15
2.3 DNA-Addukte.....	16
2.3.1 DNA-Addukte.....	16
2.3.2 Untersuchungen mittels LC-MS/MS.....	17
3 Ziel der Arbeit .....	19
4 Methoden .....	21
4.1 Vorversuche zur ATX-II Isolierung .....	21
4.1.1 Mykotoxinextrakt .....	21
4.1.2 Fraktionierung des Mykotoxinextrakts (semipräperative HPLC) .....	21
4.1.3 Aufkonzentrierung der Fraktionen und Peakidentifizierung.....	22
4.1.4 Auftrennung der gesammelten Fraktionen.....	24
4.2 Hauptversuch ATX-II-Isolierung.....	25
4.2.1 Herstellung der Mykotoxinextrakte .....	25
4.2.2 ATX-II Isolierung.....	25

4.2.3	Untersuchung der Fraktionen mittels HPLC-DAD.....	26
4.3	ATX-II Aufreinigung.....	27
4.4	Zellkultur.....	30
4.4.1	Passagieren.....	30
4.4.2	Mediumwechsel .....	30
4.4.3	Ausstreuen.....	30
4.5	tGSH-Assay .....	31
4.5.1	Testversuche zum tGSH-Assay mit AOH und AME.....	31
4.5.2	GSH-/ GSSG-Messung.....	33
4.5.3	tGSH bei Inkubation mit ATX-II.....	35
4.6	BCA-Methode .....	37
4.6.1	Durchführung (BCA-Vorversuch).....	37
4.6.2	Durchführung (BCA-Hauptversuche).....	38
4.7	Vorversuch mit Kalbsthymus-DNA zu DNA-Addukten .....	38
4.8	Vorversuch mit HT29-Zellen zu DNA-Addukten.....	40
4.9	Vorversuch Adenin/ Guanin Inkubation mit ATX-II.....	42
4.10	Hauptversuch Adenin/Guanin Inkubation mit ATX-II.....	43
5	Ergebnisse und Diskussion .....	46
5.1	Vorversuche zur ATX-II Isolierung .....	46
5.2	Hauptversuch ATX-II Isolierung.....	52
5.3	ATX-II Aufreinigung.....	54
5.4	Vorversuche vom tGSH-Assay mit AOH und AME.....	56
5.5	Bestimmung von tGSH und GSSG in mit ATX-II inkubierten HT29-Zellen .....	57
5.6	Vorversuche zu DNA-Addukten.....	63
5.7	Inkubation von DNA-Basen mit ATX-II.....	65
6	Conclusio.....	69
7	Materialliste.....	71

7.1	Chemikalienliste .....	71
7.2	Geräteliste .....	72
8	Abkürzungen.....	74
9	Literatur .....	76
10	Anhang.....	79
10.1	Abstract .....	79
10.2	Zusammenfassung.....	80
10.3	Lebenslauf .....	81
10.4	Rohdaten .....	82
10.4.1	ATX-II Isolierung.....	82
10.4.2	DNA-Addukte.....	84
10.4.3	tGSH-Vorversuche .....	90
10.4.4	tGSH-Hauptversuche .....	91

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Allen voran Fr. Prof. Doris Marko, die mir dieses interessante Thema anvertraut hat, sowie der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Wien, die mich so herzlich bei sich aufgenommen haben und mir auch immer mit Rat und Tat zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt dabei Fr. Dr. Christine Tiessen die mich sehr kompetent betreut hat und die mir stets half, weiters bei Fr. Mag. Jarolim, die meine Betreuung übernommen hat. Außerdem möchte ich mich noch ausdrücklich bei Hr. Prof. Rizzi und dem Team des Massenzentrums der Fakultät für Chemie bedanken, die mir bei den Messungen meiner Proben und der Interpretation der Spektren halfen.

Zuletzt möchte ich mich hier noch bei meinen Eltern bedanken. Ihnen widme ich auch diese Arbeit, den ohne ihre fortwährende Unterstützung von Kindesbeinen an, wäre dies nicht möglich gewesen.

# 1 Einleitung

Sichere und gesunde Lebensmittel sind für eine normale Entwicklung des Körpers von Mensch und Tier unabdingbar. Allerdings sind natürliche Lebensmittel wie Obst und Gemüse nicht nur die Nahrungsquellen von höher entwickelten Lebewesen, sondern vor allem auch von Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen aller Art. Dies kann besonders zum Problem werden, wenn diese Mikroorganismen dabei Toxine bilden (EFSA, 2009).

Obwohl in den Medien meist nur von den Gefahren der weitläufig bekannten pathogenen Keime und Bakterien gesprochen wird, stellen häufig Schimmelpilze, welche unter anderem zum Teil giftige, sekundäre Stoffwechselmetabolite (Mykotoxine) produzieren, ein Problem bei der Produktion, Lagerung und Distribution von Lebensmitteln dar, da diese alle pflanzlichen Lebensmittel und Futtermittel in allen Stadien der Produktion befallen können und je nach Art ausgesprochen stabil gegen äußere Einflüsse sind (Lorenz et al., 2012).

Mykotoxine werden von Schimmelpilzen gebildet, um sich einen Wachstumsvorteil auf dem Nährboden zu sichern. Wie der Name schon sagt, handelt es sich dabei um Toxine, die auch bei Menschen und Tieren toxisch wirken können (Ostry, 2008). Durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln bzw. Futtermitteln kann es zur Erkrankung des Individuums oder gar dem Tod durch akute bzw. chronische Wirkung (unter anderem durch Krebsentstehung) desselben kommen. Einige Mykotoxine, z.B. Ochratoxin A, können in die Milch oder das Fleisch von Nutztieren gelangen und so den Menschen über einen Carry Over-Effekt schaden (Sørensen and Elbæk, 2005, Fink-Gremmels, 2008).

Diese Arbeit befasst sich ausschließlich mit dem Mykotoxin Altertoxin II (ATX II), das zur Gruppe der *Alternaria* Toxine gehört. Diese Toxine werden von Pilzen der Gattung *Alternaria* wie zum Beispiel *A. alternata* oder *A. solani* gebildet. Diese Schimmelpilze befallen Obst, Gemüse und Getreide, sind also ubiquitär in der Ernährung von Mensch und Tier zu finden.

Neben Lebensmitteln können außerdem Baumaterialien befallen werden, wodurch es zum „sick-building Syndrom“ kommen kann (Nielsen et al., 1999).

## 2 Theorie

### 2.1 Schimmelpilze

Schimmelpilze zählen zu Mikroorganismen, die für den Verderb von Lebens- und Futtermitteln mitverantwortlich sind. Die dabei vom Pilz produzierten (Gift-)Stoffe können zu körperlichen Problemen bei Mensch und Tier führen. Um das Risiko, dieser Substanzen abschätzen zu können, benötigt es fundierte Daten und Studien, die die Toxizität und die Toxikokinetik (also der Weg und die Wirkung im Körper) der Substanz untersuchen. Allerdings sind diese Untersuchungen meist aufwendig und kostspielig (z.B. Tierversuche). Dementsprechend gibt es für einige relevante Toxine noch keine gesundheitlichen Bewertungen (Lorenz et al., 2012).

Wie viele und welche Toxine ein Schimmelpilz produziert, hängt nicht nur von der Spezies ab, sondern auch von den Wachstumsbedingungen, bei denen sich der Schimmel entwickeln konnte. Faktoren wie die Temperatur, die Wasseraktivität, der pH-Wert und nicht zuletzt den Nährstoffen die der Pilz vorfindet, wirken sich auf dessen Wachstum und dessen Toxinprofil aus. Auch die Wellenlänge bzw. der gänzliche Ausschluss von Licht kann sich stark auf das Toxinprofil, die Art und die Menge der produzierten Toxine der Schimmelpilze auswirken (Söderhäll et al., 1978, Magan et al., 1984).

#### 2.1.1 Mykotoxine

Unter der Bezeichnung „Mykotoxine“ versteht man sekundäre Stoffwechselmetabolite von Schimmelpilzen. Nicht alle Arten von Schimmelpilzen bilden sekundäre Stoffwechselmetabolite, dafür können die produzierten Mykotoxine für den Pilz spezifisch sein. Diese Substanzen können toxische Eigenschaften gegenüber pflanzlichen und tierischen Organismen zeigen, wobei ihre Toxizität, ihr Wirkort und ihre toxische Wirkung stark variieren. So wirken auch nicht alle Mykotoxine in allen Testsystemen toxisch, sondern nur auf ein paar bestimmte Organismen. Während Alternariol (AOH) und Alternariol Monomethylether (AME) beispielsweise DNA-strangbrechend in Säugerzellen und mutagen in Bakterienzelllinien (Brugger et al., 2006, Fehr et al., 2009) wirken, zeigten die Substanzen keine toxischen Effekte im Hühnerembryo-Assay (Griffin and Chu, 1983).

Zu den bekanntesten Mykotoxinen zählen unter anderem die Aflatoxine (vor allem Aflatoxin B1), Patulin, die Zearalenone, die Ochratoxine, die Ergotalkaloide und Toxine aus der Spezies

*Alternaria*, wie zum Beispiel Alternariol (AOH) und sein Monomethylether sowie auch die Tenuazonsäure (TeA).

Häufig bestehen diese Toxine aus einem Polyketid und besitzen ein oder mehrere Ringsysteme in ihrer Struktur, wobei dies keine Voraussetzung darstellt. Im Normalfall beziehen sich die Trivialnamen auf die Schimmelpilze von denen sie gebildet werden. So produziert zum Beispiel *Alternaria Alternata* die Alternertoxine I-III, Alternariol, etc. Seltener wurde bei der Namensgebung keine Rücksicht auf den Pilzstamm, der das Toxin erzeugt, gelegt.

Da viele dieser Toxine hitzestabil sind, können sie selbst in verarbeiteten Lebensmitteln nachgewiesen werden. So konnten beispielsweise einige Mykotoxine (darunter AOH und AME) zwar in verarbeiteten Tomatenprodukten (Ketchup und Tomatensaft) gefunden werden, dafür nicht in frischen Tomaten. Dasselbe galt für Zitrusäfte und entsprechend dem frischen Zitrusobst (Zhao et al., 2015). Da eine Kontamination aber nicht unbedingt visuell zu erkennen ist, ist es wichtig bereits die Rohstoffe zu untersuchen und auszusortieren, sofern diese die vorgeschriebenen Grenzwerte überschreiten.

Ein großes Problem bei der Gefahreinstufung von Mykotoxinen sind unter anderem synergistische Effekte, welche durch vorliegen von mehreren Mykotoxinen auftreten können. Auf diese Weise wird eine stärkere Toxizität induziert, als wenn die Toxine einzeln vorliegen würden (Pero et al., 1973). Andererseits kann es auch zu antagonistischen Effekten kommen, was für den betroffenen Organismus von Vorteil sein kann. Da ein Schimmelpilz niemals nur ein Mykotoxin erzeugt, ist das Wissen um diesen Umstand und weitere Untersuchungen in diese Richtung unerlässlich. Hierbei stellt sich dem Experimentator die Herausforderung, sinnvolle und naturgetreue Mischungen zu finden und zu untersuchen. Es könnte sich bei diesem Thema um eine zukunftsweisende Entwicklung in der Mykotoxinforschung handeln, die unter anderem durch genaue, analytische Methoden (HPLC-MS/MS,...) möglich gemacht wurde.

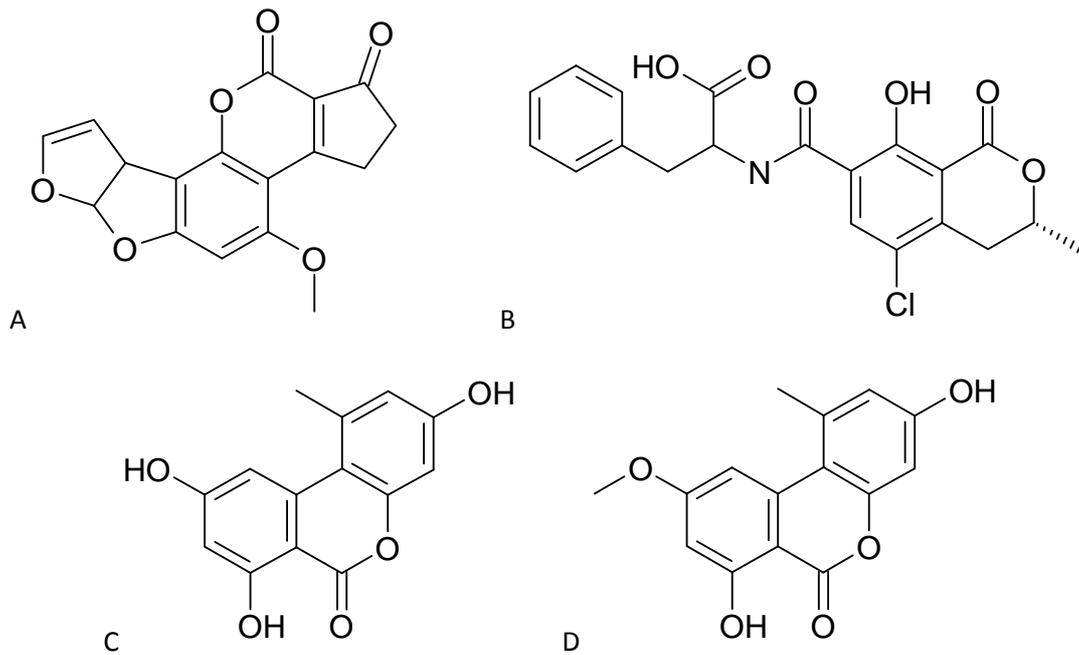


Abbildung 1: Einige exemplarische Mykotoxine: Aflatoxin B1 (A), Ochratoxin A (B), Alternariol (C) und Alternariol Monomethylether (D). AOH und AME gehören zu den *Alternaria* Toxinen.

### 2.1.2 *Alternaria*

Die Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* sind auch als Schwärzepilze bekannt und ubiquitär vorhanden. Sie gehören zum Stamm der Ascomyceten (Schlauchpilze), in der Klasse der Dothideomyceten, in der Ordnung der Pleosporales (Lorenz et al., 2012). Die ursprüngliche Gattung *Alternaria* wurde das erste Mal 1816 von Nees von Esenbeck beschrieben. 2004 wies das Index Fungorum (heute Teil des Kew-Royal Botanic Gardens) bereits 491 Eintragungen von *Alternaria* Spezies aus (Ostry, 2008). Man findet sie weltweit in den Böden von Äckern und Feldern, wobei ihre Mengenverteilung und ihr Toxinprofil je nach klimatischen Bedingungen und geografischer Lage stark variieren (Ostry, 2008).

Besonders bekannte Vertreter der Gattung *Alternaria* sind die Arten *Alternaria alternata* und *Alternaria solani*. *Alternaria alternata* befällt nicht nur Getreide sondern ist auch in Gebäuden, auf Tapeten und Baustoffen zu finden (Nielsen et al., 1999). *Alternaria solani* bevorzugt hingegen Nachtschattengewächse wie Tomaten und Kartoffeln. Andere Spezies befallen auch Obst und Früchte, *A. citri* nutzt wie der Name schon sagt Zitruspflanzen als Substrat. Durch den Einfluss von *Alternaria spp.* können ganze Ernten kontaminiert werden.

Aber nicht nur ihr weltweites Auftreten stellt ein Problem dar, sondern auch ihr Potenzial in einem großen Temperaturbereich noch Wachstumsbedingungen vorzufinden. So liegt zwar die optimale Wachstumstemperatur von *Alternaria spp.* bei 22-28°C, allerdings können sie

auch noch bei niedrigeren Temperaturen wachsen und Toxine produzieren. Die besten Wachstumsvoraussetzungen findet *A. alternata* bei 25°C und einer Wasseraktivität von 0,98 bei Weizenkörnern als Substrat vor. Unter diesen Bedingungen werden exponentiell mehr Toxine produziert, als bei 30°C oder auch 15°C. Findet der Pilz lediglich eine Wasseraktivität von 0,90 vor, wird die Toxinproduktion von AOH und AME ebenfalls extrem heruntergefahren (Magan et al., 1984). Auch *A. citri* und *A. tenuis* wachsen bei 25°C am besten, vertragen aber auch Temperaturen bis 35°C. Die *Alternaria*-Stämme bevorzugen einen sauren Nährboden, wobei dieser im optimalen Fall einen pH von 5,4 aufweist, Wachstum ist aber noch bei pH 2,7 im sauren Milieu bzw. bis pH 8 im basischen Milieu möglich (Hasija, 1970).

Durch ihr ubiquitäres Auftreten können Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* Lebens- und Futtermittel in allen Stadien der Produktion kontaminieren. Die Rohstoffe können direkt am Feld kontaminiert werden, beim Transport, bei der Lagerung, bei der Verarbeitung oder auch erst bei der Lagerung vor dem Verzehr in heimischen Kühlschränken. Die heutige Globalisierung ermöglicht *Alternaria spp.* eine breitere Distribution, auch da bei den langen Transportwegen häufig Schäden an der Fruchtschale entstehen. Normalerweise könnten *Alternaria spp.* die Fruchtschale nicht durchdringen, durch Fruchtschalenverletzungen (z.B. entstanden bei der Ernte, zu kühlere Lagerung oder unsachgemäßen Transport) sind sie allerdings in der Lage in die Frucht einzudringen und finden damit ein gutes Substrat vor (Barkai-Golan, 2001).

*A. alternata* stellt allerdings nicht nur in der Nahrung für Menschen eine Gesundheitsbelastung dar, sondern kommt auch als Schwärzeschimmel an Wänden oder in der Klimaanlage vor. Schimmelpilze in den Lebensräumen, an Wänden und Tapeten werden unter anderem für Gesundheitsschäden, die von Unwohlsein, Unkonzentriertheit und Müdigkeit zu der Entwicklung von Allergien reichen verantwortlich gemacht. Man vermutet auch, dass diese Pilze zum Teil für Anzeichen des „sick-building syndrom“ verantwortlich sind (Nielsen et al., 1999).

### 2.1.3 Toxine von *Alternaria alternata*

Der Schimmelpilz *Alternaria alternata* erzeugt mehr als 70 verschiedene Stoffwechselmetabolite, die zu den Mykotoxinen gezählt werden (Lorenz et al., 2012). Diese können in 5 Übergruppen eingeteilt werden: die Dibenzo- $\alpha$ -pyrone (z.B. AOH), die Perylenchinone (z.B. ATX-II), die AAL-Toxine (z.B. AAL-TA), die zyklischen Peptide (z.B. TEN) und die Tenuazonsäure (AOH und AME sind Abbildung 1 dargestellt).

Die bei *Alternaria* am häufigsten auftretenden und für Menschen nach derzeitigen Wissensstand potentiell gefährlichen Toxine, sind Alternariol (AOH), Alternariol Monomethylether (AME), Alternarien (ALT), Tenuazonensäure (TeA), sowie Alternertoxin I (ATX-I) und Alternertoxin II (ATX-II). ATX-II tritt zwar nicht so häufig und nicht in den Konzentrationen der zuvor genannten auf, es weist allerdings im Comet Assay eine höhere Toxizität auf als diese (Schwarz et al., 2012). Bereits 1973 untersuchte Pero *et al.* (Pero et al. 1973) die Toxizität von AOH, AME und ATX-II in HeLa-Zellen. Ermittelt wurden ID<sub>50</sub>-Werte von 6 µg/mL für AOH und 8-14 µg/mL für AME. ATX-II wies einen ID<sub>50</sub>- Wert von 0,5 µg/mL in HeLa-Zellen auf, woraus man schließen kann, dass es sich um das toxischste der drei getesteten Toxine handelt. Für AOH und AME konnte später eine DNA-strangbrechende Eigenschaft nachgewiesen werden (Fehr et al., 2009). Im Comet Assay mit HT29-Zellen führte es nach bereits einstündiger Inkubation bei einer Konzentration von 0,1 µM zu DNA-Schäden. Bei einer Konzentration von 1 µM ATX-II wurden Schweifintensitäten (bei dem Schweif handelt es sich um bruchstückhafte DNA aus dem Zellkern) von ~20% erhalten (Schwarz et al., 2012), was auf starke DNA-Schäden schließen lässt. Weiters greift ATX-II in den Zellzyklus von HT29-Zellen ein. Nach 24-stündiger Inkubation mit 1 µM ATX-II befanden sich Signifikant mehr Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase als in einer Negativkontrolle. Da außerdem wesentlich weniger Zellen in der S Phase und der G<sub>2</sub>/M Phase zu finden waren, scheint ein Zellzyklusarrest in der Zelle in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> Phase stattzufinden (Schwarz et al., 2012).

#### 2.1.4 Alternertoxin II

Das erste Mal wurde ATX-II 1973 von Pero et al. beschrieben (Pero et al., 1973), wobei in dieser Arbeit nur die Summenformel mit C<sub>20</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub> (die Molare Masse entspricht 350,32 g/mol) ermittelt werden konnte, allerdings noch keine Molekülstruktur. Die Struktur (siehe Abbildung 2) konnte später von Stack et al. identifiziert werden (Stack and Prival, 1986). ATX-II wird nicht in den Mengen wie zum Beispiel AOH gebildet. In der Arbeit von C. Schwarz (Schwarz et al., 2012) wurde aber nachgewiesen, dass es die hauptsächlich giftende Substanz in einem Mykotoxinextrakt aus *Alternaria alternata* war. Durch Messungen von einzelnen Fraktionen im Vergleich zum ursprünglichen Mykotoxinextrakt stellte sich heraus, dass die gefundenen, starken DNA-Schäden beinahe ausschließlich von einer Substanz aus einer Fraktion erzeugt werden. Durch weitere Aufreinigung dieser Fraktion und anschließender Untersuchung wurde es als ATX-II identifiziert (Schwarz et al., 2012).

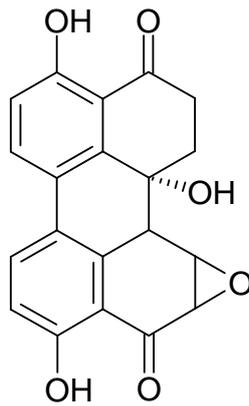


Abbildung 2: Struktur von Alvertoxin II (ATX-II)

Reines ATX-II weist eine gelbe Farbe auf. Die Reaktivität von ATX-II ist vermutlich durch seine Struktur zu erklären. Im Gegensatz zu ATX-I besitzt es eine Epoxid-Gruppe statt einer Hydroxid-Gruppe (Stack and Prival, 1986). Ebenfalls ermittelte Fleck et al. (2014), dass ATX-II in Caco-2 Zellen durch 1,3- bzw. 1,4-Dithiolen zu ATX-I reduziert (Fleck et al., 2014) wird. Auch eine Reaktion mit Glutathion konnte mittels LC-DAD-MS Analyse belegt werden, wobei die genaue Struktur des Konjugats und der genau Reaktionsweg nicht geklärt werden konnten (Fleck et al., 2014).

## 2.2 Glutathion

### 2.2.1 Nrf2/ARE-Signalweg

Zellen werden durch endogene sowie exogene (z.B. reaktive Sauerstoffspezies [=ROS]) Faktoren beeinflusst. Während einige von ihnen protektiv wirken können, sind andere schädlich für die Zellen. Zum Schutz der Zelle und deren Entgiftung gibt es unter anderem das „antioxidant response element“ (=ARE), welches wichtige Gene die zytoprotektive Enzyme kodieren, reguliert. Das ARE wird durch die Anwesenheit von elektrophilen und oxidativ wirkenden Substanzen angeregt. Dabei wird Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related protein 2) in der Zelle freigesetzt, welches sich im Nukleus akkumuliert und dort Heterodimere bildet, welche an das ARE binden. Dadurch werden ARE-regulierte Gene expremiert (Aimee et al., 2008). Als weitere Gene, die zur Detoxifizierung von z.B. ROS gelten, sind die NAD(P)H:quinon Oxidoreduktase 1, die Superoxid-Dismutase und die Glutathion-S-Transferase zu nennen.

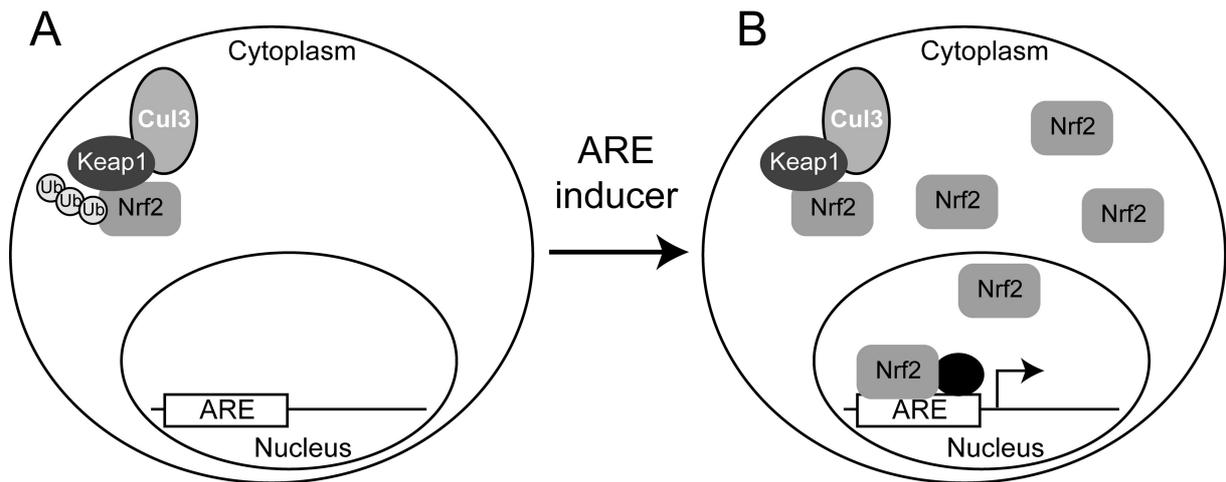


Abbildung 3: Schematische Darstellung der ARE-Aktivierung (Aimee et al, 2008). Nrf2 ist in Abwesenheit von ARE-Induzierern (z.B. ROS) ubiquitiniert und unterdrückt (Bild A). Gelangen ARE-induzierende Substanzen in die Zelle, wird die Ubiquitierung von Nrf2 inhibiert, das Nrf2 wird freigesetzt, es gelangt in den Nucleus und aktiviert ARE, wodurch zytoprotektive Enzyme aktiviert werden (Bild B).

Die Detoxifizierung der Zelle wird dabei unter anderem durch die Konjugation von Glutathion an den Fremdstoff durchgeführt, was von Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysiert wird.

### 2.2.2 Glutathion

Glutathion bezeichnet ein Tripeptid, bestehend aus den drei Aminosäuren Glutaminsäure, Glycin und Cystein.

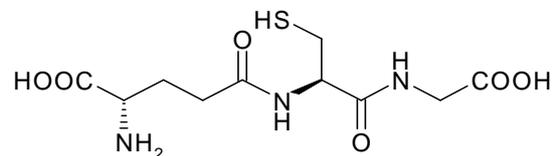


Abbildung 4: Struktur von Glutathion

Glutathion stellt einen essentiellen Bestandteil aller Zellen dar, da es als Antioxidans wirkt. Die reaktive HS-Gruppe des Cysteins ist dazu in der Lage, ROS durch Oxidation, beziehungsweise Reduktion derselbigen abzufangen, und selbst mit diesen, für die Zelle schädlichen, Verbindungen zu reagieren. Dadurch wird verhindert, dass wichtige Bestandteile und Moleküle der Zelle geschädigt werden. So zeigte Mills bereits im Jahr 1957, dass Glutathion in Anwesenheit eines, zu diesem Zeitpunkt unbekanntem, Cofaktoren den oxidativen Zerfall von Hämoglobin durch Ascorbinsäure verhindert (Mills, 1957). Er schloss daraus, dass Hydroperoxide von einer Glutathionperoxidase reduziert werden müssen, wodurch nur noch ein Alkohol so wie Wasser vorhanden ist und somit das reaktive Potential der Substanz nicht länger vorhanden ist.



Durch den GSH-Assay nach Ellman wurde es 1959 möglich, die GSH-Konzentration der Probe reproduzierbar durch eine Farbreaktion mit DTNB zu bestimmen (Ellman, 1959). Zehn Jahre später wurde die Methode durch Tietze weiterentwickelt, wodurch es nun möglich wurde auch das oxidierte Glutathion (GSSG) mitzubestimmen (Tietze, 1969).

Die in einer Zelle enthaltene Konzentration an Glutathion kann Aufschluss über deren Stresssituation liefern. Wird viel GSSG gebildet, bedeutet das, dass die Zelle zuvor noch mehr GSH gebildet haben muss, welches mit einem (Hydro-)peroxid zu GSSG oxidiert wurde. Außerdem detoxifiziert es Xenobiotika sowie endogene Stoffe. Eine Hauptfunktion ist allerdings die Lagerung von Cystein. Da Cystein sehr instabil ist und in der Zelle autooxidieren und dabei toxische freie Sauerstoffradikale erzeugen kann, wird es bei Bedarf aus Glutathion gewonnen, wodurch es bis zum benötigten Zeitpunkt, in einer stabilen Form vorliegt (Traverso et al., 2013).

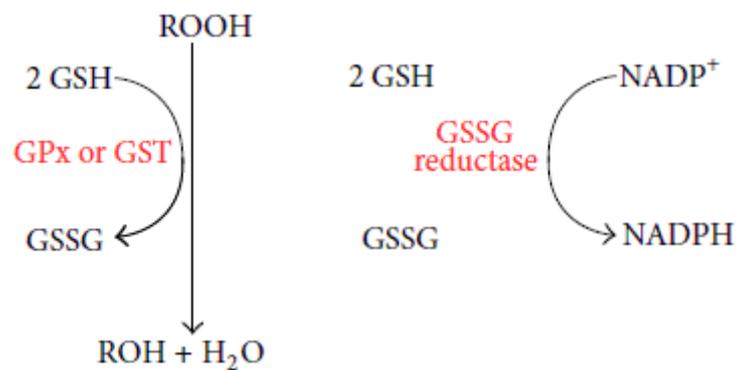


Abbildung 5: Antioxidative Reaktionswege von Glutathion (Traverso et al., 2013). Zwei Moleküle GSH oxidieren zu GSSG und reduzieren dabei ein Peroxid zu einem Alkohol und Wasser. Diese Reaktion wird von GST oder GPx katalysiert. Auch die GSSG Reduktase wandelt zwei GSH in GSSG um und verbraucht dabei NADP<sup>+</sup>. Der tGSH-Assay beruht auf der Reversibilität dieser Reaktion, wo GSSG mit NADPH reduziert wird. GST= Glutathion-S-Transferase; GPx = Glutathionperoxidase

### 2.2.3 GSH-Assay nach Ellman

Beim GSH-Assay nach Ellman wird die GSH-Konzentration in Zellen bestimmt (Ellman, 1959). Dafür wird 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (=DTNB) genutzt, welches mit GSH reagiert (siehe Abbildung 6). Dabei entstehen ein gemischtes Disulfid und 5-Thio-2-nitrobenzoat (=TNB), welches eine starke gelbe Färbung aufweist. Die Farbänderung und -intensität kann mit Hilfe eines Photometers bei  $\lambda = 412 \text{ nm}$  beobachtet und bestimmt werden. Durch Vergleich mit einer Kalibriergeraden kann die GSH-Konzentration in der Probe bestimmt werden.

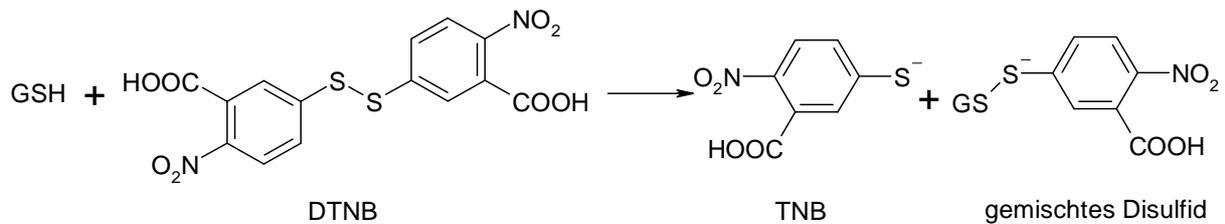


Abbildung 6: GSH-Assay nach Ellman: GSH reagiert hier in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit DTNB, wobei das gelbfarbene TNB und ein gemischtes Disulfid entsteht. Die Konzentrationssteigerung an TNB kann über eine photometrische Messung mitverfolgt werden und durch Vergleich mit einer Standardgeraden, die Konzentration an GSH in der Probe bestimmt werden.

Beim GSH-Assays ist zu beachten, dass DTNB nicht mit GSSG reagieren kann und dieses somit diskriminiert wird. Da aber auch das Verhältnis zwischen GSH und GSSG eine wichtige Information in Bezug auf den Redoxstatus der Zelle liefert, ist die Bestimmung der Konzentration an GSSG in der Zelle wünschenswert.

#### 2.2.4 tGSH-Assay nach Tietze

Beim tGSH-Assay nach Tietze wird die Konzentration des gesamten (reduzierten und oxidierten) Glutathions in der Zelle bestimmt (Tietze, 1969). Durch eine zweite Messung wird weiters die Konzentration an GSSG ermittelt. Durch Ermittlung dieser beiden Werte kann auf die Konzentration an GSH in der Zelle zurückgerechnet werden.

Um die Gesamtglutathionmenge bestimmen zu können, wird zuerst GSSG mit Glutathionreduktase (=GR) in zwei Äquivalente GSH umgewandelt. NADPH dient dabei als Protonenlieferant. Anschließend wird wie beim GSH-Assay das GSH mit DTNB zu TNB und einem gemischten Disulfid umgesetzt. Somit erhält man den tGSH-Wert.

Um die Konzentration an GSSG in der Probe zu ermitteln, wird zuerst sämtliches GSH in der Probe durch 2-Vinylpyridin (=2-VP) abreagiert (siehe auch Abbildung 7). Nach der Inkubation mit 2-VP ist nur noch GSSG vorhanden, welches erneut mit GR und NADPH zu GSH umgewandelt wird, welches daraufhin mit DTNB reagiert und so das gelbfarbene TNB entsteht (in Abbildung 8 dargestellt).

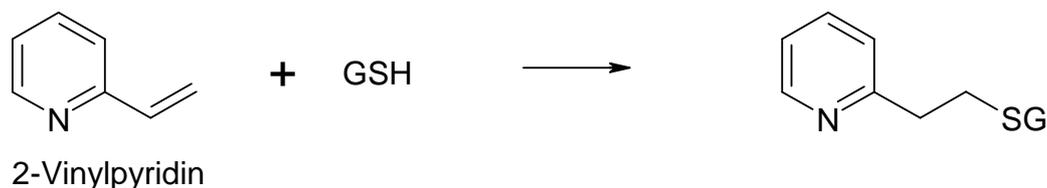


Abbildung 7: Deaktivierung des zellulären GSHs: Um den GSSG-Gehalt in der Zelle bestimmen zu können, muss zuerst sämtliches GSH deaktiviert werden. Dies wird durch die Inkubation mit 2-VP gewährleistet.

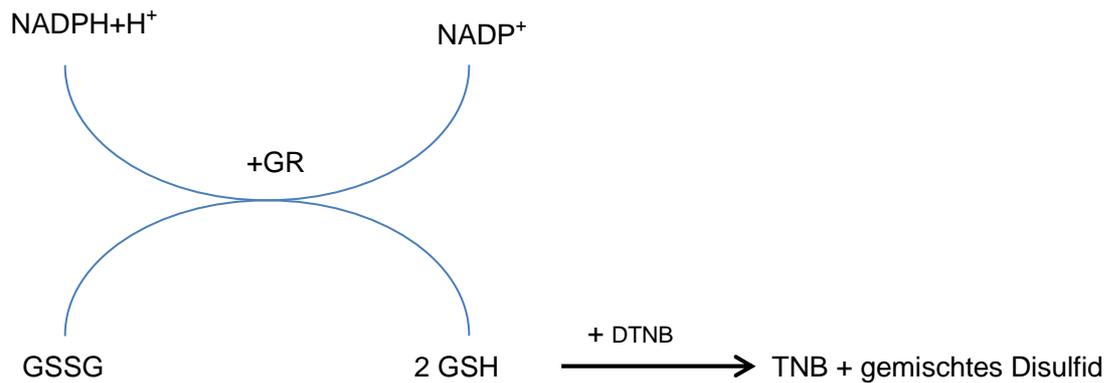


Abbildung 8: tGSH-Assay: GSSG wird mit GR und NADPH+H<sup>+</sup> zu zwei Äquivalenten GSH umgewandelt. Durch die Reaktion mit DTNB wird das gelbfarbene TNB und ein gemischtes Disulfid gebildet. Je mehr GSH gebildet wird, desto mehr TNB entsteht, wodurch die Intensität der Gelbfärbung steigt.

## 2.3 DNA-Addukte

### 2.3.1 DNA-Addukte

Unter einem DNA-Addukt versteht man einen Komplex, der zwischen einem Molekül (z.B. Probesubstanz) und einer DNA-Base, besonders häufig Guanin oder Adenin, gebildet wird.

Guanin und Adenin bilden vorrangig DNA-Addukte, da sie über ihre Purin-Struktur am besten von außen angreifbar sind. Über das freie Elektronenpaar am Stickstoff des Imidazols des Purins können Bindungen mit elektrophilen Stoffen eingegangen werden. Dabei klappt das Elektronenpaar aus und bildet so die Bindung zwischen dem Stickstoff-Atom und der elektrophilen Substanz. Durch Umlagerungen in der Struktur kann es dazu kommen, dass das reagierte Guanin oder Adenin von der DNA abgespalten wird, was zu einer apurinen Stelle in der DNA führt. Andererseits können Moleküle auch mit der Amin-Gruppe des Adenins reagieren, was allerdings seltener vorkommt. Tatsächlich scheint Guanin die reaktionsfreudigere Base von den beiden zu sein, da nach momentanen Wissensstand mehr DNA-Addukte mit Guanin als mit Adenin publiziert sind (Essigmann et al., 1977, Raney et al., 1993, Wang and Groopman, 1999). Dies kann man auf den elektronenziehenden Sauerstoff im GuaninGrundgerüst zurückführen.

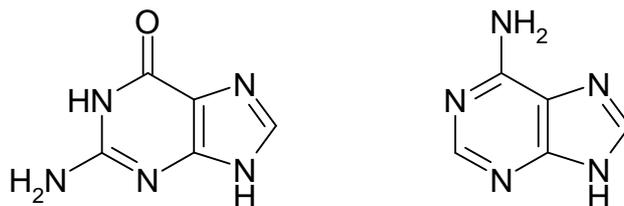


Abbildung 9: Strukturen von Guanin (links) und Adenin (rechts)

Von einigen Mykotoxinen, z.B. Aflatoxin B1 (AFB<sub>1</sub>), ist bekannt, dass sie DNA-Addukte bilden, was auf eine Schädigung der DNA schließen lässt. AFB<sub>1</sub> bildet dabei ein N<sup>7</sup>-Guanin-Addukt, das AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua, welches hauptsächlich in der Leber gefunden wird (Essigmann et al., 1977, Raney et al., 1993). Das Addukt wird schnell von der DNA entfernt und über den Urin ausgeschieden. AFB<sub>1</sub>-N<sup>7</sup>-Gua führte im Testsystem zu G→T Mutationen (Wang et al., 1999). In dieser Arbeit wird untersucht, ob die DNA-strangbrechende Wirkung von ATX-II ebenfalls durch eine Reaktion mit den Basen zu erklären ist, oder ob ein anderer Mechanismus aktiviert wird. Es wird davon ausgegangen, dass ein DNA-Addukt ähnlich wie bei Aflatoxin B1 gebildet werden könnte, da dieses ebenfalls über eine Epoxidgruppe verfügt.

### 2.3.2 Untersuchungen mittels LC-MS/MS

Früher wurden die Auftrennungen von Mykotoxinen unter anderem noch auf DC-Platten, durch Filtration beziehungsweise mittels 2D-Gel-Filtration durchgeführt (Chu, 1981, Stack and Prival, 1986).

Als eine der mittlerweile gängigsten Methoden der Analytik von Mykotoxinen werden unterschiedliche Arten der Flüssigkeitschromatografie (eng. „liquid chromatography“ = LC) mit einem Massenspektrometer (mit oder ohne UV-Detektor davor) als Detektor gekoppelt und die Mykotoxine über diese aufgetrennt und analysiert. Je nach Art des Massenspektrometers können Informationen wie das „Masse zu Ladung“-Verhältnis (=m/z) und bei hochauflösenden Geräten daraus die Zusammensetzung der Substanz abgeleitet werden. Auch quantitative Informationen können erhalten werden. Dabei ist es notwendig, das Massenspektrometer je nach Art der Aufgabenstellung zu wählen. Zum Beispiel kann man mit einem Triple Quadrupol – Gerät (=QQQ) sehr gut quantifizieren, zur Untersuchung der exakten Masse benötigt man allerdings z.B. ein QTOF (= Time of Flight) Massenspektrometer.

Da die Zielsubstanz in der Probe nicht rein vorliegt, sondern mit anderen Substanzen vermischt ist, wird eine High Performance Liquid Chromatography (=HPLC) zur Auftrennung der Probe über eine Säule mit oder ohne Lösungsmittelgradienten verwendet. Dadurch treten die verschiedenen Moleküle im Normalfall nicht gleichzeitig, sondern getrennt voneinander aus. Im Massenspektrometer werden Moleküle anschließend mit Hilfe einer Ionenquelle ionisiert. In diesem Fall wurde ein Elektronenspray (=ESI) verwendet, der als sanfte Ionisierungsmethode gilt, was bedeutet, dass große Molekülteile als ganzes erhalten bleiben und nicht in kleine Fragmente gespalten werden. Dies ist für diese Fragestellung von Vorteil. Außerdem kann davon ausgegangen werden, dass die erhaltenen Produktionen

meist einfach positiv oder negativ geladen sind, was die Zuordnung der m/z-Werte zu potentiellen Strukturen erleichtert.

