
Institut für Ernährungswissenschaft
Ernährungstoxikologie

Histologische und molekulargenetische Analyse von
Darmgeweben aus mit dem humanrelevanten Kanzerogen
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP)
behandelten F344-Ratten

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“
(Dr. rer. nat)
in der Wissenschaftsdisziplin „Ernährungswissenschaft/Toxikologie“

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Dana Kühnel
Potsdam, September 2005

Inhalt

Inhalt	2
Abkürzungsverzeichnis	4
1 Einleitung	6
2 Material und Methoden	16
2.1 Tierversuch	16
2.1.1 Haltungsbedingungen	16
2.1.2 Futterzubereitung	16
2.1.3 Versuchsschema und -verlauf	16
2.1.4 Sektion	18
2.2 Erhebung biometrischer Daten	19
2.2.1 Körpergewichte	19
2.2.2 Futteraufnahme	19
2.2.3 Organgewichte	19
2.3 Histologie	20
2.4 Mutationsanalyse	20
2.4.1 DNA-Isolierung	20
2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	21
2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese	29
2.4.4 <i>Single-stranded conformation polymorphism</i> -Analyse	30
2.4.5 Silberfärbung	33
2.4.6 Isolierung von DNA aus SSCP-Polyacrylamid-Gelen	35
2.4.7 Sequenzierung	35
2.5 Geräte	36
2.6 Chemikalien	36
2.7 Feinchemikalien und Enzyme	37
2.8 Puffer und Lösungen	38
2.9 Verbrauchsmaterialien und Software	39
3 Ergebnisse	40
3.1 Biometrische Daten	40
3.1.1 Körpergewichte	40
3.1.2 Futteraufnahme	41
3.1.3 Organgewichte	42
3.2 Tierversuch-Makroskopische Beobachtungen	44
3.2.1 Kontrollgruppe	44
3.2.2 Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe	45
3.2.3 Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe	46
3.2.4 DMH-Gruppe	48
3.3 Histologie	50
3.3.1 Kontrollgruppe	50
3.3.2 Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe	51
3.3.3 Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe	52

3.3.4	DMH-Gruppe.....	53
3.4	Mutationsanalyse.....	57
3.4.1	DNA-Isolierung und PCR.....	57
3.4.2	SSCP-Analyse.....	57
3.4.3	Isolierung von DNA aus SSCP-Gelen.....	61
3.4.4	Sequenzierung.....	62
4	Diskussion.....	66
4.1	Biometrische Beobachtungen.....	67
4.1.1	Körpergewichte.....	67
4.1.2	Futteraufnahme.....	68
4.1.3	Organgewichte.....	68
4.2	Makroskopie.....	69
4.3	Histologie.....	69
4.3.1	Veränderte Krypten.....	70
4.3.2	Entzündungen.....	73
4.3.3	Paneth-Zellen.....	73
4.3.4	Andere Organe.....	75
4.3.5	Methodische Limitierungen.....	75
4.3.6	Mögliche Ursachen für die geringen Tumorraten.....	76
4.4	Verteilung der Laufunterschiede SSCP.....	78
4.5	Sequenzierungs-Muster.....	81
4.6	Addukte.....	83
4.7	Das Tiermodell.....	86
4.8	Abschätzung des Risikos für den Menschen.....	87
4.9	Ausblick.....	91
5	Zusammenfassung.....	92
6	Summary.....	93
7	Literaturverzeichnis.....	94

Danksagung

Erklärung

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACF	Aberrante Krypten Foci
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCAC	β-Catenin-akkumulierende Krypten
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Kolorektrum
CLA	Konjugierte Linolsäure (<i>conjugated linolic acid</i>)
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450
D	Dünndarm
DC	distales Kolon
DiMeIQx	2-Amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
DMH	N,N'-Dimethylhydrazin-dihydrochlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
F344	Fischer 344-Ratte
FOBT	<i>fecal occult blood test</i>
g	Erdbeschleunigung
GALT	Darm-assoziiertes Lymphgewebe (<i>gut associated lymphatic tissue</i>)
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HAA	Heterozyklische Aromatische Amine
HACA	histologisch veränderte Krypte mit ACF-Erscheinungsbild (<i>histologically altered crypts with ACF appearance</i>)
HACN	histologisch veränderte Krypte mit makroskopisch normalem Erscheinungsbild (<i>histologically altered crypts with macroscopically normal-like appearance</i>)
HE	Hämalaun-Eosin
KG	Körpergewicht
KRK	Kolorektales Karzinom
MAP	<i>microtubule associated protein</i>
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxalin
MDF	Mucin-depletierte Foci
min	Minute
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MMR	<i>mismatch repair</i>
MRL	Max-Rubner-Laboratorium
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
NAT	N-Acetyltransferase
PAS	Perjodsäure-Schiff-Reaktion (<i>Periodic-acid-Schiff-reaction</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PC	proximales Kolon
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd

PhIP	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridin
®	eingetragenes Warenzeichen (<i>registered</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SSCP	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus (<i>single-stranded conformation polymorphism</i>)
SPF	Spezifisch Pathogen-frei
SULT	Sulfotransferase
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethyldiamin
™	eingetragenes Warenzeichen (<i>trademark</i>)
u.a.	unter anderem
ÜN	über Nacht
usw.	und so weiter
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Dickdarmkrebs ist eine der am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen in den westlichen Industrienationen. In Deutschland war er im Jahr 2000 bei beiden Geschlechtern nach Prostata- bzw. Brustkrebs die zweithäufigste Krebsart mit ca. 33.000 Neuerkrankungen und über 13.500 Todesfällen bei Männern und ca. 34.000 Neuerkrankungen und über 15.000 Todesfällen bei Frauen (Arbeitsgemeinschaft bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004). Damit nimmt Dickdarmkrebs nach Lungen- bzw. Brustkrebs bei beiden Geschlechtern die zweithöchste Zahl an Krebssterbefällen ein. Die Prognose für die Heilung einer Krebserkrankung fällt umso günstiger aus, je früher die Krankheit diagnostiziert wird (Tab. 1.1). Als ein Grund für die vergleichsweise hohe Mortalität bei Dickdarmkrebs lässt sich die häufig erst im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung gestellte Diagnose nennen. Die Entwicklung von Dickdarmkrebs ist ein komplexer, über mehrere Dekaden ablaufender Prozess. Daher sollte es bei regelmäßiger, jährlicher Untersuchung leicht sein, frühe Veränderungen zu diagnostizieren und zu behandeln. Doch trotz zahlreicher medizinischer Fortschritte auf dem Gebiet der Krebsforschung ist die Diagnose dieser Krankheit bisher nur durch das invasive Koloskopie-Verfahren sicher zu bewerkstelligen, welches als Vorsorgeuntersuchung eine geringe Akzeptanz in der Bevölkerung hat. Das am häufigsten verwendete nicht-invasive Verfahren, der Test auf verborgenes Blut im Stuhl (FOBT, *fecal occult blood test*), ist relativ unsensitiv und ungeeignet, um die frühen, nicht blutenden Tumorstadien anzuzeigen. Ein Ansatz für ein nicht-invasives Früherkennungsverfahren, welches sich gleichzeitig für das Screening großer Personengruppen eignen würde, ist der Nachweis von dickdarmkrebspezifischen Mutationen in Stuhlproben. Die Dickdarmschleimhaut ist ein schnell proliferierendes Gewebe, dessen Epithelzellen ständig erneuert werden. Nach dem programmierten Zelltod verlieren sie den Kontakt zum Gewebe und werden durch den passierenden Stuhl von der Darmoberfläche abgeschilfert. Bei der Entstehung eines Tumors kommt es zu einer Anhäufung von Mutationen in bestimmten Genen (Abbildung 1.1), die zu ungeordnetem zellulärem Wachstum durch Verlust der Proliferationskontrolle und der Zell-Zell-Kontakthemmung sowie zur Entdifferenzierung eines Zelltyps führen. Im Stuhl befindet sich dann ein Gemisch von normalen Zellen und Tumorzellen, die Träger spezifischer

Mutationen sind. Die DNA der Zellen kann aus dem Stuhl isoliert und anschließend einer Mutationsanalyse unterzogen werden.

Tabelle 1.1 Einteilung der Dickdarmkrebs-Stadien (nach Dukes und Bussey, 1958) mit 5-Jahres-Überlebensrate und Anteil der diagnostizierten Patienten.

Klassifikation	Dukes A	Dukes B	Dukes C	Dukes D
Progression	nur die obersten Zellschichten des Epithels sind betroffen	Krebszellen erstrecken sich durch die Darmwand, Lymphknoten sind nicht betroffen	Ausbreitung des Geschwürs auf Lymphknoten	Metastasen-Bildung, der Krebs befällt entfernte Organe, z.B. die Leber
5-Jahres Überlebensrate	95 %	80 %	50 %	5 %
diagnostizierte Patienten	37 %		63 %	

Neben einer Reihe von erblich bedingten und chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen sind als Risikofaktoren für die Entwicklung von Darmkrebs ein bewegungsarmer Lebensstil, Übergewicht und eine ballaststoffarme, fett- und kalorienreiche Diät zu nennen. Weiterhin stehen bestimmte Inhaltsstoffe der Nahrung, wie die heterozyklischen aromatischen Amine (HAA), im Verdacht, Dickdarmkrebs zu verursachen.

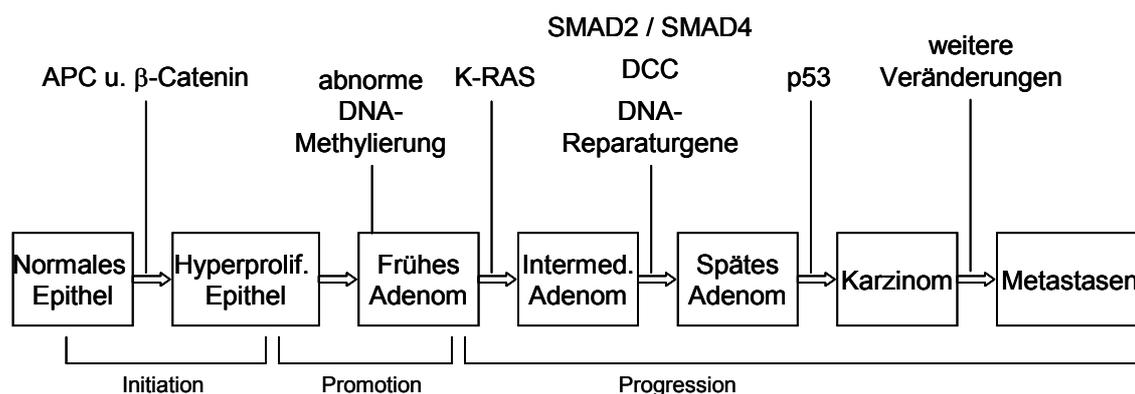


Abbildung 1.1 Mehrstufenmodell der Kolon-Kanzerogenese mit den dazu gehörenden genetischen Veränderungen, histologischen Stadien und den Phasen der Krebsentstehung (nach Fearon und Vogelstein, 1990; Fearon, 1991; Srivastava et al., 2001).

2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP, Abb. 1.2 a) ist ein wichtiger Vertreter der Gruppe der HAA, der besonders bei der Erhitzung proteinreicher Nahrungsmittel wie Fisch und Fleisch (Felton et al., 1986) entsteht. Aus in den Lebensmitteln enthaltenen Aminosäuren, Zuckern und Kreatin bildet sich bei Erhitzung ein Gemisch von HAA, an dem PhIP den mengenmäßig größten Anteil hat, gefolgt von weiteren Verbindungen dieser Substanzklasse wie MeIQx und DiMeIQx (Sinha et al., 1994; Augustsson et al., 1997; Rohrmann und Becker, 2001). PhIP konnte auch in anderen Lebensmitteln wie Bier und Wein nachgewiesen werden (Manabe et al., 1993). PhIP entfaltet im bakteriellen Mutagenitätstest nach Ames eine geringe Mutagenität, wirkt jedoch im Säugerzell-Mutagenitätstest stärker mutagen als andere Verbindungen dieser Substanzklasse (Holme et al., 1989). Die Substanz wirkt genotoxisch, indem sie nach einer metabolischen Aktivierung an Basen der DNA kovalent bindet (Takayama et al., 1989; Turesky et al., 1991) und somit ein Addukt entsteht. PhIP bildet Addukte an der C8-Position des Guanins (Frandsen et al., 1992; Lin et al., 1992) (Abb. 1.2 b). Die Aktivierung und nachfolgende Adduktbildung kann auf zwei Wegen erfolgen. Der erste Schritt der in der Leber stattfindenden Aktivierung ist die Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2)-vermittelte Oxidation, der eine N-Acetyltransferase (NAT)- bzw. Sulfotransferase (SULT)-vermittelte Konjugationsreaktion folgt. Als spontane Zerfallsprodukte entstehen Nitreniumionen, die als ultimale Kanzerogene an die nukleophilen Zentren der DNA binden können. In extrahepatischen Geweben findet vorrangig die Kooxidation von PhIP mit ungesättigten Fettsäuren durch die Cyclooxygenase (COX), einem in allen Geweben konstitutiv exprimierten Enzym, statt. Der Anteil der Kooxidation am Gesamtumsatz und der Adduktbildung ist jedoch nicht genau bekannt (Moonen et al., 2004).

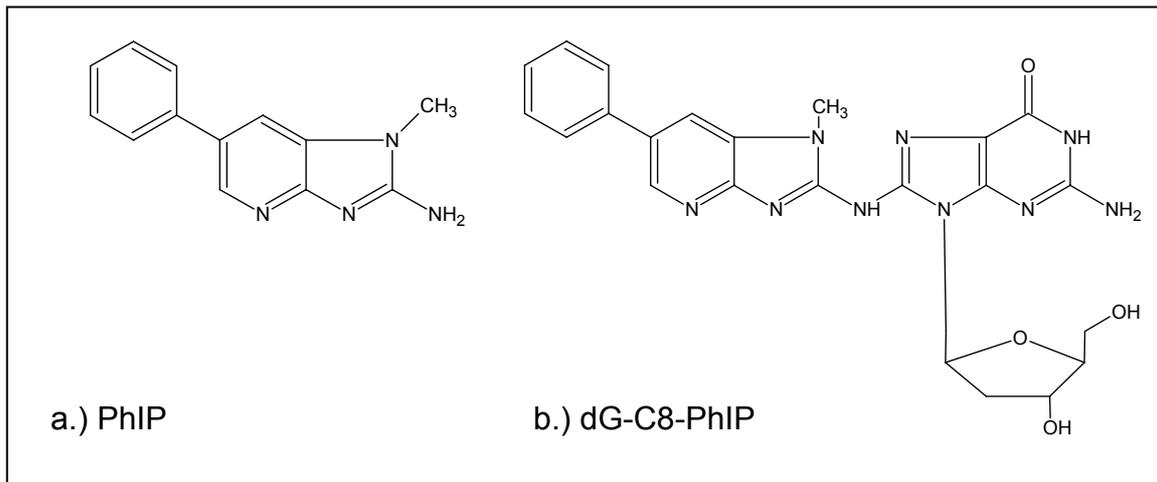


Abbildung 1.2 a.) Strukturformel des heterozyklischen aromatischen Amins PhIP, welches sich unter Einwirkung hoher Temperaturen aus Aminosäuren (besonders Phenylalanin), Zucker und Kreatin bildet (Shioya et al., 1987). **b.)** Strukturformel des Guanin-PhIP-Addukts.

Ein sowohl für die mechanistische Untersuchung der Kanzerogenese als auch zur Evaluierung der Wirkung von HAA häufig eingesetztes Tiermodell ist die Behandlung von F344-Ratten mit PhIP. In hohen Dosen und chronisch verabreicht löst es geschlechts- und organspezifisch Tumoren aus. Bei weiblichen Tieren treten Kolon- und Mammatumoren auf, männliche Tiere entwickeln Kolon- und Prostataumoren. Im Unterschied zu anderen HAA gehört die Leber nicht zu den Zielorganen der PhIP-vermittelten Kanzerogenese (Ito et al., 1991; Shirai et al., 1997).

In den bisherigen Publikationen zur PhIP-vermittelten Kanzerogenese wurden drei Parameter untersucht. In der Reihenfolge ihres Auftretens im Organismus sind dies:

(1) PhIP-DNA-Addukte als Marker für eine primäre DNA-Schädigung

Das PhIP-Guanin-Addukt führt aufgrund seiner Größe zu charakteristischen Basenfehlpaarungen. In Untersuchungen zur Bildung dieser sogenannten „*bulky adducts*“ in F344-Ratten wurden insgesamt widersprüchliche Ergebnisse erzielt. So treten Addukte nicht ausschließlich in den Zielorganen der Kanzerogenese auf und die Zielorgane enthalten nicht die höchsten Mengen an Addukten. Beispielsweise wiesen in einer Studie Lunge, Pankreas und Herz die höchsten Adduktzahlen aller untersuchten Organe auf, wohingegen im Kolon mittlere und in Hoden sehr niedrige Adduktlevel festgestellt wurden (Takayama et al., 1989). Ein Großteil der Addukte wird repariert, so dass sich nicht jedes Addukt in einer

Mutation manifestiert. Diese Daten zeigen jedoch die Möglichkeit der Bildung von Addukten in den Zielorganen der PhIP-induzierten Kanzerogenese bzw. bei der systemischen Verteilung von PhIP im Organismus.

(2) die durch PhIP-Einwirkung spezifisch hervorgerufenen Mutationen als Marker für eine manifeste DNA-Schädigung

Bei der Suche nach Mutationen, die für die Entstehung von Dickdarmkrebs essentiell sein könnten, zeigte sich ein PhIP-spezifisches Spektrum an mutierten Genen, die wiederum Mutationen an spezifischen Positionen aufwiesen („fingerprint“). Aus der Bildung von PhIP-Guanin-Addukten resultieren charakteristische Basenfehlpaarungen. Es handelt sich vor allem um GC → TA Transversionen und Deletionen eines Guanins in 5'-GGGA-3'-Sequenzen (Yadollahi-Farsani et al., 1996). Im Falle des *APC*-Gens führen Deletionen zu einer Verschiebung des Leserahmens und somit zu einem trunkierten Protein (Kakiuchi et al., 1995). Im *β-Catenin*-Gen treten Mutationen gehäuft in den Codons 32-34, 45, 47 und 56 auf, die direkt für bedeutende Phosphorylierungsstellen kodieren bzw. diese flankieren, was eine Störung der Degradierung des *β-Catenin*-Proteins zur Folge hat (Tsukamoto et al., 2000). Mutationen in den beiden Genen, deren Produkte in den Wnt-Signalweg (Abb. 1.3) involviert sind, schließen sich meist aus, d.h. in Tumoren bzw. ihren Vorstufen lassen sich entweder Mutationen im *APC*-Gen oder im *β-Catenin*-Gen nachweisen (Morin et

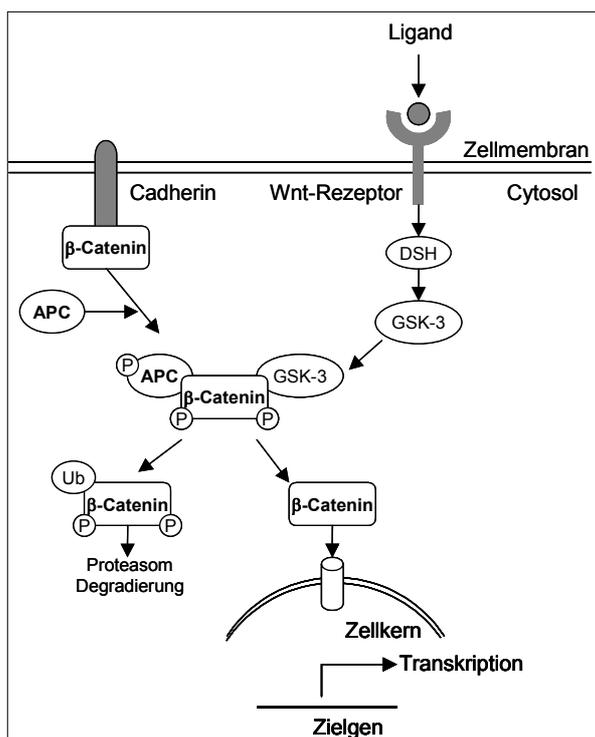


Abbildung 1.3 Die Rolle von APC und *β-Catenin* im Wnt-Signaltransduktionsweg. Das *β-Catenin* ist an das membranständige Cadherin gebunden. Nach Aktivierung des Signalweges erfolgt die Phosphorylierung (P) und Komplexbildung mit APC und GSK-3. Phosphoryliertes *β-Catenin* wird durch Bindung an Ubiquitin (Ub) degradiert. Mutationen im Proto-Onkogen *β-Catenin* verhindern die Phosphorylierung und nachfolgende Degradierung, in der Folge häuft sich *β-Catenin* im Zellkern an und es kommt zu einer vermehrten Transkription von Zielgenen. Mutationen im Tumorsuppressorgen *APC* führen ebenfalls zu einer gestörten Degradierung des *β-Catenin*, der Signaltransduktionsweg bleibt dauerhaft aktiv.

al., 1997; Dashwood et al., 1998). Mutationen in beiden Genen werden als frühe Ereignisse in der Kolonkanzerogenese betrachtet (Powell et al., 1992).

Das *Ki-ras*-Gen, dessen Produkt Teil des ERK 1/2-Weges (Abb. 1.4) ist, weist eine Häufung von Mutationen in den Codons 12, 13, 59 und 61 (Bos et al., 1987) auf. Die Mutationen treten ebenfalls früh auf, sind aber in PhIP-induzierten Kolontumoren selten (Kakiuchi et al., 1993). Mutationen im *p53*-Gen werden als spätes Ereignis der Kolonkanzerogenese beschrieben (Fearon und Vogelstein, 1990; Baker et al., 1990) und treten bei PhIP-induzierten Kolontumoren nicht auf (Makino et al., 1994).

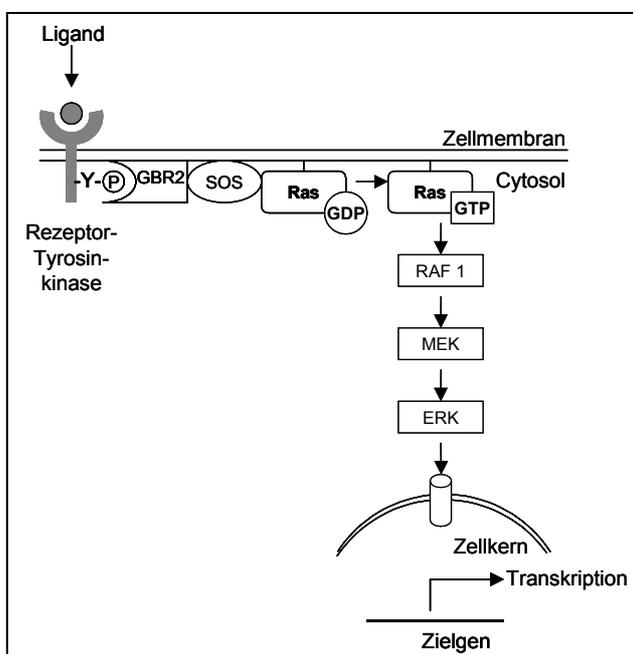


Abbildung 1.4 Die Rolle des RAS-Proteins im ERK 1/2-Signaltransduktionsweg. Mutationen im *ras*-Gen blockieren die intrinsische GTPase-Aktivität des Proteins, welches dann im daueraktiven Zustand bleibt. Dadurch ist der gesamte Signaltransduktionsweg dauerhaft aktiv, als Folge dessen kommt es zu einer vermehrten Transkription von Zielgenen.

(3) präneoplastische und neoplastische Läsionen der Zielorgane als Marker für unkontrolliertes Zellwachstum

Die ersten, früh sichtbaren Veränderungen im Kolongewebe werden nach ihrem makroskopischen Erscheinungsbild aberrante Kryptenherde („aberrant crypt foci“, ACF) und nach ihrem mikroskopischen Aussehen histologisch veränderte Krypten mit ACF-Erscheinungsbild (HACA für *histologically altered crypts with ACF appearance*) genannt. Bei F344-Ratten werden sie durch PhIP-Gabe dosis- und zeitabhängig induziert (Takahashi et al., 1991; Hasegawa et al., 1993). Den Mechanismus ihrer Entstehung verdeutlicht Abbildung 1.5. Eine weitere Vorstufe ist makroskopisch unauffällig, histologisch aber durch eine Akkumulation von β -Catenin in den Kryptenzellen gekennzeichnet. Aufgrund dieser Eigenschaft

wurden sie als BCAC (β -Catenin-akkumulierende Krypten) bzw. histologisch veränderte Krypten mit makroskopisch normalem Erscheinungsbild (HACN für *histologically altered crypts with macroscopically normal-like appearance*) bezeichnet. Der Anteil an β -Catenin-Mutationen ist bei BCAC höher als bei ACF, weshalb BCAC eher als Vorstufen für maligne Läsionen angesehen werden (Yamada et al., 2000; Yamada et al., 2001; Mori et al., 2004). Ebenfalls makroskopisch auffällig sind die Mucin-depletierten Foci (MDF), die durch das Fehlen von Becherzellen und histologisch durch eine Dysplasie (d.h. gestörter Epithelaufbau durch veränderte Zellzusammensetzung) gekennzeichnet sind. In humaner Kolonmukosa wurden ebenfalls ACF als mögliche präneoplastische Läsionen nachgewiesen (Pretlow et al., 1991). Nach längerer Expositionsdauer bilden sich im Dickdarm der Tiere Adenome und maligne Adenokarzinome (Ito et al., 1991).