Für diese Arbeit wurde eine HPLC-MS/MS-Methode zur Untersuchung auf DNA-Addukte herangezogen. Dafür wurde eine HPLC mit einer C18-Säule (reversed phase) benutzt, als Detektor wurde hauptsächlich ein Triple Quadrupol (eine TSQ Vantage der Firma ThermoFisher) und für einige Messungen auch ein QTOF-Gerät (eine maXis der Firma Bruker) verwendet. Als Ionenquelle wurde ein Elektronenspray eingesetzt, wodurch hauptsächlich einfach geladene Ionen entstehen.

### 3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, auf welche Art ATX-II die DNA bzw. die Zelle schädigt. Es wurde davon ausgegangen, dass ATX-II in der Lage ist, DNA-Addukte zu bilden und auf diese Art und Weise zu den DNA-Schäden führt. Die Bildung von solchen DNA-Addukten zwischen ATX-II und der DNA in der Zelle könnte Einfluss auf zelluläre Prozesse wie Replikation oder Transkription haben und, falls Reparaturmechanismen fehlschlagen, zu Mutationen führen.

Um das für die Versuche benötigte ATX-II zu erhalten, musste dieses aus einem bereits in der Arbeitsgruppe hergestellten Mykotoxinsubstrat (produziert und aufgereinigt aus mit *Alternaria alternata*-Stämmen inkubierten Reis) extrahiert werden, da ATX-II nicht kommerziell erhältlich ist. Da in diesem Substrat auch andere Mykotoxine enthalten waren, die für weitere Arbeiten der Arbeitsgruppe von Interesse sein könnten, sollte eine Methode entwickelt werden, um möglichst viele Mykotoxine aus dem Mykotoxinsubstrat zu gewinnen.

Mit dem hergestellten ATX-II sollte anschließend der Einfluss von ATX-II auf zelluläres GSH untersucht werden. Um heraus zu finden, in welchem Maße ATX-II die Zelle schädigt, wurde ein tGSH-Assay nach Tietze durchgeführt. Hierbei sollte analysiert werden, ob und wie stark ATX-II auf den GSH-Haushalt der Zelle wirkt. In dieser Arbeit wurde an die Arbeit von Christoph Schwarz angeknüpft, welcher die Wirkung von ATX-II auf den Glutathionspiegel bei Kurzzeitinkubation untersuchte (Schwarz et al., 2012). Dafür wurden in dieser Arbeit längere Inkubationszeiten und höhere ATX-II-Konzentrationen (bis 5  $\mu$ M) untersucht.

Weiters sollte die potentielle Adduktbildung von ATX-II mit DNA-Basen mittels HPLC-MS/MS untersucht werden. Da bisher nicht bekannt ist, ob ATX-II mit DNA-Basen reagiert, aber bereits die Reaktionen von anderen Substanzen mit einer Epoxidgruppe (z.B. Aflatoxin B1, Glycidamid) bekannt sind, wurde in dieser Arbeit ebenfalls von einer Reaktion von ATX-II mit DNA-Basen über die Epoxidgruppe ausgegangen. Im Falle, dass solche Addukte gefunden worden wären, hätte eine Methode zur Analyse mittels HPLC-MS/MS derselbigen entwickelt werden sollen.

Die Reihenfolge der Versuchsdurchführungen ist im folgenden Flussdiagramm (Abb. 10) visualisiert.

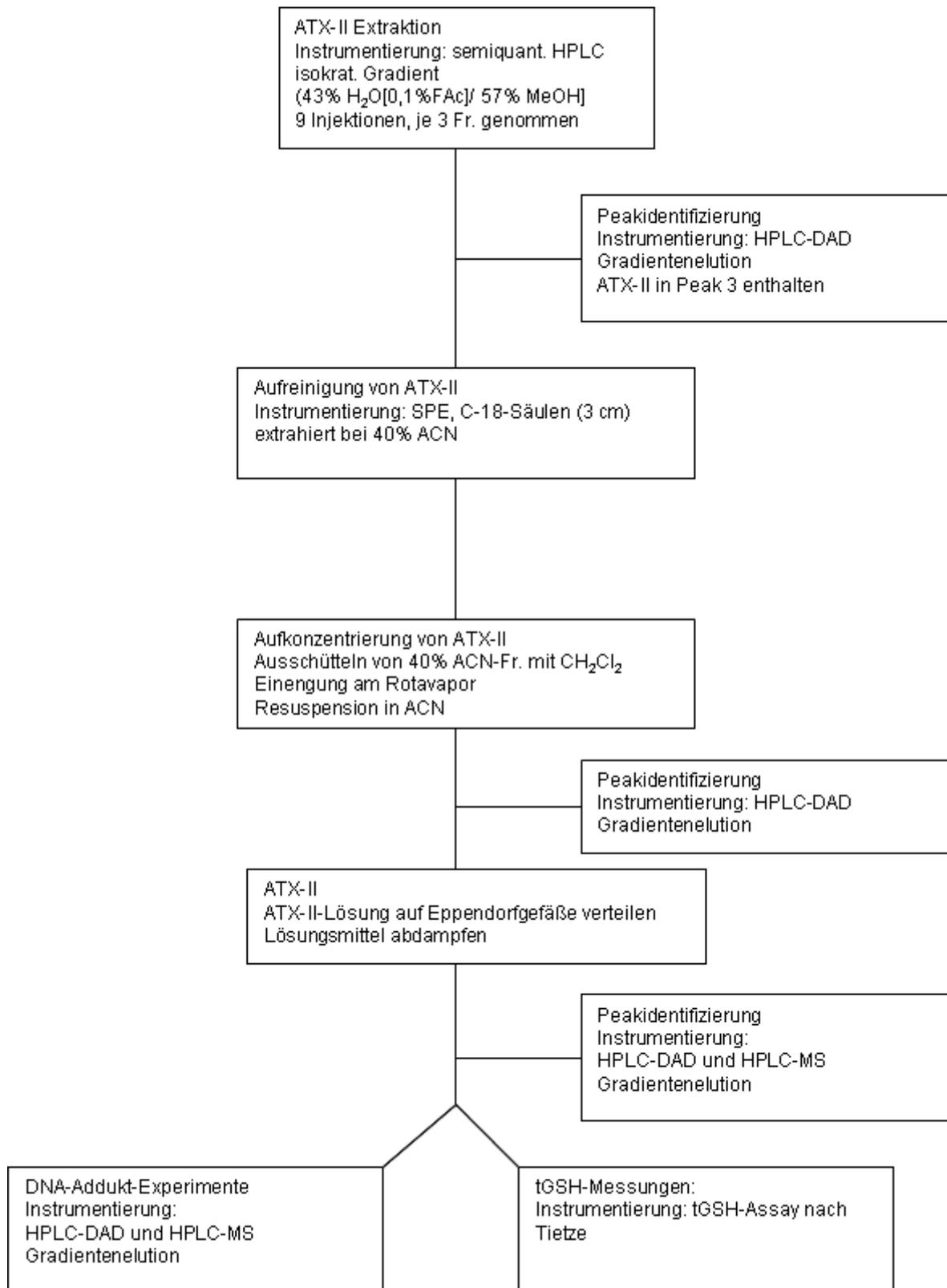


Abbildung 10: Flussdiagramm der Arbeitsreihenfolge. Zuerst wurde ATX-II aus einem Mykotoxinextrakt aufgereinigt. Mit dem hergestellten ATX-II wurden die Versuche zu den DNA-Addukten und den tGSH-Messungen durchgeführt.

## 4 Methoden

### 4.1 Vorversuche zur ATX-II Isolierung

#### 4.1.1 Mykotoxinextrakt

Für die Gewinnung von ATX-II wurde ein in der Arbeitsgruppe bereits hergestelltes Mykotoxinsubstrat verwendet. Dieses wurde durch Kultivierung von *Alternaria alternata* auf autoklaviertem Reis gewonnen. Das bei -20°C gelagerte Substrat wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und eine Spatelspitze des Mykotoxinsubstrats in 40 mL einer Mischung aus Acetonitril (ACN)/ Wasser bidest. (50%/50%) gelöst, wodurch eine leicht gelb gefärbte Lösung erhalten wurde. Der Mykotoxinextrakt und das übrige Mykotoxinsubstrat wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.1.2 Fraktionierung des Mykotoxinextrakts (semipräperative HPLC)

Um das ATX-II aus dem hergestellten Mykotoxinextrakt isolieren zu können, wurde eine präperative HPLC-Methode mit Gradientenelution gewählt. 10 mL des gelösten Extrakts wurden mittels Injektion auf eine semipräperative Säule aufgebracht und über diese aufgetrennt. Der Anfangsgradient lag bei 60% Methanol/40% H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und wurde in 10 bis 20 Minuten-Schritten auf 80%/20% geändert (siehe Tabelle 1). Die Gesamtlaufzeit betrug eine Stunde und die Durchflussrate wurde mit 10 mL/min festgelegt. Nach jedem Peak wurde eine neue Fraktion gesammelt, wodurch insgesamt 15 Fraktionen unterschiedlicher Volumina pro Lauf erhalten wurden. Die Fraktionen wurden bei +4°C gelagert.

Tabelle 1: Gradient zur Elution der Mykotoxine aus dem Substrat

Zeit [min]	%A (Methanol)	%B (H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> )	Flow [ml/min]
0	60	40	10
20	65	35	
30	70	30	
50	75	25	
60	80	20	

## Chemikalien und Geräte:

Knauer System:

Pumpe:	KNAUER Smartline Pump 1000
Steuergeräte:	ClarityChrom in Kombination mit ChemStation
Detektor:	Agilent preparative flow cell S3, 3mm path length, Agilent Technologies 1200 Series
Säule:	Luna C18, 250x21,20 mm; 5 µm
Flussgeschwindigkeit:	10 mL/min

### 4.1.3 Aufkonzentrierung der Fraktionen und Peakidentifizierung

Nach der ersten Fraktionsnahme wurden alle Fraktionen an einer SpeedVak für 6,5 h bei 2000 rpm und 38°C unter Vakuum eingengt. Hierbei fiel auf, dass sich in Fraktion 8 ein gelber Niederschlag gebildet hatte. Anschließend wurden alle Fraktionen mit einer analytischen HPLC-DAD untersucht, um so die Fraktion, die ATX-II enthält, zu identifizieren. Bei Fraktion 8 wurde einerseits die Lösung, so wie sie nach der Verdampfung am SpeedVak erhalten wurde, sowie nach Resuspension des gelben Niederschlags durch die Zugabe von 2 mL ACN analysiert. Weiters wurde eine in ACN gelöste ATX-II-Probe unbekannter Konzentration (vermutlich 100 µg/mL, zuvor hergestellt in der Arbeitsgruppe nach Anleitung von Schwarz [2012]) als (rein qualitative) Referenz mitgeführt. Für die Peakidentifizierung wurden meistens 50 µL (mindestens aber 10 µL über dem Gesamtinjektionsvolumen) der Fraktionen in HPLC-Vials pipettiert. Pro Messung wurden zunächst 10 µL der Probe, in späteren Fällen nur 5 µL injiziert, da dieses Volumen ebenfalls ausreichte, und mittels eines Lösungsmittelgradienten getrennt. Anders als bei der semipräparative HPLC wurde in diesem Fall ein Lösungsmittelgradient aus 90% Acetonitril (Laufmittel B) und angesäuertem bidestillierten Wasser (0,1% Ameisensäure [FAc]) verwendet (siehe Tabelle 2). Über den Detektor wurden die Wellenlängen 280,8 nm; 340,8 nm und 262,8 nm gemessen. ATX-II kann am besten bei 262,8 nm beobachtet werden.

Die Fraktionen 5,6,8, 10 und 12 wurden außerdem mittels HPLC-MS/MS analysiert, wobei einige µL von diesen über ein „direct Inlet“-Verfahren direkt in die Ionenquelle injiziert wurden.

**Tabelle 2: Gradient zur Peakidentifizierung**

Zeit [min]	%A (0,1%FAc)	%B (90%ACN)	Flow [ml/min]
0	81	19	1
1	81	19	
2	50	50	
12	45	55	
22	0	100	
27	0	100	
29	81	19	
35	81	19	

Auf diese Art und Weise wurden die Fraktionen nach bekannten Toxinen gescreent, wobei ATX-II in Fraktion 8 (nach Vergleich mit dem ATX-II-Standard) gefunden wurde. Um auch noch andere Toxine isolieren zu können, wurden bei folgenden Läufen weiterhin alle 15 Fraktionen aufgefangen.

Die Fraktionen dieser insgesamt 9 Läufe (siehe 4.1.2) wurden jeweils leicht eingengt und schlussendlich die gleichen Fraktionen 6, 8, 9 und 10 jeweils in einem Kolben vereinigt. Aufgrund der hohen, aber unterschiedlichen Volumina wurden diese gesammelten Fraktionen an einem Rotationsverdampfer eingengt, um das Methanol/Wasser-Gemisch schneller und effizienter verdampfen zu können. Die so eingengten Proben wurden in 3 mL ACN aufgenommen, der Kolben nochmals mit 2 mL ACN gespült und die beiden Lösungen vereinigt. Für die Messung an der analytischen HPLC wurden 10 µL als Injektionsvolumen gewählt. Der Rest der Lösungen wurde bei -20°C gelagert.

**Chemikalien und Geräte:**

Agilent Technologies 1200 Series:

Pumpe:	Quat Pump, G1311A
Steuergeräte:	ChemStation
Detektor:	Agilent preparative flow cell S3, 10mm path length, Belastungsgrenze 120bar, DAD G1315D
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18 100M, 250x4,6 mm (5 µm)
Flussgeschwindigkeit:	1 mL/min

ThermoFisher TSQ Vantage (= HPLC-MS/MS):

Betriebssoftware:	Thermo Xalibur
Scan time:	0,5 sec.
Injektionsvolumen:	20 µL
Coll. Energy:	19 V

#### 4.1.4 Auftrennung der gesammelten Fraktionen

Da durch Messungen an der analytischen HPLC-DAD bei den gesammelten Fraktionen nur eine geringe Reinheit dieser festgestellt werden konnte, wurden diese erneut über die semipräparative Säule (siehe 4.1.2) aufgetrennt. Beim ersten Lauf der gesammelten Fraktion 8 wurden dafür 1,8 mL injiziert. Da aber auf Grund der unzureichenden Peakschärfe erkannt werden konnte, dass das Injektionsvolumen zu hoch gewählt war, wurden bei den folgenden Läufen nur noch jeweils 1 mL injiziert. So wurden je gesammelter Fraktion vier bis fünf neue Fraktionen erhalten, welche am SpeedVak eingeeignet und bis zur Messung bei 4°C gelagert wurden. Diese neuen Fraktionen wurden ebenfalls mittels HPLC-DAD analysiert (siehe 4.1.3), wobei festgestellt wurde, dass bei den Fraktionen von den gesammelten Fraktionen 6, 9 und 10 die Toxine nur in einer so geringen Konzentration vorlagen, dass sich eine weitere Aufreinigung nicht auszahlte. Auch bei der gesammelten Fraktion 8 funktionierte die Aufreinigung nicht so wie gewünscht. ATX-II wurde stattdessen scheinbar über alle Fraktionen in sehr geringen Mengen verteilt, gleichzeitig war eine Trennung von den anderen Toxinen nicht der Fall. Bei dem Versuch, eine dieser Fraktionen erneut einzurotieren und den Rückstand in 2 mL Methanol zu lösen, konnte bei der Messung gar kein ATX-II gefunden werden. Bei späteren Messungen einiger dieser Proben, die bei 4°C gelagert worden waren, wiesen diese ebenfalls kein ATX-II mehr auf und auch die Intensität der anderen Toxinpeaks war drastisch gesunken. Deswegen wurde vermutet, dass ATX-II in der wässrigen Lösung bei 4°C nicht stabil ist, sondern nach einiger Zeit zerfällt.

Da dies aber erst später festgestellt wurde, wurden noch neue Proben mit einem der Mykotoxinextrakte (siehe 4.2.1) hergestellt und ebenfalls versucht, aus diesen ATX-II zu isolieren. Dieser Extrakt wurde 1:3 mit Methanol verdünnt, da sich ansonsten Schwebstoffe bildeten. Allerdings wies dieser Extrakt ein anderes Toxinprofil auf, das wesentlich weniger ATX-II im Vergleich zu anderen Inhaltsstoffen enthielt, da er aus einem anderen Mykotoxinsubstrat hergestellt wurde. Da die Proben außerdem bei 4°C gelagert worden waren (die Messungen, die bestätigten, dass die Lösungen nicht bei 4°C lagerfähig sind, wurden erst aufgrund eines Verdachtes, der bei Arbeiten mit diesen neuen Proben kam, gemacht), war es gänzlich unmöglich ATX-II aus diesen Proben zu isolieren.

## 4.2 Hauptversuch ATX-II-Isolierung

### 4.2.1 Herstellung der Mykotoxinextrakte

Das jeweilige Mykotoxinsubstrat (eine orange bis bräunliche Substanz sehr zähflüssiger Natur, unterschiedlicher Menge) wurde mit 5 mL 60%igem Methanol ausgeschüttelt, anschließend wurde der Feststoff für drei Minuten bei 300 rpm abzentrifugiert und der Überstand mit Hilfe einer 1 mL Eppendorf-Vollpipette entnommen. Dieser Prozess wurde mit einem Substrat vier Mal wiederholt, wo der Extrakt stark gelblich bis orangefarben wirkte, die Farbe aber mit jeder weiteren Extraktion heller wurde, wobei die letzte Extraktion nur noch leicht gelblich bis klar war. Die vier Extrakte eines Mykotoxinsubstrats wurden miteinander vereinigt, wobei abhängig von der ursprünglichen Menge an Mykotoxinsubstrat meist auch die Farbe intensiver war. Die so gewonnenen 20 mL Mykotoxinextrakt pro Mykotoxinsubstrat wurden bei -20°C gelagert.

### 4.2.2 ATX-II Isolierung

Mit der gewählten Methode nach Schwarz (2012) konnte die gewünschte Auftrennung erzielt werden. Dafür wurden die zuvor hergestellten Mykotoxinextrakte (siehe 4.2.1.) verwendet.

Aufreinigung von ATX-II über die semipräparative HPLC:

Ein Teil des Mykotoxinextraktes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dort 1:3 mit Methanol verdünnt. Von diesem Extrakt wurden 2-4 mL (abhängig von der Farbintensität der Lösung) auf die semipräparative Säule injiziert.

Es wurde ein isokratischer Gradient (43% [0,1% FAc]/57% [MeOH]) gewählt, der andere Toxine zu Gunsten von ATX-II diskriminiert, wodurch andere Toxine nicht an der Säule retardieren konnten bzw. erst beim spülen erneut eluierten. Außerdem wurde die Flussgeschwindigkeit auf 13 mL/min erhöht, wodurch ein chromatografischer Lauf nur noch 45 Minuten dauerte. Der gerätetechnische Aufbau wurde wie bei den Vorversuchen beibehalten.

In diesem isokratischen Lauf waren nur noch vier Peaks zu erkennen. Der erste Peak dürfte anhand seiner Retentionszeit und seiner Größe von Tenuazonsäure stammen, welche nicht benötigt und deshalb nicht gesammelt wurde. Aus der Literatur (Schwarz et al., 2012) war bekannt, dass der Alertoxin II Peak (fortan genannt Peak 3) nach ungefähr 33 Minuten eluiert. Der Peak, der zu dieser Zeit eluierte, so wie die zwei anderen unbekannt Peaks, wurden getrennt gesammelt. Die so erhaltenen Fraktionen wurden bei -20°C gelagert.

Vier bis fünf Fraktionen (je nach erhaltenen Volumen) der gleichen Art wurden in einem Rundkolben vereinigt und am Rotavapor ohne Erhitzung abrotiert. Da sich nicht die ganze Wasserphase abrotieren ließ, wurde das verbliebene Volumen mit insgesamt 60-80 mL Dichlormethan (abhängig von dem Volumen der auszusüttelnden Wasserphase) ausgeschüttelt, wobei jeweils ca. 20 mL Dichlormethan zum Ausschütteln verwendet und die Volumina an Dichlormethan in einem Rundkolben vereinigt wurden.

Das Dichlormethan wurde am Rotavapor abgezogen und der Rückstand in 1 mL Acetonitril aufgenommen. Durch mehrmaliges Schwenken und Ultraschallen für 2-5 sec. sollte gewährleistet werden, dass ATX-II quantitativ überführt wurde. Die so erhaltene Toxinlösung wurde in ein Eppendorfgefäß überführt, der Kolben auf dieselbe Weise mit 1 mL ACN nachgespült und die Lösungen im Eppendorfgefäß vereinigt. Diese wurden bei -80°C bis zur Reinheitsüberprüfung per HPLC-DAD gelagert.

### **Chemikalien und Geräte:**

Semipräparative HPLC- Knauer System:

Pumpe:	KNAUER Smartline Pump 1000
Steuergeräte+Software:	ClarityChrom in Kombination mit ChemStation
Detektor:	Agilent preparative flow cell S3, 3mm path length
Säule:	Luna C18, 250x21,20 mm; 5 µm
Flussgeschwindigkeit:	13 mL/min
Isokratischer Gradient:	43% 0,1% FAc : 57% MeOH
Injektionsvolumen:	3 mL

#### 4.2.3 Untersuchung der Fraktionen mittels HPLC-DAD

Zum analytischen Nachweis der Fraktionen wurden 50 µL der Toxinlösung aus den Eppendorfgefäßen entnommen und in ein HPLC-Gefäß überführt. Es wurden 10 µL von der Probe in die HPLC-DAD injiziert, wobei der Geräteaufbau und der Gradient wie bei den Vorversuchen (siehe 4.1.3) gleich belassen wurden. Die Probe wurde dabei erneut bei mehreren Wellenlängen (280,8 nm; 340,8 nm; 262,8 nm) gemessen, wobei die Messung bei 262,8 nm zur Auswertung und der Berechnung der ATX-II-Menge verwendet wurde.

Um die Menge an enthaltenem ATX-II zu bestimmen wurden alle Peaks im Chromatogramm zuerst mit den Signalen der mitgeführten Blanks (10 µL ACN vor jeder Messung) verglichen.

Wenn die Signale auch im Blank zu sehen waren, wurden sie aus der Liste der auszuwertenden Peaks herausgestrichen. Anschließend wurden die Peakflächen aller verbliebenen Signale addiert und durch die Peakfläche von ATX-II dividiert. Dadurch konnte zwar keine genaue Konzentration von ATX-II in der Lösung, aber der Mengenanteil von ATX-II in den 2 mL ACN bestimmt werden. Im Durchschnitt lag dieser Mengenanteil bei  $83,2 \pm 3,8\%$ .

### Chemikalien und Geräte:

Analytische HPLC - Agilent Technologies 1200 Series

Pumpe:	Quat Pump, G1311A
Steuergeräte:	ChemStation
Detektor:	Agilent preparative flow cell S3, 10mm path length, Belastungsgrenze 120bar
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18(2) 100M, 250x4,6 mm (5 $\mu$ m)
Flussgeschwindigkeit:	1 mL/min

### 4.3 ATX-II Aufreinigung

Um die Reinheit der ATX-II-Lösung auf mindestens 90% (im optimal Fall für spätere Analysen mind. über 93%) zu verbessern, wurde die weitere Aufreinigung mit einer Festphasenextraktion durchgeführt. Dafür wurden Lichrolut RP18, 3 mL-Säulen von Merck verwendet.

Aufgrund von Erfahrungswerten in der Arbeitsgruppe wurden dafür unterschiedlich konzentrierte ACN-Verdünnungen verwendet. Beim ersten Versuch wurden 9 Säulen auf eine Kammer mit angeschlossener Pumpe gesteckt. Zur Äquibilierung der Säule wurde zuerst mit 3 mL ACN und dann mit 3 mL bidestilliertem Wasser gespült. Es wurde bei jedem Spül- und Elutionsschritt darauf geachtet, dass die Säule nicht trocken läuft. In der Zwischenzeit wurden ältere ATX-II-Proben und eine Probe unbekannter Menge neu hergestelltes, nicht reines ATX-II in insgesamt 5 mL ACN gelöst und diese Lösung dann 1:10 mit bidestilliertem Wasser verdünnt. Diese wurde gleichmäßig auf die Säulen aufgebracht.

Sobald diese auf der Säule geladen waren, wurden die Säulen jeweils mit 2 mL bidestilliertem Wasser gewaschen. Für die Elution wurden jeweils 2 mL einer 10%, 20% und 30% ACN-Lösung hintereinander aufgebracht und in einem Tube gesammelt. Danach wurde mit je 2 mL 40%, 50% und 60% ACN eluiert und diese Fraktionen ebenfalls in einem Tube

aufgefangen, wobei ab hier die Migration einer gelben Bande sichtbar war. Zum Schluss wurde die Säule drei Mal mit je 3 mL reinem ACN gespült und dieses gesammelt.

Um die Proben analysieren zu können, wurden sie ähnlich aufgearbeitet, wie zuvor bei der Trennung des Rohextrakts. Die Fraktion mit 100% ACN wurde komplett am Rotavapor abrotiert, die Fraktion mit 40-60% ACN (dementsprechend insgesamt eine 50% ACN-Lösung) wurde zuerst abrotiert, das nicht abrotierbare Volumen mit 60 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt und dieses danach abrotiert. Die 0-30% Fraktion wurde direkt mit 60 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt und abrotiert. Danach wurden die Fraktionen jeweils in insgesamt 2 mL ACN (siehe 4.2.2) gelöst und auf ihren ATX-II-Gehalt untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die ATX-II-Fraktion in der 40-60% Fraktion beinhaltet war, diese allerdings auch noch stark mit anderen Substanzen verunreinigt war. Außerdem wurden noch Peak 1 und Peak 2 über dieselben Säulen aufgetrennt, um diese auf die enthaltenen Mykotoxine zu untersuchen. Dafür wurde die Probenaufarbeitung jeweils leicht abgeändert. Bei der Trennung von Peak 2 wurde zweimal mit 2 mL bidestilliertem Wasser gespült und außerdem die Fraktionen 10% und 20%, die Fraktionen 30% und 40% sowie die Fraktionen 50% und 60% extra aufgefangen. Die nachfolgende Aufarbeitung erfolgte wie bei Peak 3 (dem ATX-II-Peak). Es wurde festgestellt, dass keine dieser Fraktionen ein Mykotoxin in einer Menge enthielt, die den zusätzlichen Aufwand gerechtfertigt hätte. Dies gilt auch für Peak 1 bei dem auf 8 Säulen die Auftrennung in die Fraktionen 0-30%, 40-50%, 60% und 100% ACN erfolgte.

Aufgrund der Beobachtungen von der ersten Aufreinigung wurde die Fraktion 40-60% ACN von Peak 3 nochmals über 4 Säulen aufgetrennt, wobei die ATX-II-Lösung nur 1:5 verdünnt wurde. Die Extraktionsschritte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Es wurden nun alle Eluate einzeln in Tubes aufgefangen. Bei der Extraktion konnte beobachtet werden, dass bereits ab dem Spülen mit 30% ACN die Bande eluierte und diese bei 40% ACN gänzlich von der Säule gespült wurde. Erneut wurden die Proben mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ausgeschüttelt (wie oben beschrieben), die Fraktion mit 60% ACN wurde vorher am Rotavapor so weit wie möglich eingengt und bei der Fraktion mit 100% ACN wurde das gesamte Volumen am Rotavapor abgezogen.

Da sich das ATX-II offensichtlich (gelbe Bande) im Eluat bei 40% ACN befand, wurde das bidestillierte Wasser zusammen mit den Eluaten von 10%, 20% und 30% ACN aufgefangen. Die 40% ACN-Fraktion wurde in einem neuen Tube aufgefangen, sowie auch bei 50%, 60% und 100% ACN. Alle ATX-II-Rohextrakte wurden mit dieser Methode über die SPE-Säulen aufgetrennt. Nach dem Ausschütteln mit Dichlormethan und abrotieren desselbigen wurden die Rückstände in 1 mL ACN aufgenommen, kurz im Kolben geultraschallt, um das ATX-II besser lösen zu können und in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Der Kolben wurde mit 1 mL

ACN nachgespült und dieses mit der ATX-II-Lösung vereinigt. Zur Reinheitsuntersuchung wurden 10 µL in die analytische HPLC-DAD injiziert und das Chromatogramm ausgewertet. Der Alkyltoxins II-Gehalt wurde wie unter 4.2.3 berechnet.

**Tabelle 3: Extraktion von ATX-II von SPE-Kartuschen**

Volumen [mL]	Lösungsmittel
2 x 3	H <sub>2</sub> O <sub>dd.</sub>
2	10% ACN
2	20% ACN
2	30% ACN
2 x 2	40% ACN
2	50% ACN
2	60% ACN
6	100% ACN

Anschließend wurden die ATX-II-Lösungen ähnlicher Reinheit miteinander vereinigt und dreimal mit je 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ausgeschüttelt. Das Dichlormethan wurde am Rotavapor fast bis zur Trockene eingengt und der Rückstand in ein Tube überführt. Der Kolben wurde mit zweimal 2 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nachgespült und die 4 mL mit dem Rückstand vereinigt. Die Lösung wurde auf jeweils vier Eppendorfgefäße aufgeteilt und das CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> durch vorsichtiges Verdampfen an der SpeedVak entfernt. Das ATX-II wurde bei -80°C gelagert. Eines dieser Aliquots wurde zur Reinheitsmessung der Charge verwendet. Dafür wurde ATX-II in 1 mL ACN gelöst und wie oben (siehe 4.2.3) beschrieben die Reinheit des Aliquots analysiert. Danach wurde das ACN vorsichtig an der SpeedVak abgedampft. Ein Aliquot wurde weiters mit der QTOF-MS untersucht. Für die erhaltenen Ausbeuten siehe 5.3.

### **Chemikalien und Geräte:**

Analytische HPLC - Agilent Technologies 1200 Series

Pumpe:	Quat Pump, G1311A
Steuergeräte:	ChemStation
Detektor:	Agilent preparative flow cell S3, 10mm path length, Belastungsgrenze 120bar
Säule:	Phenomenex Luna 5u C18(2) 100M, 250x4,6 mm (5 µm)

Flussgeschwindigkeit:	1 mL/min
maXis von Bruker (=QTOF-MS):	
Software:	Compass 1.3

#### 4.4 Zellkultur

Als Versuchssystem wurden HT29-Zellen ausgewählt. Dabei handelt es sich um eine Kolon Adenokarzinom Zelllinie, die aus dem Tumor einer Patientin kaukasischen Ursprungs stammen. Als Medium wurde DMEM mit 10% FKS und 1% P/S verwendet.

##### 4.4.1 Passagieren

Die Zellen wurden regelmäßig auf ihr Wachstum, also die Zelldichte in der Flasche, kontrolliert. Wenn eine Konfluenz von ca. 70% vorhanden war, wurden die Zellen passagiert.

Um die Zellen zu passagieren wurde zuerst das Medium abgesaugt und die Zellen mit 10 mL PBS (37°C) gespült. Danach wurde das PBS abgesaugt und es wurden ca. 1-2 mL Trypsin (ebenfalls 37°C) möglichst flächendeckend und gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Die Inkubation mit Trypsin dauerte 3 Minuten und wurde bei 37°C im Brutschrank bei 5% CO<sub>2</sub> durchgeführt, wodurch sich die Zellen von der Zellkulturflasche ablösten. Die Trypsinreaktion wurde mit 10 mL 10% FKS-Medium abgestoppt und die Zellen mit der Pipette vereinzelt. Die Zellsuspension wurde in ein 50 mL Tube überführt und darin die Zellen erneut vereinzelt. Aus der Zellsuspension wurden, abhängig von der vorhandenen Menge an Zellen und wann diese als nächstes benötigt wurden, 0,5 - 1 mL entnommen und zurück in die Zellkulturflasche pipettiert. Um den Zellen, die für das Wachstum nötigen Nährstoffe zukommen zu lassen, wurden noch 40 ml 10% FKS-Medium hinzupipettiert.

##### 4.4.2 Mediumwechsel

Im Fall, dass die Zellen noch nicht „dicht genug“ zum passagieren waren, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen wie beim Passagieren mit 10 mL 37°C warmen PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden 50 mL warmes (37°C) 10% FKS-Medium in die Zellkulturflasche geleert und die Flasche zurück in den Brutschrank gestellt.

##### 4.4.3 Ausstreuen

Zum Ausstreuen der Zellen wurde zuerst mit Hilfe einer Neubauerzählkammer mittels Anfärben mit Tryphanblau die Zellzahl durch Auszählen unter dem Mikroskop bestimmt. Daraus wurde die Zellzahl im Zellysat errechnet wodurch das benötigte Volumen zum Ausstreuen ermittelt werden konnte. Das benötigte Volumen an 10% FKS-Medium und

Zelllysate wurden in einem Gefäß vereinigt und durch auf- und abpipettieren homogenisiert. Es wurden 10 mL Zelllösung pro Platte (10 cm Durchmesser) ausgestreut. Die Zellen wurden anschließend für 48h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### Verwendete Lösungen:

- PBS:
- 10 x PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)
  - 1710 mM (100 g) NaCl
  - 100 mM (14,2 g) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 34 mM (2,54 g) KCl
  - 18mM (2,45 g) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> auf 1 L auffüllen (pH=7,4)
  - steril filtrieren, 1:10 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnen und autoklavieren

## 4.5 tGSH-Assay

Die eigentliche Durchführung erfolgte nach der, in der Dissertation von Gehrke beschriebenen Methode (Gehrke, 2012). Es wurde lediglich ein tGSH-Assay durchgeführt, aber kein GSH-Assay nach Ellman.

### Durchführung des tGSH-Assays:

#### 4.5.1 Testversuche zum tGSH-Assay mit AOH und AME

Um die Methode kennenzulernen wurde der Assay zunächst zwei Mal mit Testsubstanzen durchgeführt. Verwendet wurden dafür AOH und AME. Da diese Substanzen ein anderes Löslichkeitsverhalten als Alertoxin II aufweisen, wurde bei den Testversuchen DMSO (1%) als Negativkontrolle verwendet, da die Substanzen in DMSO gelöst wurden. Bei den Hauptversuchen wurde Ethanol (0,1%) als Negativkontrolle eingesetzt. Für die beiden Testversuche wurde jeweils lediglich eine Stunde mit den Testsubstanzen inkubiert, bei den Hauptversuchen wurden zudem auch drei und 24 Stunden Inkubationen durchgeführt.

Ausstreuen:

Sobald die Zellen (HT29) eine Konfluenz von ca. 70-80% in der Zellkulturflasche erreicht hatten, wurden sie mittels Tryphanblautest ausgezählt und in sechs Platten mit einem Durchmesser von 10 cm zu je 1.6 Mio. Zellen pro Platte ausgestreut.

#### Inkubation:

Als Negativkontrolle (NK) wurde DMSO (1%) und als Positivkontrolle (PK) für das erste Experiment 4-Vinylpyridin (0,01%) und für das zweite Experiment 2-Vinylpyridin (0,01%) mitgeführt. Bei AOH und AME wurden beim ersten Experiment Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  und beim zweiten Experiment die Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  untersucht.

#### Durchführung der Inkubation:

Die Platten wurden auf die richtige Konfluenz (ca. 80%) überprüft. Es wurden je 8 mL warmes (37°C) 0% FKS-Medium in sechs 15 mL Tubes vorgelegt. Jedes Tube wurde mit einer Inkubationssubstanz (2x AOH, 2x AME, NK) durch Zugabe von 80  $\mu\text{L}$  bzw. 0,8  $\mu\text{L}$  (PK) versehen, um die gewünschte Zielkonzentration im Medium zu erhalten. Die Platten wurden aus dem Inkubator entnommen und das 10% FKS-Medium abgesaugt. Die Zellen wurden einmal mit 5 mL PBS (37°C) gespült, die vorbereiteten Inkubationslösungen daraufgekippt, die Platten beschriftet und zurück in den Inkubator gestellt, wo sie für eine Stunde bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  verblieben.

#### Ende der Inkubation:

Nach einer Stunde wurde die Inkubation beendet. Das Medium wurde abgesaugt, danach jede Platte zweimal mit 5 mL PBS (37°C) gespült. Es wurde anschließend jede Platte mit je 1 mL Trypsin (37°C) inkubiert und erneut für 3 min im Inkubator belassen.

Sobald die Inkubation beendet war, wurden die Platten aus dem Inkubator entnommen und die restliche Aufarbeitung unsteril durchgeführt. Mit 1 mL 10% FKS-Medium wurde bei jeder Platte die Trypsinreaktion gestoppt. Die Zellen wurden mit Hilfe der Pipette abgelöst und in vorbeschriftete 5 mL Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde jede Platte noch jeweils zweimal mit 1 mL 0% FKS-Medium gespült und in demselben Reaktionsgefäß vereinigt. Die Zelllösungen wurden kurz gevortext und jeweils 20  $\mu\text{L}$  für eine Viabilitätsmessung in ein 1,5 mL Eppendorfgefäß überführt. Die restliche Zelllösung wurde für 15 min, bei 4°C und 420g zentrifugiert. Währenddessen wurden die entnommenen 20  $\mu\text{L}$  mit 180  $\mu\text{L}$  Tryphanblau versetzt, kurz gevortext und anschließend 10  $\mu\text{L}$  dieser Lösung in einer Neubauerzählkammer auf ihre Viabilität ausgezählt. Nach Beendigung der Zentrifugation wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen und verworfen und das entstandene Pellet in 1 mL A/B-Puffer resuspendiert. Diese Lösung wurde erneut für 10 min bei 4°C und 420g zentrifugiert. Für die nachfolgende Proteinbestimmung wurden je 90  $\mu\text{L}$  A/B-Puffer (für eine Doppelbestimmung) in Eppis vorgelegt. Bei den fertig abrotierten Zelllösungen wurde vorsichtig der Überstand quantitativ abgenommen und verworfen und das Pellet gänzlich in 370  $\mu\text{L}$  A/B-Puffer gelöst. Es wurden je Inkubation zweimal 10  $\mu\text{L}$  für die Proteinbestimmung entnommen und mit den vorgelegten 90  $\mu\text{L}$  A/B-Puffer vereinigt. Die

restlichen 350 µL wurden mit 350 µL 10% 5-Sulfosalicylsäure versetzt und diese weißlich gefärbte, trübe Lösung quantitativ in ein 2 mL Eppi überführt. Anschließend wurden die Suspensionen für 15 min auf Eis stehen gelassen, dann kurz gevortext und abzentrifugiert (10 min, 4°C, max. Geschw.). Der Überstand wurde abgenommen und in einem neuen 2 mL Eppendorfgefäß gesammelt. Dieses wurde dann bei -80°C für den tGSH-Assay gelagert. Die Proben zur Proteinbestimmung wurden zeitgleich mit der BCA-Methode (siehe 4.6) aufgearbeitet, um den Proteingehalt zu bestimmen.

#### 4.5.2 GSH-/ GSSG-Messung

Die Proben einer Aufarbeitung wurden auf Eis aufgetaut. Außerdem wurden für die GSSG-Messung je Probe in ein Eppendorfgefäß 100 µL TEA-Lösung vorgelegt. Sobald die Proben aufgetaut waren, wurden sie noch einmal abzentrifugiert und wieder auf Eis gestellt. 500 µL des Probenüberstandes wurden zu den vorgelegten 100 µL TEA pipettiert. Unter dem Abzug wurden weiters 20 µL 2-VP zur Blockierung des, in der Probe frei vorliegenden, GSHs hinzugefügt und für 1 h bei 26°C und 1300 rpm im Dunkeln inkubiert.

##### tGSH-Messung:

Für die tGSH-Messung wurden jeweils 10 µL der GSH-Standards und der Proben als Dublikate in eine 96-Well-Platte pipettiert. Der Reaktionsmix für die GSH-Messung wurde fertig hergestellt und 190 µL dieser Lösung mit einer Mehrkanalpipette zu den Proben in die Wells pipettiert. Sofort danach wurde die erste Messung durchgeführt, wobei die Well-Platte vorher im Platerader für 30 Sekunden geschüttelt wurde und erst dann die Absorption bei 405 nm bestimmt wurde. Eine zweite Messung erfolgte exakt zwei Minuten danach, ebenfalls bei 405 nm.

##### GSSG-Messung:

Nach der einstündigen Inkubation wurden die GSSG-Proben wieder auf Eis gestellt. Je 20 µL Probe-/Standardlösung wurde pro Well als Dublikat vorgelegt. Ähnlich wie bei der GSH-Vorbereitung wurde auch hier der GSSG-Reaktionsmix fertig hergestellt, wobei er sich vom Mischungsverhältnis etwas von der GSH-Mischung unterschied. Von dem fertigen Mix wurden mit der Mehrkanalpipette je 180 µL zu jeder vorgelegten Probe und jedem vorgelegten Standard hinzupipettiert. Diese Platte wurde ebenfalls 30 Sekunden geschüttelt bevor sie bei 405 nm vermessen wurde. Nach 10 Minuten wurde die zweite Messung durchgeführt.

Zur Berechnung der Konzentrationen wurden zuerst die Mittelwerte aus den Dublikaten gebildet und anschließend die Ergebnisse der ersten Messung von den Ergebnissen der

zweiten Messung abgezogen. Über die Standardgeraden wurde eine Kalibriergerade erstellt und durch Einsetzen in die Geradengleichung die Konzentration an GSH/GSSG erhalten.