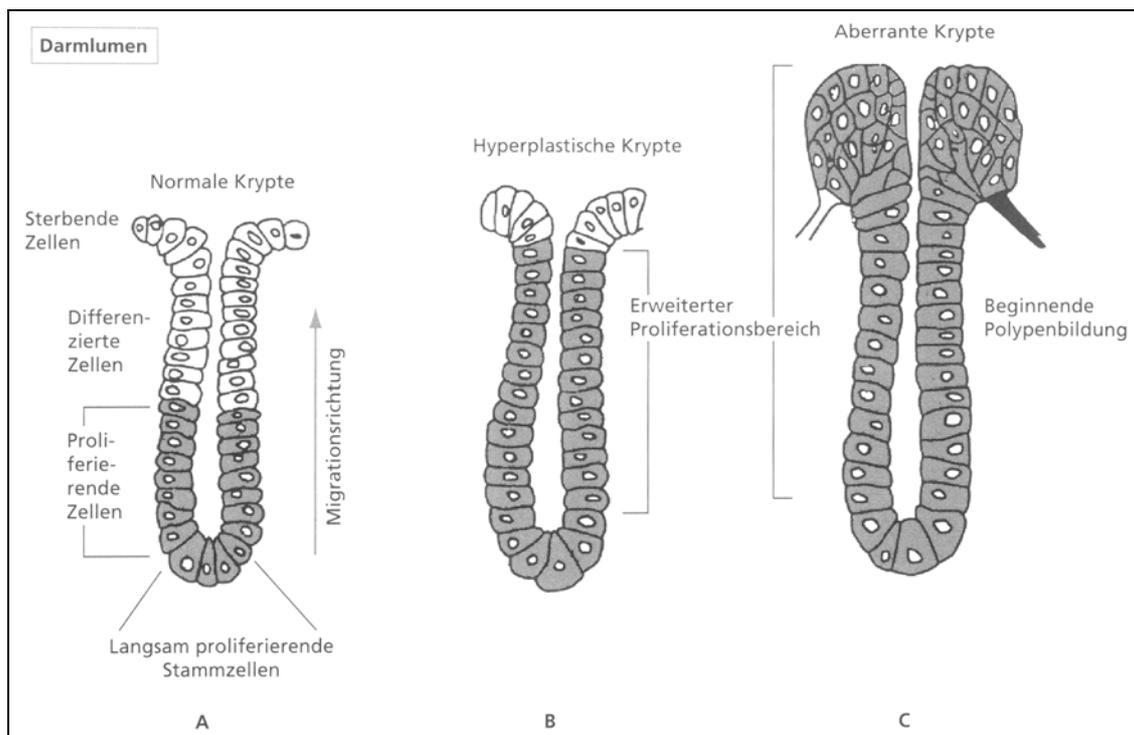


Abbildung 1.5 Entstehung aberranter Krypten.

A Am Kryptengrund sind die Stammzellen lokalisiert, die sich in der unteren Hälfte der Krypte teilen. Die obere Kryptenhälfte besteht aus ausdifferenzierten, teilungsunfähigen Zellen, die bei Erreichen der Kryptenoberfläche durch aktiven Zelltod entfernt und abgeschilfert werden.

B Genetische Schädigungen führen zur Verzögerung von Differenzierung und Zelltod und damit zu einer Expansion des Proliferationskompartiments, bis es die gesamte Krypte umfasst.

C Aberrante Krypten weisen erhöhte Zellzahlen und vergrößerte Lumina auf. Sie stellen die erste sichtbare prä-maligne Läsion dar.

(nach Marquardt und Schäfer, 2004 „Toxikologie“ 2. Auflage)

Eine weitere kanzerogene Wirkung des PhIP wird auf hormoneller Ebene im Zusammenhang mit der Brustkrebs-Induktion postuliert (Lauber et al., 2004), eine besonders im Hinblick auf die geschlechtsspezifische Organotropie der kanzerogenen Wirkung des PhIP interessante Beobachtung. Außerdem gibt es Hinweise auf eine PhIP-induzierte Kardiotoxizität (Davis et al., 1994).

Aufgrund der Ergebnisse aus Tierversuchen steht PhIP auch beim Menschen im Verdacht, an der Dickdarmkrebsentstehung beteiligt zu sein. Epidemiologische Studien betrachten meist die gesamte Substanzklasse der HAA und liefern widersprüchliche Ergebnisse. So fand eine schwedische Studie keinen Zusammenhang zwischen HAA-Aufnahme und Kolonkrebs-Inzidenz, wohingegen eine US-amerikanische Studie einen Zusammenhang zwischen kolorektalen Adenomen und der Aufnahme bestimmter HAA, jedoch nicht mit PhIP herstellen konnte (Augustsson et al., 1999; Sinha et al., 2001). Als gesichert gilt, dass sich Dickdarmkrebserkrankungen in Ländern mit einem hohen Fleischverzehr häufen (Schulmann und Schmiegel, 2002). Das Risiko steigt mit dem Verzehr von lange und auf hohe Temperaturen erhitztem Fleisch (Sinha et al., 2001). Weitere Expositionsquellen für den Menschen stellen Tabakrauch und Dieselabgase dar (Manabe et al., 1991; Manabe et al., 1993a). Der Nachweis ist vor allem deshalb schwierig, weil die Exposition des Menschen über einen längeren Zeitraum, dafür aber in geringerer Dosis erfolgt, als es im Tierversuch der Fall ist und die Dickdarmkrebsentwicklung ein Prozess ist, der über mehrere Dekaden erfolgt. Eine große Schwierigkeit besteht darin, dass der Mensch immer einem Gemisch vieler verschiedener Substanzen ausgesetzt ist, so dass der Einfluss einer einzelnen Verbindung schwer zu bestimmen ist. Dass chemische Substanzen aus der Umwelt oder der Nahrung eine ursächliche Rolle für die Krebsentstehung beim Menschen spielen können, gilt jedoch als sehr wahrscheinlich. In Deutschland beträgt die Gesamt-HAA-Aufnahme 103 ng/Tag und Person (Median), daran hat PhIP mit 63 ng/Tag (Median) den höchsten Anteil (Rohrmann und Becker, 2001). Die Bildung von PhIP-Addukten mit DNA und Proteinen konnte in Blutzellen und Dickdarmgewebe von Probanden nachgewiesen werden (Dingley et al., 1999), ebenso die Bildung von PhIP-DNA-Addukten in menschlichem Brustgewebe (Lightfoot et al., 2000). Diese Ergebnisse zeigen, dass PhIP im menschlichen Körper aktiviert und verteilt werden kann. Die Verminderung der Exposition des

Menschen gegenüber Substanzen wie HAA ist im Falle des PhIP beispielsweise durch veränderte Zubereitung der Nahrung denkbar. So können reduzierte Kochtemperatur und -zeit oder Zusatz von Kohlenhydraten zu Fleischprodukten (Persson et al., 2004) zu einer Reduktion der Entstehung von HAA führen. Des Weiteren ist in Versuchen mit Säugerzellen (Edenharder et al., 2002), im Ganztier (Nozawa et al., 2004; Tavan et al., 2002) und im Menschen (Walters et al., 2004) für eine Reihe von Lebensmitteln bzw. ihrer Inhaltsstoffe (z.B. Kohlgemüse, Kaffee, Tee, Bier, Milchprodukte) eine Interaktion mit PhIP bzw. eine Modulation seiner Wirkung beschrieben. Im F344-Tiermodell ist eine Steigerung der PhIP-Wirkung durch eine fettreiche Nahrung gezeigt (Ubagai et al., 2002). Da ein Merkmal der westlichen Diät ihr hoher Fettanteil ist, könnte dieser Zusammenhang auch für den Menschen bestehen. PhIP wird von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als „möglicherweise kanzerogen“ (2B) eingestuft (IARC1993).

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden 240 männliche F344-Ratten über 60 Wochen mit humanrelevanten und hohen PhIP-Konzentrationen behandelt. Dabei wurden Körpergewichte, Futtermittelverbrauch und Organengewichte der Versuchstiere protokolliert und einer statistischen Auswertung unterzogen.

Die gewonnenen Gewebeprobe von verschiedenen Abschnitten des Dickdarms und des Dünndarms wurden einer makroskopischen und mikroskopischen Auswertung sowie einer Mutationsanalyse unterzogen. Die makro- und mikroskopische Auswertung konzentrierte sich auf die Detektion von dysplastischen Krypten, Adenomen, Karzinomen sowie Anzeichen von Anomalien in den Organen der Tiere.

Die Mutationsanalyse erfolgte mittels *Single-stranded conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse, einer Methode, mit der über Konformationsunterschiede einzelsträngiger DNA der Nachweis von Mutationen möglich ist. Untersucht wurden bestimmte Abschnitte der Gene *APC*, *β -Catenin* und *Ki-ras*, die mittels PCR amplifiziert wurden. Diese Gene wurden ausgewählt, weil ihre Produkte Bestandteile der für die Tumorentstehung bedeutsamen Wnt- bzw. ERK 1/2-Kinase-Signaltransduktionswege sind.

Durch den Vergleich einer Hoch-Dosis- mit einer Niedrig-Dosis-Fütterungsgruppe sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine lange Exposition mit einer

humanrelevanten PhIP-Konzentration, die der PhIP-Aufnahme über die Nahrung entsprechen sollte, zu ähnlichen histologischen Veränderungen und einem ähnlichen Mutationsspektrum führt wie die Gabe von hohen PhIP-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass humanrelevante PhIP-Dosen präneoplastische Läsionen im Dickdarm von F344-Ratten induzieren. Diese sind nach einem Fütterungszeitraum von 25 Wochen erstmalig nachweisbar. Zur Bildung von Tumoren kommt es allerdings nicht, was im Gegensatz zu früheren Untersuchungen mit hohen PhIP-Dosen in diesem Tiermodell steht. Neu sind auch Befunde, die auf eine Induktion von Entzündungsreaktionen als Folge der PhIP-Behandlung im Darmgewebe hinweisen.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Haltungsbedingungen

In den Tierversuch wurden 240 männliche F344-Ratten (Charles River, Sulzfeld) eingesetzt, die in 4 Gruppen mit je 60 Tieren eingeteilt wurden. Die Tiere wurden paarweise in Macrolon-Käfigen auf Einstreu der Firma J. Rettenmaier & Söhne GmbH & Co. (Rosenberg) gehalten. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem isolierten Raum (Temperatur $22\pm 2^\circ\text{C}$, Luftfeuchtigkeit 40-60 %, Luftaustausch $15\text{ m}^3/\text{h}$, Tag-Nacht-Rhythmus 16 h/8 h). Futter und Wasser in Tropfflaschen standen *ad libitum* zur Verfügung. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn ca. 6 Wochen alt und wogen zwischen 100 und 150 g. Bei allen Ratten wurde wöchentlich die Einstreu gewechselt, wobei das Körpergewicht jedes Tieres und der Futterverbrauch für die 2 Tiere eines Käfigs ermittelt wurden. Da die Tiere aus Sicherheitsgründen im SPF-Bereich gehalten wurden, mussten sämtliche für die Haltung notwendigen Materialien wie Käfige, Einstreu, Futter und Trinkwasser vor der Benutzung autoklaviert werden.

2.1.2 Futterzubereitung

Das Futter (altromin 1321 FORTI, Altromin GmbH, Lage) wurde in Pulverform geliefert und mit 0,01 % bzw. 0,00001 % PhIP, gelöst in Pflanzenöl (BRÖLIO Europe GmbH, Hamm), versetzt. Das PhIP (BIU-Grimmer, Großharnsdorf) wurde durch Behandlung mit Ultraschall und durch Schütteln über Nacht im Öl gelöst. Je 15 kg des Futterpulvers wurden mit 6,5 l Wasser und 200 ml des Pflanzenöl-PhIP-Gemischs, welches die entsprechenden Mengen PhIP enthielt, maschinell vermengt. Mit Hilfe einer Pelletiermaschine wurde die Mischung in Pellets gepresst. Diese wurden luftgetrocknet und vor dem Verfüttern autoklaviert (118°C , 20 min). Die Zubereitung des Kontrollfutters (Gruppen A und D) erfolgte wie oben beschrieben ebenfalls durch Zugabe von Pflanzenöl, jedoch ohne PhIP.

2.1.3 Versuchsschema und -verlauf

Die Tiere in Gruppe A dienten als Kontrolltiere, Gruppe B erhielt 0,00001 % PhIP und Gruppe C 0,01 % PhIP im Futter. Die Tiere aus Gruppe D dienten als Positivkontrolle und bekamen in den ersten 5 Versuchswochen $2,5\text{ mg}/100\text{ g KG}$

DMH intraperitoneal injiziert (Tab. 2.1). DMH ist ebenfalls ein Kanzerogen, welches in F344-Ratten Tumore in Dick- und Dünndarm induziert (Weisburger, 1971; Rogers und Nauss, 1985). Die Tumorzahlen aus dieser Gruppe sollten als Vergleich dienen, um das Ausmaß der kanzerogenen Wirkung der PhIP-Behandlung besser abschätzen zu können. Das DMH wurde für die Injektion in 0,9% NaCl gelöst und vor der Injektion steril filtriert.

Tabelle 2.1 Übersicht über die 4 Versuchsgruppen.

Gruppe	Tierzahl	Behandlung	Dosis / Futter	
A	60	---	Kontrollfutter	Kontrollgruppe
B	60	PhIP	0,00001 %	humanrelevante Dosis
C	60	PhIP	0,01 %	hohe Dosis
D	60	DMH	25 mg / kg KG i.p. + Kontrollfutter	Positivkontrolle

In der 9., 16., 25., 33., 41. sowie 61. Versuchswoche erfolgte die Tötung von jeweils 10 Tieren aus den Gruppen A, B u. C. Bei Gruppe D erfolgte die Tötung von 18 bzw. 20 Tieren in der 9. und 16. Versuchswoche bzw. von je 10 Tieren in der 25. und 31. Versuchswoche (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2 Zeitlicher Verlauf des Tierversuchs und Zuordnung der Tiernummern zu den einzelnen Tötungsterminen. Die Proben der grau unterlegten Tiere wurden einer Mutationsanalyse unterzogen.

Versuchswoche	Gruppe A (Tiernummer)	Gruppe B (Tiernummer)	Gruppe C (Tiernummer)	Gruppe D (Tiernummer)
9	10 Tiere (51-60)	10 Tiere (51-60)	10 Tiere (51-60)	18 Tiere (43-60)
16	10 Tiere (41-50)	10 Tiere (41-50)	10 Tiere (41-50)	20 Tiere (21-41)
25	10 Tiere (31-40)	10 Tiere (31-40)	10 Tiere (31-40)	10 Tiere (11-20)
31	---	---	---	10 Tiere (1-10)
33	10 Tiere (21-30)	10 Tiere (21-30)	10 Tiere (21-30)	---
41	10 Tiere (11-20)	10 Tiere (11-20)	10 Tiere (11-20)	---
61	10 Tiere (1-10)	10 Tiere (1-10)	10 Tiere (1-10)	---

2.1.4 Sektion

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte durch die intraperitoneale Gabe von 0,5 ml Ketavet (Pharmacia & Upjohn) und 0,05 ml Rompun (Bayer) pro 300 g Körpergewicht. Dann wurde der Bauchraum geöffnet und aus der Vena cava Blut zur Plasmagewinnung entnommen. Anschließend erfolgte nach makroskopischer Inspektion von Milz, Niere, Leber und Prostata sowie des gesamten Gastrointestinaltraktes die Entnahme der vorher genannten Organe. Milz, Leber, Nieren und Magen wurden unmittelbar nach der Entnahme in kalter NaCl-Lösung gespült, der Magen entleert, die Organe mit Filterpapier trocken getupft und die Frischgewichte bestimmt. Wurde im Gewebe makroskopisch eine Veränderung gefunden, so wurde diese geteilt und je eine Hälfte der Mutationsanalyse bzw. der histologischen Beurteilung zugeführt. War eine Teilung nicht möglich, dann wurde die Probe für die Mutationsanalyse verwendet.

Der Gastrointestinaltrakt jeder Ratte wurde, wie in Abbildung 2.1 dargestellt, geteilt. Der Dickdarm wurde in drei Abschnitte aufgeteilt, die im Weiteren als PC

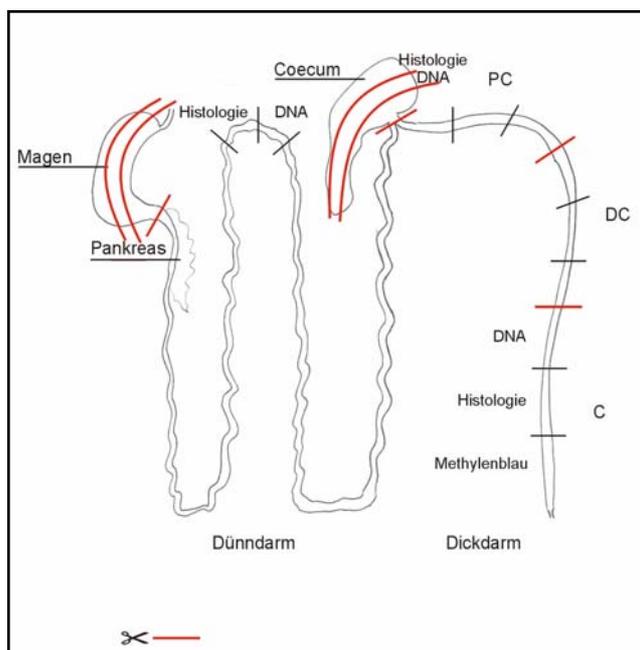


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung zur Teilung Gastrointestinaltraktes. Dabei wurden Proben für die Mutationsanalyse und für die Histologie gewonnen. Abkürzungen: PC – proximales Kolon, DC – distales Kolon, C – Kolorektum.

für proximales Kolon, DC für distales Kolon, sowie C für Kolorektum bezeichnet werden. Bis zur Aufarbeitung für die Mutationsanalyse wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proben für die histologische Untersuchung wurden in 4 % Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

Für einige Tiere erfolgte die Methyleneblau-Färbung einzelner Darmabschnitte zur ACF-Analyse.

2.2 Erhebung biometrischer Daten

2.2.1 Körpergewichte

Die Bestimmung des Körpergewichts ist eine leicht durchzuführende, nicht-invasive Erhebungsmethode. Gleichzeitig stellt es einen relativ empfindlichen Indikator für eine toxische Wirkung einer Verbindung auf den Gesamtorganismus dar und wurde hier vor allem erhoben, um den Vergleich der Wirkung der hohen und der niedrigen PhIP-Dosis zu erleichtern. Für die statistische Analyse wurden jeweils die Gewichtszunahme der Kontrollgruppe A gegen die Gewichtszunahme der PhIP-behandelten Gruppen B und C für die Zeitpunkte nach 30 und 60 Versuchswochen verglichen. Die Gruppe D wurde aufgrund des abweichenden Versuchszeitraumes lediglich nach 30 Wochen mit der Gewichtszunahme der Kontrollgruppe verglichen.

2.2.2 Futteraufnahme

Ebenfalls leicht protokollierbar und nicht-invasiv ist die Ermittlung der Futteraufnahme. Sie gibt ebenso wie das Körpergewicht einen Hinweis auf eine toxische Wirkung der Substanz im Gesamtorganismus. Für die statistische Analyse wurde jeweils die Futteraufnahme der Kontrollgruppe A gegen die Futteraufnahme der PhIP-behandelten Gruppen B und C für die Zeitpunkte nach 30 und 60 Versuchswochen, bzw. Gruppe D nach 30 Versuchswochen verglichen. Es wurde jeweils der Gesamtfutterverbrauch für die 2 Tiere eines Käfigs ermittelt. Die Auswertung von Gewichtszunahme und Futteraufnahme erfolgte mit dem Programm SPSS für Windows, Version 12.0. Die Überprüfung mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ergab, dass keine Normalverteilung vorlag. Der Vergleich der Gruppen erfolgte daher mit dem nichtparametrischen H-Test nach Kruksal und Wallis. Zeigte der H-Test signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen an, so wurde durch paarweisen Vergleich mittels U-Test nach Mann und Whitney geklärt, welche Gruppen sich im Einzelnen signifikant voneinander unterscheiden.

2.2.3 Organgewichte

Die Organgewichte von Leber, Milz, Nieren und Magen wurden unmittelbar nach der Entnahme protokolliert. Die statistische Analyse wurde einerseits mit absoluten Gewichten durchgeführt, andererseits wurden die zum Körpergewicht

des jeweiligen Tieres relativen Organgewichte ermittelt. Es wurden jeweils die Organgewichte der Kontrollgruppe A gegen die der behandelten Gruppen B, C oder D zu den Zeitpunkten 9., 16., 25., 31./33., 41. und 61. Versuchswoche verglichen. Als Testverfahren wurde der U-Test nach Mann-Whitney angewandt, der bei nicht gegebener Normalverteilung als parameterfreies Prüfverfahren zum Vergleich zweier Stichproben hinsichtlich ihrer Tendenz eingesetzt wird. Dabei werden den Werten der beiden Stichproben (hier den Organgewichten der beiden verglichenen Gruppen) Rangplätze zugeordnet. Aus den Rangsummen wird die Prüfgröße U ermittelt, welche das vorliegende Signifikanzniveau angibt. Die Berechnung der U-Werte, der Mediane sowie der halben Quartilsabstände erfolgte mit dem Programm Microsoft EXCEL (Funktion MEDIAN, QUARTILE).

2.3 Histologie

Die histologische Aufarbeitung der Gewebeproben, bestehend aus der Einbettung in Paraplast, der Anfertigung von Schnitten und Färbungen (HE, PAS) fand am Institut für Pathologie der Universität Magdeburg statt. Die anschließende Beurteilung der Gewebeproben erfolgte sowohl am Institut für Pathologie der Universität Magdeburg als auch am Max-Rubner-Laboratorium des Deutschen Instituts für Ernährungsforschung in Nuthetal (OT Bergholz-Rehbrücke).

2.4 Mutationsanalyse

2.4.1 DNA-Isolierung

Verwendet wurde das Genomic DNA Purification Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Roth). Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit bearbeiteten Proben sind Tabelle 2.2 zu entnehmen. Die Proben der Tiere 11-20 der Gruppen A, B und C sowie der Tiere 1-20 der Gruppe D wurden im Rahmen von zwei Diplomarbeiten am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam ausgewertet.

Protokoll

1. zirka 200 mg Gewebe in 400 μ l Lysis-Lösung pottern bzw. in flüssigem Stickstoff zermörsern
2. 600 μ l TE-Puffer zugeben
3. 1-2 h auf dem Thermomixer bei 65 °C und 350 rpm inkubieren
4. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren
5. Zugabe von 1 ml Chloroform, 5 x invertieren
6. 2 min bei 10.000 rpm zentrifugieren
7. 1 ml Präzipitationslösung vorbereiten: 900 μ l dest. H₂O mit 100 μ l 10 x Precipitation Sol. mixen
8. die obere Phase im Gefäß aus Schritt 6 (enthält die DNA) zur Präzipitationslösung geben
9. 2 min bei Raumtemperatur invertieren
10. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren, Überstand entfernen
11. DNA-Pellet in 100 μ l 1,2 M NaCl durch Vortexen vollständig lösen
12. 300 μ l 70 % Ethanol (-20 °C) zufügen, 10 min bei -20 °C inkubieren (DNA-Präzipitation)
13. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (4 °C), Überstand vorsichtig entfernen
14. DNA-Pellet mit 300 μ l 70 % Ethanol waschen
15. 5 min bei 13.000 rpm zentrifugieren (4 °C)
16. Überstand vorsichtig entfernen, Rest bei 37 °C im Thermomixer abdampfen
17. DNA in 100-300 μ l H₂O lösen (37 °C, 30 min, 300 rpm im Thermomixer oder ÜN)

Die Konzentration der gelösten DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm bestimmt. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l. Die Absorption bei 280 nm zeigt Verunreinigungen der Probe mit Proteinen an. Der Quotient (R-Wert) der Absorptionen bei 260 und 280 nm zeigt die Reinheit einer DNA-Lösung an; Proben mit R zwischen 1,7 und 1,9 wurden für rein genug befunden. Die aus den Gewebeproben isolierte DNA wurde für nachfolgende PCRs auf eine Konzentration von 20 ng/ μ l normalisiert.

2.4.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist ein Standard-Verfahren zur Amplifikation spezifischer Nukleinsäureabschnitte mittels DNA-Polymerasen. Die Reaktion läuft in dreistufigen Temperaturzyklen ab, die zwischen 30 und 50-mal wiederholt werden. Ein Zyklus ist untergliedert in Denaturierung (94°C), Annealing (Primer-spezifische Temperatur) und Elongation (72°C). Während des Denaturierungsschrittes wird der DNA-Doppelstrang in Einzelstränge aufgeschmolzen, um somit die Anlagerung der Oligonukleotide zu ermöglichen.

Nach erfolgtem Annealing stehen doppelsträngige DNA-Abschnitte zu Verfügung, die die DNA-Polymerase verlängern kann.

Amplifiziert wurden Abschnitte der Gene *Ki-ras*, *β-Catenin* (für die Ratte auch als *Ctnnb1* bezeichnet) sowie *Apc* (Abb. 2.2). Die Synthese aller Oligonukleotide wurde durchgeführt von der Carl Roth GmbH (Karlsruhe).