### Verwendete Lösungen:

Puffer A:	125 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8 mM EDTA; mit bidestillierten Wasser auf 250 mL auffüllen, Lagerung bei 4°C
Puffer B:	125 mM $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 8 mM EDTA; mit bidestillierten Wasser auf 250 mL auffüllen, Lagerung bei 4°C
A/B-Puffer:	15 Teile Puffer A auf 85 Teile Puffer B; Lösung immer frisch ansetzen und auf Eis aufbewahren
5-Sulfosalicylsäure-Lösung:	5% (w/v) bzw. 10% (w/v) gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , Lagerung bei 4°C
GSH-Stammlösung (1 mM):	30,736 mg in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, 200 $\mu\text{L}$ der GSH-Lsg. in 19,8 mL 5% - 5-Sulfosalicylsäure verdünnt= 20 Aliquote á 1 mL, bei -80°C gelagert
GSSG-Stammlösung (1 mM):	61,262 mg in 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst, 200 $\mu\text{L}$ der GSSG-Lsg. in 19,8 mL 5% - 5-Sulfosalicylsäure verdünnt= 20 Aliquote á 1 mL, bei -80°C gelagert
Triethanolamin (TEA):	reines TEA 50% (v/v) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ verdünnt
0,5% - $\text{NaHCO}_3$ -Lösung:	0,5% (w/v) in 25 mL, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ gelöst
DTNB-Lösung (6 mM):	7,134 mg DTNB in 3 mL A/B-Puffer lösen, für jede Messung frisch ansetzen, auf Eis lagern
NADPH-Lösung (20 mM):	9,999 mg NADPH in 0,6 mL 0,5%- $\text{NaHCO}_3$ lösen, immer frisch ansetzen, auf Eis lagern
Glutathionreduktase (GR)-Lösung (50 U/mL):	GR-Stammlösung auf 50 U/mL mit A/B-Puffer verdünnen, immer frisch ansetzen, auf Eis aufbewahren

### Reaktionsmix-Zusammensetzungen:

tGSH-Reaktionsmix:	A/B-Puffer	164 $\mu$ L
	DTNB-Lösung	20 $\mu$ L
	NADPH-Lösung	4 $\mu$ L
	GR-Lösung	2 $\mu$ L
Zusammensetzung für ein Well der Platte, Reaktionsmix darf erst unmittelbar vor der Messung hergestellt werden!		
GSSG-Reaktionsmix:	A/B-Puffer	154 $\mu$ L
	DTNB-Lösung	20 $\mu$ L
	NADPH-Lösung	4 $\mu$ L
	GR-Lösung	2 $\mu$ L
Zusammensetzung für ein Well der Platte, Reaktionsmix darf erst unmittelbar vor der Messung hergestellt werden!		

#### 4.5.3 tGSH bei Inkubation mit ATX-II

Da Alertoxin II in DMSO (1%) unlöslich ist, wurde es in Ethanol gelöst. Dementsprechend wurde bei den Tests mit ATX-II reines Ethanol als Negativkontrolle (0,1%) verwendet. Um die Wirkung von ATX-II auf Zellen besser untersuchen zu können, wurden neben unterschiedlichen Inkubationszeiten (eine, drei und 24 Stunden) auch unterschiedliche Medias verwendet, einmal mit bzw. ohne 10% FKS. Nur bei den 24 Stunden-Inkubationen wurde immer mit 10% FKS inkubiert, da ansonsten die Zellen unterversorgt gewesen und abgestorben wären.

#### Ausstreuen:

Bei 1 h Inkubationen (sowohl mit 0% FKS als auch mit 10% FKS) sowie bei 3 h Inkubationen mit 10% FKS wurden 1,6 Mio. Zellen pro Platte ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen. Im Falle einer 3 h Inkubation mit 0% FKS wurde 1 Mio. Zellen ausgestreut und über einen Anwachszeitraum von 72 Stunden anwachsen gelassen. Für die 24 h Inkubationen wurden jeweils 1,2 Mio. Zellen pro Platte ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen.

#### Inkubation:

Für die Inkubation mit ATX-II wurde wie oben beschrieben 0,1% Ethanol (v/v) als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle diente bei den Kurzzeitinkubationen (eine

und drei Stunden Inkubationen) 2-Vinylpyridin (0,01% v/v), bei den Langzeitinkubationen (24 Stunden) wurde 200  $\mu\text{M}$  tert-Buthylhydrochinon (tBHQ) benutzt, da 2-VP zu toxisch ist. Bei einigen 24 Stunden Inkubationen wurde weiters 1 mM L-Buthionin-sulfoximin (BSO) als Positivkontrolle mitgeführt, wobei zuerst versucht wurde dieses in Ethanol und später in PBS zu lösen, es in beiden Fällen allerdings zu Löslichkeitsproblemen kam. Untersucht wurden die GSH-Veränderungen bei ATX-II-Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ .

#### Durchführung:

Die Platten wurden auf die richtige Konfluenz (ca. 80%) überprüft. Danach wurden jeweils 8 mL warmes (37°C) 0% FKS-Medium bzw. 10% FKS-Medium in fünf (bzw. sechs) 15 mL Tubes vorlegt. Jedes Tube wurde mit einer Inkubationssubstanz angereichert, so dass die gewünschte Inkubationskonzentration erhalten wurde. Die Zellen wurden einmal mit 5 mL warmen (37°C) PBS gespült und die vorbereiteten Inkubationslösungen daraufkippt. Die Platten wurden für die jeweilige Inkubationsdauer (1 h, 3 h oder 24 h) bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  inkubiert.

#### Ende der Inkubation:

Anschließend wurde jede Platte zweimal mit 5 mL warmen PBS (37°C) gespült, 1 mL Trypsin (37°C) auf der gesamten Platte verteilt und für 3 Minuten im Inkubator inkubiert.

Die Aufarbeitung der Platten erfolgte auf dieselbe Art wie bei den Vorversuchen (siehe 4.5.1).

Auch die GSH und GSSG-Bestimmung wurde wie bei den Vorversuchen durchgeführt (siehe 4.5.2), wobei nicht nach jeder Aufarbeitung gemessen wurde, sondern meist 2-4 Aufarbeitungen gleichzeitig untersucht wurden. Je nach Bedarf wurden zusätzliche Eppendorfgefäße hergerichtet.

#### Verwendete Lösungen:

t-BHQ (200 $\mu\text{M}$ ):	1,662 mg in 50 $\mu\text{L}$ EtOH lösen, vor Inkubation immer frisch ansetzen
BSO (1 mM):	4,446 mg in 20 $\mu\text{L}$ PBS lösen (Löslichkeitsproblem!), vor Inkubation immer frisch ansetzen

## 4.6 BCA-Methode

Die BCA-Methode erlaubt es den Proteingehalt von Zelllösungen zu bestimmen, in denen Trypsin enthalten ist. Dies ist mit der Bradford-Methode nicht möglich. Für die BCA-Messung werden drei Lösungen benötigt: Eine Bichinonsäure-Lösung, eine Kupfer-(II)-sulfat-Lösung und die zu untersuchende Probe. Je nach Proteingehalt der Lösung färbt sich diese nach der Inkubation unterschiedlich grün bis blau. Während eine Lösung ohne Protein (Negativkontrolle) sich hell Türkis färbt, sind Proben mit hohem Proteingehalt in einem kräftigen blau-violett. Dies erfolgt durch die Bildung eines  $\text{Cu}^{2+}$ -Komplexes im alkalischen Bereich, der durch Reduktion des  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  und anschließender Reaktion des  $\text{Cu}^+$  mit 2 BCA-Molekülen einen violetten Komplex bildet, welcher im alkalischen Milieu stabil ist. Die Menge an reduzierten Cu-Ionen ist dabei proportional zur Proteinmenge, da die Reduktion durch die Peptidbindung der Proteine hervorgerufen wird. Da allerdings auch einige Aminosäuren diesen reduzierten Effekt haben, können die Ergebnisse bei Proteinsequenzen mit einem hohen Anteil dieser Aminosäuren (z.B. Cystein, Tyrosin) verfälscht werden. Die Proteinkonzentration in der Probe wird über eine mitgemessene Proteinstandardkurve bestimmt. Dafür wird die Geradengleichung der Standardgerade bestimmt, diese umgeformt und daraus die Konzentration errechnet. Der so erhaltene Wert wird anschließend noch mit 10 multipliziert, da die Probe zuvor 1:10 mit A/B-Puffer (10  $\mu\text{L}$  auf 90  $\mu\text{L}$ ) verdünnt wurde.

### 4.6.1 Durchführung (BCA-Vorversuch)

Auf diese Art wurde der Proteingehalt der Lösungen der Vorversuche vom tGSH-Assay untersucht. Die Standardgerade wurde aus einer 1 mg/mL BSA-Stammlösung hergestellt. Der Konzentrationsbereich wurde von 0,2 mg/mL bis 1 mg/mL festgelegt, die Stammlösung in  $\text{H}_2\text{O}$  bidest. verdünnt.

Fünzig Teile von Reagenz A (Bichinonsäure-Lösung) wurden mit einem Teil Reagenz B (Kupfersulfat-Lösung) versetzt. Zu den jeweils 100  $\mu\text{L}$  Probe wurden 700  $\mu\text{L}$  BCA-Reagenz zugesetzt und diese für 30 min bei 37°C und 1300 rpm inkubiert. 25  $\mu\text{L}$  der Standardlösungen und des Blindwerts (50  $\mu\text{L}$  A/B-Puffer + 50  $\mu\text{L}$  10% SSA) wurden als Dublikat in eine 96-Well-Platte pipettiert, mit 175  $\mu\text{L}$  BCA-Reagenz versetzt und für 30 min bei 37°C und 5%  $\text{CO}_2$  im Inkubator inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation der Proben wurden diese auf Eis gestellt um eine weitere Reaktion zu unterbinden und je 200  $\mu\text{L}$  der Standards (als Dublikat) in die Wells der inkubierten Platte pipettiert. Danach wurde die Platte bei  $\lambda = 595 \text{ nm}$  gemessen.

#### 4.6.2 Durchführung (BCA-Hauptversuche)

Diese folgende Art der Durchführung wurde für die eigentlichen Proben verwendet. Zuerst wurde die Standardgerade ebenfalls aus einer 1 mg/mL BSA-Stammlösung hergestellt, die dem BCA-Assay-Kit beilag. Später wurde eine BSA-Stammlösung von Thermo Scientific mit einer Konzentration von 2 mg/mL verwendet. Der Konzentrationsbereich wurde in beiden Fällen gleich belassen, nämlich von 0,2 mg/mL bis 1 mg/mL, allerdings wurde die Stammlösung dieses Mal in A/B-Puffer verdünnt.

Es wurden erneut fünfzig Teile von Reagenz A (Bichinonsäure-Lösung) mit einem Teil Reagenz B (Kupfersulfat-Lösung) versetzt. Zu 100 µL Probe wurden 700 µL BCA-Reagenz hinzupipettiert, weiters wurden 60 µL der Standardlösungen und des Blindwerts (reiner A/B-Puffer) mit 420 µL BCA-Reagenz vermischt und diese zusammen für 30 min bei 37°C und 1300 rpm inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden alle Standardlösungen und Proben auf Eis gestellt und je 200 µL der Lösungen (als Dublikat) in eine 96-Well-Platte pipettiert. Anschließend wurde die Platte bei  $\lambda = 595$  nm gemessen, wobei in diesem Fall auch eine kurze Verzögerung vor der Messung keine wesentlichen Unterschiede in den Messergebnissen lieferte.

#### Verwendete Lösungen:

A/B-Puffer:	15 Teile Puffer A auf 85 Teile Puffer B; Lösung immer frisch ansetzen und auf Eis aufbewahren
10%ige 5-Sulfosalicylsäure-Lösung:	10% (w/v) gelöst in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$ , Lagerung bei 4°C

#### 4.7 Vorversuch mit Kalbsthymus-DNA zu DNA-Addukten

Um das Handling der Methode zu erlernen, wurden Vorversuche nach der Methode von Puppel durchgeführt (Puppel, 2008). Zuerst wurden Stammlösungen von Glycidamid (GA) und Kalbsthymus-DNA (KT-DNA) hergestellt. Für die Stammlösung der KT-DNA wurden 2 mg KT-DNA in 1 mL bidestilliertem Wasser gelöst. Für die Stammlösung des Glycidamids wurden 2 mg Glycidamid in 1 mL BIS-Tris-Puffer gelöst. Beide Lösungen wurden bei -20°C gelagert. Es wurden 0,5 mL der KT-DNA-Lösung mit 0,5 mL GA-Lösung in einem Eppendorfgefäß gemischt, wodurch eine Reaktionsmischung mit einer Konzentration von 1 mg/mL KT-DNA entstand. Weiters wurde noch eine Lösung mit 10 µg/mL hergestellt und beide Lösungen bei 37°C für 24 h geschüttelt.

Die thermische Hydrolyse der Lösungen wurde anschließend durchgeführt. Dazu wurde das genaue Volumen der Lösungen nach dem Schütteln mittels Gilsenpipette bestimmt und die

Probe auf je 200  $\mu\text{L}$  in Eppendorfggefäße aliquotiert. Die Proben wurden 20 Minuten im vorgeheizten Thermoblock bei 98°C thermisch neutral hydrolysiert. Um das Aufspringen der Deckel der Eppendorfggefäße zu vermeiden, wurden diese mit Klammern fixiert und die Thermoplatte zusätzlich mit einem Styroporbehältnis abgedeckt, um das Einwirken von Licht zu unterbinden. Anschließend wurden die Lösungen auf Raumtemperatur abkühlen gelassen um diese dann mit Centrifugal Filter Devices aufzutrennen. Dafür wurden die Zentrifugenröhrchen zuerst mit 100  $\mu\text{L}$  bidest. Wasser befeuchtet und für 10 Minuten bei 1192 rpm zentrifugiert, wobei noch Wasser in den Filtern zu finden war. Das Filtrat so wie das restliche Wasser im Filter wurden verworfen, 200  $\mu\text{L}$  von der Lösung in den Filter des Zentrifugenröhrchens pipettiert und bei 13000 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Die Filter wurden entsorgt und das Filtrat mittels HPLC-MS/MS gemessen. Der Rest der Filtrate wurde bei -20°C gelagert.

Bei der MS-Messung wurde eine Gradientenelution durchgeführt (siehe Tabelle 4). Dabei wurde zuerst im Full Scan Modus gemessen, um eine breite Bandbreite an m/z zu analysieren. Da Aufgrund des hohen Hintergrundsignals aber keine brauchbaren Ergebnisse erzielt werden konnten, wurde weiters eine „Single Reaction Monitoring“ (SRM) Analyse durchgeführt. Bei jeder Messung wurde im positiven Ionenmodus gemessen. Hierbei wurde als Parent-Ion für das Guanin-Addukt nach einem Masse/Ladungs-Verhältnis von  $239 \pm 1$  (was dem errechneten m/z entspricht) gesucht, sowie nach den Fragmenten  $152 \pm 1$  m/z. Für das Adenin-Parent-Ion wurde nach dem Masse/Ladungs-Verhältnis 223 und einem Produkt-Ion mit 88 m/z, sowie 136 m/z gesucht. Weitere Zielionen können der Tabelle 9 entnommen werden. Die Massen 152 m/z und 136 m/z stellen dabei die einfach protonierten Massen von Guanin bzw. Adenin dar.

Derselbe Versuch wurde auch mit ATX-II statt GA durchgeführt. Dafür wurden 20 mM Lösungen (in Ethanol) von ATX-II und AOH hergestellt. Es wurden 500  $\mu\text{L}$  KT-DNA-Stammlösung mit 495  $\mu\text{L}$  BIS-Tris-Puffer und 5  $\mu\text{L}$  20 mM Toxinlösung (entspricht einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{M}$  Toxin) vermischt und auf dieselbe Weise aufgearbeitet, wie die mit Glycidamid inkubierte KT-DNA.

Tabelle 4: Gradient zur Untersuchung der Glycidamid-Addukte auf der HPLC-MS/MS

Zeit [min]	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> + 0,1% FAc	Acetonitril
0	98	2
15	75	25
17	0	100
21	0	100
22	98	2
40	98	2

### Verwendete Lösungen:

BIS-Tris-Puffer: 0,105 g BIS-Tris; 0,0036 g EDTA; in 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> gelöst; pH 7,1 eingestellt

### Chemikalien und Geräte:

ThermoFisher TSQ Vantage (= HPLC-MS/MS):

Autosampler:	Accela Autosampler
Pumpe:	Accela 1250 Pump
Betriebssoftware:	Thermo Xalibur
Säule:	Phenomenex Aqua C-18, 250 x 4,6mm
Flussrate:	0,3 ml/min
Ofentemperatur:	20°C
Tray-Temperatur:	10°C
Scan time:	0,5 sec.
Loop:	5 µL
Injektionsvolumen:	5 µL
Coll. Energy:	19 V

## 4.8 Vorversuch mit HT29-Zellen zu DNA-Addukten

Nachdem im Vorversuch mit reiner DNA und GA die gewünschten Addukte gefunden werden konnten, wurde versucht die Methode (ebenfalls nach Puppel [2008]) auf die Zellkultur

anzuwenden. Dafür wurden sieben Platten mit je 3.850.000 HT29-Zellen in Petrischalen (144 mm Durchmesser) ausgestreut. Nach drei Tagen waren die Platten zu ca. 70% bewachsen. Die Zellen wurden mit 900 µM Glycidamid, welches in 1% DMSO gelöst war, für 22 h inkubiert. Danach wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen je zwei Mal mit 3 mL eiskaltem PBS (4°C) abgespült. Anschließend wurden die Zellen mit je 2 mL PBS abgeschabt und je 3,5 Platten in einem 50 mL Tube vereinigt. Die Platten wurden nochmals mit je 2 mL PBS gewaschen und die Zellsuspension für 10 min bei 4°C bei 1500g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 5 mL PBS (4°C) resuspendiert und die Lösungen vereinigt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet in 10 mL PBS aufgenommen und die Lösung auf 3 Tubes (ungefähr 100 Mio. Zellen/ Tube) aufgeteilt. Die Tubes wurden über Nacht bei -20°C gelagert.

Für die weitere Probenaufarbeitung wurden die Reaktionsgefäße im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und die Zellen für 15 Sekunden mit dem Ultraschallstab vereinzelt und vorlysiert. Danach wurden je 10 mL eines kalten (4°C) Lysepuffers zugegeben sowie 30 mL kaltes bidest. Wasser (4°C). Die Proben wurden 10 Mal über Kopf geschwenkt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 Minuten bei 4°C und 1300g zentrifugiert. Für die weitere Probenaufarbeitung wurde ein „Blood and Cell Culture Maxi DNA Kit“ (Quiagen) benutzt. Die Überstände wurden verworfen und jeweils 2 mL C1-Puffer (4°C) und 6 mL bidest. Wasser (4°C) zu den Pellets pipettiert. Die Proben wurden erneut zentrifugiert und die Überstände verworfen. Danach wurden die Pellets in je 10 mL G2-Lyse-Puffer gelöst und für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit gevortext. 200 µL Protease-Lösung wurden zugesetzt und die Proben für 2 h bei 37°C inkubiert. Die Trennsäulen aus dem Kit wurden zur DNA-Isolierung mit 10 mL QBT-Puffer equilibriert und die klaren Proben wurden, nach weiteren 10 Sekunden vortexen, schnell auf die warmen Säulen aufgetragen. Nach Einziehen (alleine durch Schwerkraft) der Probe wurde zwei Mal mit je 15 mL QC-Puffer gewaschen. Danach wurde der Auffangbehälter der Säulen eingesetzt und mit 15 mL des auf 40°C vorgewärmten, auf pH 7,4 abgesenkten QF-Puffer, die DNA eluiert. Um die DNA zu präzipitieren wurde das Eluat mit 10,5 mL Isopropanol (4°C) (entspricht 0,7 Vol%) versetzt und anschließend zur Lagerung über Nacht bei -20°C eingefroren.

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und für 1 h bei 4200g zentrifugiert. Der Überstand, über dem glasigen Pellet wurde abgenommen und erneut für ca. 15 Minuten zentrifugiert. Die isolierte DNA wurde mit 4 mL 70% Ethanol gewaschen, wodurch das restliche Isopropanol ausgetauscht wurde und nach 15 Minuten Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit und 4°C ein weißes Pellet erkennbar wurde. Der Überstand wurde durch Zugabe von einigen Tropfen Ethanol auf verbliebene DNA geprüft und nochmals für 15 min zentrifugiert. Die so erhaltenen Pellets wurden vereint und die DNA nochmals für 15 min

zentrifugiert (4°C). Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet in ein Reaktionsgefäß überführt und Luft getrocknet. Das DNA-Pellet wurde anschließend in 500 µL BIS-Tris-Puffer (pH 7,1) aufgenommen und für 10 Minuten bei 26°C im Thermoblock geschüttelt.

Neben der 22 h Inkubation wurde auch noch eine 6 h Inkubation durchgeführt. Hierfür wurden 10 Platten á 4 Mio. Zellen/Platte ausgestreut. Die Proben wurden auf dieselbe Art aufgearbeitet, wie die 22 h Inkubation. Bei der Bestimmung der DNA-Ausbeute mittels Nano-Drop-Methode wurde bei der 6 h Inkubation ein DNA-Gehalt von 2,35 mg/mL (entspricht 1,175 mg DNA) und bei der 22 h Inkubation ein DNA-Gehalt von 1,5 mg/mL (entspricht 0,75 mg DNA) bestimmt.

Diese Proben wurden mittels HPLC-MS/MS wie beim Vorversuch bei der Inkubation von KT-DNA mit Glycidamid analysiert. Dabei konnten die gesuchten Massen nicht in einer Intensität gefunden werden, die zu einer eindeutigen Identifizierung notwendig gewesen wäre. Vermutlich waren die Lösungen zu niedrig konzentriert und damit waren die Signale nicht vom Rauschen zu unterscheiden.

#### **Verwendete Lösungen:**

BIS-Tris-Puffer:	siehe 4.7, S.40
Lysepuffer:	292,2 mg EDTA; 605,7 mg Tris; 2,1 mg SDS; in 100 mL H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub> gelöst; pH 8 eingestellt
PBS:	siehe 4.4.3, S.31

#### **4.9 Vorversuch Adenin/ Guanin Inkubation mit ATX-II**

Um bei der Suche nach den unbekanntem, potentiellen Adduktfragmenten ein geringeres Hintergrundsignal zu erhalten, wurde ATX-II mit den reinen DNA-Basen Adenin bzw. Guanin inkubiert (Methode nach persönlicher Korrespondenz mit Pfenning C. entwickelt). Auf diese Art sollte, im Falle eines Signals dessen m/z-Verhältnis neu auftritt, die Bestimmung und Zuordnung erleichtert werden.

Dafür wurden Zielkonzentrationen von 0,75 mmol bei Adenin bzw. Guanin, sowie 1 mmol für ATX-II als Endkonzentration in der Reaktionslösung angestrebt. Da es sich um eine qualitative Fragestellung handelte, durften die Konzentrationen leicht variieren. Es wurden 0,218 mg Guanin in 2 mL PBS (= 0,721 mM); 0,194 mg Adenin in 2 mL PBS (= 0,717 mM) und 0,336 mg ATX-II in 20 µL EtOH (= 47,95 mM) (es sollten nur 10 µL sein, allerdings trat ein Löslichkeitsproblem auf) gelöst. 490 µL DNA-Basen-Lösung wurden 10 µL ATX-II-Lösung

hinzupipettiert und für 3 Tage unter Lichtausschluss bei 26°C und schütteln inkubiert. Die so erstellten Proben wurden mittels HPLC-DAD mit zwei unterschiedlichen Laufmittelsystemen analysiert, wobei nur eines verwertbare Ergebnisse aufwies. Hierbei wurde ein leicht abgeänderter Gradient mit 0,1% FAc und 90% Acetonitril verwendet und die Fließgeschwindigkeit betrug nur 0,3 mL/min (siehe Tabelle 5). Es wurden auch Messungen auf der QTOF-MS durchgeführt („direct-Inlet“-Verfahren), da die Proben allerdings in PBS gelöst waren und Phosphat-Puffer schädlich für das Massenspektrometer sind, mussten die Proben 1:100.000 mit Ethanol verdünnt werden, wodurch die Signale nicht mehr vom Rauschen unterscheidbar waren.

**Tabelle 5: Gradient zur DNA-Addukt Auftrennung auf der HPLC-DAD**

Zeit [min]	%A (0,1%FAc)	%B (90%ACN)	Flow [ml/min]
0	81	19	0,3
3	81	19	
6	50	50	
36	45	55	
40	0	100	
45	0	100	
47	81	19	
55	81	19	

**Verwendete Lösungen:**

PBS: siehe 4.4.3, S.31

**Chemikalien und Geräte:**

maXis von Bruker (=QTOF-MS):

Software: Compass 1.3

**4.10 Hauptversuch Adenin/Guanin Inkubation mit ATX-II**

Aufgrund der Erkenntnisse durch die Messungen an der HPLC-DAD wurde diese Methode auf die HPLC-MS/MS übertragen. Dafür wurden neue Proben, gelöst in Ammoniumacetat und Salzsäure (da sich ansonsten speziell Guanin nicht gut lösen lässt), hergestellt. Die Adenin-Stammlösung hatte in diesem Fall eine Konzentration von 2,04 mM und die Guanin-Stammlösung eine Konzentration von 2,02 mM. Um das Adenin zu lösen wurden zuerst

zweimal jeweils 1 mL Ammoniumacetat und 0,5 mL 4N HCl zum Feststoff pipettiert und anschließend mit 7 mL Ammoniumacetat auf 10 mL aufgefüllt. Guanin löst sich in Ammoniumacetat nicht gänzlich, weshalb es in 2 mL 4N HCl und 8 mL Ammoniumacetat gelöst wurde. Dieses Mal wurde allerdings das Konzentrationsverhältnis von den DNA-Basen zu ATX-II geändert, so dass nun die DNA-Basen im Überschuss vorhanden waren. Es wurde dafür eine 3,785 mM Alkyltoxin II-Lösung (1,326 mg ATX-II gelöst in 1 mL EtOH) hergestellt und 264 µL der ATX-II-Lösung mit 736 µL DNA-Basen-Lösung gemischt, wodurch man eine Endkonzentration von 1 mM ATX-II und 1,472 mM DNA-Base erhält. Die Lösung wurde für 48 h bei 25°C und 300 rpm unter Lichtausschluss inkubiert. Bei der Messung mittels HPLC-MS/MS wurde die Methode so adaptiert, dass das bidestillierte Wasser nicht mehr angesäuert wurde und statt 90% ACN, reines ACN verwendet werden konnte. Dementsprechend wurde der Gradient geändert (siehe Tabelle 6). Beim Injektionsvolumen wurden unterschiedliche Modi (Full Loop, No Waste) durchprobiert. Zuerst wurden 5-20 µL mit der Full Loop-Methode injiziert, wobei diese Methode zuviel Probe benötigte (bei 20 µL Injektion werden laut Handbuch insgesamt 96 µL Probe verbraucht). Anschließend wurden einige Messungen mit „No Waste“ durchgeführt, was allerdings die Intensitäten nicht verbesserte. Da aber mehrere Signale mit einem m/z von  $349 \pm 0,5$  gefunden wurden, wurde versucht diese Substanzen in Fraktionen zu sammeln.

Für die Fraktionsnahme wurden drei Messungen mit je 20 µL Probe mit der „No Waste“-Injektion über die HPLC der MS/MS aufgetrennt und gesammelt. Diese Proben wurden bei -80°C gelagert. Die gesammelten Fraktionen wurden später aufgetaut und über das „direct Inlet“-Verfahren an der QTOF-MS gemessen, wobei festgestellt werden musste, dass das Hintergrundrauschen scheinbar zu groß war im Vergleich zu den gewünschten Signalen.

Tabelle 6: Gradient zur Detektion von DNA-Addukten auf der HPLC-MS/MS

Zeit [min]	ACN [%]
0	40
6	45
36	50
40	100
50	100
52	40
60	40

### Verwendete Lösungen:

5 mM Ammoniumacetat: 38,596 mg NH<sub>4</sub>Ac auf 100 mL H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

### Chemikalien und Geräte:

ThermoFisher TSQ Vantage (= HPLC-MS/MS):

Autosampler:	Accela Autosampler
Pumpe:	Accela 1250 Pump
Betriebssoftware:	Thermo Xalibur
Säule:	Phenomenex Aqua C-18, 250 x 4,6mm
Laufmittel A:	H <sub>2</sub> O <sub>bidest.</sub>
Laufmittel B:	Acetonitril
Flussrate:	0,3 ml/min
Ofentemperatur:	40°C
Tray-Temperatur:	10°C
Scan time:	0,5 sec.
Loop:	5 µL
Injektionsvolumen:	5 bzw. 20 µL
Coll. Energy:	19 V
Kapillartemperatur:	300°C
Spray Voltage:	3000 V

maXis von Bruker (=QTOF):

Software:	Compass 1.3
-----------	-------------

## 5 Ergebnisse und Diskussion

Da ein Teil der Arbeit die Entwicklung einer neuen Extraktionsmethode für ATX-II umfasste, sind in diesem Abschnitt einige Methodenspezifische Informationen zu finden. Die genaue Methoden- und Experimentbeschreibung sind dem Punkt „3. Methoden“ zu entnehmen.

### 5.1 Vorversuche zur ATX-II Isolierung

Da für die späteren Versuche ATX-II benötigt wurde und dieses nicht kommerziell erhältlich ist, sollte dieses aus bereits fertig hergestellten Mykotoxinsubstraten (aus *Alternaria alternata* Stämmen, welche auf Reis kultiviert wurden) gewonnen werden. Diese Substrate enthalten nicht nur ATX-II, sondern auch andere Mykotoxine wie Tenuazonsäure, AOH, AME und viele weitere, von *Alternaria alternata* produzierte Mykotoxine. Um die Substrate wirtschaftlicher zu nutzen, wurde anfangs versucht, auch die anderen Toxine zu isolieren. Großes Interesse wurde unter anderem Stemphylytoxin III beigemessen, da es schwerer zu isolieren ist als ATX-II und bisher nur wenige toxikologische Informationen vorliegen (Schwarz et al., 2012). Der gesamte Arbeitsverlauf bezüglich der ATX-II-Gewinnung ist im nachfolgenden Fließdiagramm (Abbildung 11) dargestellt.

Um die Elution der Toxine aus dem Substrat zu testen wurde ein fertiges Mykotoxinsubstrat in einer Mischung aus ACN und bidestillierten Wasser (siehe auch Punkt 4.1.1) gelöst und mittels semipräparativer HPLC aufgetrennt. Diese Injektion wurde als Injektion 0 (Inj.0) bezeichnet. Bei Inj.0 wurden 15 Fraktionen aufgefangen und mit Hilfe einer analytischen HPLC-DAD untersucht.

Beim Chromatogramm von Inj. 0 (Abbildung 12) ist zu erkennen, dass die Peaks nicht gänzlich aufgetrennt sind, allerdings sind sie von einander unterscheidbar. Fraktion 4 (die Fraktion in der das stärkste Signal vorliegt) enthält vermutlich Tenuazonsäure. Darauf wird aufgrund der vorliegenden Daten der Retentionszeit und der Peakintensität geschlossen (Schwarz et al., 2012).

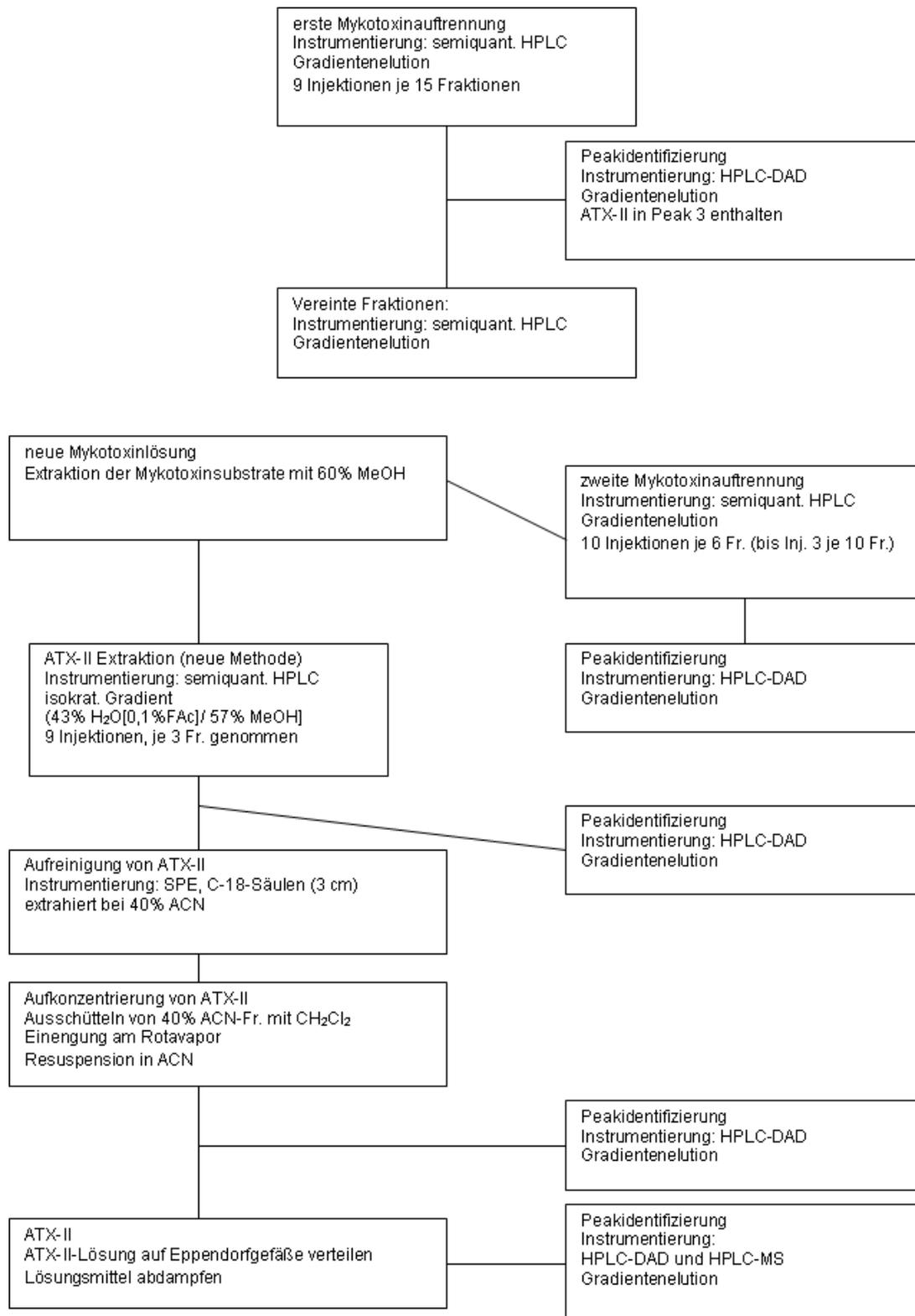


Abbildung 11: Darstellung der Arbeitsschritte zur Gewinnung von ATX-II. Es wurde zweimal versucht mit einem Gradientensystem ATX-II rein zu isolieren, was allerdings nicht gelang (siehe 4.1.2 [hier erste Mykotoxinauftrennung] und 4.1.4 [hier zweite Mykotoxinauftrennung]). Deswegen wurde stattdessen eine isokratische Methode (Schwarz, 2012) verwendet. Durch die „Peakidentifizierungen“ wurden jeweils die erhaltenen Signale mit bekannten Retentionszeiten (Schwarz, 2012) verglichen, und so die gefundenen Signale unterschiedlichen Mykotoxinen zugewiesen. Zusätzlich wurden bei der ersten Mykotoxinauftrennung, sowie bei der isokratischen Auftrennung ein ATX-II-Standard (zuvor in der Arbeitsgruppe hergestellt) mitgeführt, der eine direkte Zuordnung ermöglichte. semiquant. = semipräp.

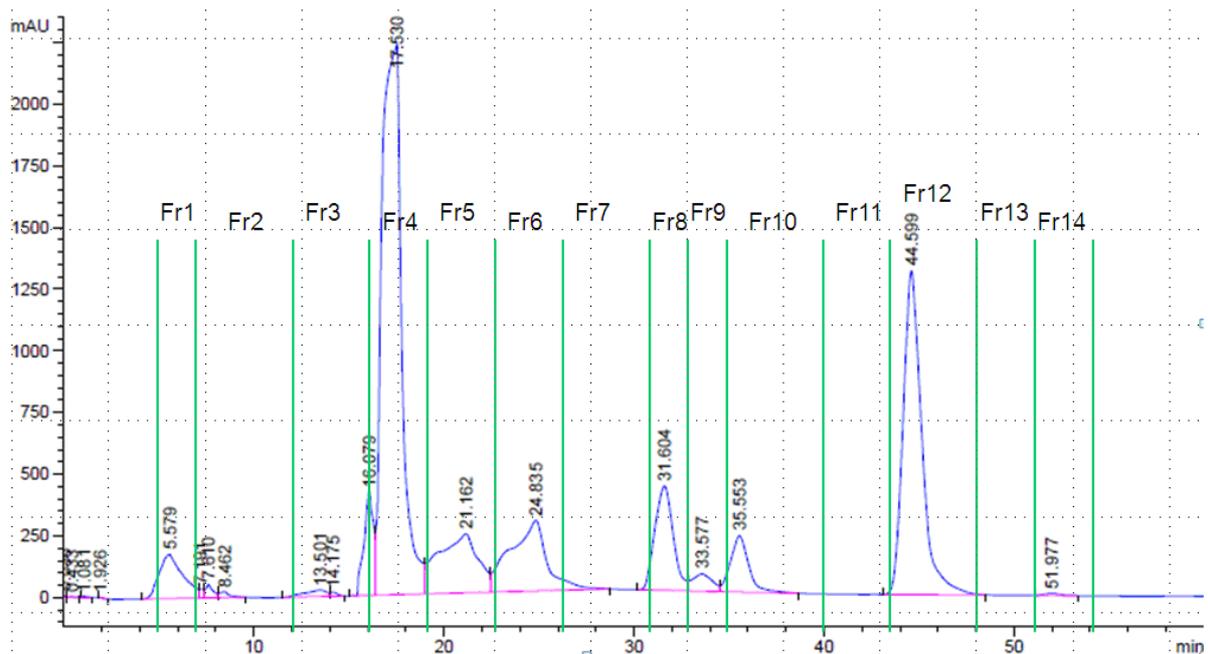


Abbildung 12: Injektion 0 (Mykotoxinextrakt); Der Beginn und das Ende der Fraktionsentnahme werden mittels grüner Striche symbolisiert, die Nummer der Fraktion ist darüber ersichtlich. Aufgrund der Höhe und der Lage des Signals im Chromatogramm ist davon auszugehen, dass es sich bei Fraktion 4 um Tenuazonensäure handelte (Schwarz et al., 2012).

Zur Peakidentifizierung wurden Messungen an einer HPLC mit DAD-Detektor durchgeführt. Die in den Fraktionen 1 und 2 gefundenen Peaks konnten keinen Substanzen zugeordnet werden (Vergleich mit Schwarz [2012]), die für eine weitere Nutzung interessant gewesen wären, weshalb diese auch nicht weiter untersucht wurden. Fünf Fraktionen (5, 6, 8, 10 und 12) wurden zusätzlich mit HPLC-MS/MS mittels „direct Inlet“-Verfahren (direktes Einspritzen in die Ionenquelle) bestimmt, um erste Erfahrungen mit dem Massenspektrometer sammeln zu können. Diese Fraktionen wurden gewählt, da eine von ihnen ATX-II (nach Vergleich der Retentionszeiten mit Schwarz [2012]) beinhalten sollte und um zu überprüfen, ob die Auftrennung sauber war oder ob gleiche  $m/z$  in unterschiedlichen Fraktionen zu finden sind. Durch Vergleich der Retentionszeit von ATX-II (mitgeführter Standard) konnte bei der HPLC-DAD-Messung der Peak der in Fraktion 8 eluierte, als ATX-II identifiziert werden. Auch die HPLC-MS/MS-Daten bestätigten die Anwesenheit von ATX-II in dieser Fraktion. Die HPLC-MS/MS-Messung von Fraktion 12 ergab, dass sie ebenfalls geringe Konzentrationen an ATX-II enthielt, dies wurde später allerdings nicht mehr gemessen und auch bei den HPLC-DAD-Messungen ließ sich in dieser Fraktion kein ATX-II nachweisen. Bei Fraktion 8 zeigte sich nach Aufkonzentrierung an einem Vakuumconcentrator (= SpeedVak) auf ca. 1 mL der Niederschlag eines gelben Feststoffs, der sich mit ACN wieder in Lösungen bringen ließ. Durch erneute Messung mittels HPLC-DAD wurde festgestellt, dass es sich um beinahe reines ATX-II handelte (siehe Abbildung 14), allerdings konnte in weiteren Versuchen das Ausfallen von ATX-II weder beobachtet noch herbeigeführt werden. Dies liegt vermutlich auch daran,

dass aus unbekanntem Grund die Mykotoxinpeaks bei der Trennung mittels der semipräp.-HPLC-DAD eine immer stärkere Verbreiterung aufwiesen, was in den Chromatogrammen der einzelnen Injektionen sichtbar wurde (siehe Abbildung 13). Gründe dafür könnten eine Überladung der Säule sein, es ist aber von Schwarz et al. (2012) bekannt, dass es bei dieser Art von Proben große Probleme mit enthaltenen Lipiden gibt, die sich nicht mehr von der Säule eluieren lassen und so die Säule verstopfen, bzw. eine Retention der eigentlich Analyten verhindern. Weiters wurde beobachtet, dass die Peakintensitäten mit jedem Durchgang stark schwankten.

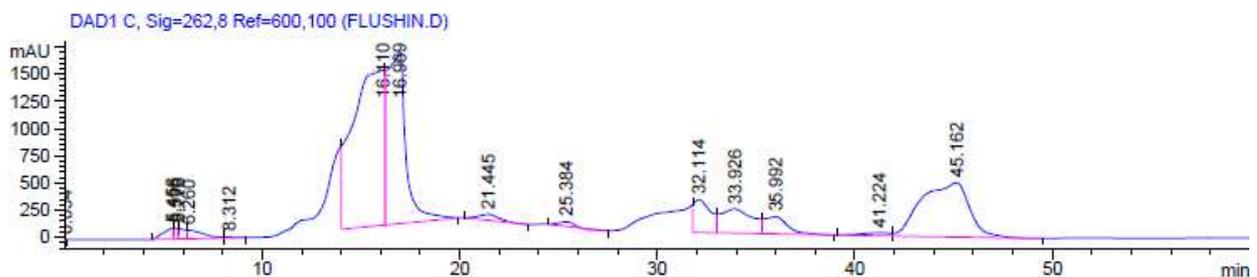


Abbildung 13: Injektion 5; Bereits nach fünf Mykotoxinextraktinjektionen auf die Trennsäule kommt es zu einer starken Peakverbreiterung, wodurch die einzelnen Peaks nicht mehr gut erkennbar sind. Dadurch wird eine gleichmäßige Fraktionsnahme stark erschwert.