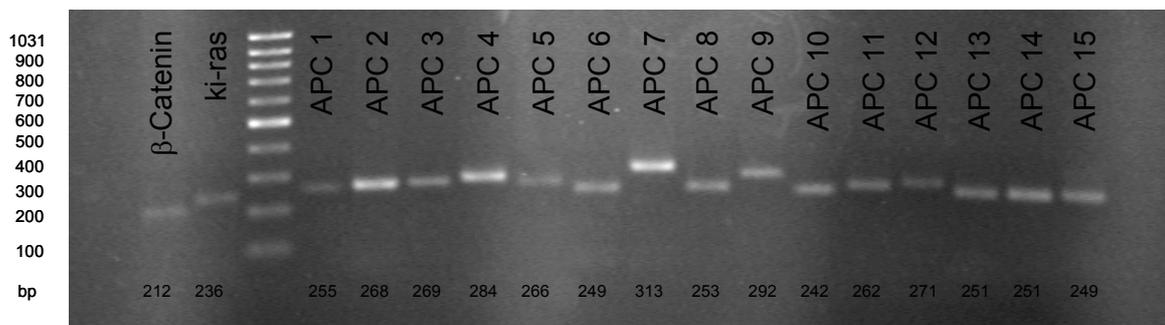


Abbildung 2.2 Übersichtsgel mit sämtlichen bearbeiteten PCR-Produkten. Als Template wurde DNA aus dem Dickdarm eines unbehandelten Tieres eingesetzt. Die Reaktionen erfolgten mit den in Tab. 2.4 und 2.5 aufgeführten Primerpaaren bei den genannten Annealing-Temperaturen nach dem in Tab. 2.6 angegebenen Ansatz (2 % Agarose in 1 x TAE, 100 V, 1 h Laufzeit, Basenpaar-Standard: Gene Ruler™, 100 bp DNA Ladder von FERMENTAS).

Apc

Die PCR-Produkte sollten eine maximale Länge von 300 bp nicht überschreiten. Diese Limitierung gab die Methode zur Mutationsanalyse (SSCP) vor. Die Amplifizierung längerer Abschnitte mit anschließender Restriktion mittels Endonukleasen erwies sich als methodisch zu aufwändig. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, wurden für Exon 14 und 15 des Gens insgesamt 15 überlappende Primerpaare eingesetzt (Abb. 2.3).

Als Vorarbeit wurden für alle verwendeten Oligonukleotid-Paare des *Apc*-Gens die optimalen Annealing-Temperaturen ermittelt. Dazu wurden Gradienten-PCRs durchgeführt (Gradienten-Funktion des Mastercycler Gradient-Gerätes, Eppendorf), die es ermöglichen, mehrere mögliche Annealing-Temperaturen gleichzeitig zu testen. Als grobe Orientierung für deren Festlegung dienen die berechneten Schmelztemperaturen (T_m), abzüglich 8°C. Die optimale Temperatur ist durch das Fehlen unspezifisch amplifizierter Produkte und der Bildung möglichst großer Mengen des gewünschten Produktes gekennzeichnet. Für einige Primerpaare waren starke Abweichungen des tatsächlichen Optimums von den errechneten Temperaturen zu beobachten; für diese wurden mehrere Gradienten-

PCRs durchgeführt (Tab. 2.3 und Abb. 2.4). Tabelle 2.4 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primerpaare und die Längen der Produkte.

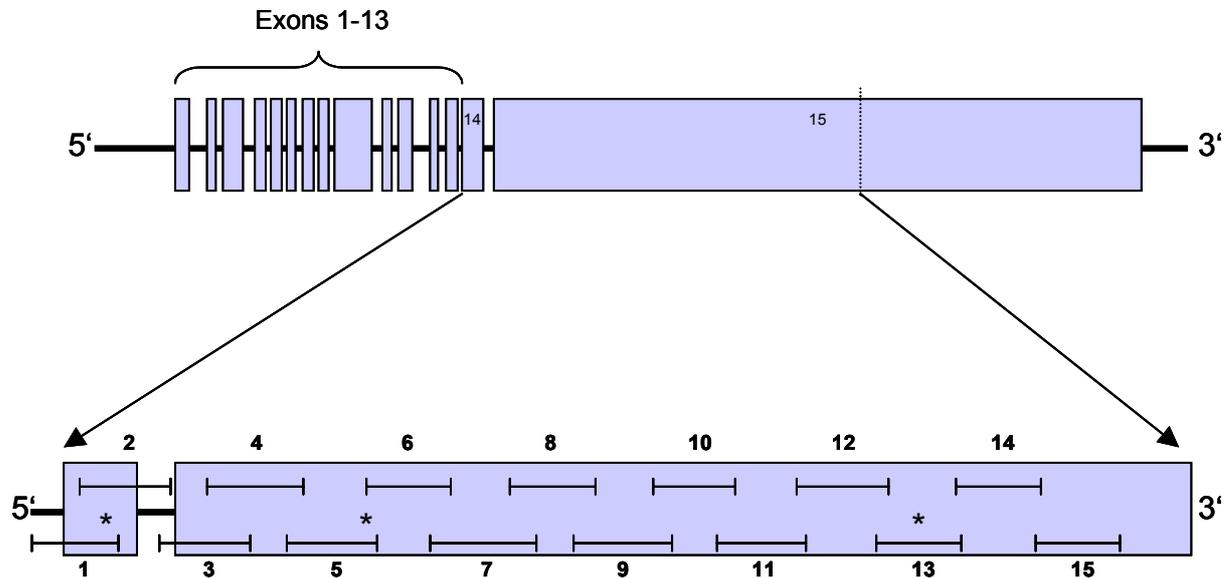


Abbildung 2.3 Schema des *Apc*-Gens der Ratte mit den 15 amplifizierten Genabschnitten. Die bekannten *Hot Spots of Mutation* an den Positionen 1903-5, 2604-6 sowie 4237-9 (nach Kakiuchi et al., 1995) sind markiert (*). (Länge der Introns nicht maßstabsgetreu; GenBank-Nummer D 38629)

Tabelle 2.3 Gradienten-PCR zur Ermittlung optimaler Annealing-Temperaturen.

Primerpaar	errechnete Tm (-8) in °C		Gradient (°C)	ermitteltes Optimum (°C)
	s	as		
1	52 (44)	52 (44)	49 ± 5°C	50
2	64 (56)	54 (46)	51 ± 5°C	56
3	56 (48)	66 (58)	53 ± 5°C	56,5
4	64 (56)	60 (52)	54 ± 3°C 60 ± 5°C	64
5	68 (60)	70 (62)	62 ± 2°C	62
6	64 (56)	62 (54)	55 ± 3°C 60 ± 2°C	60
7	64 (56)	56 (48)	52 ± 4°C 58 ± 2°C	58
8	60 (52)	60 (52)	52 ± 3°C 58 ± 3°C	60
9	66 (58)	64 (56)	57 ± 2°C	58,5
10	58 (50)	58 (50)	50 ± 2°C 53 ± 3°C	50,5
11	60 (52)	62 (54)	60 ± 6°C	66
12	68 (60)	72 (64)	62 ± 4°C	64
13	74 (66)	68 (60)	63 ± 4°C	66
14	68 (60)	64 (56)	58 ± 3°C	60,5
15	68 (60)	62 (54)	57 ± 5°C	58,2

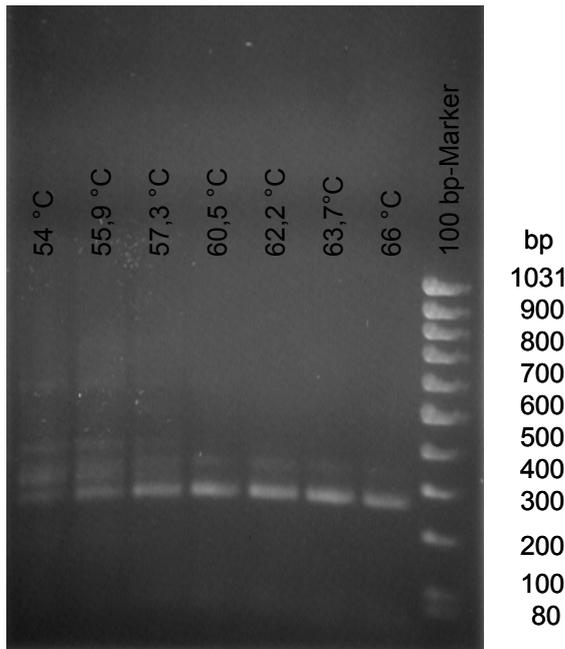


Abbildung 2.4 Exemplarisches Beispiel einer Gradienten-PCR für das Fragment 11 des *Apc*. Die Fragmentlänge beträgt 262 bp, die Bildung unspezifischer Produkte nimmt mit Erhöhung der Annealing-Temperatur ab. Als optimale Annealing-Temperatur wurden 66°C festgelegt (2 % Agarose in 1 x TAE, 100 V, 1 h Laufzeit, Basenpaar-Standard: Gene Ruler™, 100 bp DNA Ladder von FERMENTAS).

Tabelle 2.4 Sequenz, Annealing-Temperaturen und Produktlängen der verwendeten Oligonukleotide für das *Apc*-Gen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Ann.Temp. (°C)	Produkt-Länge (bp)	Position im Gen
<i>Apc</i> (GenBank Nr. D 38629)				
rAPC-E14Afw	TTT ATA GAA ACA GCA CTG AA	50	255	Intron
rAPC-E14Arev	CAC TTT CAA TGA TGG CTA A			1950-1932
rAPC-E14Bfw	AAA GCG TCT TGA GTG CCT TAT G	56	268	1804-1825
rAPC-E14Brev	CGT TCT AAA GAA ACA AAC TC			Intron
rAPC-E15A/s	TGT CAC TAA CCA CAT TTC CT	56,5	269	Intron
rAPC-E15A/2222as	AGC TGC TGC GCT CCC CAT AG			2222-2203
rAPC-E15B/2130s	CAG GAG GCT CTG TGG GAC AT	64	284	2130-2149
rAPC-E15B/2413as	TGC TTA CTG CGA TGA GAT GC			2413-2394
rAPC-E15/2375s	TGA CAA TTT AAG TCC CAA GGC ATC	62	266	2375-2398
rAPC-E15/2640as	AAT GGT AAG TGC TGA GGC CAA TAC			2640-2617
rAPC-E15/2603s	GGA GAG AGA ACG AGG TAT TGG	60	249	2603-2623
rAPC-E15/2851as	TGT GTG TTT GGA TGT GTG TGG			2851-2831
rAPC-E15/2823s	TCT GCG TCC CAC ACA CAT CC	58	313	2823-2842
rAPC-E15/3135as	TGA GGC TGT AGT TTA TTG GT			3135-3116
rAPC-E15/3058s	TAG CCC ATA AGA TAC ACA GTG	60	253	3058-3078
rAPC-E15/3310as	TTG AGG TGT TTG TCA TCA GTG			3310-3290
rAPC-E15/3246s	CAA TCA AGA AGC CAG AAC ACC AA	58,5	292	3246-3268
rAPC-E15/3537as	TGC TGT AAT TTG TCG GTC TCT C			3537-3516

rAPC-E15/3453s	GAA GAT GAC AAG CCT ACC AA	50,5	242	3453-3472
rAPC-E15/3694as	TCA CTG CTT GGA GAG TTA TG			3694-3675
rAPC-E15/3677s	TAA CTC TCC AAG CAG TGA GG	66	262	3677-3696
rAPC-E15/3938as	AGA GTC TGC CTC CTG TGT TG			3938-3919
rAPC-E15/3916s	AGA CAA CAC AGG AGG CAG ACT C	64	271	3916-3936
rAPC-E15/4186as	GGC GTC TCC TGG ACA TAG TGT TC			4186-4164
rAPC-E15/4160s	CCC AGA ACA CTA TGT CCA GGA GAC	66	251	4160-4183
rAPC-E15/4410as	TTG GCA CCT CTC TCT TGG TCT G			4410-4389
rAPC-E15/4389s	CAG ACC AAG AGA GAG GTG CCA A	60,5	251	4389-4410
rAPC-E15/4639as	TCC TGA ACT GGA GGC ATT ATT C			4639-4618
rAPC-E15/4563s	AGC CTA AGT GCT CTG AGT CTG G	58,2	249	4563-4584
rAPC-E15/4811as	TGA TGA CTT TGT TGG CAT GGC			4811-4791

***Ki-ras* und β -Catenin**

Für beide Gene erfolgte jeweils die Amplifizierung des *Hot-Spot*-tragenden Abschnitts (Abb. 2.5). Tabelle 2.5 zeigt die Sequenzen der verwendeten Primerpaare und die Längen der Produkte.