Während in Fraktion 8 ATX-II gefunden wurde, wurden die Fraktionen 6, 9 und 10 zur weiteren Aufreinigung ausgewählt, da die darin gefundenen Retentionszeiten auf Toxine von Interesse schließen ließen. Aufgrund der Retentionszeiten im Vergleich zu den, aus bereits veröffentlichten Arbeiten (Schwarz et al., 2012), bekannten Retentionszeiten von *Alternaria* Toxinen, wurde vermutet, dass es sich bei Fraktion 6 um AME, bei Fraktion 9 um ATX-III (wurde bei Schwarz et al. (2012) nicht eindeutig identifiziert) und Fraktion 10 um Stemphylotoxin III handelte.

Insgesamt wurden neun Injektionen mittels semipräparativer HPLC durchgeführt. Die Fraktionen dieser Läufe wurden ebenfalls an der SpeedVak auf einige Milliliter eingengt und bei 4°C gelagert. Daraus wurden durch Vereinigung gleicher Fraktionen sogenannte „gesammelte Fraktionen“ erstellt. Bei den „gesammelten Fraktionen“ wurden jeweils die Fraktionen der einzelnen Injektionen mit gleichen (bzw. ähnlichen) Retentionszeiten vereinigt. So wurden für die „gesammelte Fraktion 8“ von den Injektionen L0, L1, L2, L3, L4, L7, L8 und L9 die jeweilige Fraktion 8 mit der Fraktion 7 (Fr.7) von L5 sowie der Fraktion 9 von L6 vereinigt. Bei L5 wurde Fr.7 gewählt, da der übliche Peak von Fr.7 im Peak von Fr.6 unterging und keine eigene Fraktion genommen wurde. Bei L6 hingegen wurde eine zusätzliche Fraktion genommen, da das Chromatogramm einen zusätzlichen Peak schon nach 13 Minuten erahnen ließ.

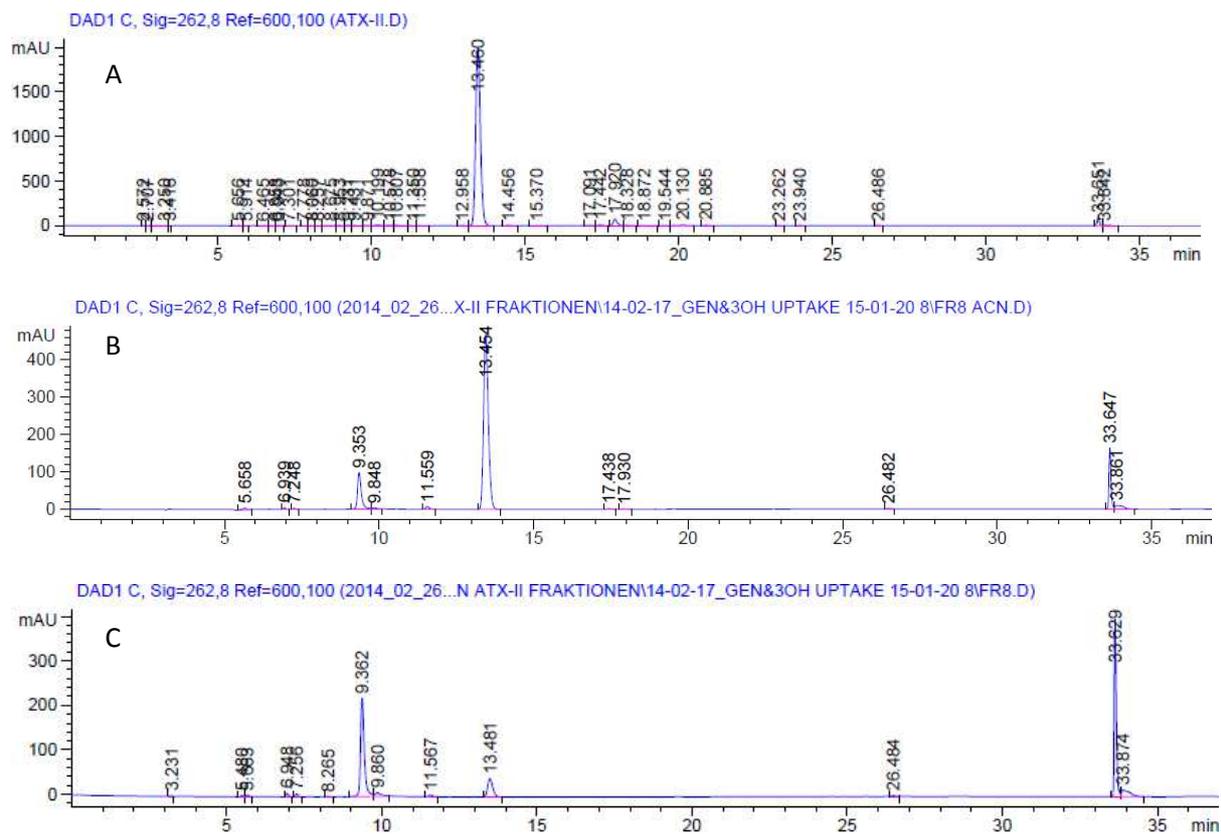


Abbildung 14: Ergebnisse von der analytischen HPLC, Inj. 0, Injektionsvolumen je 10  $\mu$ L. Chromatogramm A zeigt das als Referenz gemessene reine ATX-II (ATX-II Standard), Chromatogramm B ist das Chromatogramm von dem gelben Feststoff der in Fr.8 ausgefallen war und wieder in ACN resuspendiert wurde. Chromatogramm C zeigt den Überstand von Fr.8. Festzuhalten ist hierbei, dass das Signal von dem resuspendierten Feststoff von Fr.8 gut mit dem Peak des ATX-II-Standards übereinstimmt. Im Überstand von Fraktion 8 ist hingegen fast kein ATX-II mehr vorhanden.

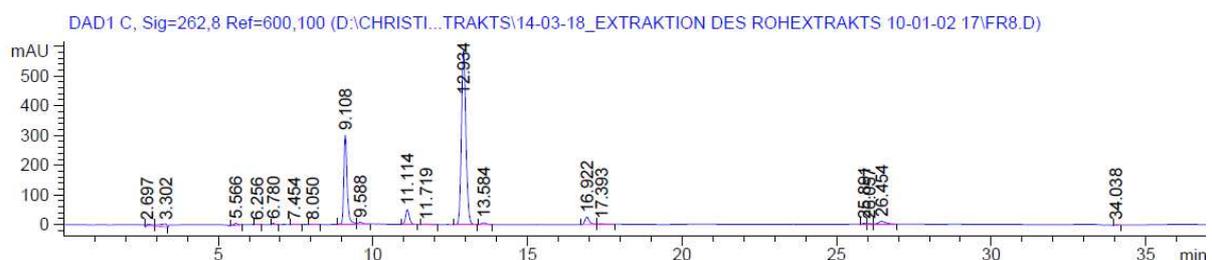
Auch die Fraktionen 6, 9 und 10 wurden gesammelt und als „gesammelte Fraktion 6“ (=gFr.6), gFr.9 und gFr.10 bezeichnet, da, wie oben erwähnt, die Retentionszeiten dieser Fraktionen auf Toxine schließen ließen, die für eine weitere Aufarbeitung interessant sein könnten. Eine Zusammenstellung dieser Fraktionen ist in Tabelle 7 aufgelistet. Diese gesammelten Fraktionen wurden aufgrund ihrer großen Volumina an einem Rotavapor vorsichtig bis zur Trockene abrotiert, in ACN resuspendiert und erneut über die analytische Säule gemessen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Dabei wurde festgestellt, dass die so aufkonzentrierten, gesammelten Fraktionen 6, 8, 9 und 10 noch starke Verunreinigungen mit anderen Toxinen (vor allem Tenuazonsäure und AOH) aufwiesen (das Chromatogramm der gesammelte Fraktion 8 ist in Abbildung 15 dargestellt). Um die Reinheit zu erhöhen, wurden die gesammelten Fraktionen erneut über die semipräparative Säule aufgetrennt, wodurch je gesammelter Fraktion wieder 4-5 Fraktionen erhalten wurden. Die Toxine wurden dabei scheinbar auf die einzelnen Fraktionen verteilt, anstatt wie erwartet in einer Fraktion abgetrennt zu werden. Bei den Fraktionen der gesammelten Fraktion 9 und der gesammelten Fraktion 10 konnten Toxine nur noch in so geringen Konzentrationen gefunden werden, dass der Arbeitsaufwand einer weiteren Isolierung nicht gerechtfertigt gewesen

wäre. Auch bei den gesammelten Fraktionen 8 zahlte sich die weitere Aufreinigung aufgrund der geringen Toxinkonzentration nicht weiter aus. Da sich außerdem die Retentionszeit verschoben hatte, wurde befürchtet, dass ATX-II eventuell zerfallen war.

**Tabelle 7: Zusammensetzungen der „gesammelten Fraktionen“ gFr.6, gFr.8, gFr.9 und gFr.10 (L= Lauf [=Injektion], Fr.= Fraktion). Um die jeweiligen Toxine anzureichern, wurden die Fraktionen mit denselben Retentionszeiten aus den unterschiedlichen Injektionen miteinander vereinigt. Da der Toxinpeak von Fraktion 6 nach der dritten Injektion nicht mehr aufgetrennt erkennbar war, wurden nur die Injektionen 0-3 (L0-3) miteinander vereinigt. Das Hauptaugenmerk lag auf gFr.8, da darin ATX-II vermutet wurde.**

	gFr.6	gFr.8	gFr.9	gFr.10
Fr.6	L0-3			
Fr.7		L5		
Fr.8		L0-4 und L7-9		
Fr.9		L6	L0-4 und L7-9	L5
Fr.10				L0-4 und L6-9

Deshalb wurden zusätzlich neue Fraktionen erstellt, um aus diesen mit dem bisher gesammelten Wissen ATX-II zu isolieren. Da der bisher verwendete Mykotoxinextrakt verbraucht war, wurden neue Mykotoxinextrakte aus den Mykotoxinsubstraten hergestellt (siehe 4.2.1).



**Abbildung 15: Analyse der gesammelten Fraktion 8; Das Signal bei 12,934 min wurde ATX-II zugeordnet, das zweithöchste Signal bei 9,1 min ist vermutlich eine Verunreinigung durch AOH.**

Einer dieser neuen Mykotoxinextrakte wurde nun für die Messungen herangezogen und als M4 bezeichnet. Mit M4 wurden 10 Läufe durchgeführt, wobei immer 1-2 mL injiziert wurden. Es wurden in diesem Fall 12 Fraktionen aufgefangen. Ab Injektion Nr. 3 wurden nur noch 6 Fraktionen aufgefangen, da der neue Extrakt ein anderes Toxinprofil aufwies als der zuerst verwendete. Die Fraktionen, in denen ATX-II und andere interessante Mykotoxine

vermutet wurden, wurden am SpeedVak einrotiert. Die restlichen Fraktionen und die einrotierten Fraktionen wurden bei +4°C gelagert. Die einrotierten Proben wurden mittels HPLC-DAD gemessen, wobei aufgrund der Peakintensität festgestellt wurde, dass nur wenig ATX-II in den entsprechenden Fraktionen vorhanden war. Durch Nachmessungen von zuvor gemessenen Proben (eine Fraktionen der zuvor untersuchten gFr.8) stellte sich heraus, dass ATX-II in wässrigen Lösungen bei +4°C scheinbar nicht lagerfähig ist (Lagerzeitraum: 1 Monat), da in diesen Proben gar kein ATX-II mehr enthalten war und auch die Intensitäten der anderen Toxinpeaks gesunken waren. Dementsprechend konnte auch aus diesen Fraktionen kein ATX-II mehr gewonnen werden. Dieses Problem wurde zuvor vermutlich deshalb nicht erkannt, da der erste Mykotoxinextrakt wesentlich mehr ATX-II enthielt und außerdem schneller aufgearbeitet werden konnte.

Da es nicht gelang ATX-II und andere Mykotoxine mithilfe des Gradientsystems zu gewinnen, wurde ab dann ein isokratisches Laufsystem verwendet, welches andere Mykotoxine außer ATX-II diskriminiert. Bei diesem, von Christoph Schwarz (Schwarz, 2012) entwickelten System wurde zusätzlich das bidestillierte Wasser mit 0,1% FAc angesäuert.

## 5.2 Hauptversuch ATX-II Isolierung

Nach den Vorversuchen konnte mit der neugewählten Methode eine ausreichende Auftrennung erzielt werden. Dafür wurden die zuvor hergestellten Mykotoxinextrakte verwendet, welche unterschiedliche Toxinprofile (insbesondere in Bezug auf die ATX-II-Konzentration) aufwiesen.

Anders als bei den Vorversuchen wurde hierbei ein isokratischer Gradient (43% [H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>+0,1%FAc]/57% [MeOH]) gewählt, um die Toxine aufzutrennen. Der Vorteil dieses Gradienten ist, dass ATX-II zwar weiterhin als aufgetrennter, einzelner Peak vorliegt, allerdings werden die meisten anderen Toxine nicht länger getrennt eluiert. In diesem isokratischen Lauf waren deshalb nur noch vier Peaks zu erkennen. Vom ersten der vier Peaks wurde auf Grund seiner Intensität und seiner Lage im Chromatogramm vermutet, dass es sich um Tenuazonsäure handelte. Dieser wurde nicht gesammelt. Die anderen Peaks eluierten zwischen 19-21 min, 29-31 min bzw. 33-35 min. Obwohl die Elutionszeiten der einzelnen Peaks somit um bis zu zwei Minuten verschoben waren, konnten die Peaks anhand der Peakform und der Lage im Chromatogramme abgeglichen und zugeteilt werden. Für die starke Schwankung der Retentionszeiten kommen unterschiedliche Gründe in Frage. Einerseits wurde die Säule per manueller Injektion geladen, der Lauf musste aber am Computer gestartet werden, was einen geringen Zeitversatz erklärt. Weiters wurde bereits

mit einer alten Säule (ca. zwei Jahre) gearbeitet und auch die vorherige Überladung dieser könnte eine Rolle gespielt haben. Vor allem das schwankende Injektionsvolumen, welches je nach Farbintensität des Mykotoxinextrakts gewählt wurde (je oranger der Extrakt desto geringer das Injektionsvolumen) und die Zusammensetzung der, aus unterschiedlichen Mykotoxinsubstraten extrahierten, Mykotoxinextrakte, hatten zu diesen Ungleichmäßigkeiten geführt. War der Extrakt zu intensiv gefärbt oder zeigten sich Schwebstoffe, wurde der Extrakt weiter verdünnt, was allerdings zu unterschiedlichen Beladungen der Säule führte. Aus der Literatur (Schwarz, 2012) war bekannt, dass ATX-II nach ungefähr 33 Minuten eluiert. Dementsprechend wurde der als drittes eluierende Peak (der Peak der Tenuazonsäure wurde nicht mit einberechnet), welcher bei Retentionszeiten zwischen 33-35 min eluierte, als ATX-II-Peak oder „Peak 3“, so wie die zwei anderen unbekannt Peaks getrennt gesammelt. Auch bei diesen Injektionen wiesen einige Chromatogramme verbreiterte Peaks auf, allerdings führte es nicht zur Überlappung von Signalen, weshalb nur ein größeres Volumen aufgefangen werden musste. Die so erhaltenen Fraktionen wurden bei -20°C gelagert, da sich, wie oben beschrieben, herausgestellt hatte, dass sie bei +4°C nicht lagerfähig waren.

Um die Proben schneller aufarbeiten zu können und somit einen Toxinverlust zu vermeiden, wurden in diesem Fall die Fraktionen der drei Toxinpeaks jeweils aus 4 oder 5 Injektionen gesammelt und dann direkt mittels Rotavapor abrotiert. Da der Wasseranteil dieser Fraktionen zu hoch war um ihn alleine mit dem Rotavapor abzuziehen, wurde die verbliebene wässrige Phase mehrmals mit Dichlormethan ausgeschüttelt und anschließend das Dichlormethan zur Gänze über den Rotavapor entfernt. Der gelbe Rückstand im Kolben wurde in 2 mL Acetonitril resuspendiert und in einem Eppendorfgefäß bei -80°C aufbewahrt.

Diese Toxinrohlösungen wurden wieder auf der analytischen HPLC-DAD untersucht. Die Proben wurden bei mehreren Wellenlängen (siehe Punkt 4.2.3) gemessen, wobei das Signal von ATX-II bei 262,8 nm am höchsten war. Bei den Toxinlösungen von „Peak 3“ konnte aufgrund der Lage des Signals bei ungefähr 13,3 Minuten sichergestellt werden, dass es sich um ATX-II handelte. Auf diese Art wurden insgesamt 9 Eppendorfgefäße mit je 2 mL ATX-II-Rohextrakt gewonnen. Die Reinheit dieser Lösungen lag durchschnittlich bei  $83,2 \pm 3,8\%$ .

### 5.3 ATX-II Aufreinigung

Da eine Reinheit von mindestens 90%, besser über 93% für experimentelle Zwecke benötigt wurde, musste der ATX-II-Rohextrakt mittels Lichrolut RP18-Säulen von Merck weiter aufgereinigt werden. Auch hierbei musste zuerst die richtige Elutionsmethode durch Vorversuche erprobt werden.

Bei den daraufhin durchgeführten Vorversuchen wurde auch versucht die Toxine von „Peak 1“, bei welchem zwei Peaks enthalten waren ( $t_{R1} = 7,87$  min und  $t_{R2} = 8,11$  min), und „Peak 2“ ( $t_R = 9,090$  min) zu isolieren. Allerdings ließ sich „Peak 1“ nicht gut aufreinigen und bei „Peak 2“ schien es sich aufgrund der Retentionszeit ( $t_R = 9,09$  min) um AOH zu handeln, weshalb aus Zeitgründen beschlossen wurde, nur noch „Peak 3“ ( $t_R = 13,26$  min) aufzuarbeiten. Obwohl das vermutete ATX-II beim ersten Versuch erst bei der Elution mit 50% ACN von der Säule gespült wurde, eluierte es bei der schlussendlichen Methode in der Fraktion von 40% ACN, was durch das Verschwinden einer sichtbar gelb gefärbten Bande auf der Säule gut zu erkennen war. So wurden die zuvor erhaltenen Rohextrakte über die SPE-Säulen aufgetrennt. Durch Ausschütteln mit Dichlormethan und Abrotieren desselbigen wurden gelbe bis leicht bräunliche Rückstände erhalten, welche erneut in ACN gelöst wurden, wodurch je nach ATX-II Menge schwach bis stark gelb gefärbte Lösungen erhalten wurden. Diese wurden zur Reinheitsbestimmung erneut an der analytischen HPLC-DAD analysiert. Durch das gleichmäßige verteilen auf vorgewogene Eppendorfgefäße und vorsichtiges Abrotieren an der SpeedVac derselbigen, konnte die Masse an ATX-II bestimmt werden. Die Eppendorfgefäße wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Um sicher zu stellen, dass beim Auswägungsprozess ATX-II nicht zerfallen war, wurde der Inhalt eines der Eppendorfgefäße erneut in Acetonitril gelöst und untersucht. Dafür wurde eine weitere HPLC-DAD-Messung durchgeführt. Von den dabei erhaltenen Signalen wurden die Signale einer mitgeführten Blank-Messung (reines Acetonitril) abgezogen und die Peakflächen der verbliebenen Signale addiert. Die Peakfläche des ATX-II-Signals wurde anschließend durch die Summe aller Peakflächen dividiert, wodurch der prozentuale Anteil von ATX-II in der Probe erhalten wurde (siehe auch 4.3). Die Reinheit dieses Äquivalents wurde als Reinheit für die gesamte Charge übernommen.

Um sicher zu gehen, dass es sich bei der erzeugten Substanz um ATX-II handelte, wurde außerdem noch eine massenspektroskopische Messung mittels QTOF-MS mit direkt Inlet-Verfahren durchgeführt. Diese Messung bestätigte, dass es sich bei dem erhaltenen Produkt um ATX-II handelt, wobei das Ergebnis um  $-3,9$  ppm vom Ideal abwich (die exakte Masse von ATX-II beträgt  $350,07904$  g/mol [<http://www.sisweb.com/referenc/tools/exactmass.htm>]).

Auch die charakteristischen Wasserabspaltungen konnten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16).

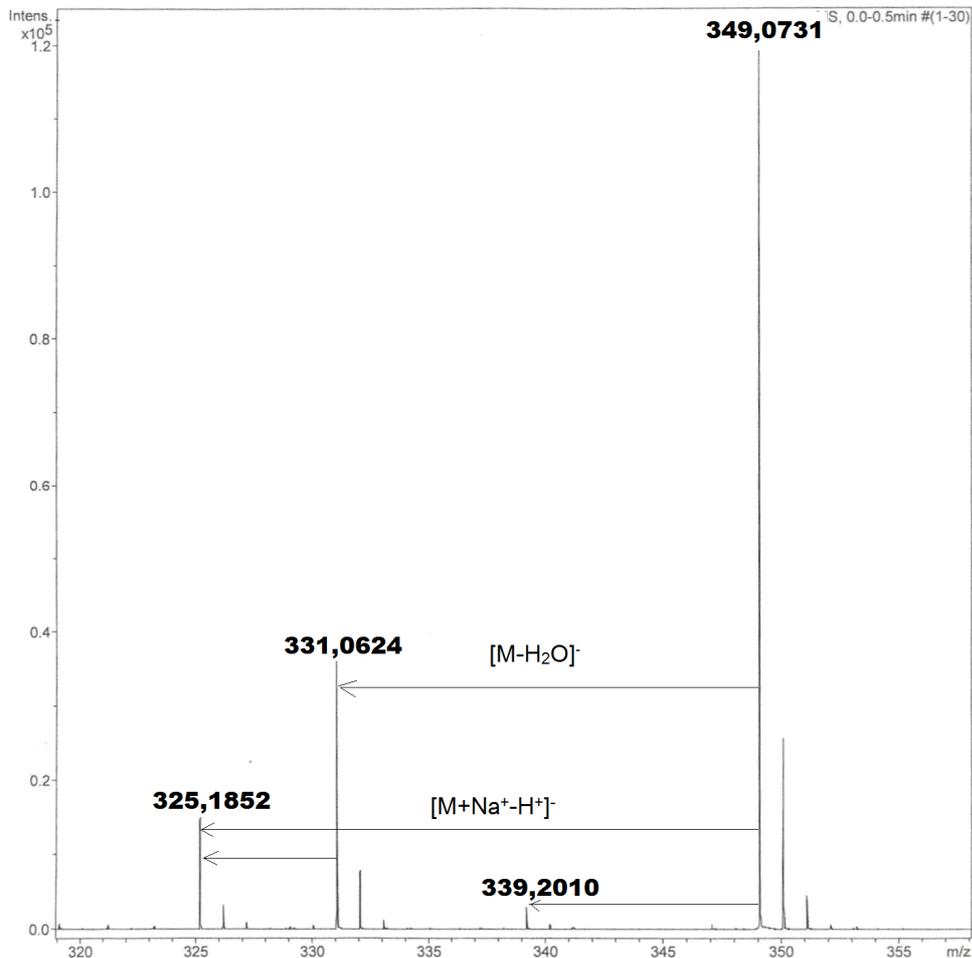


Abbildung 16: ATX-II-Messung (im negativen Ionenmodus, QTOF-MS) von Eppi Nr.10. Das Signal bei 331,0624 entspricht einer Wasserabspaltung.

Insgesamt wurden laut Auswaage der Eppendorfggefäße 21,911 mg ATX-II hergestellt, wobei 12,964 mg eine Reinheit von mindestens 93% besitzen.

Bei der letzten Charge von 2,616 mg mit einer Reinheit von nur 84,4% handelt es sich um die Aufarbeitung von drei Restfraktionen um sämtliches ATX-II zu erhalten, das in den Lösungen vorhanden war. Tatsächlich konnte auf dieses Weise die Reinheit von 56% bzw. 60% auf 84,4% gesteigert werden.

Tabelle 8: ATX-II Ausbeute und Reinheit

Menge ATX-II [mg]	Reinheit [%]
4,863	96,1
3,094	95,3
0,869	95
4,138	93
6,331	92,4
2,616	84,4

#### 5.4 Vorversuche vom tGSH-Assay mit AOH und AME

Um Glutathiongehalte zu messen wurde der tGSH-Assay nach Tietze (Tietze, 1969) gewählt. Dieser erlaubt es sowohl den Gesamtglutathiongehalt (tGSH) als auch die Menge an oxidierten Glutathion (GSSG) in zwei individuellen Reaktionen zu bestimmen. Durch Abzug des GSSG-Gehalts vom tGSH-Gehalt erhält man die Menge an freiem GSH in der Zelle. Andere Formen des Glutathions außer GSH und GSSG werden jedoch nicht berücksichtigt.

Für die Vorversuche wurden AOH und AME als Inkubationssubstanzen gewählt.

Es wurden zwei Versuche mit AOH und AME durchgeführt, wobei unterschiedliche Konzentrationen der Toxine eingesetzt wurden. Da hierfür Reste von einem anderen Versuch verwendet wurden und keine weitere Substanz aufgewendet werden sollte, mussten die benötigten Volumina für den zweiten Versuch durch die Verdünnung der bisherigen Konzentrationen erreicht werden.

Beim ersten Versuch wurden die Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  verwendet, der zweite Versuch wurde mit Konzentrationen von 5  $\mu\text{M}$  und 25  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Da es, wie oben erwähnt, bei diesen Tests hauptsächlich darum ging, den Assay zu erlernen und dementsprechend nur ein nicht aussagekräftiges  $n=1$  vorliegt, sind die Ergebnisse hier nicht abgebildet (siehe im Anhang 10.4.3, S.90ff).

Bei den Messungen wurde festgestellt, dass die GSSG-Konzentrationen der Proben, die beim GSSG-Assay ermittelt wurden, sehr gering und zum Teil nicht vom Grundsignal zu unterscheiden waren. Da von einer früheren Arbeit bekannt war, dass der GSSG-Anteil der Proben beinahe vernachlässigbar ist, wurde überlegt, den GSSG-Assay nicht mehr durchzuführen. Da es sich hierbei allerdings nur um Testsubstanzen handelte, wurde beschlossen auch bei den ATX-II-Proben den GSSG-Assay durchzuführen und diesen, sollte die GSSG-Konzentration vernachlässigbar sein, wegfällen zu lassen.

## 5.5 Bestimmung von tGSH und GSSG in mit ATX-II inkubierten HT29-Zellen

Im zweiten Teil der Arbeit wurden Konzentrationen von tGSH und GSSG in mit ATX-II inkubierten Zellen untersucht. Die Menge an Glutathionspezies in der Zelle kann dementsprechend Auskunft über deren Zustand bzw. deren Reaktion auf von außen oder innen, oxidierend oder reduzierend wirkende Schadstoffe liefern.

Um die Wirkungsweise von ATX-II auf die Zellen besser einschätzen zu können, wurden unterschiedliche Inkubationsarten gewählt, die sich in Inkubationsdauer und durch die Zugabe von FKS-haltigen bzw. nicht FKS-haltigen Medium unterschieden. Es wurden Kurzzeitinkubationen von einer bzw. drei Stunden mit und ohne FKS-haltigem Medium durchgeführt. Zur Untersuchung der Langzeitwirkung von ATX-II wurden die Zellen für 24 Stunden inkubiert. Bei allen Inkubationen wurden ATX-II-Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$  untersucht. Schwarz et al. (2012) führte bereits einen tGSH-Test bei einstündiger Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  mit FKS-haltigem Medium durch, konnte dabei aber keinen Effekt auf den Glutathionspiegel beobachten. Da in dieser Arbeit auch eine Inkubation für 3 Stunden und eine Inkubation für 24 Stunden untersucht werden sollten, wurden diese Konzentrationen trotzdem untersucht. Für die Kurzzeitinkubationen wurde als Positivkontrolle 2-Vinylpyridin (2-VP) verwendet, da tBHQ bei Kurzzeitinkubationen keinen ausreichenden Effekt aufweist. 2-VP ist durch seine Vinylgruppe in der Lage GSH direkt abzufangen (was dem Entgiftungsprozess der Zelle entspricht) und senkt dadurch die Konzentration an zellulärem GSH (nicht aber GSSGs) ab. Da 2-VP allerdings bei längerer Inkubation zytotoxisch wirkt, wurden für die 24 Stunden Inkubationen tBHQ und BSO verwendet. tBHQ steigert dabei die Menge an zellulärem GSH, da es ROS bildet und somit den Nrf2/ARE-Signalweg aktiviert, BSO hingegen senkt die GSH-Konzentration stark, da es direkt in die de-novo-Synthese von GSH durch eine Hemmung des  $\gamma$ -GCL eingreift und somit die Synthese von neuem GSH unterbindet (Marengo et al., 2008). Da die GSH-Gehalte auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen werden sollten, wurde bei jeder Probe nach deren Aufarbeitung mit Hilfe der BCA-Methode der Proteingehalt ermittelt. Es wurde die BCA-Methode gewählt, da die Bradford-Methode aufgrund des in der Probe enthaltenen Trypsins nicht angewendet werden darf, da ansonsten die Ergebnisse verfälscht werden würden. Die BCA-Methode wird durch Trypsin nicht gestört und ist leicht und schnell anzuwenden, weshalb sich diese Methode gut eignete.

Während Schwarz et al. (2012) keine signifikante Veränderung der GSH-Konzentration bei einer 1 h Inkubation mit FKS-haltigen Medium feststellen konnte, zeigte sich in dieser Arbeit ein leichter Effekt in Form einer geringen Senkung des tGSH-Spiegels bei den beiden höheren ATX-II-Konzentrationen (1  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ) bei einer Inkubationsdauer von einer Stunde mit

FKS-haltigen Medium. Bei einer dreistündigen Inkubation wurde hingegen, sowohl mit als auch ohne FKS-Medium, ein Anstieg der Glutathionkonzentration mit steigender ATX-II-Konzentration beobachtet. Bei den 24 h Inkubationen wurden ebenfalls steigende tGSH-Konzentrationen mit steigenden ATX-II-Konzentrationen festgestellt. Durch die Vergleiche von FKS-haltigen und nicht FKS-haltigen Proben zeigte sich, dass die Zugabe von FKS-Medium geringe Auswirkungen auf die tGSH-Gehalte der Proben hatten. Bei den Messungen mit FKS-haltigen Inkubationsmedien waren die Werte meist konstanter. Besonders interessant sind die 1 h Inkubationen. Hier zeigten sich unterschiedliche Effekte, je nachdem ob mit oder ohne FKS inkubiert wurde. Bei der Inkubation ohne FKS ist kein Effekt zu sehen, bei der Inkubation mit FKS-haltigen Medium sinken hingegen die tGSH-Werte mit steigenden ATX-II-Konzentrationen geringfügig.

Da von der Arbeit von Fleck et al. (2014) bekannt ist, dass GSH mit ATX-II reagiert, wird vermutet, dass bei einer Inkubation mit 5  $\mu\text{M}$  ATX-II, eben das geschehen ist. Es wäre allerdings auch denkbar, dass durch ATX-II oxidativer Stress in der Zelle induziert wurde, wodurch ROS gebildet und von GSH abgefangen wurden.

Bei der 24 h Inkubation mit ATX-II ist ein starker Anstieg der tGSH-Konzentration zu erkennen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass es oxidativ in den Zellen wirken könnte. Das ATX-II den Nrf2/ARE-Signalweg beeinflussen könnte, vermutete Schwarz bereits 2012. In seiner Arbeit (Schwarz, 2012) führte er eine 3 h Inkubation mit ATX-II durch und untersuchte die Transkriptionsraten der Gene Nrf2, GSTA1 (Glutathion-S-Transferase A1) und GSTA2, welche unter anderem für die Detoxifizierung der Zelle zuständig sind. Dabei wurden keine gesteigerten Transkriptionsraten für Konzentrationen von 0,01-1 $\mu\text{M}$  ATX-II gefunden. Da in dieser Arbeit allerdings mit höherer ATX-II-Konzentration und auch mit längeren Inkubationszeiten gearbeitet wurde, könnte eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs durchaus möglich sein. Auf welche Gene und Regulationsmechanismen ATX-II sich dabei auswirkt, kann anhand der gesteigerten GSH-Konzentration allerdings nicht bestimmt werden.

Festzuhalten ist auch, dass die GSSG-Konzentration im Verhältnis zur tGSH-Konzentration mit steigenden Inkubationszeiten sinkt (siehe Anhang Tabelle 32, S. 124ff). Dies ist überraschend, da die Detoxifizierung von ROS in der Zelle im Normalfall durch eine Reaktion von zwei GSH Molekülen zu GSSG, katalysiert durch GSTs, stattfindet. Deshalb ist es denkbar, dass ATX-II möglicherweise direkt ein Gen oder das ARE des Nrf2/ARE-Signalwegs beeinflusst.

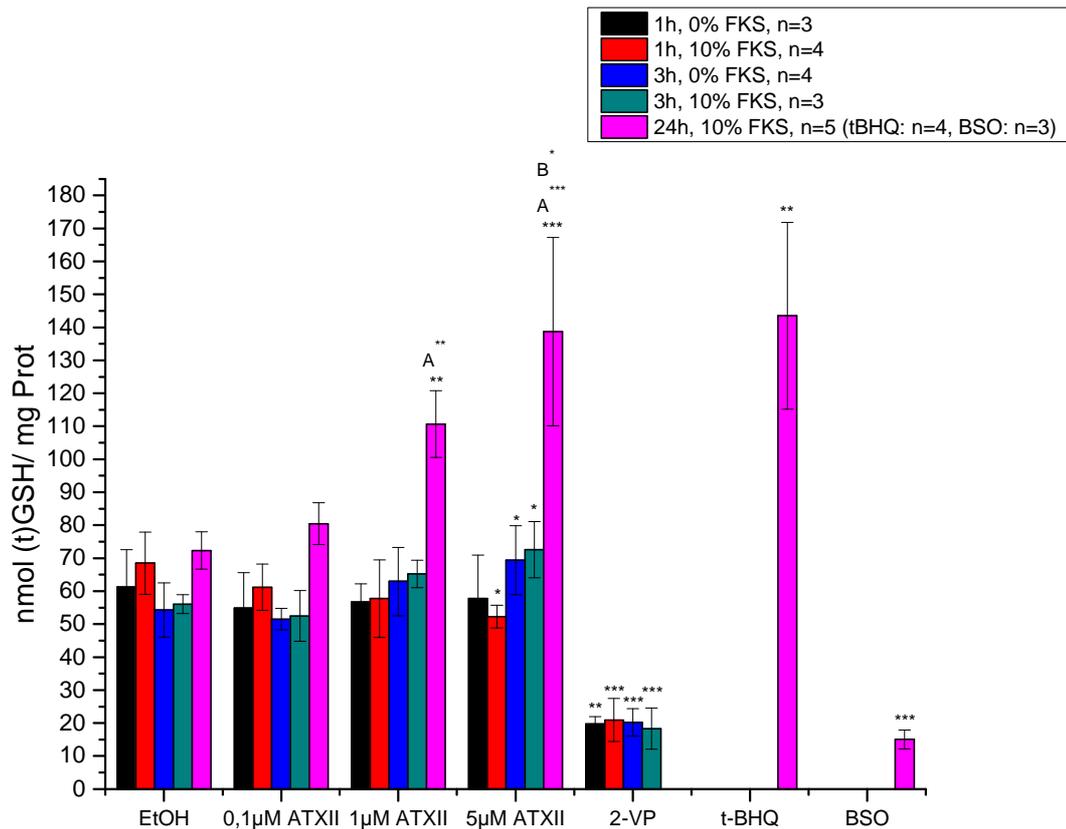


Abbildung 17: tGSH-Konzentrationen [nmol GSH/ mg Protein] der unterschiedlichen Inkubationen. Man erkennt einen starken Anstieg der GSH-Konzentration bei der 24 h Inkubation. Auch bei den 3 h Inkubationen steigt die GSH-Konzentration leicht an, nach 1 h (10% FKS) sinkt die GSH-Konzentration hingegen ab. EtOH wurde als Negativkontrolle, 2-VP als Positivkontrolle bei den Kurzzeitinkubationen und tBHQ und BSO bei den 24 h Inkubationen mitgeführt. Die Signifikanzen ohne Buchstabe beziehen sich auf die Negativkontrolle, Signifikanzen zur 0,1 µM ATX-II-Probe wurden mit dem Buchstaben A und Signifikanzen zur 1 µM ATX-II-Probe mit dem Buchstaben B gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

Bei den GSSG-Messungen wurden sehr große Schwankungen festgestellt. Diese sind unter anderem durch die verwendeten Chemikalien zu erklären. Wie sich erst bei späteren Messungen herausstellte, dürfte ein bereits Älteres (mindestens 6 Monate bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert), aber noch nicht geöffnetes NADPH eine geringere Reaktivität gehabt haben als eine neue Charge, weshalb die GSSG-Werte niedriger waren. Auch mit der Glutathionreduktase gab es bei einer Messung Probleme, da die ältere Charge gänzlich ihrer Reaktivität verloren hatte. Diese Messungen wurden bei der Auswertung nicht miteinbezogen.

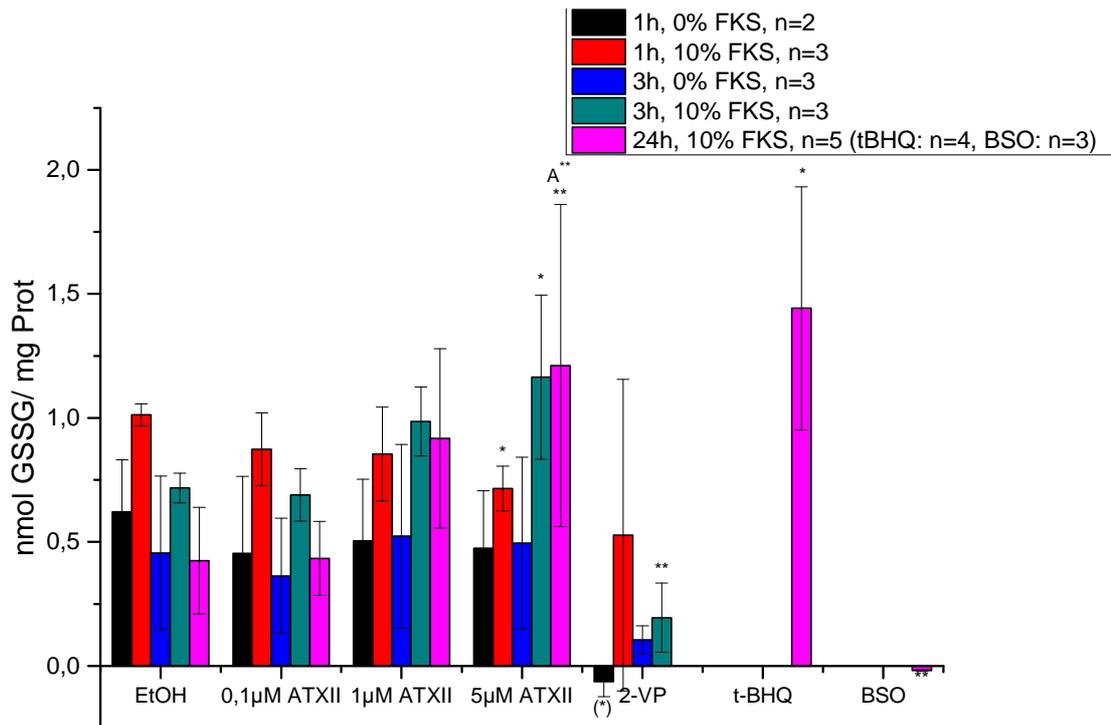


Abbildung 18: GSSG-Konzentrationen [nmol GSSG/ mg Protein] der unterschiedlichen Inkubationen. Selbst bei der 24 h Inkubation werden nicht einmal 2 nmol GSSG/ mg Prot. gebildet, was weniger als 1% des Gesamtglutathions entspricht. Allerdings sind die Schwankungen sehr groß, was möglicherweise an der Reaktivität der Glutathionreduktase und des NADPHs liegen kann. EtOH wurde als Negativkontrolle, 2-VP als Positivkontrolle bei den Kurzzeitinkubationen und tBHQ und BSO bei den 24 h Inkubationen mitgeführt. Die Signifikanzen ohne Buchstabe beziehen sich auf die Negativkontrolle, Signifikanzen zur 0,1 µM ATX-II-Probe wurden mit dem Buchstaben A gekennzeichnet (\* = p < 0,05; \*\* = p < 0,01; \*\*\* = p < 0,001).