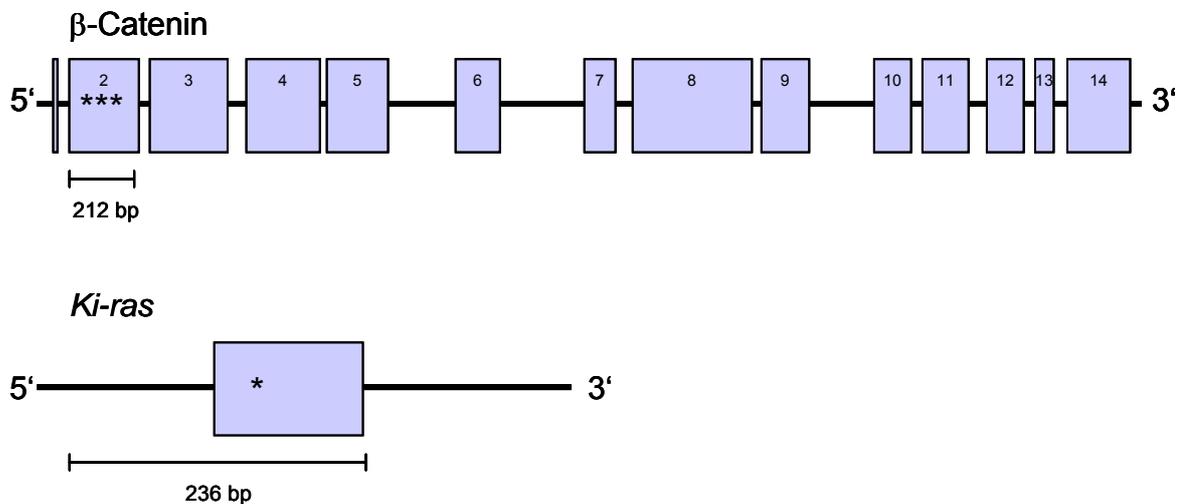


Abbildung 2.5 Schema der amplifizierten Abschnitte des β -Catenin- und des *Ki-ras*-Gens der Ratte, die bekannten *Hot Spots of Mutation* (*) sind die Codons 32-34, 45, 47 und 56 für das β -Catenin-Gen und die Codons 12 und 13 für das *Ki-ras*-Gen (Länge der Introns nicht maßstabsgetreu; GenBank-Nummern: AF 397179 und X 74502).

Tabelle 2.5 Sequenz, Annealing-Temperaturen und Produktlängen der verwendeten Oligonukleotide für die Gene *Ki-ras* und *β-Catenin*.

Bezeichnung	Sequenz (5'→3')	Ann.temp. (°C)	Produkt-Länge (bp)	Position im Gen
β-Catenin (GenBank Nr. AF 397179)				
rβ-cat-F2s	GGA GTT GGA CAT GGC CAT GG	56	212	481 - 692
rβ-CateninEx2/692as	CTT GCT CTT GCG TGA AGG AC			
Ki-ras (GenBank Nr. X 74502)				
k-ras 1-1	GAA TGC CTT AGA GTT TTA CAG ACA	60	236	27 - 262
k-ras 262 as	CTC TAT CGT AGG ATC ATA TTC ATC			

Für bestimmte Anwendungen, z.B. zur Ermittlung optimaler Annealing-Temperaturen mittels Gradienten-PCR, wurde mit Einzelansätzen à 20, 50 oder 100 µl Volumen gearbeitet (Tabelle 2.6). Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis, wobei die Polymerase als letztes hinzugefügt wurde. Der Ansatz wurde nach dem Mischen und Zentrifugieren sofort in den vorgeheizten PCR-Block gestellt.

Tabelle 2.6 PCR-Einzelansatz (100 µl Endvolumen, Standardprogramm).

Reaktionsansatz	Endkonzentration		Reaktionsverlauf	
10 x NH ₄ -Puffer	10 µl	1 x	94 °C	10 min
50 mM MgCl ₂	5 µl	2,5 mM	94 °C	1 min
10 mM dNTP	2 µl	0,2 mM	** °C	1 min
10 µM s-Primer	3 µl	0,3 µM	72 °C	1 min
10 µM as-Primer	3 µl	0,3 µM	72 °C	10 min
DNA (20 ng/µl)	1 µl	0,2 ng/µl	4 °C	(Programmende)
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	2,5 U		
Dest. H ₂ O	75,5 µl		**-Primer-spezifische Annealing-Temperatur	

Aufgrund der enormen Menge an durchzuführenden Polymerase-Ketten-Reaktionen wurde auf Einzelansätze weitgehend verzichtet und im 96-well-Format gearbeitet. Dabei wurden jeweils die 60 inneren wells einer Platte bestückt (Belegschema, Abb. 2.6). Der Reaktionsansatz pro well betrug 20 µl, wobei 19,5 µl des Mastermixes (Tabelle 2.7) mit einem bestimmten Primerpaar vorgelegt und durch Zugabe von 0,5 µl einer individuellen DNA-Probe komplettiert wurde. Alle Pipettierschritte erfolgten auf Eis. Die Platte wurde mit einer sterilen Verschlussfolie verschlossen, kurz abzentrifugiert, gemischt, nochmals

zentrifugiert und in den vorgeheizten PCR-Block gestellt. Die Reaktionsansätze und –verläufe wurden an das 96-well-Format angepasst (Tab. 2.7 und 2.8)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		C1PC	C2PC	C3PC	C4PC	C5PC	C6PC	C7PC	C8PC	C9PC	C10PC	
C		C21PC	C22PC	C23PC	C24PC	C25PC	C26PC	C27PC	C28PC	C29PC	C30PC	
D		C1C	C2C	C3C	C4C	C5C	C6C	C7C	C8C	C9C	C10C	
E		C21C	C22C	C23C	C24C	C25C	C26C	C27C	C28C	C29C	C30C	
F		C1DC	C2DC	C3DC	C4DC	C5DC	C6DC	C7DC	C8DC	C9DC	C10DC	
G		C21DC	C22DC	C23DC	C24DC	C25DC	C26DC	C27DC	C28DC	C29DC	C30DC	
H											(-)	

Abbildung 2.6 Exemplarisches Belegschema für eine 96 well-Platte (Proben der Gruppe C, Tiere 1-10 und 21-30, grau markierte Felder blieben leer; (-) Negativ-Kontrolle, DNA durch Wasser ersetzt.

Tabelle 2.7 Reaktionsansatz für PCR im 96 well-Format. Angegeben sind jeweils der Mastermix für 65 wells einer 96-well-Platte (siehe Belegschema, Abb. 2.7) und der 20 µl-Ansatz für ein well.

Reaktionsansatz	Mastermix	20 µl / well	Endkonzentration
10 x NH ₄ -Puffer	130 µl	2 µl	1 x
50 mM MgCl ₂	65 µl	1 µl	2,5 mM
10 mM dNTP	26 µl	0,4 µl	0,2 mM
10 µM s-Primer	39 µl	0,6 µl	0,3 µM
10 µM as-Primer	39 µl	0,6 µl	0,3 µM
DNA (20 ng/µl)	---	0,5 µl	0,5 ng/µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	6,5 µl	0,1 µl	0,5 U
Dest. H ₂ O	1281 µl	14,8 µl	---

Tabelle 2.8 Standardprogramm für den Reaktionsverlauf einer PCR im 96-well-Format.

Reaktionsverlauf	
94 °C	10 min
94 °C	30 sec
** °C	30 sec
72 °C	30 sec
72 °C	10 min
4 °C	(Programmende)

**-Primer-spezifische Annealing-Temperatur

Aus SSCP-Gelen isolierte Fragmente mussten vor ihrer Sequenzierung einer Re-PCR unterzogen werden (siehe Kapitel 3.5.3). Da die DNA-Konzentrationen in diesen Eluaten z.T. sehr gering waren, wurden die Primer in fünffacher Menge eingesetzt (Tab. 2.9).

Tabelle 2.9 Reaktionsansatz für Re-PCR nach Isolierung eines Fragments aus dem SSCP-Gel mit 5-facher Primermenge und Standardprogramm.

Reaktionsansatz			Reaktionsverlauf	
10 x NH ₄ -Puffer	10 µl	1 x	94 °C	10 min
50 mM MgCl ₂	5 µl	2,5 mM	94 °C	1 min } 35 Zyklen
10 mM dNTP	2 µl	0,2 mM	** °C	1 min } 35 Zyklen
100 µM s-Primer	1,5 µl	1,5 µM	72 °C	1 min } 35 Zyklen
100 µM as-Primer	1,5 µl	1,5 µM	72 °C	10 min
DNA-Fragment	(gesamtes Eluat)		4 °C	(Programmende)
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,5 µl	2,5 U		
Dest. H ₂ O	auf 100 µl		**-Primer-spezifische Annealing-Temperatur	

Für die routinemäßige Analyse von PCR-Produkten auf SSCP-Gelen war eine vorhergehende Reinigung nicht notwendig (Diplomarbeit Peter Wend, Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam, 2003). Für Sequenzierungsreaktionen oder für Re-PCRs von bereits vorhandenen Produkten wurde jedoch ein Reinigungsschritt durchgeführt, bei dem Oligonukleotide, Nukleotide, Polymerase und Salze entfernt wurden. Verwendet wurde das QIAquick PCR Purification Kit der Firma Qiagen.

Protokoll

alle Zentrifugationsschritte in der Mikrozentrifuge bei 13.000 rpm

1. 5 Volumen Puffer PB zu einem Volumen PCR-Produkt geben und mischen
2. QIAquick spin Säule in ein 2 ml Sammelröhrchen stecken
3. die Probe auf die Säule geben und für 30-60 s zentrifugieren
4. Durchfluß verwerfen, Säule wieder ins Sammelröhrchen stecken und nochmals 1 min zentrifugieren
5. Säule in ein sauberes 1,5 ml Reaktionsgefäß stecken
6. zum Eluieren der DNA 50 µl Puffer EB oder H₂O in die Mitte der QIAquick-Membran pipettieren und die Säule für 1 min zentrifugieren (für erhöhte DNA-Ausbeute 30 ml Elutionspuffer einsetzen und die Säule vor dem Zentrifugieren 1 min inkubieren)

(Alternativ wurde das JetQuick PCR Purification Spin Kit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers verwendet.)

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für die Überprüfung von PCR-Produkten auf Ausbeute, korrekte Produktlänge und unspezifische Amplikons wurde die Agarose-Gelelektrophorese angewandt. Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft der negativ geladenen DNA aus, im elektrischen Feld in Richtung Anode zu wandern. Agarose ist ein langkettiges Polysaccharid, welches durch Erhitzen in 1 x TAE-Puffer gelöst wird und beim Erkalten ein Molekularsieb bildet, dessen Poren kleinen DNA-Fragmenten weniger Widerstand bieten als großen. Dadurch erfolgt die Auftrennung der DNA ihrer Größe entsprechend. Zur Beurteilung der Fragmentlängen werden Molekulargewichtsmarker auf jedes Gel aufgetragen. Verwendet wurden standardmäßig 2 %ige Agarosegele (40 ml TAE-Puffer und 0,8 g Agarose). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 V für 60 min in 1 x TAE-Puffer. Die DNA wurde anschließend durch eine 10-minütige Inkubation in Ethidiumbromid angefärbt und auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht. Der UV-Tisch war zur Dokumentation mit einer CCD-Kamera ausgerüstet.

In einigen Fällen war es auch durch Optimierung der PCR-Bedingungen nicht möglich, die Synthese unspezifischer DNA-Fragmente vollständig zu eliminieren. Besonders häufig trat dieser Fall bei der Arbeit mit dem Oligonukleotidpaar für *Ki-ras* ein. Um mit dem spezifischen DNA-Fragment weiterarbeiten zu können, war eine Isolierung der PCR-Produkte aus Agarosegelen notwendig. Verwendet wurde das QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen.

Protokoll

(Die Puffer QG, QC und PE sind im Kit enthalten.)

1. DNA mit einem sauberen Skalpell aus dem Gel ausschneiden; Gewicht der ausgeschnittenen Agarose bestimmen und in Eppendorf-Gefäße überführen (maximal 400 mg Agarose)
2. pro 100 mg Agarose (2 %) werden 600 µl Puffer QG zugegeben
3. Agarose mit Puffer QG für 10 min bei 50 °C inkubieren (falls sich die Agarose nicht gelöst hat, Inkubationszeit verlängern)
4. ein Volumen Isopropanol hinzugeben (z.B bei 100 mg Gel 100 µl Isopropanol), mixen. Gemisch auf eine QIAquick Säule geben und 1 min zentrifugieren (dieser und alle folgenden Zentrifugationsschritte bei mehr als 10 000 x g)
5. Durchfluß verwerfen und die Säule in das Eppi zurückstellen
6. Zugabe von 500 µl QC-Lösung, zentrifugieren, Durchfluß verwerfen
7. waschen durch Zugabe von 0,75 µl PE-Lösung, zentrifugieren, Durchfluß verwerfen

8. erneut zentrifugieren, um Reste an Ethanol zu entfernen
9. Säule in ein neues 1,5 ml Eppi stellen
10. Elution mit 30 bis 50 µl dest. H₂O
(Alternativ wurde das JetSorb Gel Extraction Kit der Firma Genomed nach Angaben des Herstellers verwendet.)