Der eigentliche GSH-Gehalt der Probe, der in nmol GSH/mg Protein angegeben wird, wurde durch Subtraktion des GSSG-Gehalts vom gemessenen tGSH-Gehalt erhalten. Da es sich dementsprechend um relative Werte handelt, wurden hierbei keine Signifikanzen angegeben. Da aber die Gesamtglutathionkonzentration hauptsächlich vom GSH abhängt (GSSG trägt bis zu 1,5% zur Gesamtglutathionkonzentration bei), kann davon ausgegangen werden, dass dieselben Konzentrationen an GSH wie tGSH signifikant sind.

$$\text{GSH(A) [nmol GSH/mg Prot]} = \text{tGSH(A)} - \text{GSSG(A)}$$

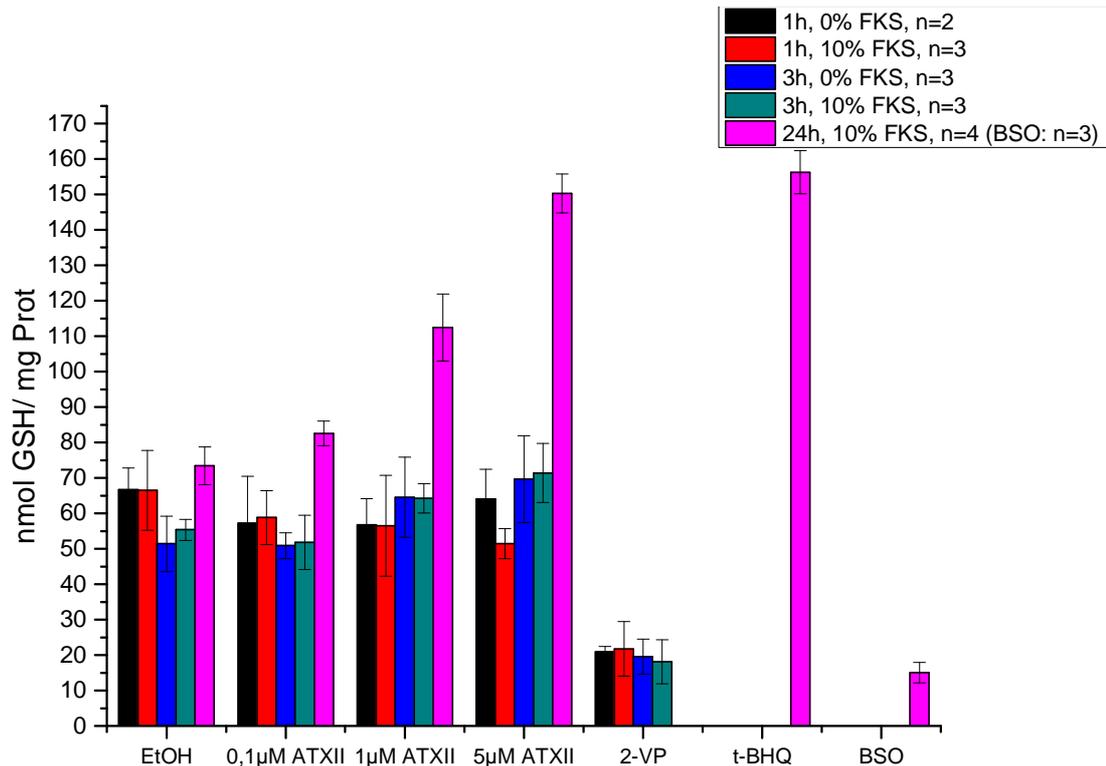


Abbildung 19: Abgebildet sind die errechneten GSH-Konzentrationen [nmol GSH/ mg Protein] durch die Differenzrechnung von tGSH und GSSG. Bei den Kurzzeitinkubationen (1 h und 3 h) wurde 2-VP als Positivkontrolle verwendet, welches die GSH-Konzentration stark senkt, bei den 24 h Inkubation wurden tBHQ und in drei Fällen auch BSO als Positivkontrollen mitgeführt.

Im Laufe der Untersuchungen wurden je Inkubationsart eine größere Anzahl an Proben gemessen als hier abgebildet (außer bei der 3 h, 10% FKS-Inkubation). Bei den nicht miteinbezogenen Daten handelte es sich um Messungen bei denen aufgrund der Kalibriergerade festgestellt werden konnte, dass bei diesen Tests die Glutathionreduktase inaktiv war und somit die Bestimmung des GSSG-Gehalts in der Probe nicht möglich war, weshalb für diese Proben kein GSH-Wert errechnet werden konnte. Da die GSSG-Gehalte allerdings sehr gering waren (zum Teil unter 1% des Gesamtglutathiongehalts), wurden bei den tGSH-Auswertungen trotz allem auch diese Versuchsdurchgänge mitberücksichtigt. Bei der Bestimmung der normierten tGSH-Gehalte zeigte sich, dass die Verhältnisse der fehlerbehafteten Proben dieselben sind, wie bei den normalen Proben.

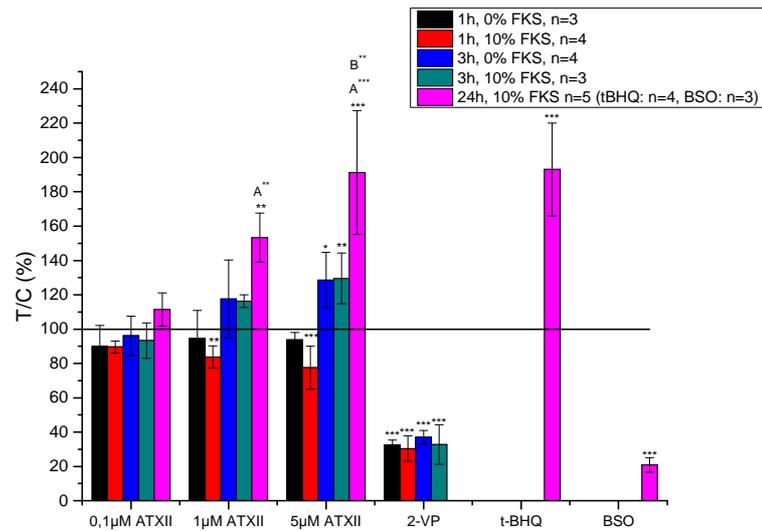


Abbildung 20: Abgebildet sind die normierten tGSH-Werte. Dafür wurden GSH-Konzentrationen der Negativkontrolle (EtOH) als 100% angenommen (dargestellt durch die horizontale Linie). EtOH wurde als Negativkontrolle, 2-VP als Positivkontrolle bei den Kurzzeitinkubationen und tBHQ und BSO bei den 24 h Inkubationen mitgeführt. Die Signifikanzen ohne Buchstabe beziehen sich auf die Negativkontrolle, Signifikanzen zur 0,1 µM ATX-II-Probe wurden mit dem Buchstaben A und Signifikanzen zur 1 µM ATX-II-Probe mit dem Buchstaben B gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

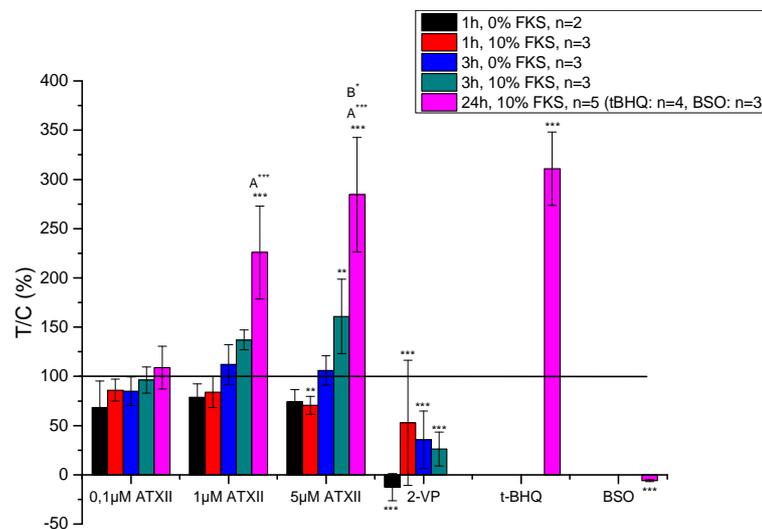


Abbildung 21: Die normierten GSSG-Konzentrationen: Die GSSG-Konzentration der Negativkontrolle (EtOH) wurde als 100% angenommen (dargestellt durch die horizontale Linie). Man erkennt gut, dass in diesem Fall die Schwankungen bei weitem nicht mehr so groß sind, was sich durch ähnliche Verhältnisse der Proben zueinander erklären lässt. EtOH wurde als Negativkontrolle, 2-VP als Positivkontrolle bei den Kurzzeitinkubationen und tBHQ und BSO bei den 24 h Inkubationen mitgeführt. Die Signifikanzen ohne Buchstabe beziehen sich auf die Negativkontrolle, Signifikanzen zur 0,1 µM ATX-II-Probe wurden mit dem Buchstaben A und Signifikanzen zur 1 µM ATX-II-Probe mit dem Buchstaben B gekennzeichnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ ).

## 5.6 Vorversuche zu DNA-Addukten

Ein Ziel dieser Arbeit war es eine Methode zur DNA-Addukt Messung von DNA mit ATX-II an einem LC-MS/MS Instrument zu etablieren. Da nicht bekannt war, ob ATX-II überhaupt mit DNA-Basen Addukte bildet, musste mit Hilfe von Positivkontrollen die Methode etabliert werden, um anschließend nach den ATX-II-DNA-Addukten suchen zu können. Dafür wurde eine Testsubstanz benötigt, die ähnliche strukturelle Eigenschaften wie ATX-II aufweist. Aufgrund seiner Epoxidgruppe, den vielen Publikationen über gebildete DNA-Addukte und die kommerzielle Verfügbarkeit, wurde Glycidamid als Positivkontrolle gewählt.

Glycidamid ( $M = 135,13 \text{ g/mol}$ ) ist zwar ein wesentlich kleineres Molekül als ATX-II, was einen direkten Vergleich der beiden Substanzen erschwert. Da es aber auf dieselbe Weise mit der DNA reagiert, die in dieser Arbeit auch für ATX-II vermutet wird, wurde es trotzdem zur Methodenentwicklung herangezogen.

Von den DNA-Addukten, die Glycidamid mit Guanin bzw. mit Adenin bildet, sind die Strukturen sowie die Massen und die Massen der Fragmente sowie deren Strukturen bekannt. Diese sind in der Abbildung 23 bzw. der Tabelle 9 dargestellt und aufgelistet.

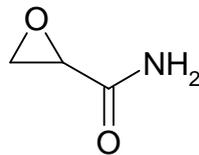


Abbildung 22: Struktur von Glycidamid

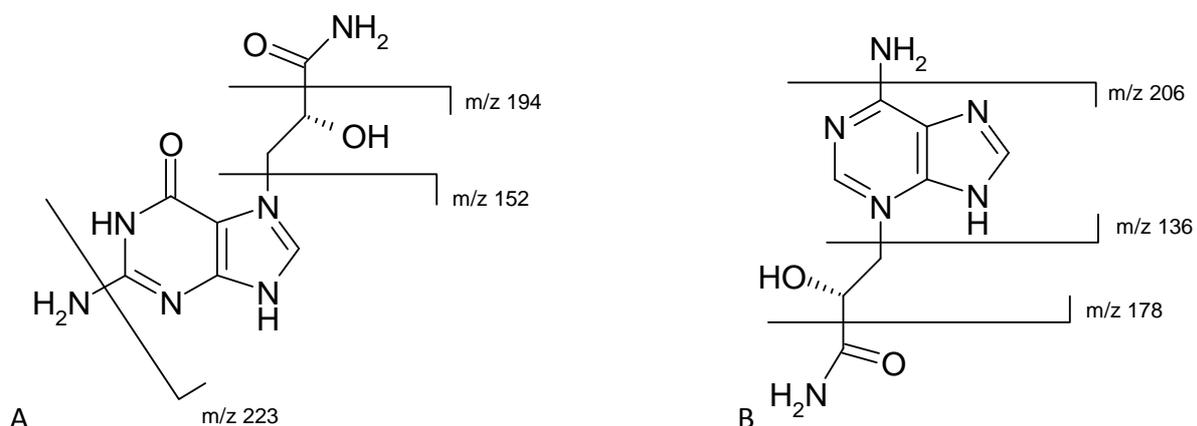


Abbildung 23: DNA-Basen-Addukte mit Glycidamid (GA). Die  $m/z$ -Verhältnisse geben die bekannten Bruchstellen für das N7-Guanin-GA-Addukt (Abb. A) und das N3-Adenin-GA-Addukt (Abb. B) an.

Um potentielle Produktionen von ATX-II-DNA-Addukten berechnen zu können, wurden zuerst potenzielle Strukturen dieser Addukte überlegt und berechnet. Als wahrscheinlichstes

Addukt wurde ein N7-Guanin-ATX-II-Addukt angenommen, wie es auch von Aflatoxin B1 mit Guanin bekannt ist (Essigmann et al., 1977). Als die wichtigsten Fragment-Ionen wurden das zurückbleibende Guanin und der Rest des Toxins vermutet, wobei sich die Epoxidgruppe entweder in ein Hydroxid- oder in eine Ketongruppe umlagern sollte (siehe Abbildung 24 und 25). Unter Berücksichtigung dieser Annahmen wurden die Massen der vermuteten Fragmente berechnet und im positiven Ionenmodus mittels „Single Ion Reaction Monitoring“ (SRM) gesucht, da die Massen im „Full Scan“-Modus aufgrund des hohen Hintergrundsignals nicht gefunden werden konnten (siehe auch Tabelle 10).

Für die ersten Versuche wurde Kalbsthymus-DNA (KT-DNA) mit Glycidamid (GA) inkubiert. Bei diesem Versuch konnten die bekannten und charakteristischen Fragmente (siehe auch Tabelle 9) von den Glycidamid-Addukten mit Adenin und Guanin gefunden werden, wobei scheinbar mehr GA-Guanin gebildet wurde. Nachdem die Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit Glycidamid gelungen war und die charakteristischen Addukte mit der verwendeten Methode gefunden werden konnten, wurde derselbe Versuch mit ATX-II durchgeführt. Allerdings konnten in diesem Fall keine gesuchten Signale gefunden werden. Trotz des negativen Ergebnisses wurde ein Zellversuch mit Glycidamid durchgeführt, um einen solchen zu erproben. Dafür wurden HT29-Zellen mit Glycidamid inkubiert, aufgearbeitet und an der HPLC-MS/MS gemessen. Dabei konnten keine Adduktfragmente nachgewiesen werden, da unter anderem das Hintergrundrauschen zu stark war bzw. das Messsignal zu niedrig. Diese Versuche wurden anschließend nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurden eine andere Methode versucht, über die durch persönliche Korrespondenz erfahren wurde.

**Tabelle 9: Produktionen Tabelle für Glycidamid mit Guanin und Adenin. Das Adenin-Glycidamid-Addukt besitzt eine Masse von m/z 223, das Guanin-Glycidamid-Addukt eine Grundmasse von m/z 239. Massenfragmente von N7-Guanin-GA-Addukt und das N3-Adenin-GA-Addukt laut Untersuchungen von Gamboa da Costa et. al. (2003).**

Parention [m/z] [M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	Produktion [m/z]
223	88
223	136
223	178
223	206
239	152
239	194

Tabelle 10: Produktionen Tabelle für potentielle Massenfragmente eines ATX-II-DNA-Basen-Addukt. Die potentiellen Adenin-ATX-II-Addukte wurden mit Massen von m/z 484 bzw. m/z 486 berechnet, bei den potentiellen Guanin-ATX-II-Addukten wurden Grundmassen von m/z 500 bzw. m/z 502 angenommen.

Parention [m/z] [M+H <sup>+</sup> ] <sup>+</sup>	Produktion [m/z]
484	136
484	349
486	136
486	351
500	152
500	349
502	152
502	351

### 5.7 Inkubation von DNA-Basen mit ATX-II

Da bei der Inkubation von Kalbsthymus-DNA mit ATX-II keine Addukte beobachtet werden konnten, wurde eine neue Methode nach dem Vorbild von Pfenning C. (nach persönlicher Korrespondenz) erdacht.

In diesem Fall werden die reinen DNA-Basen, Guanin und Adenin, mit ATX-II inkubiert und untersucht, ob es zu einer Reaktion kommt. Diese Methode hat den Vorteil, dass nur die Reaktion von ATX-II mit jeweils einer Base möglich sein sollte. In diesem Fall erhöht sich natürlich die gesamte Ausbeute von einem Produkt, wodurch die Wahrscheinlichkeit, dass ein Produkt in messbarer Konzentration vorhanden ist, steigt.

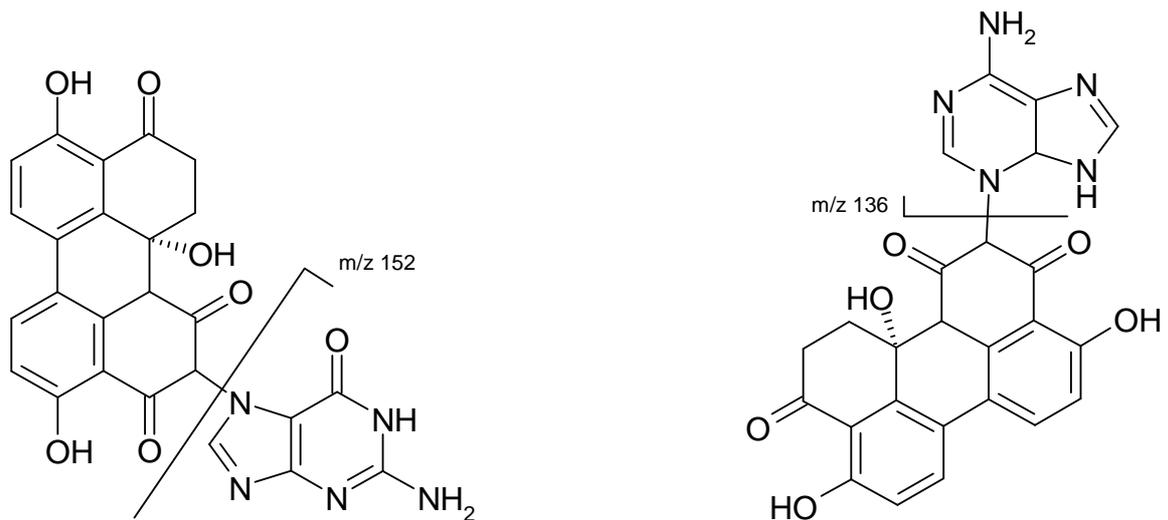


Abbildung 24: Hypothetische Strukturen potentieller DNA-Addukte mit ATX-II. In diesem Fall wurde davon ausgegangen, dass die Epoxidgruppe des ATX-II mit jeweils einem der Stickstoffe in Position 3 bzw. 7 des Purinsystems reagiert. Für das Guanin-Addukte wurde hierbei eine N7-Bindung angenommen, da diese Struktur bereits von Aflatoxin B1 mit Guanin bekannt ist. Bei Adenin wurde von einer Addition an N3 ausgegangen, da es besonders exponiert liegt und eine Bindung am N7 durch die Aminogruppe erschwert werden würde.

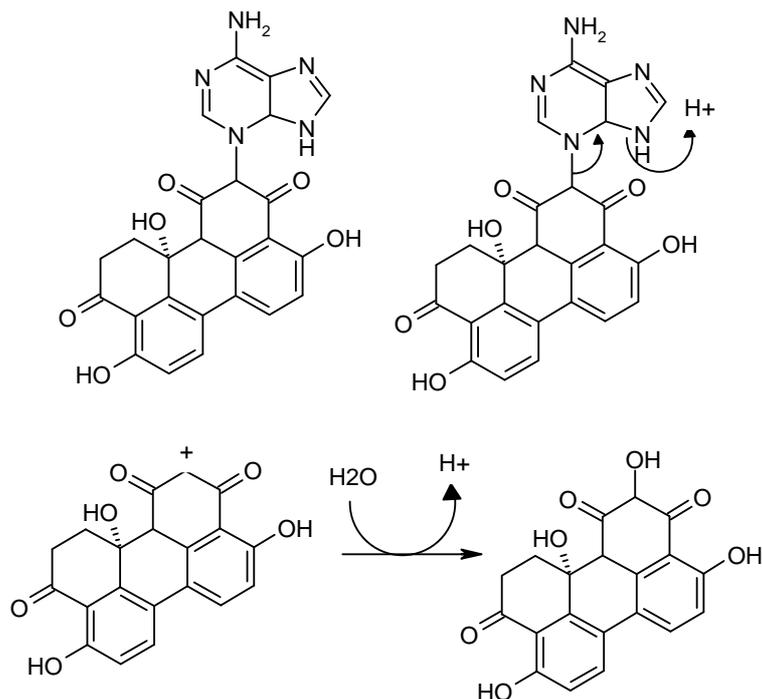
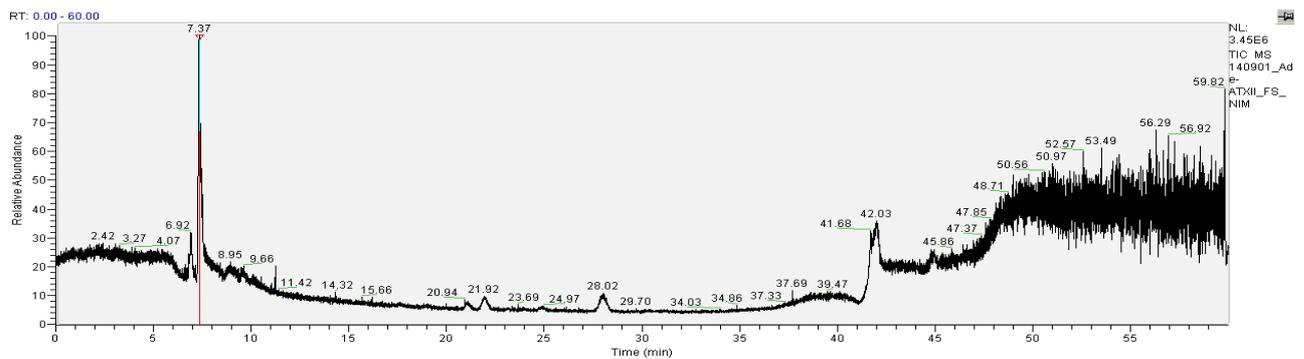


Abbildung 25: Mögliche Fragmentstrukturen des Adenin-ATX-II-Adduktes: Es wurden Reaktionswege überlegt, welche Fragmente in der Masse gebildet werden könnten. Dabei wurde hauptsächlich davon ausgegangen, dass sich das Adenin wieder vom ATX-II löst, wobei die verbleibende Struktur des ehemaligen ATX-II nicht klar ist. Eine der Überlegungen ist oben abgebildet, wobei es zu einer Dicarbonylbildung kommen würde. Durch Addition von Wasser könnte eine zusätzlich Hydroxygruppe angelagert werden.

Dementsprechend wurde Guanin und Adenin jeweils mit ATX-II inkubiert. Die mit ATX-II inkubierten DNA-Basen wurden wieder an der HPLC-MS/MS gemessen. Wie bei den

Vorversuchen mit Glycidamid und Kalbsthymus-DNA wurde zuerst im positiven Ionenmodus gemessen. Da hier allerdings nur ein sehr niedriges ATX-II-Signal zu sehen war, wurden weitere Messungen im negativen Ionenmodus durchgeführt, in dem ATX-II höhere Intensitäten zeigte. Dabei nahm jedoch die Intensität des Adeninpeaks ab. Weiters wurde nicht länger in Ethanol, sondern in Ammoniumacetat gelöst und darin die Probe analysiert, da dieses, Messungen im negativen Ionenmodus begünstigte sollte.



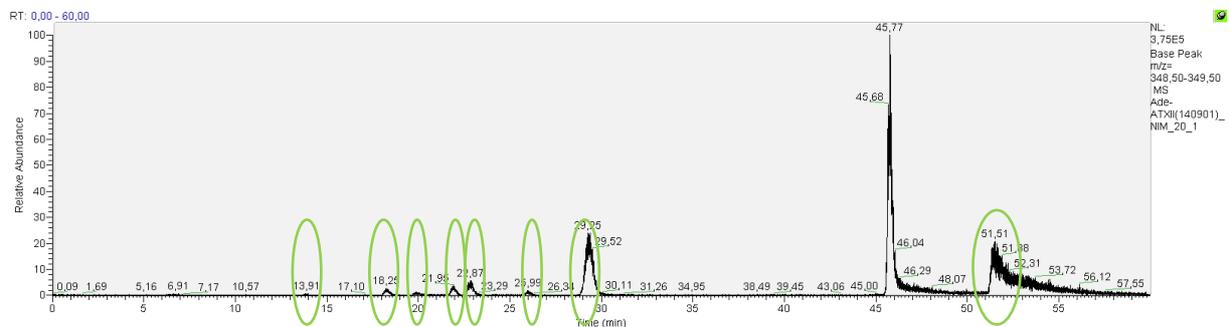
**Abbildung 26:** Mit ATX-II inkubierte Adenin-Lösung (in Ammoniumacetat), negativer Ionenmodus. Intensität:  $3,45 \cdot 10^6$ ; das erste, große Signal bei  $t_R = 7,37$  min entspricht Adenin, die folgenden Signale, geringerer Höhe entsprechen einem  $m/z = 349 \pm 0,5$ .

Beim Full Scan im negativen Ionenmodus von mit ATX-II inkubiertem Adenin fielen einige kleine Signale auf. Bei Betrachtung der  $m/z$ -Werte im Bereich von  $m/z = 349 \pm 0,5$  wurde festgestellt, dass diese kleinen Signale darin liegen (siehe Abbildung 26 und 27). Diese Signale wurden bei der Guanin-ATX-II Probe nicht gefunden. Um diesem Phänomen nachzugehen wurden die weiteren Untersuchungen nur noch mit inkubiertem Adenin durchgeführt, obwohl eigentlich erwartet worden war, dass sich hauptsächlich Guanin-Addukte bilden würden.

Um die beobachteten Signale genauer hinsichtlich ihrer Masse untersuchen zu können, wurden diese mittels des zuvor verwendeten LC-Laufs aufgetrennt. Dafür wurde die HPLC, die an der MS/MS angeschlossen war, verwendet. In sehr eng bemessenen Zeitintervallen (Zeitintervalle durch vorige Messungen festgelegt, siehe Abbildung 27) wurden die Fraktionen gesammelt und an einer QTOF-MS gemessen. Der Vorteil dieses Gerätes liegt darin, dass die exakten Massen bestimmt werden können. Da allerdings, die auf der HPLC-MS/MS beobachteten Massen, nicht auf der QTOF-MS zu finden waren, wurde angenommen, dass in den Fraktionen zu viel Matrix enthalten war, da sich die gemessenen Massen von Fraktion zu Fraktion fast nicht unterschieden. Hierbei ist nicht auszuschließen, dass die Zielmoleküle über den Zeitraum der Fraktionsnahme zerfallen waren. Dies ist andererseits unwahrscheinlich, da diese Proben für nur relativ kurze Zeit ungekühlt stehen

geblieben waren, wohin gegen die Messungen an der HPLC-MS/MS zum Teil erst nach 8 Stunden bei auf 10°C gekühlten Proben durchgeführt wurden.

Fraktion	RT [min]
1	13-14
2	17,5-18,5
3	19,5-20,5
4	21,2-22,2
5	22,2-23,2
6	25,3-26,3
7	28,5-29,5
8	51-52



**Abbildung 27: Base Peak-Analyse (aus Full Scan Messung) bei  $m/z$  349  $\pm$  0,5; Die Markierungen (grüne Ovale) zeigen die Signale/Zeiten, bei denen eine Fraktion genommen wurde, an. Parameter der Messung sind auf Seite 43ff (unter Punkt 4.10) zu finden.**

Da dieselbe Masse normalerweise nicht bei unterschiedlichen Retentionszeiten eluieren kann, muss davon ausgegangen werden, dass ATX-II zum Zeitpunkt der Auftrennung auf der Säule nicht in Reinform, sondern in Verbindungen oder Komplexen vorlag, welche bei der Ionisierung zerfallen waren. Diese Komplexe lassen sich scheinbar auf der Trennsäule auftrennen, sind allerdings nicht Hitze beständig, wodurch sie im Elektronenspray der ESI zerfallen. Hierbei handelt es sich allerdings rein um eine Hypothese. Es wurde daher versucht, den Elektronenspray auf niedrigere Temperaturen (200-250°C) einzustellen, um so die potentielle thermische Zersetzung zu minimieren. Das war aber nicht möglich, da bei diesen Versuchen stets das Vakuum zusammenbrach (die Vakuum-Messröhre war defekt) und somit automatisch die Messung abgebrochen wurde. Mögliche Komplex- oder ähnliche, hitzelabile Verbindungen wären neben einem ATX-II-Adenin-Addukt ein ATX-II-Ammoniumkomplex, so wie ein ATX-II Hydrochlorid. Es kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass ATX-II möglicherweise mit einem anderen ATX-II-Molekül einen Komplex oder gar eine echte chemische Verbindung bildet und dieses ATX-II-Dimere dann in der ESI wiederum zerfällt.

## 6 Conclusio

In dieser Arbeit sollte das Potential von ATX-II, Zellen (besonders hinsichtlich Angriffe auf die DNA) zu schädigen untersucht werden. Es war bereits bekannt, dass ATX-II zu schweren DNA-Schäden führen kann, allerdings sind die genauen zellulären Abläufe noch nicht geklärt.

Um Test mit ATX-II durchführen zu können, musste es zuerst isoliert werden. Nach einigen Versuchen wurde schlussendlich eine von Schwarz (2012) publizierte Methode verwendet. Mit dieser gelang es fast 13 mg ATX-II mit einer Reinheit von mindestens 93% zu generieren.

Dieses ATX-II wurde verwendet, um die Wirkung von ATX-II auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen zu untersuchen. Ähnliche Messungen wurden schon von Christoph Schwarz in seiner Dissertation (Schwarz, 2012) durchgeführt, allerdings mit anderen Konzentrationen und Inkubationszeiten/-bedingungen. In diesem Teil der Arbeit wurde festgestellt, dass eine ATX-II-Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  die tGSH-Konzentration bei einer einstündigen Inkubation leicht absenkt. Bei längeren Inkubationszeiten wurde der tGSH-Gehalt der Zelle hingegen signifikant gesteigert. Insbesondere nach einer Inkubationsdauer von 24 h mit ATX-II wurde ein starker Anstieg des tGSH-Gehalts in der Zelle gemessen, der bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  ATX-II beinahe dasselbe Ausmaß wie die Positivkontrolle tBHQ annimmt. Dies weist auf einen schweren Eingriff in den Redox-Cyclus der Zelle hin. Einerseits, da signifikant mehr GSH produziert wurde, welches die Zelle zum Abfangen von ROS benötigt. Andererseits sinkt der prozentuale GSSG-Gehalt nach 24 h Inkubation im Vergleich zur 1 h Inkubation stark, gleichzeitig steigt die GSSG-Konzentration konzentrationsabhängig in jeder Inkubation an (siehe Anhang Tabelle 32). Dadurch verändert sich das GSH/GSSG-Verhältnis der Zelle, wobei mehr GSSG gebildet wird. Dies passiert wenn zwei Moleküle GSH zu GSSG oxidiert werden, um dadurch ROS zu reduzieren. Christoph Schwarz (2012) untersuchte bereits die Möglichkeit der Aktivierung der Gene Nrf2, GSTA1 und GSTA2 durch ATX-II mit der Vermutung, dass ATX-II auf den Nrf2/ARE-Signalweg wirken könnte, welcher für die Detoxifizierung der Zelle zuständig ist (Schwarz, 2012). Vorstellbar wäre unter anderem eine verstärkte Expression von  $\gamma$ -GCL, wodurch verstärkt GSH biosynthetisiert werden würde.

Bereits nach drei Stunden Inkubationszeit mit ATX-II war der zelluläre GSH-Spiegel signifikant erhöht, was auf oxidativen Stress schließen lässt. Allerdings waren die Werte nicht in dem Ausmaß erhöht, wie bei einer 24 h Inkubation.

Bei der 1 h Inkubation (mit 10% FKS) könnte GSH mit ATX-II reagiert haben (Fleck et al. 2014), was die leichte GSH-Senkungen erklären würde. Andererseits ist es auch denkbar, das

ATX-II bereits nach diesem Zeitintervall oxidativen Stress induziert und GSH zum Abfangen der ROS verbraucht wird.

Weiters wurde in dieser Arbeit der These nachgegangen, dass ATX-II möglicherweise ähnlich wie Aflatoxin-B<sub>1</sub> DNA-Addukte bilden könnte. Diese These konnte in der Arbeit nicht bestätigt und auch nicht widerlegt werden. Es wurden bei den HPLC-MS/MS-Messungen keine gesuchten Massen gefunden, die auf ein ATX-II-DNA-Addukt hätten schließen lassen. Weiters wurden auch keine m/z-Signale gefunden, die ein Fragment eines solchen Addukts hätten sein können. Da das reine ATX-II Molekül auch kein besonderes Fragmentierungsmuster, sondern lediglich zwei Wasserabspaltung bei weicher Ionisation (ESI) aufweist, war dies zu befürchten. Im Vorfeld wurde spekuliert, dass bei einer Anlagerung an die DNA-Basen stabile Verbindungen geknüpft werden, welche man anhand ihrer Masse einer ATX-II-DNA-Base-Verbindung zu ordnen könnte. Da es sich bei ESI um eine sanfte Ionisierungsmethode handelt, wurde nicht erwartet, dass die Basenaddukte anders fragmentieren als ATX-II selbst. Andererseits konnten Signale mit denselben Massen bei unterschiedlichen Retentionszeiten gefunden werden, was darauf schließen lässt, dass auf der Trennsäule eine Auftrennung stattgefunden haben muss, was wiederum darauf hindeutet, dass zuvor unterschiedliche (Komplex-) Verbindungen mit ATX-II vorhanden gewesen waren, welche im Elektronenspray zerfallen sind. Diesem Problem könnte man durch geringere Temperaturen im Elektronenspray entgegen wirken, was allerdings mit dem verfügbaren Gerät zu diesem Zeitpunkt nicht möglich war, da es defekt war. Weiters wäre es sicher hilfreich, das Trennsystem auf eine UHPLC zu adaptieren, um so eine größere Menge Probe im Vergleich zum Lösungsmittelhintergrund applizieren zu können und so höhere Konzentrationen bei gleichem Probenvolumen zu untersuchen. Anfangs sollte man die Messungen an einem Gerät mit hoher Massengenauigkeit durchführen, um bei eventuell gefundenen unbekanntem Molekülen direkt eine potentielle Struktur erarbeiten zu können. Dafür würde sich die oben genannte QTOF gut eignen.

## 7 Materialliste

### 7.1 Chemikalienliste

Acetonitril:	SAF, Acetonitril Chromasolv 2,5L
bidestilliertes Wasser:	Millipore, Milli-Q, Direct 8
Methanol:	SAF, Methanol LC-MS Chromasolv 2,5L, K2
Ameisensäure (FAc):	Fisher Scientific, Ameisensäure, Optima, LC-MS gradl, 50 ml
Dichlormethan:	VWR, Methylenchlorid techn., E17
HT29-Zellen:	HT-29 (ATCC® HTB-38™)
DMEM 1x-Medium:	Gilbco, DMEM, high glucose, pyruvate
PS:	Gilbco, Penicillin-Streptomycin (5,000 U/mL)
FKS:	Gilbco, Fetal Bovine Serum, qualified, heat inactivated, E.U.-approved, South America Origin
Trypsin:	Roth, Trypsin
KT-DNA:	Sigma, Deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus
Glycidamid:	Sigma, Glycidamide
DMSO:	Roth, Dimethylsulfoxid für Zellkultur
Isopropanol:	Roth, 2-Propanol ROTISOLV® ≥99,95 %, LC-MS-Grade
Ethanol:	Roth/Austr.Alc Agrqar, Ethanol Absolut
Guanin:	Aldrich, Guanine, 98%
Adenin:	Sigma, Adenine, >99%
Ammoniumacetat:	Fluka, Ammoniumacetat, puriss
4N HCl:	Roth, Salzsäure 4 mol/L – 4N Lösung
Tryphanblau	Sigma, Trypan Blue solution

10% FKS – Medium:	siehe 4.4. Zellkultur
0% FKS – Medium:	siehe 4.4. Zellkultur
4- Vinylpyridine:	Sigma, 4-Vinylpyridine
2- Vinylpyrdine:	Sigma, 2-Vinylpyridine
Kaliumdihydrogenphosphat:	Roth, Kaliumdihydrogenphosphat, >99%, p.a.
Dikaliumhydrogenphosphat:	Roth, di-Kaliumhydrogenphosphat, 99%, p.a., wasserfrei
5-Sulfosalicylsäure:	Sigma, Sulfosalicylic acid dihydrate -5
reduziertes Glutathion:	Sigma, L-Glutathione reduced
oxidiertes Glutathion:	Sigma, L-Glutathione oxidized
Glutathionreduktase:	Sigma, Glutathione Reductase from baker's yeast ( <i>S. cerevisiae</i> ), G3664
NADPH:	Sigma, Isocitic Dehydrogenase
DTNB:	Sigma, 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoicacid)
t-BHQ:	Sigma, tert-Buthylhydrochinon
BSO:	Sigma, L-Buthionine-sulfoximine
BCA-Kit:	Sigma, BCA1-KT
BSA:	Thermo Scientific, Prod-#: 23210, Albumin Standard (2 mg/mL)

## 7.2 Geräteliste

Verdampfer:	S-Concentrator BA-VC-300H, H. Saur
Vakuumpumpe:	Vaccumbrand PC 3000 series
Kühlgerät:	endocal, Neslab
Rotationsverdampfer:	Büchi Rotavapor R-114, Waterbath B-480, Laboport KNF Neuberger
Ultraschallbad:	VWR, Ultrasonic Cleaner
Festphasensäulen:	Merck, 3 mL Lichrolut RP-18 (40-63 µm)
Pumpe:	KNF Laboport
Zellkulturflasche:	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D

Brutschrank:	Hera Cell 240i, CO2 Inkubator
Laminar:	Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifugenfilter:	Millipore's Amicon Microcon Centrifugal Filter Devices
Heizrüttler:	IKA RCT basic
Qiagen Kit:	Blood and Cell Culture DNA Maxi Kit (10), Qiagen, Cat. No. 13362
pH-Meter:	Mettler Toledo, Seven Easy
Thermoblock:	Thermo Shaks TS-100
Zentrifuge:	Mikro 200, Hettich Zentrifugen
Nano-Drop:	NanoDrop 2000 c, peQLab
Zentrifuge:	Zentrifuge Rotina 420R, Rotina 420 4786, Hettich
Platereader:	Victor V3 Multilable Plate Counter, Perkin Elmer, Boston, MA, USA
Software:	Wallac 1420, Version 3.00

## 8 Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AFB <sub>1</sub>	Aflatoxin B1
AOH	Alternariol
AME	Alternariolmonomethylether
ARE	antioxidant response element
ATX-I	Altertoxin I
ATX-II	Altertoxin II
tBHQ	tert-Buthylhydrochinon
BSO	L-Buthionin-sulfoximin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
ESI	Elektronenspray Ionisation
FKS	Fötales Kälber Serum
GA	Glycidamid
GR	Glutathionreduktase
tGSH	Gesamtglutathion
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
GSTA1	Glutathion-S-Transferase A1
GSTA2	Glutathion-S-Transferase A2
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Massenspektrometer
NADPH+H <sup>+</sup>	reduziertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat

NADP <sup>+</sup>	oxidiertes Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related protein 2
SSA	5-Sulfosalicylsäure
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoat
QTOF	Time of Flight
2-VP	2-Vinylpyridin
4-VP	4-Vinylpyridin

## 9 Literatur

- Aimee L.E., et al. (2008): "Molecular mechanisms of natural products in chemoprevention: Induction of cytoprotective enzymes by Nrf2." Molecular Nutrition and Food Research **52**: 84-94.
- Anderson, C. P., et al. (1999). "Depletion of Glutathione by Buthionine Sulfoximine Is Cytotoxic for Human Neuroblastoma Cell Lines via Apoptosis." Experimental Cell Research **246**(1): 183-192.
- Barkai-Golan, R. (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control, Elsevier.
- Bräse, S., et al. (2013). Alternaria Metabolites. The Chemistry of Mycotoxins, Springer Vienna. **97**: 127-137.
- Brugger, E.-M., et al. (2006). "Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells." Toxicology Letters **164**(3): 221-230.
- Chu, F. (1981). "Isolation of altenuisol and altertoxins I and II, minor mycotoxins elaborated by alternaria." Journal of the American Oil Chemists' Society **58**(12): A1006-A1008.
- EFSA (2009), Scientific information on mycotoxins and natural plant toxicants, EFSA-Q-2008-04995, [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific\\_output/files/main\\_documents/24e.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/24e.pdf) (18.10.15)
- Ellman, G. L. (1959). "Tissue sulfhydryl groups." Archives of Biochemistry and Biophysics **82**(1): 70-77.
- Essigmann, J. M., et al. (1977). "Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences **74**(5): 1870-1874.
- Fehr, M., et al. (2009). "Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II $\alpha$  isoform." Molecular Nutrition and Food Research **53**(4): 441-451.
- Feld, J. (2010). Charakterisierung der DNA-schädigenden Wirkung von Acrylamid in Lebensmitteln am Modell der Ratte, Dissertation. Technische Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern.
- Fink-Gremmels, J. (2008). "Mycotoxins in cattle feeds and carry-over to dairy milk: A review." Food Additives & Contaminants: Part A **25**(2): 172-180.
- Fleck, S. C., et al. (2014). "Epoxide Reduction to an Alcohol: A Novel Metabolic Pathway for Perylene Quinone-Type Alternaria Mycotoxins in Mammalian Cells." Chemical Research in Toxicology **27**(2): 247-253.

Gamboa da Costa, G., et al. (2003). "DNA Adduct Formation from Acrylamide via Conversion To Glycidamide in Adult and Neonatal Mice", *Chem. Res.Toxicol.* 16: 1328-1337

Gehrke, H. S. (2012). Biologische Wirkungen metallischer und nichtmetalloxidischer Nanopartikel in Zellen des Gastrointestinaltrakts, uniwiien.

Griffin, G. F. and F. S. Chu (1983). "Toxicity of the Alternaria metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay." *Applied and Environmental Microbiology* 46(6): 1420-1422.

Hasija, S. K. (1970). "Physiological Studies of Alternaria citri and A. tenuis." *Mycologia* 62(2): 289-295.

Lorenz, N., et al. (2012). "Report: Aktueller Sachstand zum Thema „Alternaria-Toxine“ aus Sicht des gesundheitlichen Verbraucherschutzes." *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 7(4): 359-365.

Magan, N., et al. (1984). "Effect of water activity and temperature on mycotoxin production by Alternaria alternata in culture and on wheat grain." *Applied and Environmental Microbiology* 47(5): 1113-1117.

Marengo, B., et al. (2008). "Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma." *Free Radical Biology and Medicine* 44(3): 474-482.

Mills, G. C. (1957). "HEMOGLOBIN CATABOLISM: I. GLUTATHIONE PEROXIDASE, AN ERYTHROCYTE ENZYME WHICH PROTECTS HEMOGLOBIN FROM OXIDATIVE BREAKDOWN." *Journal of Biological Chemistry* 229(1): 189-197.

Nielsen, K. F., et al. (1999). "Production of mycotoxins on artificially and naturally infested building materials." *Mycopathologia* 145(1): 43-56.

Ostry, V. (2008). "Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs." *World Mycotoxin Journal* 1(2): 175-188.

Pero, R. W., et al. (1973). "Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria". " *Environmental Health Perspectives* 4: 87-94.

Puppel, N. (2008). *Untersuchungen zur Genotoxizität von Acrylamid und Glycidamid an Säugerzellen*, VDM, Verlag Dr. Müller.

Raney, V. M., et al. (1993). "DNA conformation mediates aflatoxin B1-DNA binding and the formation of guanine N7 adducts by aflatoxin B1 8,9-exo-epoxide." Chemical Research in Toxicology **6**(1): 64-68.

Schwarz, C., et al. (2012). "Characterization of a genotoxic impact compound in *Alternaria alternata* infested rice as Alvertoxin II." Archives of Toxicology **86**(12): 1911-1925.

Schwarz, C. R. H. (2012). Charakterisierung genotoxischer Impactkomponenten komplexer *Alternaria*extrakte, uniwiien.

Sies, H., et al. (1972). "Oxidation in the NADP system and release of GSSG from hemoglobin-free perfused rat liver during peroxidatic oxidation of glutathione by hydroperoxides." FEBS Letters **27**(1): 171-175.

Söderhäll, K., et al. (1978). "Light inhibits the production of alternariol and alternariol monomethyl ether in *Alternaria alternata*." Applied and Environmental Microbiology **36**(5): 655-657.

Sørensen, L. K. and T. H. Elbæk (2005). "Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography B **820**(2): 183-196.

Stack, M. E. and M. J. Prival (1986). "Mutagenicity of the *Alternaria* metabolites alvertoxins I, II, and III." Applied and Environmental Microbiology **52**(4): 718-722.

Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues." Analytical Biochemistry **27**(3): 502-522.

Traverso, N., et al. (2013). "Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**.

Wang, J.-S. and J. D. Groopman (1999). "DNA damage by mycotoxins." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis **424**(1-2): 167-181.

Zhao, K., et al. (2015). "Natural Occurrence of Four *Alternaria* Mycotoxins in Tomato- and Citrus-Based Foods in China." Journal of Agricultural and Food Chemistry **63**(1): 343-348.

## 10 Anhang

### 10.1 Abstract

Mycotoxins are secondary metabolites of moulds. They are found worldwide but in different concentrations and mixtures due to climatic (e.g. temperature) and area specific (ground, pH value of the ground) properties. Contaminating the food and feed of animals and humans alike, they pose a threat to their health.

The mycotoxins ATX-II possess a perylenchinon structure and shows genotoxic and cytotoxic properties, which maybe can be explained with its structure. Scientific research proved DNA strand-breaking activity in cells but the reaction path is yet to be known.

To enhance our knowledge of ATX-II it is the goal of this thesis to gather more data concerning the toxicology of ATX-II. Since ATX-II is not commercial available the first step was to isolate ATX-II from a mycotoxin extract. Using the method described by Schwarz (2012) it was possible to isolate nearly 13 mg ATX-II with a purity of at least 93%. 21,91 mg ATX-II were isolated in total.

The glutathione (=GSH) level is one of the main parameters for the stress levels in the cells. GSH reacts with reactive oxygen species (=ROS) and acts therefore as an antioxidant. In this thesis it is shown that ATX-II affects the GSH concentration in HT29 cells using the tGSH-Assay by Tietze (1969). While incubating HT29 cells for 1 h with ATX-II did only slightly change the tGSH concentration at the highest concentration of ATX-II used (5  $\mu$ M), exposing the cells to ATX-II for 3 h increased the tGSH concentration (at ATX-II concentrations of 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M) a little. After 24 h incubation with ATX-II (1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M) the tGSH levels increased strongly.

At last it was investigated if ATX-II could produce DNA-adducts. By incubating adenine/guanine directly with ATX-II the formation of ATX-II-Adducts with the respective DNA base. On the HPLC-MS/MS there was no m/z ratios found, that could be associated with potential DNA-adducts.

## 10.2 Zusammenfassung

Mykotoxine sind sekundäre Stoffwechselmetabolite von Schimmelpilzen. Auf Grund des ubiquitären Vorkommens von Schimmelpilzen, sind auch Mykotoxine weltweit zu finden. Allerdings unterscheiden sich die Arten und die Konzentrationen an Mykotoxinen ja nach klimatischen Bedingungen (Temperatur, Wasseraktivität) sowie räumlichen Bedingungen (Bodenzusammensetzung, pH-Wert des Bodens) stark. Durch Kontamination von Lebens- und Futtermitteln, sowie auch von Baustoffen und Textilien, stellen Schimmelpilze und dementsprechend auch ihr Mykotoxine eine Gefahr für die Gesundheit und das Leben von Menschen und Tieren dar.

Die Giftwirkung eines Mykotoxins hängt neben der Konzentration und der Art der Einnahme auch von dem Toxin spezifischen Eigenschaften wie der Struktur ab. Das Mykotoxin Alkoxin II verfügt über eine Epoxid-Gruppe, von der vermutet wird, dass sie maßgeblich für die genotoxischen und zytotoxischen Eigenschaften verantwortlich ist. Es ist bereits bekannt, dass ATX-II zu den DNA-Strangbrüchen in der Zelle führen kann, der genaue Mechanismus dafür ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Vorstellbar wäre die Bildung von DNA-Addukten, wie sie bereits von Aflatoxin B<sub>1</sub>, welches ebenfalls über eine Epoxid-Gruppe verfügt, bekannt sind.

Da ATX-II nicht kommerziell erhältlich ist, musste es zuerst aus einem Mykotoxinextrakt isoliert werden. Dies gelang mit einer von Schwarz (2012) entwickelten Methode, mit der 13 mg ATX-II einer Reinheit von mindestens 93% erhalten wurden. Insgesamt konnten 21 mg ATX-II isoliert werden.

Dieses wurde genutzt um das Ausmaß an oxidativen Stress in Zellen durch ATX-II mit Hilfe des tGSH-Assays nach Tietze (1969) untersucht. Hierbei sollte festgestellt werden, ob ATX-II die Konzentration an GSH, welches reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle abfängt, verringert/ erhöht/ unberührt lässt. Durch die Untersuchung des GSSG-Gehalts der Probe konnte außerdem ein weiterer Hinweis auf den Redox-Status in der Zelle erhalten werden. Bei diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die Glutathionkonzentration bei einer Exposition der Zellen für 1 h unverändert bis leicht verringert (bei einer ATX-II Konzentration von 5 µM) wird. Werden die Zellen für 3 h mit ATX-II inkubiert, steigen die Glutathionkonzentrationen bei den höchsten Konzentration (1 µM und 5 µM) leicht an. Nach 24 h Inkubationszeit ist die Glutathionkonzentration stark erhöht (1 µM und 5 µM ATX-II).

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob ATX-II ähnlich wie Aflatoxin B<sub>1</sub> in der Lage ist DNA-Addukte zu bilden und auf diesen Weg Zellen zu schädigen. Es konnten keine

Addukte mit den DNA-Basen Adenin und Guanin gefunden, allerdings auch nicht gänzlich ausgeschlossen werden.

### 10.3 Lebenslauf

Frau Victoria Dostal wurde am 2. Februar 1991 in Wien geboren. Der Besuch des Realgymnasiums Keimgasse (Mödling) mit Schwerpunkt auf Naturwissenschaften prägte ihr Interesse für Chemie. So nahm sie bereits ab der 5.Klasse (Gymnasium) am Freifach Chemieolympiade teil, wobei sie insgesamt drei Mal ihre Schule im Landeswettbewerb vertreten durfte und dabei Plätze unter den ersten 20 erreichte.

Mit 18 Jahren begann sie ihre universitäre Ausbildung an der Universität Wien an der Fakultät für Chemie. Nach sechs Semestern (Mindestzeit) erhielt sie ihren Bachelor für Chemie durch das Verfassen einer Bachelor-Arbeit im Bereich Materialchemie bei Hrn. Prof. Ipser.

Im Masterstudiengang der Chemie an der Universität Wien vertiefte sie ihre Kenntnisse der analytischen Chemie, der Umweltchemie und nicht zuletzt der Lebensmittelchemie und Toxikologie in der sie auch ihre Masterarbeit unter der Betreuung von Fr. Prof. Dr. Marko schrieb.

In der Zeit des Masterstudiums erhielt sie zweimal das Leistungsstipendium der Universität Wien.

## 10.4 Rohdaten

### 10.4.1 ATX-II Isolierung

Tabelle 11: Auswertung der Peaks, die mit der isokratischen Auftrennung [43% 0,1% FAc/57% MeOH] erhalten wurden.

Gezeigt wird das Signal mit der höchsten Intensität (bei Peak 1 die zwei höchsten Signale) jedes Chromatogramms.

Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.2.3, S 26ff)

	Retentionszeit (min)	Area (mAU*s)	Peakhöhe (mAU)
Peak 1(P1)	7,876	4103,37	595,16
Peak 1(P2)	8,107	3201,25	399,17
Peak 2	9,090	4090,41	424,71
Peak 3	13,272	4407,56	401,56
P3 (1)	13,256	5457,47	76,63
P3 (2)	13,274	5736,83	519,70
P3 (3)	13,262	6669,94	610,80
P3 (4)	13,282	3843,40	348,88
P3 (5)	13,266	9465,59	852,21
P3 (6)	13,276	3940,76	358,72
P3 (7)	13,255	4194,55	379,91
P3 (8)	13,290	2277,54	204,98
P3 (H2O)	13,256	980,86	89,48
Peak 3	13,993	8693,04	751,99

Tabelle 12: Gezeigt sind die Messungen nach dem ersten SPE-Durchlauf (siehe auch 4.3, S.27ff) der jeweiligen Fraktion.

Anhand der Daten wird beschlossen, Peak 1 und Peak 2 nicht mehr zu sammeln und aufzuarbeiten. Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.2.3, S.26ff)

	Retentionszeit (min)	Area (mAU*s)	Peakhöhe (mAU)
P3 (0-30%)	9,098	381,36	50,34
P3 (40-60%) P1	8,802	10150,9	1376,83
P3 (40-60%) P2	9,109	4598,67	552,18
P3 (40-60%) P3	13,131	17365,8	1602,41
P3 (100%)	13,097	447,73	41,27
P2 (10-20%)	5,645	72,66	4,60
P2 (30-40%)	9,277	217,64	22,41
P2 (50-60%)	9,095	6237,4	792,91
P2 (100%)	9,101	151,85	18,56
P1 (0-30%)	28,690	86,95	7,85
P1 (40-50%)	8,878	33010,7	2934,86
P1 (60%)	8,875	924,33	125,92
P1 (100%)	8,880	330,05	45,59

**Tabelle 13: Weitere Untersuchungen der Fraktionen von Peak 3 nach Aufarbeitung über die SPE-Säulen (siehe 4.3, S27ff).** Wie zu erkennen ist, ist ATX-II hauptsächlich in der 40% ACN Fraktion enthalten, geringere Mengen finden sich auch in der 50% ACN Fraktion. Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.2.3, S.26ff)

	Retentionszeit (min)	Area (mAU*s)	Peakhöhe (mAU)
P3 (30%)	8,859	8275,47	1141,91
P3 (40%)	13,246	13488,0	1249,11
P3 (50%)	13,249	1017,02	93,78
P3 (60%)	5,647	309,89	58,42
P3 (100%)	5,647	320,05	58,73
P3 (50%) 17.7	13,397	18764,9	1664,02
P3 (50%) 21.7.	13,412	4827,85	430,43
P3 (40%) 24.7.	13,428	11711,2	1037,38
P3 (50%) 23.7.	13,408	16188,3	1449,58
P3 (40%) 21+23.7.	13.384	2441,07	217,36
P3 (50%) 28.7.	13,403	1769,12	147,83
P3 (50%) n.k.	13,409	3084,33	272,84
P3 (40%) 28.7.	13,368	16724,8	1482,79

**Tabelle 14: Gezeigt sind die Reinheitsmessungen nach der Aliquotierung (siehe 4.3, S 27ff).** Bei Probe 5 sowie bei Probe 20, in denen weniger ATX-II enthalten ist, handelt es sich um aufgearbeitete Reste. Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.2.3, S.26ff)

	Retentionszeit (min)	Area (mAU*s)	Peakhöhe (mAU)
4	13,390	8712,72	773,45
5	13,426	1074,80	87,77
23.7.	13,393	10112,3	901,85
10	13,408	19131,3	1671,65
15	13,403	12183,3	1074,89
19	13,406	20734,7	1801,59
20	13,401	2735,08	242,72

**Tabelle 15: Errechnung der Reinheit er ATX-II-Aliquote.** Hierbei wurde das ATX-II Signal durch die Summe aller Signale dividiert und mit 100 multipliziert, wodurch das prozentuelle Volumen an ATX-II erhalten wurde. Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.2.3, S.26ff)

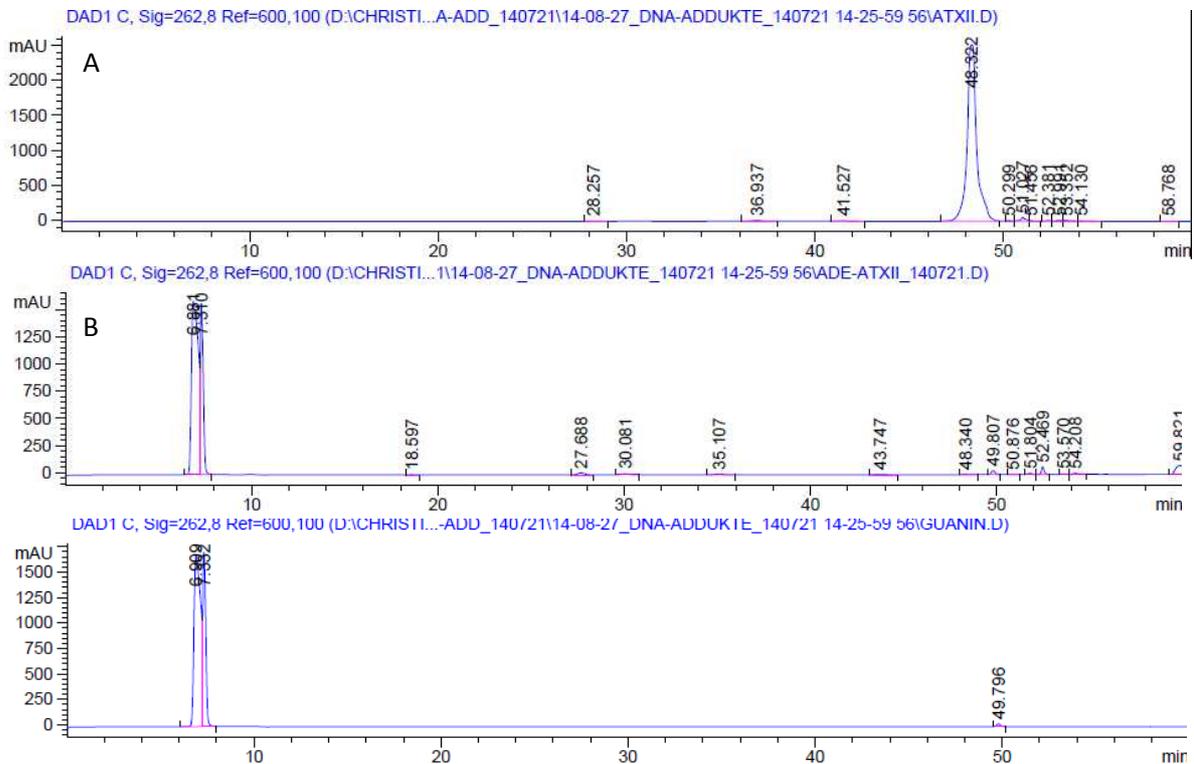
ATX-II-Konzentration nach SPE-Aufreinigung			
Name	Signal ATX-II	Signale gesamt	Verhältnis ATX-II/gesamt (%)
P3(40%)	2441,073	2994,100	81,5

21.7				
P3(40%)				
27.7.	16724,8	17477,398	95,7	
50%	1769,124	2934,215	60,3	
4	8712,720	9066,193	96,1	
5	1074,804	1907,310	56,4	
23.7.	10112,3	10644,594	95	
10	19131,3	20071,939	95,3	
15	12183,3	13106,923	93	
19	20734,7	22440,400	92,4	
20	2735,084	3227,455	84,7	

#### 10.4.2 DNA-Addukte

#### Messung von potentiellen Guanin-Addukten mittels HPLC-DAD

Exemplarische Darstellung der Chromatogramme der HPLC-DAD-Messung von Guanin, Gua-ATX-II und ATX-II. Bild A zeigt ATX-II (Standard), Bild B zeigt mit ATX-II inkubiertes Guanin und Bild C zeigt Guanin. Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.9, S.42ff)



Guanin:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.909	BV	0.3321	4.03715e4	1681.77283	66.9431
2	7.332	VV	0.1791	1.95483e4	1712.90198	32.4145
3	49.796	BB	0.2209	387.40631	27.41231	0.6424

Gua-ATX-II:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.881	BV	0.3349	3.91974e4	1593.89990	63.1174
2	7.310	VB	0.1785	1.78841e4	1574.50867	28.7978
3	18.597	BB	0.2501	27.30904	1.69352	0.0440
4	27.688	BB	0.4029	466.20758	17.95660	0.7507
5	30.081	BB	0.4185	223.44757	8.28958	0.3598
6	35.107	BB	0.5250	253.74278	7.38211	0.4086
7	43.747	BB	0.5696	148.69765	3.75829	0.2394
8	48.340	BB	0.3271	80.24326	3.45349	0.1292
9	49.807	BB	0.2196	509.24197	35.87125	0.8200
10	50.876	BB	0.1990	23.79082	1.94106	0.0383
11	51.804	BV	0.2334	172.55345	12.17487	0.2779
12	52.469	VB	0.1574	724.64520	70.78492	1.1669
13	53.570	BB	0.1893	65.54441	5.33644	0.1055
14	54.208	BB	0.3252	212.21242	9.55029	0.3417
15	59.821	BBA	0.4234	2113.22705	81.78690	3.4028

ATX-II:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.108	BB	0.3139	170.67249	7.21621	0.1992
2	6.574	BB	0.4130	7.08143e4	2340.72412	82.6426
3	18.486	BB	0.4175	322.61914	11.35376	0.3765
4	35.061	BV	0.7893	2002.88855	36.55196	2.3374
5	36.928	VB	0.7823	4921.02148	92.85553	5.7430
6	43.762	BB	0.7455	400.39151	7.95060	0.4673
7	48.312	BV	0.3400	1394.18994	58.93333	1.6271
8	49.431	VV	0.4366	594.53418	17.05873	0.6938
9	49.799	VB	0.3632	1284.25928	49.74473	1.4988
10	50.902	BB	0.4845	697.19067	18.21653	0.8136
11	51.865	BV	0.3014	615.25708	27.67494	0.7180
12	52.459	VV	0.2424	1095.84790	63.17657	1.2789
13	53.051	VV	0.2758	257.76819	12.97244	0.3008
14	53.528	VV	0.4089	318.72495	10.19060	0.3720
15	54.160	VB	0.3974	112.93681	4.15108	0.1318
16	55.599	BB	0.3039	57.54317	2.66542	0.0672
17	59.557	BBA	0.3079	627.26727	31.55490	0.7320

## Messung von potentiellen Adenin-Addukten mittels HPLC-DAD:

Messungen bei 262,8 nm, mit HPLC-DAD, Inj.Volumen 10µL. (siehe 4.9, S.42ff)

Adenin:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	6.600	BB	0.1993	2.94467e4	2364.25073	99.8363
2	7.267	BB	0.1753	48.28237	3.87658	0.1637

Ade-ATX-II:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.108	BB	0.3139	170.67249	7.21621	0.1992
2	6.574	BB	0.4130	7.08143e4	2340.72412	82.6426
3	18.486	BB	0.4175	322.61914	11.35376	0.3765
4	35.061	BV	0.7893	2002.88855	36.55196	2.3374
5	36.928	VB	0.7823	4921.02148	92.85553	5.7430
6	43.762	BB	0.7455	400.39151	7.95060	0.4673
7	48.312	BV	0.3400	1394.18994	58.93333	1.6271
8	49.431	VV	0.4366	594.53418	17.05873	0.6938
9	49.799	VB	0.3632	1284.25928	49.74473	1.4988
10	50.902	BB	0.4845	697.19067	18.21653	0.8136
11	51.865	BV	0.3014	615.25708	27.67494	0.7180
12	52.459	VV	0.2424	1095.84790	63.17657	1.2789
13	53.051	VV	0.2758	257.76819	12.97244	0.3008
14	53.528	VV	0.4089	318.72495	10.19060	0.3720
15	54.160	VB	0.3974	112.93681	4.15108	0.1318
16	55.599	BB	0.3039	57.54317	2.66542	0.0672
17	59.557	BBA	0.3079	627.26727	31.55490	0.7320

ATX-II:

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	0.108	BB	0.3139	170.67249	7.21621	0.1992
2	6.574	BB	0.4130	7.08143e4	2340.72412	82.6426
3	18.486	BB	0.4175	322.61914	11.35376	0.3765
4	35.061	BV	0.7893	2002.88855	36.55196	2.3374
5	36.928	VB	0.7823	4921.02148	92.85553	5.7430
6	43.762	BB	0.7455	400.39151	7.95060	0.4673
7	48.312	BV	0.3400	1394.18994	58.93333	1.6271
8	49.431	VV	0.4366	594.53418	17.05873	0.6938
9	49.799	VB	0.3632	1284.25928	49.74473	1.4988
10	50.902	BB	0.4845	697.19067	18.21653	0.8136
11	51.865	BV	0.3014	615.25708	27.67494	0.7180
12	52.459	VV	0.2424	1095.84790	63.17657	1.2789
13	53.051	VV	0.2758	257.76819	12.97244	0.3008
14	53.528	VV	0.4089	318.72495	10.19060	0.3720
15	54.160	VB	0.3974	112.93681	4.15108	0.1318
16	55.599	BB	0.3039	57.54317	2.66542	0.0672
17	59.557	BBA	0.3079	627.26727	31.55490	0.7320

## HPLC-MS/MS-Messungen:

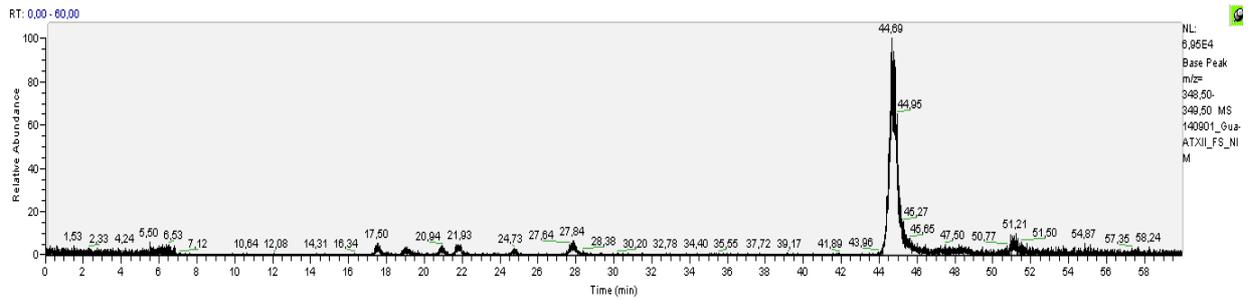


Abbildung 28: Mit ATX-II inkubiertes Guanin. Auch hier sind Signale zu erkennen, allerdings nicht so deutlich wie bei der Adenin-ATX-II Lösungen, weshalb für die Versuche nur noch das inkubierte Adenin verwendet wurde. LC-MS/MS-Chrom. (neg. Ionenmodus), Base Peak (aus Full Scan) ( $m/z$  349 $\pm$ 0,5), Guanin gelöst in  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , Ionenscan von 349  $\pm$  0,5  $m/z$  (siehe 4.10)

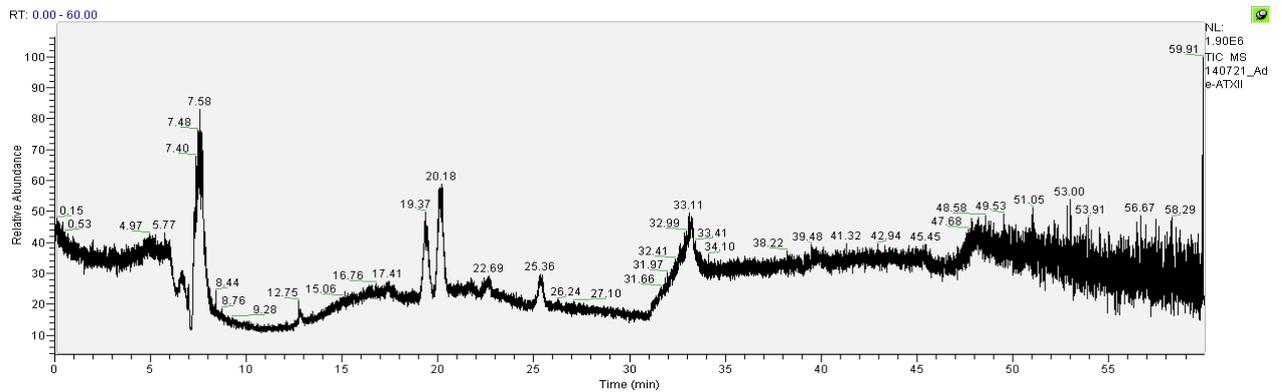


Abbildung 29: Adenin-ATX-II, gelöst in EtOH, LC-MS/MS-Chrom. (neg. Ionenmodus), Full Scan, (siehe 4.10), Intensität:  $1,9 \cdot 10^6$ .

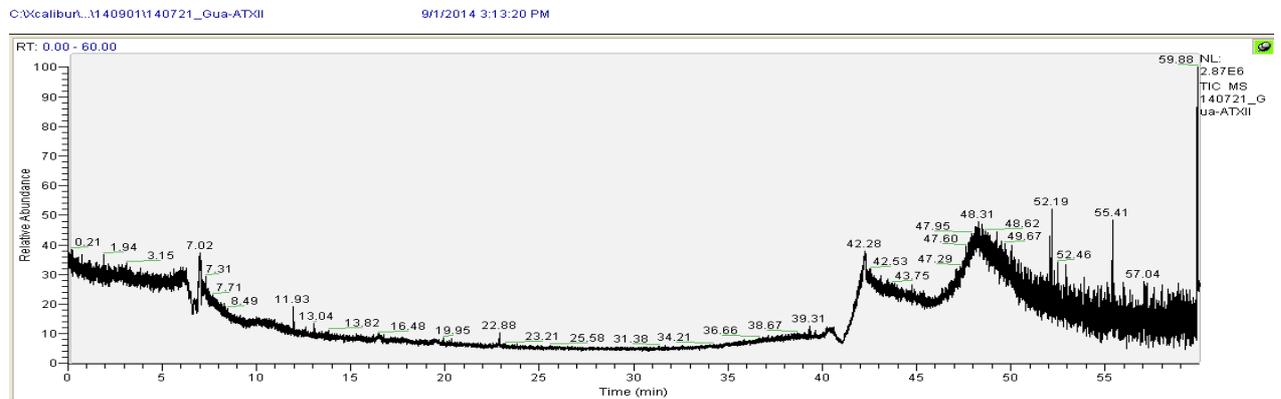


Abbildung 30: Guanin-ATX-II, gelöst in EtOH, LC-MS/MS-Chrom. (neg. Ionenmodus), Full Scan, (siehe 4.10), Intensität:  $2,87 \cdot 10^6$ .

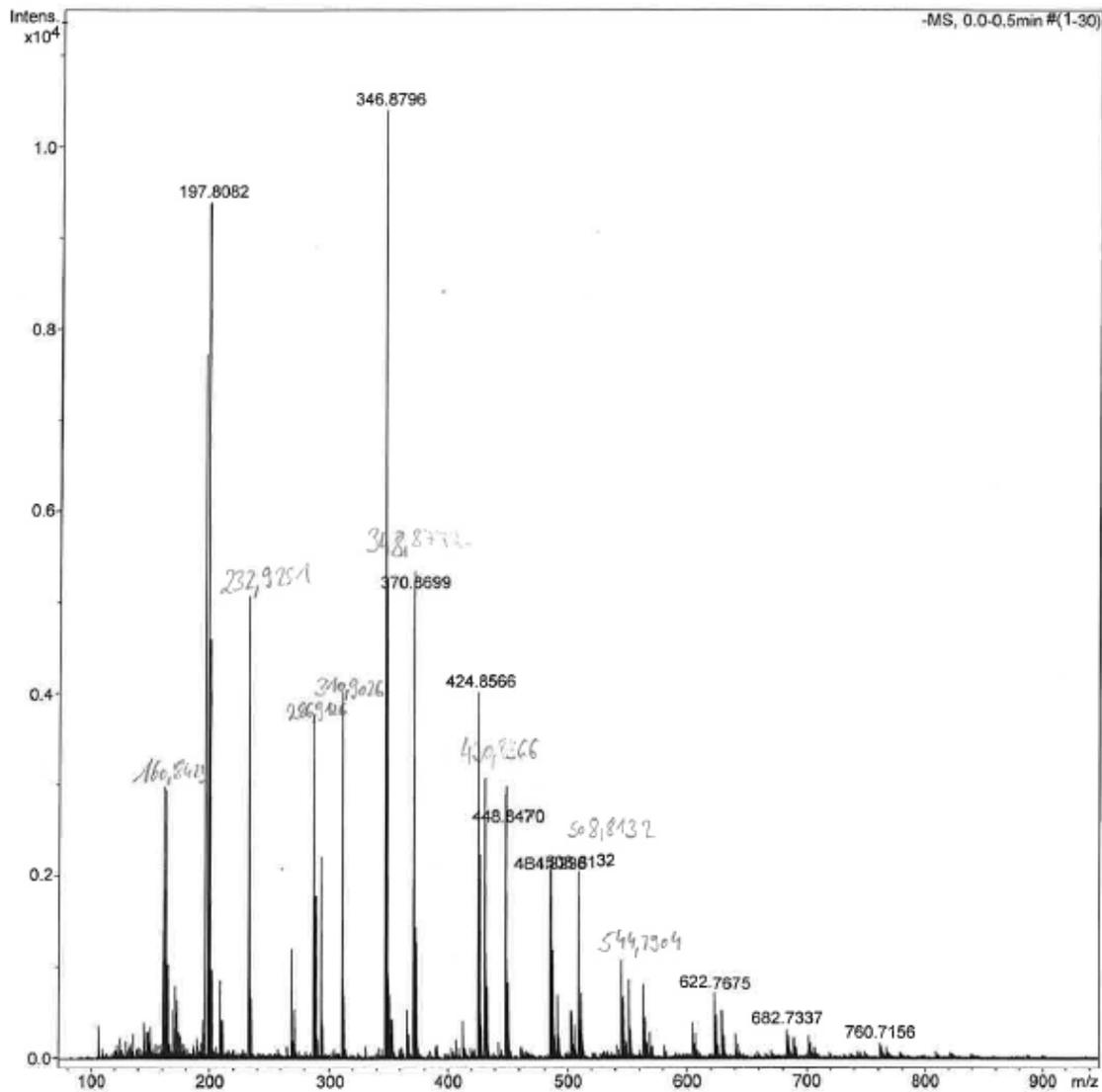


Abbildung 31: Exemplarische Messung der, an der LC-MS/MS gesammelten DNA-Addukt-Fractionen (siehe 4.10), gemessen mit einer QTOF-MS (maXis), negativer Ionenmodus. Es handelt sich hierbei um die Fraktion 7. Im Vergleich zu anderen Fraktionen zeigten sich sehr ähnliche Spektren, allerdings keine Massen, die ATX-II oder potentiellen Addukten zugeordnet werden konnten (siehe 4.10).

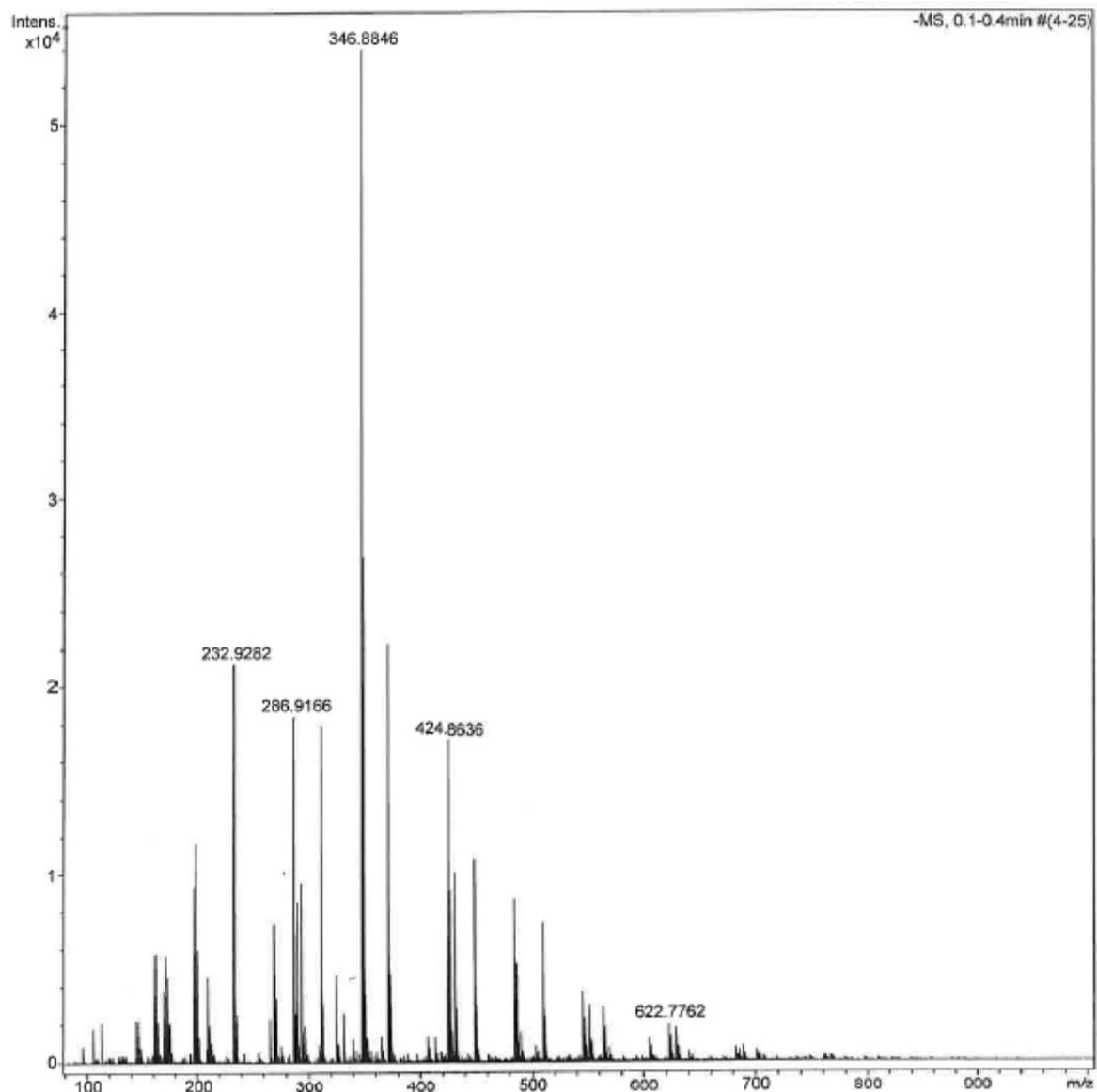


Abbildung 32: Exemplarische Messung der, an der LC-MS/MS gesammelten DNA-Addukt-Fractionen (siehe 4.10), gemessen mit einer QTOF-MS (maXis), neg. Ionenmodus. Abbildet ist das Spektrum von Fraktion 2. Man findet dieselben Massen wie bei Fraktion 7 wieder, wobei es sich vermutlich um Signale aus den Lösungsmitteln handelt.

### 10.4.3 tGSH-Vorversuche

Tabelle 16: Ausgewertet Daten der GSH-Messungen der Vorversuche (siehe 4.5.1 und 4.5.2)

	g/L	mM GSH (1:1 Verdünnung mit 10%SSA)	nmGSH/gProt	µmGSH/gProt	nmGSH/mgProt	DMSO = 100%
DMSO1	11,2200	0,3003	0,0268	26,7617	26,7617	100,00
DMSO2	8,0242	0,2014	0,0251	25,0938	25,0938	100,00
5 µM AOH	7,3351	0,1732	0,0236	23,6102	23,6102	94,09
10 µM AOH	9,2410	0,1980	0,0214	21,4277	21,4277	80,07
25 µM AOH	8,8780	0,2048	0,0231	23,0733	23,0733	91,95
50 µM AOH	9,1246	0,2227	0,0244	24,4098	24,4098	91,21
5 µM AME	8,0968	0,1782	0,0220	22,0053	22,0053	87,69
10 µM AME	7,4016	0,2029	0,0274	27,4074	27,4074	102,41
25 µM AME	7,7581	0,1943	0,0250	25,0449	25,0449	99,81
50 µM AME	7,1222	0,2426	0,0341	34,0620	34,0620	127,28
VP1	7,7509	0,0541	0,0070	6,9776	6,9776	39,62
VP2	8,1169	0,0807	0,0099	9,9428	9,9428	26,07

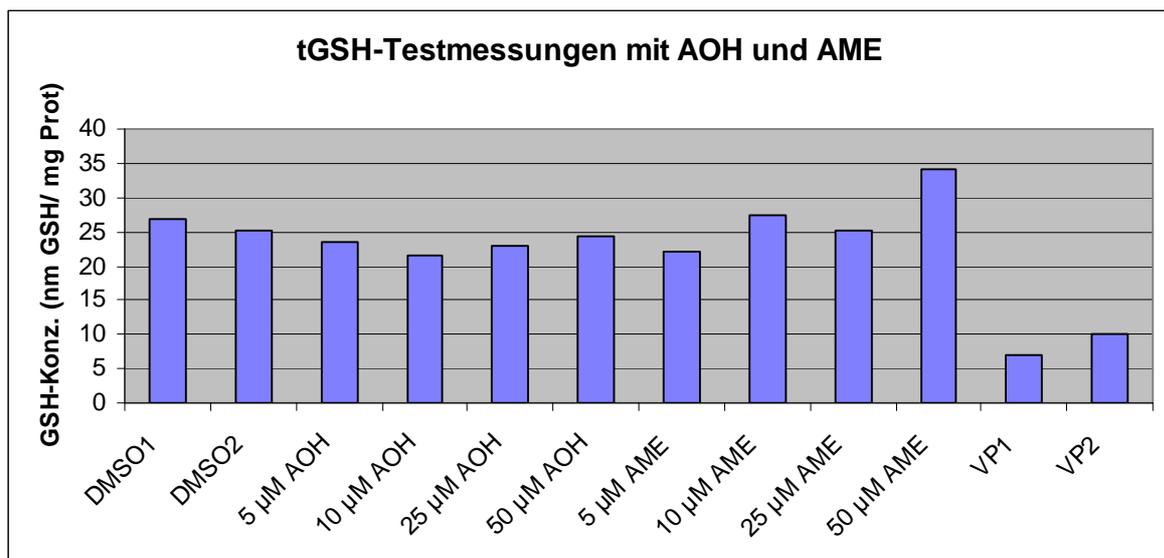
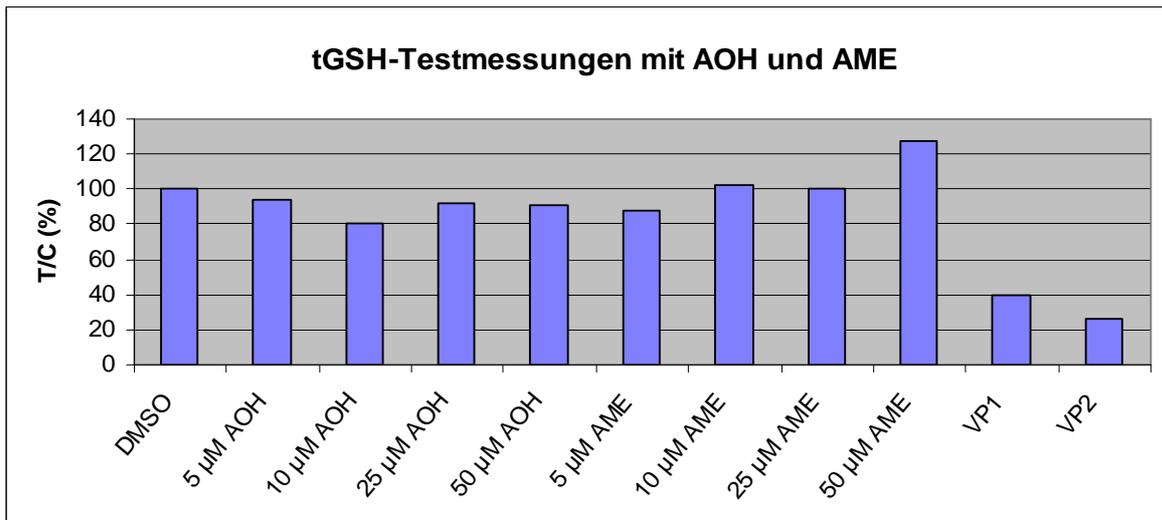


Abbildung 33: Graphische Darstellung, der in Tabelle 16 angeführten Werte.