2.4.4 Single-stranded conformation polymorphism-Analyse

Für die hier durchgeführte Mutationsanalyse war der Einsatz einer Methode notwendig, mit der Mutationen unbekannter Art und Position nachgewiesen werden können. Außerdem musste die Methode für die Analyse einer hohen Probenzahl geeignet sein, um Proben ohne Mutationen von solchen zu trennen, die möglicherweise eine Mutation tragen, und damit die Anzahl von durchzuführenden Sequenzierungen einzugrenzen.

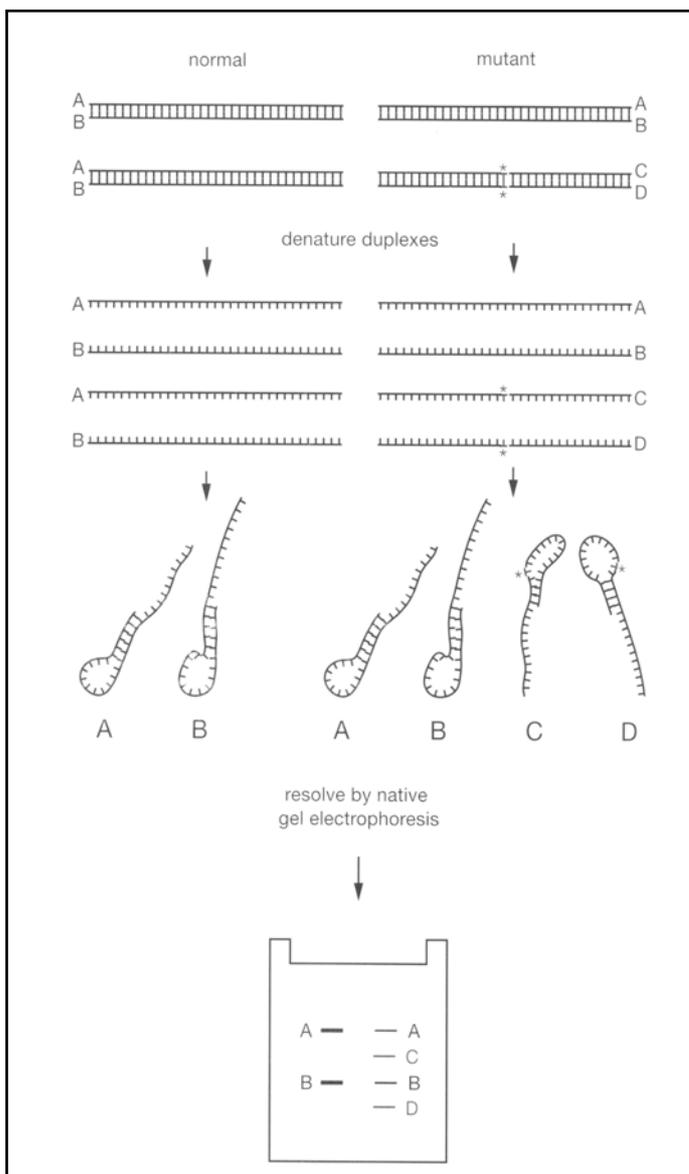


Abbildung 2.7 Schematische Darstellung der SSCP-Technik. Es werden 2 verschiedene DNA-Proben (hier als „normal“ und „mutant“ bezeichnet) denaturiert. Dabei bilden die Einzelstränge die Konformationen A und B aus, die auf dem Gel als 2 Banden aufgetrennt werden. Die „mutant“-Probe weist einen Basenaustausch auf, welcher in den abweichenden Konformationen C und D resultiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung ergibt sich ein vierfaches Bandenmuster. Aus dem Vergleich mit dem Bandenmuster der „normal“-Probe lassen sich Mutationen identifizieren. (nach Sambrook und Russell, 2001, S. 13.50)

Eine häufig eingesetzte Technik zum Nachweis von Mutationen beruht auf der veränderten Mobilität von DNA-Einzelsträngen in nichtdenaturierenden Polyacrylamid-Gelen. Diese Methode wird als *single-stranded conformation polymorphism* (SSCP)-Analyse bezeichnet (Abbildung 2.7) und wurde erstmals im Jahr 1989 beschrieben (Orita et al., 1989). Schon der Austausch oder Verlust einer einzelnen Base (Punktmutation) kann mittels SSCP detektiert werden. Der Genombereich von Interesse wird mittels PCR angereichert (siehe Kap. 2.4.2), wobei die Fragmente eine Länge von 300 bp nicht überschreiten sollten, um die nötige Sensitivität zu gewährleisten (Hayashi und Yandell, 1993). Die doppelsträngige DNA wird durch Erhitzen auf 95°C denaturiert, dieser Vorgang kann durch Zugabe verschiedener Chemikalien (hier Formamid) zum Auftragspuffer unterstützt werden. Die so entstandenen Einzelstränge bilden beim anschließenden sehr schnellen Abkühlen intramolekulare Basenpaare aus und nehmen dadurch eine dreidimensionale Konformation an. Da diese Konformationen sich je nach Basensequenz der DNA-Fragmente unterscheiden, zeigen sie in einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel unterschiedliche Mobilitäten. Die Auftrennung erfolgt im Unterschied zu denaturierenden Gelen nicht nach der Größe bzw. Ladung der Stränge, sondern nach ihrer dreidimensionalen Konformation. Wurde ein Laufunterschied festgestellt, so kann mit einer Isolierung der DNA aus dem Gel, erneuter Anreicherung des Fragments mittels PCR und nachfolgender Sequenzierung die Mutation spezifiziert werden. Ein Nachteil der SSCP ist, dass es sich um eine empirische Methode handelt, da die dreidimensionale Konformation einzelsträngiger DNA unter bestimmten Bedingungen nicht vorhersagbar ist. Damit ist auch kein Rückschluss auf die Idealbedingungen möglich, unter denen sich die Migration von DNA mit bestimmten Mutationen im Gel von Wildtyp-DNA unterscheidet. Diese Bedingungen müssen durch Variationen der Laufbedingungen experimentell bestimmt werden. Folgende Parameter können variiert werden: die Konzentration von Laufpuffer und Acrylamid, Zugabe von Glycerol zu Gel und Laufpuffer, Zusammensetzung des Laufpuffers, Temperatur beim Lauf sowie die angelegte Spannung und Laufzeit. Dabei beeinflusst die Position der Mutation in Kombination mit den Laufbedingungen die erfolgreiche Detektion (Sheffield et al., 1993). Aufgrund dieser Problematik erübrigt sich bei der Suche nach unbekanntem oder variablen Mutationen der Einsatz von Positivkontrollen. Diese sind nur dann

sinnvoll, wenn sie zur nachzuweisenden Mutation in Art und Position 100 % identisch sind. Aufgrund der Anzahl der zu bearbeitenden Proben wurde eine einheitliche und leicht reproduzierbare Laufbedingung für alle Fragmente gewählt. Es wurde ausschließlich mit Maxigelen gearbeitet. Zur Herstellung wurden folgende Komponenten verwendet: kleine Glasscheiben (Maße 16 x 20 cm), große Glasscheiben (Maße 18,3 x 20 cm), Spacer (0,75 mm Dicke) und Käbme (0,75 mm Dicke mit 25 Taschen). Gegossen wurden 8 bzw. 10 % Acrylamidgele (Zusammensetzung siehe Tab. 2.10) mit einem Gesamtgelvolumen von 30 ml.

Tabelle 2.10 Zusammensetzung der 8 bzw. 10 % Acrylamidgele mit einem Endvolumen von 30 ml.

Lösung	8 % (in ml)	10 % (in ml)
30 % Acrylamid/Bis	8	10
10 x TBE	3	3
dest H ₂ O	18,67	16,67
TEMED	0,03	0,03
10 % APS	0,3	0,3
Endvolumen	30	30

Das Gel-Sandwich wurde nach Anleitung zusammengebaut und das Gel nach Rezept zusammenpipettiert. Acrylamid, 10 x TBE und Wasser wurden vorgelegt und vermischt, dann erfolgte die Zugabe der Polymerisationsstarter APS und TEMED. Alle Komponenten wurden bei Raumtemperatur und unter Vermeidung von Blasenbildung verarbeitet, da sowohl Kälte als auch Sauerstoff den Polymerisationsvorgang behindern. Der Gelansatz wurde nochmals gemischt und sofort gegossen. Die Gele polymerisierten vor der Benutzung mindestens 2 h aus, die Aufbewahrung über Nacht erfolgte im Kühlschrank.

Probenvorbereitung

Pro PCR-Produkt wurde standardmäßig ein Volumen von 3 µl eingesetzt. Jede Probe wurde mit dem gleichen Volumen 2 x Auftragspuffer versetzt und gut gemischt. Um die Länge der untersuchten Fragmente zu kontrollieren wurden pro Gel 0,5 µl Molekulargewichts-Standard (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) mit 0,5 µl 2 x Auftragspuffer vorbereitet. Die Mischungen wurden kurz zentrifugiert, die PCR-Produkte 5 min bei 95 °C denaturiert und 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden Proben und Marker sofort auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese gestartet.

Bedingungen der Elektrophorese

Der Elektrophorese-Tank wurde mit 6 l 1 x TBE als Laufpuffer gefüllt und auf 4 °C vorgekühlt. Die gesamte Elektrophorese erfolgte bei einer Temperatur von 4 °C. Dazu wurde die Gelkammer im Kühlschrank und auf einem Magnetrührer platziert, um eine konstante Temperaturverteilung im Laufpuffer über die gesamte Laufzeit zu gewährleisten. Zunächst liefen die Proben bei einer Spannung von 300 V für 5 min in die Gelmatrix ein. Dann wurde die Spannung auf 60 V abgesenkt, hier erfolgte die Auftrennung der DNA-Einzelstränge über 20 h. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Elektrophorese gestoppt und mit der Silberfärbung begonnen.

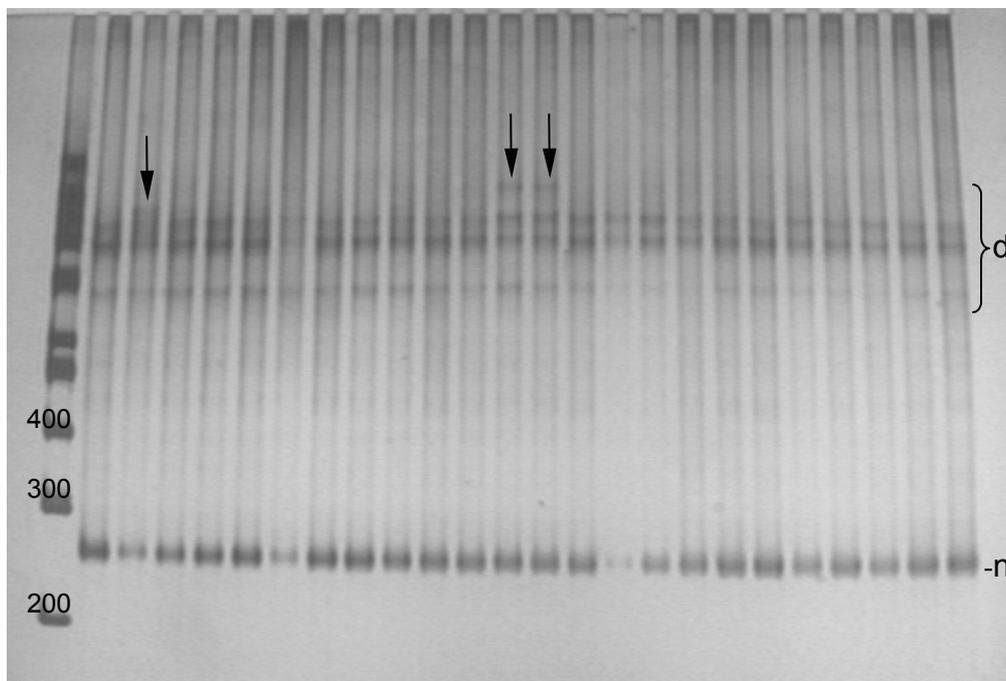


Abbildung 2.7 Exemplarisches SSCP-Gel (8 % Acrylamid-Bis, 1xTBE, Laufzeit 20 h bei 50 V, Basenpaar-Standard: Gene Ruler™, 100 bp DNA Ladder von FERMENTAS). Aufgetragen wurden PCR-Produkte des Fragments APC 2 mit einer Produktlänge von 268 bp, welche am Laufverhalten der mit -n markierten nativen, (doppelsträngigen) DNA bestätigt werden kann. Oberhalb befinden sich die denaturierten, einzelsträngigen Banden (d). Die Proben der mit Pfeilen markierten Spuren zeigen abweichendes Laufverhalten, sichtbar an einer zusätzlichen Bande oberhalb von (d). Die DNA wurde mittels Silberfärbung sichtbar gemacht.