#### 10.4.4 tGSH-Hauptversuche

Auswertung der tGSH- und GSSG-Daten:

- 1) Berechnung des Mittelwerts aus dem Dublikat einer Probe/Standards
- 2) Der Mittelwert einer Probe bei t=2 wird von der Messung bei t=0 derselben Probe subtrahiert
- 3) Vom Ergebnis wird der Blindwert abgezogen
- 4) Das Ergebnis wird durch 2 dividiert (Messung nach 2 Minuten)
- 5) Ermittlung der Kalibriergerade aus den mitgeführten Standards
- 6) Berechnung der Konzentration an nM GSH/ nM GSSG in der Probe durch einsetzen in die Geradengleichung  $[y = kx + d \rightarrow x = (y - d) / k]$
- 7) Die errechnete Konzentration wird mit 2 multipliziert (Verdünnungsfaktor mit 5% SSA)
- 8) Berechnete Konzentration durch den berechneten Proteingehalt dividieren und auf nm GSH/ mg Protein bzw. nm GSSG/ mg Protein umformen

Nachfolgend sind die Rohdaten sämtlicher tGSH-Messungen aufgelistet (Daten aus den Punkten 4.5.2 und 4.5.3), sowie der BCA-Messungen (siehe 4.6). Die tGSH- und GSSG-Messungen wurden am Plate Reader bei  $\lambda = 405$  nm durchgeführt, die BCA-Messungen bei  $\lambda = 595$  nm.

Tabelle 17: BCA-Rohdaten der 1 h, 10% FKS Messungen mit Auswertung

15.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,060	0,060	0,249	0,245	0,253	0,250	EtOH	Standardger			Proben			Mg/mL	x10

							ade (mg/mL)								
0,190	0,035	0,294	0,286	0,282	0,277	0,1µM ATXII	0	0,060	0,000	EtOH	0,249	0,189	0,301	3,012	
0,303	0,035	0,258	0,256	0,261	0,252	1µM ATXII	0,2	0,190	0,130	0,1µM ATXII	0,285	0,224	0,359	3,589	
0,431	0,035	0,278	0,273	0,283	0,275	5µM ATXII	0,4	0,303	0,243	1µM ATXII	0,257	0,196	0,313	3,133	
0,566	0,035	0,368	0,360	0,332	0,324	2-VP	0,6	0,431	0,371	5µM ATXII	0,277	0,217	0,347	3,469	
0,671	0,035	0,038	0,038	0,038	0,037		0,8	0,566	0,506	2-VP	0,346	0,286	0,459	4,590	
0,036	0,037	0,038	0,038	0,037	0,037		1	0,671	0,611						
0,036	0,037	0,038	0,038	0,037	0,037										

29.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,087	0,087	0,313	0,306	0,281	0,273	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10
0,239	0,231	0,369	0,362	0,346	0,339	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,293	0,206	0,268	2,680
0,390	0,385	0,284	0,275	0,299	0,280	1µMA TXII	0,2	0,235	0,148	0,1µM ATXII	0,354	0,267	0,362	3,622
0,521	0,515	0,429	0,416	0,340	0,333	5µM ATXII	0,4	0,387	0,301	1µMATX II	0,284	0,197	0,255	2,549
0,650	0,641	0,292	0,285	0,283	0,270	2-VP	0,6	0,518	0,431	5µM ATXII	0,379	0,292	0,401	4,014
0,769	0,739	0,034	0,038	0,037	0,037		0,8	0,646	0,559	2-VP	0,282	0,195	0,252	2,517
0,036	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037		1	0,754	0,667					
0,036	0,037	0,038	0,037	0,037	0,037									

05.11.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,087	0,087	0,279	0,262	0,280	0,273	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10
0,242	0,236	0,275	0,267	0,286	0,272	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,273	0,186	0,252	2,516
0,371	0,362	0,275	0,262	0,276	0,262	1µMA TXII	0,2	0,239	0,152	0,1µM ATXII	0,275	0,188	0,254	2,540
0,487	0,481	0,302	0,301	0,275	0,260	5µM ATXII	0,4	0,367	0,280	1µMATX II	0,269	0,182	0,244	2,443
0,637	0,632	0,230	0,219	0,210	0,199	2-VP	0,6	0,484	0,397	5µM ATXII	0,285	0,198	0,270	2,695
0,743	0,713	0,265	0,247	0,267	0,253	EtOH (KJ)	0,8	0,635	0,548	2-VP	0,214	0,127	0,157	1,569
0,037	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,728	0,641	EtOH (KJ)	0,258	0,171	0,227	2,270

0,037	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038														
-------	-------	-------	-------	-------	-------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

<b>12.11.2014</b>																			
Std.Gerade			Probe	Probe	Probe	Probe													
0,086	0,085	0,259	0,236	0,266	0,264	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10					
0,220	0,216	0,332	0,323	0,318	0,306	0,1µM ATXII	0	0,085	0,000	EtOH	0,256	0,171	0,2570 849	2,571					
0,360	0,342	0,310	0,297	0,301	0,295	1µM ATXII	0,2	0,218	0,133	0,1µM ATXII	0,320	0,234	0,3674 9408	3,675					
0,452	0,432	0,306	0,302	0,302	0,270	5µM ATXII	0,4	0,351	0,266	1µM ATXII	0,301	0,215	0,3346 1538	3,346					
0,581	0,561	0,301	0,274	0,297	0,277	2-VP	0,6	0,442	0,357	5µM ATXII	0,295	0,209	0,3243 5941	3,244					
0,687	0,675	0,036	0,037	0,037	0,037		0,8	0,571	0,486	2-VP	0,287	0,202	0,3110 6729	3,111					
0,036	0,037	0,037	0,037	0,037	0,038		1	0,681	0,595										
0,037	0,037	0,038	0,038	0,037	0,037														

<b>Inkubationsart: 1h, 10%FCS, Anwachzeit 48h</b>				<b>Messung: als Dublikat</b>			
Name der Probe	1h, 10%FKS	29.10.	5.11.	12.11.			
Passage	P10 (8mL)	P15 (8mL)	P17	P19			
Ausgestreut am	13.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	10.11.2014			
Inkubiert am	15.10.2014	29.10.2014	05.11.2014	12.11.2014			
Aufgearbeitet am	15.10.2014	29.10.2014	05.11.2014	12.11.2014			
Gemessen am	21.10.2014	11.11.2014	11.11.2014	03.12.2014		Einzelmessung	
Wiederholung am		03.12.2014					

<b>Messung vom 21.10.14</b>						
Standardgerade	t=0					
Konz. mM		Blank korr.	1h, 10%FKS		BW Korr.	
0,000	0,231	0,000	BW	0,247	0,000	
0,010	0,309	0,078	EtOH	1,003	0,756	
0,020	0,382	0,151	0,1µM ATXII	1,104	0,858	
0,040	0,532	0,300	1µM ATXII	0,889	0,642	
0,080	0,806	0,575	5µM ATXII	0,890	0,643	

0,160	1,403	1,172		2-VP	0,511	0,264
0,200	1,677	1,445				

Standardgerade	t=2 min					
Konz. mM		Blank korr.		1h, 10%FKS		BW Korr.
0,000	0,244	0,000		BW	0,258	0,000
0,010	0,392	0,148		EtOH	1,706	1,449
0,020	0,537	0,293		0,1µM ATXII	1,874	1,617
0,040	0,828	0,584		1µM ATXII	1,498	1,240
0,080	1,362	1,118		5µM ATXII	1,494	1,237
0,160	2,450	2,206		2-VP	0,787	0,530
0,200	2,937	2,693				

**Messung vom  
11.11.14**

Standardgerade	t=0							
Konz. mM		Blank korr.		1h, 10%FKS, 5.11.		BW Korr.	1h, 10%FKS, 29.10.	BW Korr.
0,000	0,183	0,000		EtOH	0,420	0,236	EtOH	0,354 0,170
0,010	0,210	0,027		0,1µM ATXII	0,399	0,214	0,1µM ATXII	0,421 0,237
0,020	0,243	0,060		1µM ATXII	0,361	0,176	1µM ATXII	0,361 0,177
0,040	0,312	0,129		5µM ATXII	0,390	0,205	5µM ATXII	0,403 0,218
0,080	0,448	0,265		2-VP	0,215	0,031	2-VP	0,263 0,079
0,160	0,731	0,548		BW	0,184	0,000		
0,200	0,953	0,770						

Standardgerade	t=2 min							
Konz. mM		Blank korr.		1h, 10%FKS, 5.11.		BW Korr.	1h, 10%FKS, 29.10.	BW Korr.
0,000	0,186	0,000		EtOH	0,629	0,444	EtOH	0,599 0,414
0,010	0,231	0,048		0,1µM ATXII	0,586	0,400	0,1µM ATXII	0,704 0,518
0,020	0,293	0,110		1µM ATXII	0,513	0,328	1µM ATXII	0,558 0,373
0,040	0,421	0,238		5µM ATXII	0,566	0,381	5µM ATXII	0,634 0,448
0,080	0,670	0,487		2-VP	0,242	0,057	2-VP	0,335 0,150
0,160	1,170	0,987		BW	0,185	0,000		
0,200	1,569	1,386						

**Messung vom  
3.12.14**

Standardgerade	t=0							

Konz. mM		Blank korr.		1h, 29.10.		BW Korr.	1h, 12.11.		BW Korr.
0,000	0,216	0,000		BW	0,214	0,000	BW	0,215	0,000
0,010	0,272	0,056		EtOH	0,813	0,599	EtOH	0,641	0,426
0,020	0,326	0,109		0,1µM ATXII	0,914	0,700	0,1µM ATXII	0,788	0,573
0,040	0,439	0,222		1µM ATXII	0,731	0,517	1µM ATXII	0,691	0,476
0,080	0,646	0,430		5µM ATXII	0,768	0,553	5µM ATXII	0,711	0,496
0,160	1,080	0,863		2-VP	0,407	0,193	2-VP	0,394	0,178

Standardgerade	t=2								
Konz. mM		Blank korr.		1h, 29.10.		BW Korr.	1h, 12.11.		BW Korr.
0,000	0,224	0,007		BW	0,220	0,006	BW	0,222	0,007
0,010	0,338	0,121		EtOH	1,396	1,182	EtOH	1,067	0,851
0,020	0,447	0,230		0,1µM ATXII	1,583	1,369	0,1µM ATXII	1,343	1,128
0,040	0,671	0,455		1µM ATXII	1,239	1,025	1µM ATXII	1,163	0,947
0,080	1,085	0,868		5µM ATXII	1,322	1,108	5µM ATXII	1,210	0,995
0,160	1,935	1,718		2-VP	0,618	0,403	2-VP	0,594	0,379

Tabelle 18: Ausgewertet Daten der Proben, die für 1h mit 10% FKS inkubiert worden sind

n=3: ohne 21.10.	1h, 10%FKS	1h, 5.11.	1h, 29.10.	1h, 12.11.	n=3	n=4	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4
EtOH	71,320	61,385	80,585	60,663	67,544	68,488	11,299	9,417
0,1µM ATXII	65,812	54,532	68,630	55,929	59,697	61,226	7,767	7,041
1µM ATXII	58,847	46,490	73,631	51,896	57,339	57,716	14,366	11,754
5µM ATXII	52,781	48,590	51,124	56,726	52,147	52,305	4,163	3,414
2-VP	16,865	14,944	29,374	22,611	22,310	20,949	7,220	6,493

T/C	1h, 10%FKS	1h, 5.11.	1h, 29.10.	1h, 12.11.	n=3	n=4	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	92,276	88,836	85,164	92,197	88,732	89,618	3,517	3,375
1µM ATXII	82,511	75,734	91,370	85,548	84,217	83,791	7,902	6,508
5µM ATXII	74,006	79,155	63,441	93,510	78,702	77,528	15,040	12,502
2-VP	23,646	24,345	36,451	37,273	32,690	30,429	7,238	7,441

Tabelle 19: BCA-Rohdaten der 1h, 0% FKS Messungen mit Auswertung

17.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
							Konz.	BW			BW			
							mg/mL	korr.	Proben		korr.	mg/mL	X10	
0,146	0,106	0,372	0,275	0,257	0,340	EtOH								
0,296	0,317	0,314	0,268	0,310	0,325	0,1µM ATXII	0	0,126	0,000	EtOH	0,311	0,185	0,180	1,802
0,468	0,478	0,250	0,248	0,218	0,245	1µM ATXII	0,2	0,307	0,181	0,1µM ATXII	0,304	0,179	0,170	1,699
0,596	0,546	0,279	0,246	0,267	0,315	5µM ATXII	0,4	0,473	0,347	1µM ATXII	0,240	0,114	0,070	0,696
0,733	0,720	0,308	0,224	0,321	0,301	2-VP	0,6	0,571	0,445	5µM ATXII	0,277	0,151	0,127	1,268
0,783	0,857	0,038	0,041	0,038	0,046		0,8	0,726	0,601	2-VP	0,289	0,163	0,145	1,452
0,037	0,051	0,043	0,038	0,081	0,037		1	0,820	0,694					
0,037	0,066	0,046	0,074	0,058	0,037									

23.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
							Konz.	BW			BW			
							mg/mL	korr.	Proben		korr.	mg/mL	X10	
0,036	0,037	0,036	0,037	0,038	0,037									
0,088	0,088	0,255	0,243	0,221	0,212	EtOH	0	0,088	0,000	EtOH	0,233	0,145	0,180	1,800
0,239	0,226	0,245	0,231	0,239	0,225	0,1µM ATXII	0,2	0,232	0,145	0,1µM ATXII	0,235	0,147	0,183	1,832
0,382	0,383	0,254	0,240	0,253	0,236	1µMA TXII	0,4	0,383	0,295	1µMATX II	0,246	0,158	0,200	2,002
0,513	0,502	0,303	0,293	0,262	0,241	5µM ATXII	0,6	0,507	0,420	5µM ATXII	0,275	0,187	0,246	2,462
0,629	0,629	0,244	0,233	0,280	0,266	2-VP	0,8	0,629	0,542	2-VP	0,256	0,168	0,216	2,162
0,753	0,731	0,035	0,037	0,038	0,037		1	0,742	0,655					
0,036	0,037	0,037	0,038	0,037	0,038									

31.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
							Konz.	BW			BW			
							mg/mL	korr.	Proben		korr.	mg/mL	x10	
0,095	0,096	0,329	0,318	0,286	0,275	EtOH								
0,262	0,256	0,347	0,349	0,307	0,297	0,1µM ATXII	0	0,095	0,000	EtOH	0,302	0,207	0,262	2,623
0,396	0,383	0,313	0,307	0,326	0,322	1µMA TXII	0,2	0,259	0,163	0,1µM ATXII	0,325	0,229	0,299	2,992
0,503	0,507	0,333	0,327	0,336	0,328	5µM ATXII	0,4	0,389	0,294	1µMATX II	0,317	0,222	0,286	2,864
0,659	0,657	0,315	0,309	0,325	0,319	2-VP	0,6	0,505	0,410	5µM	0,331	0,235	0,309	3,088

											ATXII				
0,746	0,738	0,034	0,037	0,037	0,037		0,8	0,658	0,563		2-VP	0,317	0,221	0,286	2,862
0,036	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037		1	0,742	0,647						
0,036	0,037	0,037	0,037	0,037	0,037										

<b>07.11.2014</b>															
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe										
0,080	0,084	0,248	0,246	0,232	0,229	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,225	0,215	0,265	0,259	0,270	0,272	0,1µM ATXII	0	0,082	0,000	EtOH	0,239	0,157	0,223	2,235	
0,357	0,351	0,287	0,284	0,281	0,270	1µM TXII	0,2	0,220	0,138	0,1µM ATXII	0,267	0,185	0,271	2,707	
0,457	0,453	0,284	0,281	0,278	0,277	5µM ATXII	0,4	0,354	0,272	1µMATX II	0,280	0,198	0,294	2,941	
0,584	0,575	0,254	0,248	0,259	0,256	2-VP	0,6	0,455	0,373	5µM ATXII	0,280	0,198	0,293	2,933	
0,705	0,693	0,083	0,085	0,037	0,039		0,8	0,579	0,497	2-VP	0,254	0,172	0,250	2,496	
0,037	0,038	0,038	0,040	0,039	0,039		1	0,699	0,617						
0,037	0,038	0,036	0,039	0,039	0,039										

<b>Inkubationsart: 1h, 0%FCS, Anwuchszeit 48h</b>					<b>Messung: als Dublikat</b>				
<b>Name der Probe</b>	<b>1h, 21.10.</b>	<b>1h, 0%FCS</b>	<b>31.10.</b>	<b>7.11.</b>					
<b>Passage</b>	<b>P11 (8mL)</b>	<b>P13 (8mL)</b>	<b>P15</b>	<b>P18</b>					
<b>Ausgestreut am</b>	<b>15.10.2014</b>	<b>21.10.2014</b>	<b>29.10.2014</b>	<b>05.11.2014</b>					
<b>Inkubiert am</b>	<b>17.10.2014</b>	<b>23.10.2014</b>	<b>31.10.2014</b>	<b>07.11.2014</b>					
<b>Aufgearbeitet am</b>	<b>17.10.2014</b>	<b>23.10.2014</b>	<b>31.10.2014</b>	<b>07.11.2014</b>					
<b>Gemessen am</b>	<b>21.10.2014</b>	<b>28.10.2014</b>	<b>10.12.2014</b>	<b>10.12.2014</b>					
<b>Wiederholung am</b>									

**Messung vom 21.10.2014**

<b>Standardgerade</b>	<b>t=0</b>				
<b>Konz. mM</b>		<b>Blank korr.</b>		<b>1h, 21.10.</b>	<b>BW Korr.</b>
0,000	0,231	0,000		BW	0,247 0,000
0,010	0,309	0,078		EtOH	0,730 0,483
0,020	0,382	0,151		0,1µM ATXII	0,743 0,496
0,040	0,532	0,300		1µM ATXII	0,766 0,519
0,080	0,806	0,575		5µM ATXII	0,795 0,548
0,160	1,403	1,172		2-VP	0,446 0,200
0,200	1,677	1,445			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	1h, 21.10.		BW Korr.
0,000	0,244	0,000	BW	0,258	0,000
0,010	0,392	0,148	EtOH	1,194	0,937
0,020	0,537	0,293	0,1µM ATXII	1,202	0,945
0,040	0,828	0,584	1µM ATXII	1,253	0,995
0,080	1,362	1,118	5µM ATXII	1,323	1,066
0,160	2,450	2,206	2-VP	0,662	0,404
0,200	2,937	2,693			

Messung vom  
28.10.2014

Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	1h, 0%FKS		BW Korr.
0,000	0,201	0,000	BW	0,199	0,000
0,010	0,233	0,031	EtOH	0,421	0,222
0,020	0,275	0,073	0,1µM ATXII	0,395	0,196
0,040	0,366	0,165	1µM ATXII	0,440	0,240
0,080	0,557	0,355	5µM ATXII	0,431	0,232
0,160	0,932	0,731	2-VP	0,267	0,068
0,200	1,337	1,136			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	1h, 0%FKS		BW Korr.
0,000	0,202	0,000	BW	0,201	0,000
0,010	0,273	0,072	EtOH	0,623	0,423
0,020	0,361	0,160	0,1µM ATXII	0,601	0,400
0,040	0,551	0,349	1µM ATXII	0,694	0,494
0,080	0,932	0,731	5µM ATXII	0,680	0,479
0,160	1,658	1,457	2-VP	0,354	0,153
0,200	2,392	2,190			

Messung vom  
10.12.2014

Standardgerade	t=0						
Konz. mM		Blank korr.	1h, 31.10.		BW Korr.	1h, 7.11.	BW Korr.

0,000	0,249	0,000		BW	0,246	0,000	BW	0,249	0,000
0,010	0,329	0,080		EtOH	0,936	0,690	EtOH	0,754	0,506
0,020	0,410	0,160		0,1µM ATXII	0,978	0,732	0,1µM ATXII	0,728	0,480
0,040	0,564	0,315		1µM ATXII	0,899	0,653	1µM ATXII	0,809	0,560
0,080	0,873	0,624		5µM ATXII	1,060	0,814	5µM ATXII	0,877	0,628
0,160	1,441	1,191		2-VP	0,484	0,238	2-VP	0,440	0,192
0,200	1,721	1,472							

Standardgerade	t=2								
Konz. mM		Blank korr.		1h, 31.10.		BW Korr.	1h, 7.11.		BW Korr.
0,000	0,258	0,009		BW	0,256	0,009	BW	0,259	0,010
0,010	0,415	0,166		EtOH	1,523	1,276	EtOH	1,205	0,956
0,020	0,565	0,316		0,1µM ATXII	1,601	1,355	0,1µM ATXII	1,150	0,902
0,040	0,852	0,603		1µM ATXII	1,461	1,214	1µM ATXII	1,294	1,046
0,080	1,408	1,159		5µM ATXII	1,731	1,485	5µM ATXII	1,415	1,167
0,160	2,405	2,155		2-VP	0,713	0,467	2-VP	0,631	0,382
0,200	2,895	2,646							

Tabelle 20: Ausgewertet Daten der Proben, die für 1h mit 0% FKS inkubiert worden sind

	1h, 0%FKS	1h, 31.10.	1h, 7.11.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	49,181	71,793	62,804	67,298	61,259	6,356	11,385
0,1µM ATXII	49,100	67,265	48,180	57,722	54,848	13,496	10,763
1µM ATXII	55,737	62,694	51,896	57,295	56,776	7,636	5,474
5µM ATXII	44,184	70,626	58,395	64,510	57,735	8,648	13,233
2-VP	17,621	21,986	19,718	20,852	19,775	1,604	2,183

T/C	1h, 0%FKS	1h, 31.10.	1h, 7.11.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	99,836	93,693	76,715	85,204	90,081	12,006	11,976
1µM ATXII	113,330	87,327	82,632	84,979	94,430	3,320	16,536
5µM ATXII	89,841	98,374	92,980	95,677	93,732	3,814	4,316
2-VP	35,829	30,624	31,396	31,010	32,616	0,546	2,809

Tabelle 21: BCA-Rohdaten der 3 h, 10% FKS Messungen mit Auswertung

11.12.2014															
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe										
0,088	0,088	0,279	0,268	0,291	0,279	EtOH	Konz. mg/mL	BW korr.		Proben		BW korr.	mg/mL	X10	
0,247	0,242	0,310	0,303	0,309	0,298	0,1µM	0	0,088	0,000	EtOH	0,279	0,191	0,241	2,408	

						ATXII								
0,387	0,394	0,311	0,302	0,311	0,306	1µMA TXII	0,2	0,245	0,157	0,1µM ATXII	0,305	0,217	0,281	2,814
0,510	0,512	0,304	0,286	0,316	0,306	5µM ATXII	0,4	0,390	0,302	1µMATX II	0,307	0,219	0,285	2,853
0,629	0,624	0,281	0,269	0,290	0,278	2-VP	0,6	0,511	0,423	5µM ATXII	0,303	0,215	0,278	2,782
0,755	0,760	0,088	0,088	0,037	0,038	BW	0,8	0,627	0,539	2-VP	0,280	0,192	0,241	2,410
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,757	0,669	BW	0,088			
0,037	0,037	0,038	0,038	0,037	0,038									

15.12.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,089	0,086	0,316	0,296	0,336	0,326	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	X10
0,242	0,237	0,343	0,341	0,337	0,322	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,319	0,233	0,312	3,123
0,385	0,376	0,344	0,338	0,365	0,359	1µMA TXII	0,2	0,239	0,152	0,1µM ATXII	0,336	0,250	0,339	3,394
0,513	0,508	0,336	0,317	0,334	0,323	5µM ATXII	0,4	0,380	0,293	1µMATX II	0,351	0,266	0,364	3,640
0,641	0,631	0,337	0,330	0,339	0,323	2-VP	0,6	0,510	0,423	5µM ATXII	0,328	0,242	0,327	3,265
0,744	0,742	0,086	0,086	0,037	0,038	BW	0,8	0,636	0,549	2-VP	0,332	0,247	0,334	3,340
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,743	0,656	BW	0,086			
0,036	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038									

18.12.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,087	0,086	0,291	0,280	0,298	0,286	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10
0,243	0,232	0,296	0,286	0,289	0,273	0,1µM ATXII	0	0,086	0,000	EtOH	0,289	0,200	0,264	2,640
0,386	0,385	0,291	0,271	0,304	0,294	1µMA TXII	0,2	0,238	0,151	0,1µM ATXII	0,286	0,197	0,260	2,601
0,514	0,500	0,289	0,272	0,300	0,285	5µM ATXII	0,4	0,385	0,299	1µMATX II	0,290	0,201	0,266	2,661
0,638	0,628	0,250	0,235	0,268	0,249	2-VP	0,6	0,507	0,420	5µM ATXII	0,286	0,198	0,261	2,607
0,765	0,772	0,087	0,091	0,037	0,038	BW	0,8	0,633	0,547	2-VP	0,250	0,162	0,206	2,055
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,769	0,682	BW	0,089			
0,037	0,037	0,038	0,038	0,038	0,037									

Inkubationsart: 3h, 10%FCS, Anwachszeit 48h			Messung: als Dublikat	
Name der Probe	3h,11.12.	3h,15.12.	3h,18.12.	
Passage	P29	P30	P31	
Ausgestreut am	09.12.2014	13.12.2014	16.12.2014	
Inkubiert am	11.12.2014	15.12.2014	18.12.2014	
Aufgearbeitet am	11.12.2014	15.12.2014	18.12.2014	
Gemessen am	09.01.2015	09.01.2015	09.01.2015	
Wiederholung am				

### Messung vom 09.01.2015

Standardgerade	t=0											
Konz. mM		Blank korr.	3h, 11.12		BW Korr.	3h, 15.12.		BW Korr.		3h, 18.12		BW Korr.
0,000	0,219	0,000	BW	0,215	0,000	BW	0,217	0,000		BW	0,217	0
0,010	0,320	0,101	EtOH	0,819	0,604	EtOH	0,927	0,711		EtOH	0,872	0,655
0,020	0,425	0,206	0,1µM ATXII	0,928	0,713	0,1µM ATXII	0,872	0,655		0,1µM ATXII	0,842	0,624
0,040	0,602	0,383	1µM ATXII	1,055	0,840	1µM ATXII	1,169	0,952		1µM ATXII	0,967	0,750
0,080	0,979	0,760	5µM ATXII	1,204	0,989	5µM ATXII	1,165	0,949		5µM ATXII	0,963	0,745
0,160	1,643	1,424	2-VP	0,497	0,282	2-VP	0,494	0,278		2-VP	0,372	0,154
0,200	2,013	1,794										

Standardgerade	t=2											
Konz. mM		Blank korr.	3h, 11.12		BW Korr.	3h, 15.12.		BW Korr.		3h, 18.12		BW Korr.
0,000	0,231	0,012	BW	0,227	0,012	BW	0,228	0,012		BW	0,229	0,012
0,010	0,428	0,209	EtOH	1,343	1,128	EtOH	1,547	1,331		EtOH	1,458	1,241
0,020	0,625	0,406	0,1µM ATXII	1,542	1,327	0,1µM ATXII	1,435	1,219		0,1µM ATXII	1,394	1,177
0,040	0,960	0,741	1µM ATXII	1,770	1,554	1µM ATXII	1,967	1,751		1µM ATXII	1,629	1,412
0,080	1,640	1,421	5µM ATXII	2,032	1,817	5µM ATXII	1,956	1,740		5µM ATXII	1,627	1,410
0,160	2,736	2,517	2-VP	0,771	0,556	2-VP	0,769	0,552		2-VP	0,534	0,316
0,200	3,200	2,981										

Tabelle 22: Ausgewertet Daten der Proben, die für 3h mit 10% FKS inkubiert worden sind

	3h, 18.12	3h, 11.12	3h, 15.12.	n=3	Std.ab. N=3
EtOH	58,772	56,502	53,022	56,099	2,896
0,1µM ATXII	55,667	58,125	43,712	52,501	7,711
1µM ATXII	67,041	68,129	60,515	65,228	4,118
5µM ATXII	68,673	82,381	66,748	72,601	8,525
2-VP	12,290	24,736	17,894	18,307	6,233

T/C	3h, 18.12	3h, 11.12	3h, 15.12.	n=3	Std.ab. N=3
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000
0,1µM ATXII	94,717	102,872	82,441	93,343	10,285
1µM ATXII	114,070	120,577	114,132	116,260	3,739
5µM ATXII	116,846	145,802	125,887	129,512	14,814
2-VP	20,912	43,778	33,747	32,813	11,462

Tabelle 23: BCA-Rohdaten der 3h, 0% FKS Messungen mit Auswertung

20.10.2014													
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe								
0,088	0,090	0,397	0,380	0,384	0,373	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL x10
0,248	0,243	0,409	0,405	0,438	0,423	0,1µM ATXII	0	0,089	0,000	EtOH	0,383	0,294	0,394 3,940
0,385	0,388	0,390	0,381	0,441	0,427	1µMATXII	0,2	0,246	0,157	0,1µM ATXII	0,419	0,330	0,448 4,480
0,536	0,537	0,386	0,376	0,399	0,388	5µM ATXII	0,4	0,387	0,298	1µMATXII	0,410	0,321	0,434 4,342
0,662	0,652	0,353	0,339	0,356	0,354	2-VP	0,6	0,536	0,447	5µM ATXII	0,387	0,298	0,400 4,000
0,777	0,754	0,035	0,038	0,039	0,040		0,8	0,657	0,568	2-VP	0,350	0,261	0,344 3,435
0,037	0,039	0,040	0,039	0,038	0,040		1	0,766	0,676				
0,038	0,039	0,041	0,039	0,039	0,039								

27.10.2014													
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe								
0,087	0,086	0,439	0,428	0,424	0,415	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL x10
0,243	0,234	0,442	0,435	0,413	0,407	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,426	0,340	0,477 4,767
0,391	0,378	0,441	0,434	0,412	0,408	1µMATXII	0,2	0,238	0,152	0,1µM ATXII	0,424	0,338	0,473 4,733
0,514	0,514	0,446	0,438	0,494	0,475	5µM ATXII	0,4	0,384	0,297	1µMATXII	0,424	0,337	0,472 4,725
0,639	0,642	0,562	0,552	0,582	0,589	2-VP	0,6	0,514	0,428	5µM ATXII	0,463	0,377	0,534 5,344

											ATXII				
0,751	0,747	0,035	0,037	0,038	0,038			0,8	0,640	0,554	2-VP	0,571	0,484	0,703	7,032
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,042			1	0,749	0,662					
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038										

03.11.2014															
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe										
0,086	0,086	0,308	0,296	0,325	0,317	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,261	0,256	0,310	0,306	0,369	0,361	0,1µM ATXII	0	0,086	0,000	EtOH	0,311	0,225	0,288	2,879	
0,396	0,397	0,287	0,281	0,351	0,343	1µM ATXII	0,2	0,259	0,173	0,1µM ATXII	0,337	0,251	0,325	3,253	
0,498	0,500	0,291	0,280	0,362	0,356	5µM ATXII	0,4	0,396	0,310	1µMATX II	0,316	0,229	0,294	2,943	
0,668	0,636	0,291	0,275	0,331	0,325	2-VP	0,6	0,499	0,413	5µM ATXII	0,322	0,236	0,304	3,042	
0,811	0,811	0,035	0,037	0,038	0,038		0,8	0,652	0,566	2-VP	0,306	0,220	0,280	2,797	
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,811	0,725						
0,036	0,037	0,038	0,038	0,039	0,038										

07.11.2014															
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe										
0,090	0,086	0,287	0,271	0,287	0,268	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,236	0,232	0,343	0,330	0,330	0,314	0,1µM ATXII	0	0,088	0,000	EtOH	0,278	0,191	0,279	2,785	
0,367	0,357	0,332	0,318	0,310	0,287	1µM ATXII	0,2	0,234	0,146	0,1µM ATXII	0,329	0,242	0,361	3,615	
0,455	0,430	0,331	0,306	0,318	0,301	5µM ATXII	0,4	0,362	0,274	1µMATX II	0,312	0,224	0,333	3,327	
0,631	0,611	0,294	0,284	0,288	0,269	2-VP	0,6	0,442	0,355	5µM ATXII	0,314	0,226	0,336	3,365	
0,726	0,707	0,034	0,037	0,037	0,037		0,8	0,621	0,533	2-VP	0,284	0,196	0,287	2,868	
0,036	0,039	0,038	0,037	0,038	0,038		1	0,716	0,628						
0,036	0,040	0,041	0,038	0,037	0,039										

Inkubationsart: 3h, 0%FCS, Anwuchszeit 72h		Messung: als Dublikat						
Name der Probe	3h, 0%FKS	3h, 27.10.	3.11.	7.11.				
Passage	P12 (8mL)	P14 (8mL)	P17	P17				
Ausgestreut am	17.10.2014	24.10.2014	31.10.2014	04.11.2014				
Inkubiert am	20.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	07.11.2014				
Aufgearbeitet am	20.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	07.11.2014				
Gemessen am	21.10.2014	28.10.2014	03.12.2014	03.12.2014				
Wiederholung am			10.12.2014		Wiederholte Messung zum testen, ob Proben beständig sind, oder nicht			

#### Messung vom 21.10.14

Standardg erade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 0%FKS		BW Korr.
0,000	0,231	0,000	BW	0,247	0,000
0,010	0,309	0,078	EtOH	1,113	0,866
0,020	0,382	0,151	0,1µM ATXII	1,110	0,863
0,040	0,532	0,300	1µM ATXII	1,163	0,916
0,080	0,806	0,575	5µM ATXII	1,239	0,992
0,160	1,403	1,172	2-VP	0,503	0,256
0,200	1,677	1,445			

Standardg erade	t=2 min				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 0%FKS		BW Korr.
0,000	0,244	0,000	BW	0,258	0,000
0,010	0,392	0,148	EtOH	1,905	1,647
0,020	0,537	0,293	0,1µM ATXII	1,876	1,619
0,040	0,828	0,584	1µM ATXII	1,966	1,709
0,080	1,362	1,118	5µM ATXII	2,111	1,853
0,160	2,450	2,206	2-VP	0,771	0,514
0,200	2,937	2,693			

#### Messung vom 3.12.14

Standardgerade	t=0								
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.		3h, 7.11.	BW Korr.	
0,000	0,216	0,000	BW	0,217	0,000		BW	0,216	0,000
0,010	0,272	0,056	EtOH	0,649	0,433		EtOH	0,667	0,450
0,020	0,326	0,109	0,1µM ATXII	0,702	0,486		0,1µM ATXII	0,739	0,522
0,040	0,439	0,222	1µM ATXII	0,847	0,631		1µM ATXII	0,786	0,570
0,080	0,646	0,430	5µM ATXII	0,889	0,672		5µM ATXII	0,902	0,686
0,160	1,080	0,863	2-VP	0,382	0,166		2-VP	0,384	0,168

Standardgerade	t=2								
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.		3h, 7.11.	BW Korr.	
0,000	0,224	0,007	BW	0,223	0,006		BW	0,223	0,007
0,010	0,338	0,121	EtOH	1,074	0,857		EtOH	1,112	0,896
0,020	0,447	0,230	0,1µM ATXII	1,185	0,968		0,1µM ATXII	1,249	1,032
0,040	0,671	0,455	1µM ATXII	1,463	1,246		1µM ATXII	1,350	1,134
0,080	1,085	0,868	5µM ATXII	1,545	1,328		5µM ATXII	1,575	1,359
0,160	1,935	1,718	2-VP	0,564	0,347		2-VP	0,571	0,354

Messung vom 10.12.14

Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.
0,000	0,249	0,000	BW	0,249	0,000
0,010	0,329	0,080	EtOH	0,850	0,601
0,020	0,410	0,160	0,1µM ATXII	0,914	0,666
0,040	0,564	0,315	1µM ATXII	1,075	0,826
0,080	0,873	0,624	5µM ATXII	1,188	0,939
0,160	1,441	1,191	2-VP	0,486	0,237
0,200	1,721	1,472			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.
0,000	0,258	0,009	BW	0,259	0,011
0,010	0,415	0,166	EtOH	1,376	1,127
0,020	0,565	0,316	0,1µM ATXII	1,496	1,247
0,040	0,852	0,603	1µM ATXII	1,773	1,525

0,080	1,408	1,159	5µM ATXII	1,974	1,725
0,160	2,405	2,155	2-VP	0,715	0,466
0,200	2,895	2,646			

Messung vom 28.10.14					
Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 27.10.		BW Korr.
0,000	0,201	0,000	BW	0,189	0,000
0,010	0,233	0,031	EtOH	0,709	0,520
0,020	0,275	0,073	0,1µM ATXII	0,711	0,521
0,040	0,366	0,165	1µM ATXII	0,789	0,600
0,080	0,557	0,355	5µM ATXII	0,894	0,705
0,160	0,932	0,731	2-VP	0,395	0,206
0,200	1,337	1,136			
Konz. mM		Blank korr.	3h, 27.10.		BW Korr.
0,000	0,202	0,000	BW	0,191	0,000
0,010	0,273	0,072	EtOH	1,176	0,986
0,020	0,361	0,160	0,1µM ATXII	1,219	1,028
0,040	0,551	0,349	1µM ATXII	1,380	1,190
0,080	0,932	0,731	5µM ATXII	1,578	1,388
0,160	1,658	1,457	2-VP	0,619	0,429
0,200	2,392	2,190			

Tabelle 24: Ausgewertete Daten der Proben, die für 3h mit 0% FKS inkubiert worden sind

	3h, 0%FKS	3h, 27.10.	3h, 3.11.	3h, 7.11.	n=2	n=4	Std.ab. N=2	Std.ab. N=4
EtOH	61,605	42,859	54,074	58,638	56,356	54,294	3,228	8,229
0,1µM ATXII	52,373	46,999	54,712	51,987	53,350	51,518	1,927	3,244
1µM ATXII	56,712	54,748	77,649	62,731	70,190	62,960	10,549	10,365
5µM ATXII	67,099	55,982	80,213	74,250	77,231	69,386	4,216	10,421
2-VP	21,709	13,963	22,567	22,522	22,545	20,190	0,032	4,170

T/C	3h, 0%FKS	3h, 27.10.	3h, 3.11.	3h, 7.11.	n=2	n=4	Std.ab. N=2	Std.ab. N=4
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	85,014	109,661	101,181	88,658	94,919	96,128	8,855	11,372
1µM ATXII	92,058	127,740	143,599	106,979	125,289	117,594	25,894	22,686

5µM ATXII	108,919	130,620	148,339	126,623	137,481	128,625	15,356	16,176
2-VP	35,239	32,578	41,735	38,408	40,071	36,990	2,352	3,960

Tabelle 25: BCA-Rohdaten der 24 h, 10% FKS Messungen mit Auswertung

16.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,087	0,086	0,353	0,348	0,353	0,345	EtOH	Konz. mg/mL	BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,239	0,236	0,430	0,434	0,401	0,394	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,350	0,263	0,362	3,620
0,384	0,375	0,324	0,319	0,319	0,306	1µM ATXII	0,2	0,237	0,150	0,1µM ATXII	0,415	0,328	0,465	4,655
0,517	0,506	0,345	0,338	0,402	0,325	5µM ATXII	0,4	0,379	0,293	1µM ATXII	0,317	0,230	0,310	3,097
0,640	0,612	0,426	0,340	0,343	0,297	tBHQ	0,6	0,511	0,424	5µM ATXII	0,353	0,266	0,367	3,667
0,747	0,738	0,035	0,173	0,111	0,037		0,8	0,626	0,539	tBHQ	0,351	0,265	0,365	3,646
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,118		1	0,743	0,656					
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038									

30.10.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,107	0,105	0,437	0,434	0,428	0,420	EtOH	Konz. mg/mL	BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,266	0,256	0,458	0,452	0,465	0,467	0,1µM ATXII	0	0,106	0,000	EtOH	0,429	0,324	0,442	4,420
0,417	0,413	0,453	0,443	0,387	0,379	1µM ATXII	0,2	0,261	0,155	0,1µM ATXII	0,461	0,355	0,489	4,889
0,529	0,523	0,458	0,453	0,191	0,187	5µM ATXII	0,4	0,415	0,309	1µMATX II	0,416	0,310	0,421	4,210
0,679	0,673	0,514	0,477	0,466	0,458	tBHQ	0,6	0,526	0,420	5µM ATXII	0,455	0,349	0,481	4,809
0,794	0,790	0,034	0,037	0,038	0,037		0,8	0,676	0,570	t-BHQ	0,479	0,373	0,517	5,165
0,036	0,037	0,038	0,038	0,037	0,038		1	0,792	0,686					
0,036	0,037	0,037	0,038	0,037	0,037									

06.11.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,087	0,088	0,291	0,289	0,283	0,265	EtOH	Konz. mg/ mL	BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL	x10	
0,239	0,232	0,306	0,302	0,317	0,312	0,1µM ATXII	0	0,087	0,000	EtOH	0,282	0,195	0,267	2,671

0,372	0,373	0,306	0,298	0,327	0,318	1µMATXII	0,2	0,235	0,148	0,1µMATXII	0,309	0,222	0,310	3,105
0,482	0,474	0,333	0,329	0,335	0,327	5µMATXII	0,4	0,372	0,285	1µMATXII	0,312	0,225	0,315	3,153
0,639	0,628	0,336	0,330	0,316	0,310	t-BHQ	0,6	0,478	0,391	5µMATXII	0,331	0,244	0,346	3,457
0,734	0,720	0,312	0,304	0,318	0,304	BSO	0,8	0,634	0,546	t-BHQ	0,323	0,236	0,333	3,329
0,037	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,727	0,640	BSO	0,310	0,222	0,311	3,113
0,037	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038									

13.11.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,085	0,085	0,372	0,368	0,356	0,351	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL x10	
0,240	0,239	0,423	0,408	0,394	0,395	0,1µMATXII	0	0,085	0,000	EtOH	0,362	0,277	0,387	3,867
0,373	0,380	0,393	0,404	0,408	0,380	1µMATXII	0,2	0,239	0,154	0,1µMATXII	0,405	0,320	0,459	4,591
0,498	0,500	0,319	0,324	0,317	0,310	5µMATXII	0,4	0,377	0,292	1µMATXII	0,396	0,312	0,445	4,449
0,610	0,611	0,374	0,370	0,352	0,340	BSO	0,6	0,499	0,414	5µMATXII	0,317	0,233	0,313	3,127
0,707	0,731	0,035	0,037	0,038	0,038		0,8	0,611	0,526	BSO	0,359	0,274	0,382	3,825
0,036	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038		1	0,719	0,634					
0,037	0,037	0,038	0,038	0,038	0,038									

14.11.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,085	0,083	0,345	0,333	0,340	0,336	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL x10	
0,237	0,227	0,369	0,360	0,365	0,351	0,1µMATXII	0	0,084	0,000	EtOH	0,338	0,254	0,359	3,595
0,379	0,366	0,374	0,367	0,370	0,356	1µMATXII	0,2	0,232	0,148	0,1µMATXII	0,361	0,277	0,398	3,977
0,499	0,484	0,352	0,332	0,350	0,327	5µMATXII	0,4	0,373	0,289	1µMATXII	0,367	0,283	0,407	4,072
0,598	0,597	0,377	0,366	0,355	0,338	t-BHQ	0,6	0,491	0,407	5µMATXII	0,340	0,256	0,363	3,627
0,725	0,706	0,335	0,329	0,324	0,309	BSO	0,8	0,598	0,514	t-BHQ	0,359	0,275	0,394	3,938
0,037	0,037	0,038	0,038	0,037	0,037		1	0,715	0,631	BSO	0,324	0,240	0,335	3,355
0,037	0,037	0,037	0,038	0,037	0,037									

05.12.2014														
Std.Gerade		Probe	Probe	Probe	Probe									
0,088	0,089	0,471	0,452	0,449	0,441	EtOH	Konz. mg/mL		BW korr.	Proben		BW korr.	mg/mL x10	
0,234	0,233	0,458	0,457	0,484	0,476	0,1µM ATXII	0	0,088	0,000	EtOH	0,453	0,365	0,520	5,196
0,383	0,391	0,481	0,477	0,491	0,484	1µMATXII	0,2	0,233	0,145	0,1µM ATXII	0,469	0,381	0,544	5,437
0,512	0,505	0,407	0,407	0,457	0,455	5µM ATXII	0,4	0,387	0,299	1µMATXII	0,483	0,395	0,566	5,658
0,643	0,642	0,468	0,467	0,473	0,487	t-BHQ	0,6	0,509	0,420	5µM ATXII	0,431	0,343	0,486	4,860
0,758	0,756	0,088	0,088	0,039	0,038		0,8	0,643	0,554	t-BHQ	0,474	0,385	0,551	5,509
0,037	0,038	0,039	0,038	0,038	0,038		1	0,757	0,669					
0,037	0,038	0,038	0,038	0,038	0,038									

Inkubationsart: 24h, 10%FCS, Anwuchszeit 48h		Messung: als Dublikat												
Name der Probe	24h, 10%FCS	30.10.	13.11.	14.11.	6.11.	5.12.								
Passage	P10 (8mL)	P15 (KJ)	P19	P20	P17	P27								
Ausgestre ut am	13.10.2014	27.10.2014	10.11.2014	11.11.2014	03.11.2014	02.12.2014								
Inkubiert am	15.10.2014	29.10.2014	12.11.2014	13.11.2014	05.11.2014	04.12.2014								
Aufgearbe itet am	16.10.2014	30.10.2014	13.11.2014	14.11.2014	06.11.2014	05.12.2014								
Gemessen am	21.10.2014	14.11.2014	14.11.2014	14.11.2014	14.11.2014	10.12.2014								
Wiederholung am														

Messung vom 21.10.2014					
Standardgera de	t=0				
Konz. mM	Blank korr.	24h, 10%F KS		BW Korr.	
0,000	0,231	0,000	BW	0,247	0,000
0,010	0,309	0,078	EtOH	1,103	0,857
0,020	0,382	0,151	0,1µ	1,518	1,271

Messung vom 10.12.2014					
Standardger ade	t=0				
Konz. mM	Blank korr.	24h, 5.12.		BW Korr.	
0,000	0,249	0,000	BW	0,249	0,000
0,010	0,329	0,080	EtOH	1,351	1,102
0,020	0,410	0,160	0,1µM	1,362	1,114

			M ATXII		
0,040	0,532	0,300	1µM ATXII	1,420	1,174
0,080	0,806	0,575	5µM ATXII	1,445	1,198
0,160	1,403	1,172	t-BHQ	1,699	1,452
0,200	1,677	1,445			

			ATXII		
0,040	0,564	0,315	1µM ATXII	1,920	1,671
0,080	0,873	0,624	5µM ATXII	2,412	2,163
0,160	1,441	1,191	t-BHQ	2,574	2,325
0,200	1,721	1,472			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 10%F KS		BW Korr.
0,000	0,244	0,000	BW	0,258	0,000
0,010	0,392	0,148	EtOH	1,889	1,632
0,020	0,537	0,293	0,1µM ATXII	2,572	2,315
0,040	0,828	0,584	1µM ATXII	2,421	2,163
0,080	1,362	1,118	5µM ATXII	2,488	2,230
0,160	2,450	2,206	t-BHQ	2,887	2,629
0,200	2,937	2,693			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 5.12.		BW Korr.
0,000	0,258	0,009	BW	0,258	0,009
0,010	0,415	0,166	EtOH	2,253	2,004
0,020	0,565	0,316	0,1µM ATXII	2,273	2,024
0,040	0,852	0,603	1µM ATXII	3,031	2,782
0,080	1,408	1,159	5µM ATXII	3,346	3,097
0,160	2,405	2,155	t-BHQ	3,343	3,094
0,200	2,895	2,646	außerhalb des linearen Bereichs!		

Messung vom  
14.11.2014

Standardgerade	t=0													
Konz. mM		Blank korr.	24h, 30.10		BW Korr.	24h, 13.1		BW Korr.	24h, 14.11		BW Korr.	24h, 6.11.		BW Korr.
0,000	0,212	0,000	BW	0,211	0,000	BW	0,212	0,000	BW	0,224	0,000	BW	0,223	0,000
0,010	0,261	0,049	EtOH	0,741	0,530	EtOH	0,582	0,371	EtOH	0,606	0,382	EtOH	0,517	0,294
0,020	0,315	0,103	0,1µM ATXII	0,811	0,600	0,1µM ATXI	0,767	0,555	0,1µM ATXII	0,742	0,518	0,1µM ATXII	0,578	0,355
0,040	0,437	0,225	1µM	0,927	0,716	1µM	1,007	0,796	1µM	0,840	0,615	1µM	0,796	0,573

			ATXII			ATXI			ATXII			ATXII		
0,080	0,682	0,470	5µM ATXII	1,340	1,129	5µM ATXI I	0,954	0,743	5µM ATXII	1,046	0,822	5µM ATXII	1,047	0,824
0,160	1,148	0,936	t-BHQ	1,663	1,452	BSO	0,294	0,082	t-BHQ	1,162	0,937	t-BHQ	1,028	0,805
0,200	1,443	1,231							BSO	0,266	0,041	BSO	0,286	0,062

Konz. mM		Blank korr.	24h, 30.10		BW Korr.	24h, 13.1 1.		BW Korr.	24h, 14.11		BW Korr.	24h, 6.11.		BW Korr.
0,000	0,220	0,000	BW	0,220	0,000	BW	0,221	0,000	BW	0,234	0,000	BW	0,233	0,000
0,010	0,322	0,110	EtOH	1,260	1,040	EtO H	0,970	0,749	EtOH	1,003	0,770	EtOH	0,831	0,598
0,020	0,436	0,224	0,1µ M ATXII	1,425	1,205	0,1µ M ATXI I	1,336	1,116	0,1µ M ATXII	1,265	1,032	0,1µ M ATXII	0,948	0,715
0,040	0,685	0,473	1µM ATXII	1,636	1,416	1µM ATXI I	1,781	1,561	1µM ATXII	1,460	1,226	1µM ATXII	1,386	1,154
0,080	1,170	0,958	5µM ATXII	2,399	2,179	5µM ATXI I	1,670	1,450	5µM ATXII	1,848	1,614	5µM ATXII	1,874	1,641
0,160	2,073	1,861	t-BHQ	2,924	2,704	BSO	0,390	0,169	t-BHQ	2,055	1,821	t-BHQ	1,823	1,590
0,200	2,667	2,455							BSO	0,328	0,095	BSO	0,370	0,137

Tabelle 26: Ausgewertet Daten der Proben, die für 24h mit 10% FKS inkubiert worden sind

	24h, 10%FKS	24h, 30.10.	24h, 14.11.	24h, 6.11.	24h, 13.11.	n=3	n=4	n=5	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4	Std.ab. N=5
EtOH	66,709	78,090	73,111	77,452	66,388	76,217	73,840	72,350	2,709	5,244	5,633
0,1µM ATXII	70,439	83,418	87,262	78,725	82,355	83,135	79,961	80,440	4,275	7,245	6,365
1µM ATXII	100,208	111,904	101,123	124,217	115,733	112,415	109,363	110,637	11,555	11,237	10,140
5µM ATXII	88,376	146,652	146,999	159,030	152,252	150,894	135,264	138,662	7,048	31,784	28,555
t-BHQ	101,694	162,711	150,872	158,765		157,449	143,510	143,510	6,028	28,309	28,309
BSO			11,800	17,217	16,153			15,056			2,870

T/C	24h, 10%FKS	24h, 30.10.	24h, 14.11.	24h, 6.11.	24h, 13.11.	n=3	n=4	n=5	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4	Std.ab. N=5

EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	105,592	106,824	119,355	101,645	124,050	109,275	108,354	111,493	9,106	7,660	9,658
1µM ATXII	150,217	143,302	138,314	160,380	174,327	147,332	148,053	153,308	11,572	9,558	14,373
5µM ATXII	132,481	187,800	201,063	205,329	229,336	198,064	181,668	191,202	9,141	33,630	36,093
t-BHQ	152,445	208,364	206,360	204,986		206,570	193,039	193,039	1,699	27,098	27,098
BSO			16,140	22,229	24,330			20,900			4,254

Nachfolgend sind sämtliche Rohdaten der GSSG-Messungen und die fertigen Auswertungen aufgelistet:

Inkubationsart: 1h, 10%FCS, Anwuchszeit 48h				Messung: als Dublikat						
Name der Probe	1h, 10%FCS	29.10.	5.11.	12.11.						
Passage	P10 (8mL)	P15 (8mL)	P17	P19						
Ausgestreut am	13.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	10.11.2014						
Inkubiert am	15.10.2014	29.10.2014	05.11.2014	12.11.2014						
Aufgearbeitet am	15.10.2014	29.10.2014	05.11.2014	12.11.2014						
Gemessen am	21.10.2014	11.11.2014	11.11.2014	03.12.2014	Standardgerade hat nicht funktioniert					
Wiederholung am		03.12.2014			Wiederholte Messung zum testen, ob Proben beständig sind, oder nicht					

**Messung vom  
21.10.14**

Standardgerade	t=0	Blank korr.	1h, 10%FCS	BW Korr.
Konz. mM				
0,000	0,226	0,000	BW	0,242
0,001	0,236	0,010	EtOH	0,260
0,003	0,228	0,003	0,1µM ATXII	0,265
0,005	0,230	0,004	1µM ATXII	0,260
0,010	0,245	0,019	5µM ATXII	0,255
0,020	0,255	0,030	2-VP	0,248
0,040	0,276	0,050		

Standardgerade	t=2 min					
Konz. mM		Blank korr.		1h, 10%FKS		BW Korr.
0,000	0,262	0,000		BW	0,294	0,000
0,001	0,288	0,026		EtOH	0,426	0,132
0,003	0,265	0,002		0,1µM ATXII	0,447	0,153
0,005	0,276	0,014		1µM ATXII	0,442	0,148
0,010	0,312	0,049		5µM ATXII	0,430	0,136
0,020	0,356	0,094		2-VP	0,349	0,055
0,040	0,467	0,204				

**Messung vom  
11.11.14**

Standardgerade	t=0							
Konz. mM		Blank korr.	1h, 10%FKS, 29.10.		BW Korr.	1h, 10%FKS, 5.11.		BW Korr.
0,000	0,193	0,000	BW	0,194	0,000			
0,001	0,199	0,006	EtOH	0,195	0,001	EtOH	0,197	0,003
0,003	0,204	0,011	0,1µM ATXII	0,198	0,004	0,1µM ATXII	0,199	0,005
0,005	0,215	0,022	1µM ATXII	0,195	0,001	1µM ATXII	0,194	0,000
0,010	0,241	0,048	5µM ATXII	0,196	0,002	5µM ATXII	0,195	0,001
0,020	0,287	0,094	2-VP	0,194	0,000	2-VP	0,193	-0,001
0,040	0,414	0,221						

Standardgerade	t=2 min							
Konz. mM		Blank korr.	1h, 10%FKS, 29.10.		BW Korr.	1h, 10%FKS, 5.11.		BW Korr.
0,000	0,203	0,000	BW	0,201	0,000			
0,001	0,226	0,033	EtOH	0,213	0,012	EtOH	0,215	0,014
0,003	0,265	0,072	0,1µM ATXII	0,217	0,017	0,1µM ATXII	0,212	0,012
0,005	0,354	0,161	1µM ATXII	0,209	0,009	1µM ATXII	0,206	0,005
0,010	0,567	0,374	5µM ATXII	0,211	0,010	5µM ATXII	0,207	0,006
0,020	0,942	0,750	2-VP	0,205	0,004	2-VP	0,202	0,001
0,040	1,751	1,558						

**Messung vom  
3.12.14**

Standardgerade	t=0							

Konz. mM		Blank korr.	1h, 29.10.		BW Korr.	1h, 12.11.		BW Korr.
0,000	0,224	0,000	BW	0,226	0,000	BW	0,225	0,000
0,001	0,241	0,018	EtOH	0,250	0,025	EtOH	0,246	0,021
0,003	0,256	0,032	0,1µM ATXII	0,256	0,030	0,1µM ATXII	0,246	0,021
0,005	0,286	0,063	1µM ATXII	0,250	0,024	1µM ATXII	0,246	0,020
0,010	0,345	0,121	5µM ATXII	0,248	0,022	5µM ATXII	0,242	0,017
0,020	0,473	0,249	2-VP	0,236	0,010	2-VP	0,232	0,007
0,040	0,726	0,502						

Standardgerade	t=2							
Konz. mM		Blank korr.	1h, 29.10.		BW Korr.	1h, 12.11.		BW Korr.
0,000	0,241	0,017	BW	0,268	0,042	BW	0,266	0,041
0,001	0,343	0,120	EtOH	0,394	0,168	EtOH	0,379	0,153
0,003	0,443	0,219	0,1µM ATXII	0,426	0,200	0,1µM ATXII	0,384	0,159
0,005	0,634	0,411	1µM ATXII	0,386	0,160	1µM ATXII	0,367	0,142
0,010	1,011	0,788	5µM ATXII	0,392	0,166	5µM ATXII	0,359	0,133
0,020	1,768	1,544	2-VP	0,305	0,079	2-VP	0,297	0,071
0,040	3,080	2,856						

**Tabelle 27: Ausgewertete Daten der Proben, die für 1h mit 10% FKS inkubiert worden sind. Messung der GSSG-Konzentration.**

n=3: ohne 21.10.	1h, 29.10.	1h, 5.11.	1h, 12.11.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	1,063	0,993	0,982	0,987	1,013	0,008	0,044
0,1µM ATXII	1,019	0,876	0,726	0,801	0,874	0,106	0,147
1µM ATXII	1,024	0,889	0,651	0,770	0,855	0,169	0,189
5µM ATXII	0,718	0,804	0,624	0,714	0,715	0,128	0,090
2-VP	0,212	1,251	0,120	0,685	0,528	0,800	0,628

T/C	1h, 29.10.	1h, 5.11.	1h, 12.11.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	95,855	88,188	73,925	81,057	85,990	10,086	11,129
1µM ATXII	96,307	89,576	66,290	77,933	84,058	16,465	15,751
5µM ATXII	67,500	80,980	63,533	72,256	70,671	12,337	9,145
2-VP	19,933	125,963	12,233	69,098	52,710	80,419	63,556

Inkubationsart: 1h, 0%FCS, Anwachszeit 48h			Messung: als Dublikat	
Name der Probe	1h, 21.10.	1h, 0%FCS	31.10.	7.11.
Passage	P11 (8mL)	P13 (8mL)	P15	P18
Ausgestreut am	15.10.2014	21.10.2014	29.10.2014	05.11.2014
Inkubiert am	17.10.2014	23.10.2014	31.10.2014	07.11.2014
Aufgearbeitet am	17.10.2014	23.10.2014	31.10.2014	07.11.2014
Gemessen am	21.10.2014	28.10.2014	10.12.2014	10.12.2014
Wiederholung am				

**Messung vom  
21.10.2014**

Standardgerade	t=0				
Konz. mM		BW korr.	1h, 21.10.		BW Korr.
0,000	0,226	0,000	BW	0,242	0,000
0,001	0,236	0,010	EtOH	0,252	0,010
0,003	0,228	0,003	0,1µM ATXII	0,253	0,011
0,005	0,230	0,004	1µM ATXII	0,247	0,005
0,010	0,245	0,019	5µM ATXII	0,249	0,007
0,020	0,255	0,030	2-VP	0,249	0,008
0,040	0,276	0,050			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		BW korr.	1h, 21.10.		BW Korr.
0,000	0,262	0,000	BW	0,294	0,000
0,001	0,288	0,026	EtOH	0,381	0,087
0,003	0,265	0,002	0,1µM ATXII	0,380	0,086
0,005	0,276	0,014	1µM ATXII	0,376	0,082
0,010	0,312	0,049	5µM ATXII	0,384	0,090
0,020	0,356	0,094	2-VP	0,339	0,045
0,040	0,467	0,204			

**Messung vom  
28.10.2014**

Standardgerade	t=0				
Konz. mM		BW korr.	1h, 0%FCS		BW Korr.
0,000	0,203	0,000	BW	0,198	0,000
0,001	0,208	0,004	EtOH	0,195	-0,003
0,003	0,213	0,010	0,1µM ATXII	0,193	-0,005
0,005	0,239	0,036	1µM ATXII	0,193	-0,005
0,010	0,289	0,086	5µM ATXII	0,193	-0,005

0,020	0,367	0,164	2-VP	0,193	-0,005
0,040	0,579	0,376			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		BW korr.	1h, 0%FKS		BW Korr.
0,000	0,213	0,000	BW	0,207	0,000
0,001	0,262	0,059	EtOH	0,207	0,009
0,003	0,325	0,121	0,1µM ATXII	0,205	0,007
0,005	0,493	0,290	1µM ATXII	0,204	0,007
0,010	0,848	0,645	5µM ATXII	0,205	0,007
0,020	1,334	1,131	2-VP	0,203	0,006
0,040	2,595	2,392			

**Messung vom  
10.12.2014**

Standardgerade	t=0								
Konz. mM		BW korr.	1h, 31.10.		BW Korr.	1h, 7.11.		BW Korr.	
0,000	0,210	0,000	BW	0,213	0,000	BW	0,210	0,000	
0,001	0,221	0,012	EtOH	0,226	0,013	EtOH	0,218	0,008	
0,003	0,232	0,022	0,1µM ATXII	0,225	0,012	0,1µM ATXII	0,215	0,005	
0,005	0,260	0,051	1µM ATXII	0,224	0,012	1µM ATXII	0,218	0,008	
0,010	0,317	0,108	5µM ATXII	0,222	0,009	5µM ATXII	0,217	0,007	
0,020	0,409	0,199	2-VP	0,210	-0,003	2-VP	0,207	-0,003	
0,040	0,628	0,418							

Konz. mM		BW korr.	1h, 31.10.		BW Korr.	1h, 7.11.		BW Korr.	
0,000	0,241	0,000	BW	0,267	0,000	BW	0,263	0,000	
0,001	0,342	0,133	EtOH	0,366	0,099	EtOH	0,327	0,064	
0,003	0,430	0,221	0,1µM ATXII	0,365	0,098	0,1µM ATXII	0,312	0,049	
0,005	0,630	0,421	1µM ATXII	0,363	0,096	1µM ATXII	0,325	0,062	
0,010	1,019	0,810	5µM ATXII	0,361	0,094	5µM ATXII	0,322	0,059	
0,020	1,681	1,472	2-VP	0,286	0,019	2-VP	0,276	0,013	
0,040	2,999	2,789							

**Tabelle 28: Ausgewertete Daten der Proben, die für 1h mit 0% FKS inkubiert worden sind. Messung der GSSG-Konzentration.**

	1h, 31.10.	1h, 7.11.	n=2	Std.ab. N=2
EtOH	0,770	0,474	0,622	0,209
0,1µM ATXII	0,674	0,235	0,454	0,310
1µM ATXII	0,681	0,328	0,505	0,249
5µM ATXII	0,639	0,311	0,475	0,232
2-VP	-0,020	-0,105	-0,063	0,060
T/C	1h, 31.10.	1h, 7.11.	n=2	Std.ab. N=2
EtOH	100,000	100,000	100,000	0,000
0,1µM ATXII	87,474	49,569	68,521	26,803
1µM ATXII	88,367	69,247	78,807	13,520
5µM ATXII	82,960	65,569	74,264	12,298
2-VP	-2,602	-22,243	-12,422	13,888

Inkubationsart: 3h, 10%FCS, Anwachszeit 48h				Messung: als Dublikat
Name der Probe	3h,11.12.	3h,15.12.	3h,18.12.	
Passage	P29	P30	P31	
Ausgestreut am	09.12.2014	13.12.2014	16.12.2014	
Inkubiert am	11.12.2014	15.12.2014	18.12.2014	
Aufgearbeitet am	11.12.2014	15.12.2014	18.12.2014	
Gemessen am	09.01.2015	09.01.2015	09.01.2015	
Wiederholung am				

**Messung vom  
09.01.2015**

Standardgerade	t=0										
Konz. mM	Blank korr.		3h, 11.12	BW Korr.		3h, 15.12.	BW Korr.		3h, 18.12	BW Korr.	
0,000	0,215	0,000	BW	0,218	0,000	BW	0,218	0,000	BW	0,215	0,000
0,001	0,227	0,012	EtOH	0,233	0,016	EtOH	0,236	0,018	EtOH	0,229	0,014
0,003	0,240	0,025	0,1µM ATXII	0,237	0,019	0,1µM ATXII	0,235	0,018	0,1µM ATXII	0,229	0,014
0,005	0,270	0,056	1µM ATXII	0,241	0,023	1µM ATXII	0,245	0,028	1µM ATXII	0,230	0,015
0,010	0,337	0,122	5µM ATXII	0,246	0,028	5µM ATXII	0,247	0,029	5µM ATXII	0,234	0,019
0,020	0,441	0,227	2-VP	0,225	0,007	2-VP	0,229	0,011	2-VP	0,223	0,008
0,040	0,686	0,471									

Standardgerade	t=2										
Konz. mM		Blank korr.	3h, 11.12		BW Korr.	3h, 15.12.		BW Korr.	3h, 18.12		BW Korr.
0,000	0,241	0,000	BW	0,268	0,000	BW	0,267	0,000	BW	0,263	0,000
0,001	0,342	0,127	EtOH	0,367	0,099	EtOH	0,389	0,123	EtOH	0,360	0,097
0,003	0,447	0,232	0,1µM ATXII	0,387	0,119	0,1µM ATXII	0,383	0,117	0,1µM ATXII	0,354	0,091
0,005	0,649	0,434	1µM ATXII	0,415	0,147	1µM ATXII	0,446	0,180	1µM ATXII	0,375	0,112
0,010	1,065	0,851	5µM ATXII	0,450	0,182	5µM ATXII	0,457	0,190	5µM ATXII	0,375	0,112
0,020	1,752	1,537	2-VP	0,316	0,048	2-VP	0,342	0,075	2-VP	0,302	0,040
0,040	3,076	2,861									

**Tabelle 29: Ausgewertete Daten der Proben, die für 3h mit 10% FKS inkubiert worden sind. Messung der GSSG-Konzentration.**

	3h, 18.12	3h, 11.12	3h, 15.12.	n=3	Std.ab. N=3
EtOH	0,655	0,725	0,774	0,718	0,060
0,1µM ATXII	0,600	0,807	0,663	0,690	0,106
1µM ATXII	0,826	1,058	1,074	0,986	0,139
5µM ATXII	0,791	1,422	1,281	1,165	0,331
2-VP	0,063	0,181	0,341	0,195	0,139
T/C	3h, 18.12	3h, 11.12	3h, 15.12.	n=3	Std.ab. N=3
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000
0,1µM ATXII	91,679	111,256	85,729	96,221	13,356
1µM ATXII	126,134	145,973	138,799	136,969	10,045
5µM ATXII	120,855	196,170	165,614	160,880	37,880
2-VP	9,581	25,026	44,021	26,209	17,251

<b>Inkubationsart: 3h, 0%FCS, Anwuchszeit 72h</b>			<b>Messung: als Dublikat</b>											
Name der Probe	3h, 0%FCS	3h, 27.10.	3.11.	7.11.										
Passage	P12 (8mL)	P14 (8mL)	P17	P17										
Ausgestreut am	17.10.2014	24.10.2014	31.10.2014	04.11.2014										
Inkubiert am	20.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	07.11.2014										
Aufgearbeitet am	20.10.2014	27.10.2014	03.11.2014	07.11.2014										
Gemessen am	21.10.2014	28.10.2014	03.12.2014	03.12.2014	Standardgerade hat nicht funktioniert									
Wiederholung am			10.12.2014		Wiederholte Messung zum testen, ob Proben beständig sind, oder nicht									

Messung vom 21.10.14						Messung vom 28.10.14					
Standardgerade	t=0					Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 0%FCS		BW Korr.	Konz. mM		Blank korr.	3h, 27.10.		BW Korr.
0,000	0,226	0,000	BW	0,242	0,000	0,000	0,203	0,000	BW	0,199	0,000
0,001	0,236	0,010	EtOH	0,259	0,017	0,001	0,208	0,004	EtOH	0,197	0,002
0,003	0,228	0,003	0,1µM ATXII	0,257	0,016	0,003	0,213	0,010	0,1µM ATXII	0,195	0,004
0,005	0,230	0,004	1µM ATXII	0,250	0,008	0,005	0,239	0,036	1µM ATXII	0,197	0,002
0,010	0,245	0,019	5µM ATXII	0,252	0,010	0,010	0,289	0,086	5µM ATXII	0,196	0,003
0,020	0,255	0,030	2-VP	0,250	0,009	0,020	0,367	0,164	2-VP	0,193	0,006
0,040	0,276	0,050				0,040	0,579	0,376			

Standardgerade	t=2					Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 0%FCS		BW Korr.	Konz. mM		Blank korr.	3h, 27.10.		BW Korr.
0,000	0,262	0,000	BW	0,294	0,000	0,000	0,213	0,000	BW	0,208	0,000
0,001	0,288	0,026	EtOH	0,419	0,125	0,001	0,262	0,059	EtOH	0,209	0,011
0,003	0,265	0,002	0,1µM ATXII	0,406	0,112	0,003	0,325	0,121	0,1µM ATXII	0,207	0,008
0,005	0,276	0,014	1µM ATXII	0,396	0,102	0,005	0,493	0,290	1µM ATXII	0,210	0,011

0,010	0,312	0,049	5µM ATXII	0,414	0,120	0,010	0,848	0,645	5µM ATXII	0,209	0,010
0,020	0,356	0,094	2-VP	0,361	0,067	0,020	1,334	1,131	2-VP	0,206	0,007
0,040	0,467	0,204				0,040	2,595	2,392			

**Messung vom  
3.12.14**

Standard gerade	t=0									
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.		3h, 7.11.		BW Korr.	
0,000	0,224	0,000	BW	0,227	0,000		BW	0,225	0,000	
0,001	0,241	0,018	EtOH	0,240	0,014		EtOH	0,241	0,017	
0,003	0,256	0,032	0,1µM ATXII	0,241	0,014		0,1µM ATXII	0,239	0,014	
0,005	0,286	0,063	1µM ATXII	0,249	0,023		1µM ATXII	0,243	0,019	
0,010	0,345	0,121	5µM ATXII	0,245	0,018		5µM ATXII	0,237	0,013	
0,020	0,473	0,249	2-VP	0,231	0,005		2-VP	0,229	0,005	
0,040	0,726	0,502								

Standard gerade	t=2									
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.		3h, 7.11.		BW Korr.	
0,000	0,241	0,017	BW	0,266	0,040		BW	0,263	0,039	
0,001	0,343	0,120	EtOH	0,345	0,119		EtOH	0,350	0,125	
0,003	0,443	0,219	0,1µM ATXII	0,346	0,120		0,1µM ATXII	0,341	0,117	
0,005	0,634	0,411	1µM ATXII	0,375	0,149		1µM ATXII	0,362	0,138	
0,010	1,011	0,788	5µM ATXII	0,367	0,140		5µM ATXII	0,356	0,132	
0,02	1,768	1,544	2-VP	0,289	0,062		2-VP	0,294	0,070	
0,04	3,080	2,856								

**Messung vom  
10.12.14**

Standard gerade	t=0					
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.	
0,000	0,210	0,000	BW	0,211	0,000	
0,001	0,221	0,012	EtOH	0,223	0,013	
0,003	0,232	0,022	0,1µM ATXII	0,223	0,012	
0,005	0,260	0,051	1µM ATXII	0,230	0,019	

0,010	0,317	0,108	5µM ATXII	0,229	0,018
0,020	0,409	0,199	2-VP	0,209	-0,002
0,040	0,628	0,418			
Standard gerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	3h, 3.11.		BW Korr.
0,000	0,241	0,000	BW	0,267	0,000
0,001	0,342	0,133	EtOH	0,361	0,093
0,003	0,430	0,221	0,1µM ATXII	0,361	0,094
0,005	0,630	0,421	1µM ATXII	0,393	0,126
0,010	1,019	0,810	5µM ATXII	0,388	0,120
0,020	1,681	1,472	2-VP	0,293	0,025
0,040	2,999	2,789			

**Tabelle 30: Ausgewertet Daten der Proben, die für 3h mit 0% FKS inkubiert worden sind. Messung der GSSG-Konzentration.**

	3h, 3.11.	3h, 7.11.	3h, 27.10.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	0,597	0,670	0,102	0,633	0,456	0,052	0,309
0,1µM ATXII	0,531	0,460	0,099	0,496	0,363	0,050	0,232
1µM ATXII	0,808	0,657	0,104	0,733	0,523	0,107	0,370
5µM ATXII	0,736	0,651	0,099	0,693	0,495	0,060	0,346
2-VP	0,077	0,171	0,070	0,124	0,106	0,066	0,056
T/C	3h, 3.11.	3h, 7.11.	3h, 27.10.	n=2	n=3	Std.ab. N=2	Std.ab. N=3
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	88,917	68,729	97,242	78,823	84,962	14,275	14,662
1µM ATXII	135,384	98,083	102,848	116,734	112,105	26,376	20,301
5µM ATXII	123,318	97,126	97,388	110,222	105,944	18,520	15,047
2-VP	12,908	25,452	68,485	19,180	35,615	8,869	29,149

Inkubationsart: 24h, 10%FCS, Anwachszeit 48h			Messung: als Dublikat												
Name der Probe	24h, 10%FCS	30.10.	13.11.	14.11.	6.11.	5.12.									
Passage	P10 (8mL)	P15 (KJ)	P19	P20	P17	P27									
Ausgestreut am	13.10.2014	27.10.2014	10.11.2014	11.11.2014	03.11.2014	02.12.2014									
Inkubiert am	15.10.2014	29.10.2014	12.11.2014	13.11.2014	05.11.2014	04.12.2014									
Aufgearbeitet am	16.10.2014	30.10.2014	13.11.2014	14.11.2014	06.11.2014	05.12.2014									
Gemessen am	21.10.2014	14.11.2014	14.11.2014	14.11.2014	14.11.2014	10.12.2014	Standardgerade hat nicht funktioniert								
Wiederholung am															

Messung vom 21.10.2014					
Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 10%F KS		BW Korr.
0,000	0,226	0,000	BW	0,242	0,000
0,001	0,236	0,010	EtOH	0,264	0,023
0,003	0,228	0,003	0,1µM ATXII	0,287	0,045
0,005	0,230	0,004	1µM ATXII	0,291	0,050
0,010	0,245	0,019	5µM ATXII	0,289	0,047
0,020	0,255	0,030	t-BHQ	0,321	0,079
0,040	0,276	0,050			

Messung vom 10.12.2014					
Standardgerade	t=0				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 5.12.		BW Korr.
0,000	0,210	0,000	BW	0,210	0,000
0,001	0,221	0,012	EtOH	0,236	0,025
0,003	0,232	0,022	0,1µM ATXII	0,236	0,026
0,005	0,260	0,051	1µM ATXII	0,264	0,054
0,010	0,317	0,108	5µM ATXII	0,278	0,068
0,020	0,409	0,199	t-BHQ	0,287	0,076
0,040	0,628	0,418			

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 10%F KS		BW Korr.
0,000	0,262	0,000	BW	0,294	0,000
0,001	0,288	0,026	EtOH	0,455	0,161

Standardgerade	t=2				
Konz. mM		Blank korr.	24h, 5.12.		BW Korr.
0,000	0,241	0,000	BW	0,261	0,000
0,001	0,342	0,133	EtOH	0,437	0,175

0,003	0,265	0,002	0,1µM ATXII	0,574	0,280	0,003	0,430	0,221	0,1µM ATXII	0,427	0,165
0,005	0,276	0,014	1µM ATXII	0,631	0,337	0,005	0,630	0,421	1µM ATXII	0,583	0,322
0,010	0,312	0,049	5µM ATXII	0,636	0,342	0,010	1,019	0,810	5µM ATXII	0,682	0,421
0,020	0,356	0,094	t-BHQ	0,783	0,489	0,020	1,681	1,472	t-BHQ	0,731	0,469
0,040	0,467	0,204				0,040	2,999	2,789			

**Messung vom  
14.11.2014**

Standard gerade	t=0													
Konz. mM		Blank korr.	24h, 30.10.		BW Korr.	24h, 13.11.		BW Korr.	24h, 6.11.		BW Korr.	24h, 14.11.		BW Korr.
0,000	0,262	0,000	BW	0,243	0,000	BW	0,212	0,000	BW	0,236	0,000	BW	0,160	0,000
0,001	0,281	0,018	EtOH	0,261	0,018	EtOH	0,223	0,010	EtOH	0,168	-0,069	EtOH	0,120	0,040
0,003	0,291	0,029	0,1µM ATXII	0,270	0,027	0,1µM ATXII	0,234	0,021	0,1µM ATXII	0,182	-0,054	0,1µM ATXII	0,132	0,028
0,005	0,331	0,069	1µM ATXII	0,275	0,032	1µM ATXII	0,234	0,021	1µM ATXII	0,208	-0,029	1µM ATXII	0,141	0,019
0,010	0,395	0,133	5µM ATXII	0,286	0,043	5µM ATXII	0,230	0,018	5µM ATXII	0,234	-0,002	5µM ATXII	0,161	0,001
0,020	0,527	0,265	t-BHQ	0,288	0,045	BSO	0,195	0,017	t-BHQ	0,218	-0,019	t-BHQ	0,160	0,000
0,040	0,709	0,446							BSO	0,184	-0,052	BSO	0,111	0,049

Standard gerade	t=2													
Konz. mM		Blank korr.	24h, 30.10.		BW Korr.	24h, 13.11.		BW Korr.	24h, 6.11.		BW Korr.	24h, 14.11.		BW Korr.
0,000	0,296	0,000	BW	0,266	0,000	BW	0,231	0,000	BW	0,255	0,000	BW	0,172	0,000
0,001	0,397	0,134	EtOH	0,341	0,076	EtOH	0,272	0,040	EtOH	0,224	-0,031	EtOH	0,176	0,004
0,003	0,490	0,227	0,1µM ATXII	0,359	0,093	0,1µM ATXII	0,301	0,070	0,1µM ATXII	0,241	-0,014	0,1µM ATXII	0,202	0,030
0,005	0,704	0,442	1µM ATXII	0,396	0,131	1µM ATXII	0,333	0,101	1µM ATXII	0,353	0,098	1µM ATXII	0,264	0,092
0,010	1,113	0,851	5µM ATXII	0,450	0,185	5µM ATXII	0,315	0,084	5µM ATXII	0,432	0,177	5µM ATXII	0,277	0,105

0,020	1,894	1,631	t-BHQ	0,511	0,245	BSO	0,214	0,017	t-BHQ	0,372	0,117	t-BHQ	0,339	0,166
0,040	3,046	2,784							BSO	0,203	-0,052	BSO	0,123	0,049

**Tabelle 31: Ausgewertete Daten der Proben, die für 24h mit 10% FKS inkubiert worden sind. Messung der GSSG-Konzentration.**

	24h, 5.12.	24h, 30.10.	24h, 14.11.	24h, 6.11.	24h, 13.11.	n=3	n=4	n=5	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4	Std.ab. N=5
EtOH	0,787	0,375	0,343	0,403	0,215	0,374	0,477	0,425	0,030	0,208	0,215
0,1µM ATXII	0,689	0,393	0,417	0,366	0,301	0,392	0,466	0,433	0,025	0,150	0,150
1µM ATXII	1,400	0,688	0,797	1,178	0,524	0,888	1,016	0,917	0,257	0,331	0,361
5µM ATXII	2,197	0,870	0,841	1,534	0,614	1,081	1,360	1,211	0,392	0,643	0,649
t-BHQ	2,175	1,148	1,247	1,200		1,198	1,442	1,442	0,049	0,490	0,490
BSO			-0,020	-0,019	-0,014			-0,018			0,003
T/C	24h, 5.12.	24h, 30.10.	24h, 14.11.	24h, 6.11.	24h, 13.11.	n=3	n=4	N=5	Std.ab. N=3	Std.ab. N=4	Std.ab. N=5
EtOH	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	100,000	0,000	0,000	0,000
0,1µM ATXII	87,539	104,865	121,594	90,913	139,689	105,791	101,228	108,920	15,362	15,511	21,824
1µM ATXII	177,770	183,574	232,535	292,467	243,212	236,192	221,587	225,912	54,538	53,256	47,124
5µM ATXII	279,082	232,054	245,130	380,778	285,000	285,987	284,261	284,409	82,351	67,328	58,309
t-BHQ	276,236	306,357	363,542	297,835		322,578	310,992	310,992	35,731	37,256	37,256
BSO			-5,966	-4,679	-6,636			-5,760			0,995

**Tabelle 32: Prozentualer Anteil von GSSG in der Probe. Der jeweilige GSSG-Wert wurde durch den tGSH-Wert dividiert und mit 100 multipliziert. Wie man erkennen kann, verändert sich das GSSG-Verhältnis in der Probe bei der Langzeitinkubation. Es wird im Verhältnis weniger GSSG gebildet, als bei den Kurzzeitinkubationen.**

	MW (nmol GSH/mg Prot)		MW (nmol GSH/mg Prot)		MW (nmol GSH/mg Prot)		MW (nmol GSH/mg Prot)		MW (nmol GSH/mg Prot)		
	1h, 0%	1h, 10%	3h, 0%	3h, 10%	24h, 0%	24h, 10%	24h, 0%	24h, 10%	n=3	n=4	n=5
FKS:	n=2	FKS:	n=3	FKS:	n=2	FKS:	n=3	FKS:	n=3	n=4	n=5
EtOH	67,298	EtOH	67,544	EtOH	56,356	EtOH	56,099	EtOH	76,217	73,84	72,350
0,1µM	57,722	0,1µM	59,697	0,1µM	53,350	0,1µM	52,501	0,1µM	83,135	79,96	80,440

ATXII		ATXII		6	ATXII		ATXII		ATXII		1	
1µM		1µM		57,71	1µM		1µM		1µM	112,41	109,3	
ATXII	57,295	ATXII	57,339	6	ATXII	70,190	ATXII	65,228	ATXII	5	63	110,637
5µM		5µM		52,30	5µM		5µM		5µM	150,89	135,2	
ATXII	64,510	ATXII	52,147	5	ATXII	77,231	ATXII	72,601	ATXII	4	64	138,662
2-VP		2-VP		20,94	2-VP		2-VP		t-BHQ	157,44	143,5	
	20,852		22,310	9		22,545		18,307		9	10	143,510
									BSO			15,056

1h, 0%		1h, 10%		3h, 0%		3h, 10%		24h, 10%		MW (nmol GSSG/mg Prot)		
FKS:	Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	GSSG/mg Prot)
	n=2		n=2	n=3		n=2	n=3		n=3	n=4	n=5	
EtOH	0,622	EtOH	0,987	1,013	EtOH	0,633	EtOH	0,718	EtOH	0,37	0,477	0,425
0,1µM		0,1µM			0,1µM		0,1µM		0,1µM	0,39		
ATXII	0,454	ATXII	0,801	0,874	ATXII	0,496	ATXII	0,690	ATXII	2	0,466	0,433
1µM		1µM			1µM		1µM		1µM	0,88		
ATXII	0,505	ATXII	0,770	0,855	ATXII	0,733	ATXII	0,986	ATXII	8	1,016	0,917
5µM		5µM			5µM		5µM		5µM	1,08		
ATXII	0,475	ATXII	0,714	0,715	ATXII	0,693	ATXII	1,165	ATXII	1	1,360	1,211
2-VP		2-VP			2-VP		2-VP		t-BHQ	1,19		
	-0,063		0,685	0,528		0,124		0,195		8	1,442	1,442
									BSO			-0,018

Prozent GSSG:

1h, 0%		1h, 10%		3h, 0%		3h, 10%		24h, 10%		MW (nmol GSSG/mg Prot)		
FKS:	Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	FKS:	GSSG/mg Prot)	GSSG/mg Prot)
	n=2		n=2	n=3		n=2	n=3		n=3	n=4	n=5	
EtOH	0,92	EtOH	1,46	1,48	EtOH	1,12	EtOH	1,28	EtOH	0,49	0,65	0,59
0,1µM		0,1µM			0,1µM		0,1µM		0,1µM			
ATXII	0,79	ATXII	1,34	1,43	ATXII	0,93	ATXII	1,31	ATXII	0,47	0,58	0,54
1µM		1µM			1µM		1µM		1µM			
ATXII	0,88	ATXII	1,34	1,48	ATXII	1,04	ATXII	1,51	ATXII	0,79	0,93	0,83
5µM		5µM			5µM		5µM		5µM			
ATXII	0,74	ATXII	1,37	1,37	ATXII	0,90	ATXII	1,60	ATXII	0,72	1,01	0,87
2-VP		2-VP			2-VP		2-VP		2-VP			
	-0,30		3,07	2,52		0,55		1,06		0,76	1,01	1,01
									BSO			-0,12