2.4.5 Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung muß die DNA im SSCP-Gel sichtbar gemacht werden. Die Nutzung des weit verbreiteten Ethidiumbromids war hier nicht möglich, da sich dieser Farbstoff schlecht an einzelsträngige DNA anlagert. Deshalb wurde mit der wesentlich sensitiveren Silberfärbung gearbeitet. Die Nachweisgrenze von DNA mit der Silberfärbung liegt bei 0,03 ng DNA/mm² Gel. Das Grundprinzip dieser Methode basiert auf der Fixierung der DNA-Banden im

Gel, dem Ansäuern und der anschließenden Anlagerung des Silbernitrats, der Reduktion von Silbernitrat zu elementarem Silber in Anwesenheit eines starken Reduktionsmittels und dem Abstoppen der Färbereaktion durch Änderung des pH-Wertes. Das Redoxpotential erhöht sich in Anwesenheit von Nukleinsäuren im Vergleich zum umgebenden Gel. Dadurch fällt das Silber nur dort aus, wo sich Nukleinsäuren im Gel befinden. Nach der Entwicklung sind bräunliche Banden auf möglichst farblosem Hintergrund sichtbar. Eine Färbung des Hintergrunds tritt dann auf, wenn Lösungen oder das Gel mit Proteinen oder Nukleinsäuren kontaminiert sind. Zur Dokumentation wurden die gefärbten Gele auf weißem Untergrund auf einem Leuchttisch fotografiert.

Protokoll

1. Nach Beendigung der Elektrophorese das Gel mit einer Glasscheibe in eine Plastikschaale legen, niemals die Oberfläche berühren.
2. Das Gel 2 x mit dest. H₂O spülen, um den Elektrophorese-Puffer zu entfernen. Das Gel löst sich von der Glasplatte, diese kann entfernt werden.
3. Das Gel in 10 % Ethanol durch 10 minütige Inkubation auf dem Schütteltisch fixieren. Ethanol absaugen und den Schritt wiederholen. Das Gel kann für einige Stunden, auch ÜN in Ethanol bleiben.
4. Soviel Salpetersäure zugeben, dass das Gel gerade bedeckt ist. Für 6 min auf dem Schütteltisch inkubieren. Salpetersäure absaugen und Gel und Schale 2 x mit dest. H₂O spülen.
5. Soviel Silbernitrat zugeben, dass das Gel gerade bedeckt wird. Für 30 min auf dem Schütteltisch inkubieren. Silbernitrat absaugen und Gel und Schale 3 x mit dest. H₂O spülen. Silbernitratlösung kann mehrmals verwendet werden.
6. 100 ml Entwickler und 125 µl Formaldehyd zugeben. Schale abdunkeln und schütteln lassen bis Banden erscheinen. Falls die Lösung braun wird oder ein dunkles Präzipitat ausfällt, sollte sie nochmals erneuert werden. Wenn die Färbung stark genug erscheint, die Lösung absaugen.
7. Gel für 5 min in 250 ml Essigsäure schütteln.
8. Essigsäure absaugen und Gel mit 10 % Ethanol waschen. Ethanol absaugen und für 2 min nochmals in 10 % Ethanol einlegen.
9. Zur längeren Aufbewahrung Gel in 10 % Ethanol/7 % Glycerol einlegen und in Folie einschweißen.

(nach: Sambrook und Russell, 2001, S. A9.6 f.)

2.4.6 Isolierung von DNA aus SSCP-Polyacrylamid-Gelen

DNA-Banden, die in SSCP-Gelen ein verändertes Laufverhalten zeigten, wurden einer Sequenzierung unterzogen, um zu klären, ob es sich tatsächlich um eine Probe mit mutierter DNA handelte. Dazu war es notwendig, die DNA wieder aus der Gelmatrix herauszulösen. Polyacrylamid ist ein chemisch inertes Material, welches nicht durch Hitze aufgeschmolzen werden kann. Aus diesem Grund wurde eine Diffusionselution (nach Suzuki et al., 1991) durchgeführt. Dabei wird die Bande von Interesse mit einem sterilen Einmal-Skalpell aus dem silbergefärbten Gel ausgeschnitten, zur Oberflächenvergrößerung mechanisch zerkleinert und in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dest. Wasser versetzt. Für den eigentlichen Elutionsvorgang wird das Gefäß auf einem Thermoschüttler für 1 h bei 95°C und 350 rpm inkubiert. Danach wird die Gelmatrix durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm abgetrennt und der Überstand komplett als Template in eine PCR mit den entsprechenden Primern eingesetzt. Der Einsatz des kompletten Überstandes ist notwendig, da aus den oben genannten Gründen die Ausbeute an DNA sehr gering ist.

2.4.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung ist die Methode der Wahl, um die genaue Art einer Mutation zu klären. Alle Sequenzierungen wurden am Sequenzier-Gerät (CEQ 200, Beckmann Coulter, München) der Abteilung Biochemie der Ernährung der Universität Potsdam mit dem zugehörigen Sequenzierungskit nach der Kettenabbruch-Methode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Bevor die DNA in die Sequenzierungsreaktion eingesetzt werden konnte, waren eine Reinigung und eine Quantifizierung erforderlich. Die Proben wurden auf eine DNA-Konzentration von 1,65 ng DNA pro 100 bp in einem Volumen von 2 µl eingestellt. Die Primer (siehe Tab. 2.4 und 2.5) wurden in Konzentrationen von 1,6 pmol/µl Wasser eingesetzt. Es erfolgte zunächst eine Sequenzierung mit dem jeweiligen *sense*-Primer, der bei Bedarf eine weitere mit dem *antisense*-Primer folgte. Auffällige Proben der Tiere 1-20 aus Gruppe D, sowie der Tiere 11-20 der Gruppen A, B und C wurden im Rahmen zweier Diplomarbeiten sequenziert.

Der Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit den Wildtyp-Sequenzen, bezogen über die GenBank™ des NCBI (NIH, USA), erfolgte mit Hilfe des Programmes VECTOR NTI® (Version 6, InfoMarx Inc., Bethesda, USA).

2.5 Geräte

Zentrifugen	Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
	Galaxy mini	Merck eurolab, VWR, Darmstadt
PCR Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
Agarose-Gelsystem	Mini SUB Cell GT	BIO-Rad, München
	Wide SUB Cell GT	BIO-Rad, München
SSCP-Gelsystem	DCode System	BIO-Rad, München
	Protean II xi Cell	BIO-Rad, München
Homogenisatoren	Schütt Homogen plus (Potter)	Schütt, Göttingen
	Potter S homogenizer	B. Braun Bioteck, Melsungen
	Teflon-Pistill	Braun Bioteck, Melsungen
	Mörser 55-Oa	Haldenwanger, Berlin
	Mikropistille	Eppendorf, Hamburg
	Vortex – Genie 2™	Scientific Industries, N.Y., USA
Stromversorgungsgeräte	Power Pak 300	BIO-RAD, München
	BIO 105 LVD	Biometra, Göttingen
Geldokumentationssysteme	Fluorescent Combi Light	LFT Labortechnik, Wasserburg
	Leuchtpult	Relux Leuchtsysteme, Erlangen
Spektralphotometer	UVIKON 922	Bio-Tek, Bad Friedrichshall
Schütteltisch	Rocky	Fröbel Labortechnik, Lindau
Schüttelinkubator	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	MR 3001 / 3002	Heidolph, Kelheim
Kühlaggregat	PCR-Cooler	Eppendorf, Hamburg
Sequenzierer	CEQ 200	Beckmann Coulter, München
Waage	BL 610	Satorius, Straubenhardt
Wasserstrahlpumpe		Carl Roth GmbH & Co., München

2.6 Chemikalien

2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]	
pyridin	BIU-Grimmer, Großharnsdorf
Acrylamid/Bis Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Borsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Dimethylhydrazin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)
Di-Natriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
EDTA	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol (vergällt und reinst)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Formaldehyd (37 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Formamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kalium	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin	Bio-Rad Laboratories, München
Natriumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Natronlauge	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Salpetersäure (53 %)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Silbernitrat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris Pufferan ®	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Xylencyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

2.7 Feinchemikalien und Enzyme

Auftragspuffer für Agarosegele	
6 x Loading Dye Solution	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
BIOTAQ™ DNA-Polymerase	
10 x NH ₄ PCR-Puffer	
50 mM MgCl ₂ –Lösung	Bioline, Luckenwalde
dNTP Set 100 mM	
(dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	Bioline, Luckenwalde
Dye Terminator Cycle Sequencing	
with Quick Start Kit	Beckmann Coulter GmbH, München
Gene-Ruler™ DNA-Ladder 50 und 100 bp	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Genomic DNA Purification Kit	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Mass Gene Ruler™ DNA-Ladder	MBI-Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore Corp., Bedford, MA, USA
JetQuick PCR Purification Kit	Genomed, Löhne
JetSorb Gel Extraction Kit	Genomed, Löhne
Qiaquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

2.8 Puffer und Lösungen

Gewebefixierung

Natriumchloridlösung	0,9 % NaCl w/v in dest. H ₂ O
10 x PBS	1,37 M NaCl, 0,16 M Na ₂ HPO ₄ , 0,05 M KCl, 0,01 M KH ₂ PO ₄
4 % Paraformaldehyd	0,5 M Na ₂ HPO ₄ ; 0,02 M NaH ₂ PO ₄ ; 4 % PFA w/v in 1 x PBS

PCR

10 mM dNTP-Lösung	je 10 µl dATP, dTTP, dCTP, dGTP (100 mM) dest. H ₂ O ad 100 µl
TE-Puffer	10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8

Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	2,0 M Tris, 5,71 % v/v Eisessig, 0,05 mM EDTA; pH 8
Ethidiumbromidbad	0,5 µg/ml Ethidiumbromid in 1 x TAE - Puffer

SSCP

0,5 M EDTA	37,2 g EDTA, mit dest. H ₂ O ad 200 ml pH 8,0
2 x Auftragspuffer	0,5 % Bromphenolblau, 0,5 % Xylencyanol, 95 % Formamid, 20 mM EDTA, pH 8,0 (Lagerung bei RT)
TBE-Puffer (10 x)	0,9 M Tris, 0,9 M Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8.0 (autoklavieren, Lagerung bei RT)
10 % APS	10 % w/v Ammoniumpersulfat in dest. H ₂ O (Lagerung bei -20°C nicht länger als 1 Woche)

Silberfärbung

Fixierer	10 % unvergällter Ethanol v/v in dest. H ₂ O
0,7 % Salpetersäure	13.21 ml 53 % Salpetersäure mit dest. H ₂ O ad 1 l
Essigsäure	3 % Essigsäure v/v in dest. H ₂ O
0,2 % Silbernitrat	w/v in Aqua dest.
Entwickler	22.9 % Na ₂ CO ₃ w/v in dest. H ₂ O (Schutz vor direktem Licht)
Ethanol / Glycerol	10 % unvergällter Ethanol v/v und 7 % Glycerol v/v in dest. H ₂ O

2.9 Verbrauchsmaterialien und Software

Sämtliche Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Glas- oder Plastikpipetten wurden von den Firmen Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe) und Sarstedt (Nürnbrecht) bezogen. Die 96-*well*-Platten für PCR wurden bei der Firma VWR International GmbH (Darmstadt) erworben, die zugehörigen Verschlussfolien von der Firma SecureSeal™ Thermal (Simport, Bernard-Pilon, Kanada). PCR-8-fach-Reaktionsgefäße mit 200 µl Volumen wurden über die Firma G. Kisker GbR (Steinfurt) bezogen, Gel-Loader Pipettenspitzen über die Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen). Uvetten[®], sterile Einmalküvetten zur DNA-Bestimmung, wurden von der Firma Eppendorf (Hamburg) erworben. Sämtliche Verbrauchsmaterialien wurden vor Benutzung autoklaviert, sofern es sich nicht um steriles Einwegmaterial handelte. Das Zeichnen chemischer Formeln erfolgte mit dem Programm ACD/ChemSketch Freeware.

3 Ergebnisse

3.1 Biometrische Daten

3.1.1 Körpergewichte

Alle Tiere zeigten eine normale Körpergewichtsentwicklung mit einer zügigen Gewichtszunahme in den ersten Wochen und einer verlangsamten, jedoch stetigen Zunahme im folgenden Versuchszeitraum. Die Körpergewichte nach 61 Lebenswochen lagen für die Kontrollgruppe bei durchschnittlich 418 ± 17 g pro Tier und für die Behandlungsgruppen B und C bei 388 ± 32 g bzw. 387 ± 31 g pro Tier. Für die kürzer behandelte Gruppe D (31 Wochen) betrug das Körpergewicht 351 ± 14 g in Vergleich zu gleichaltrigen Tieren der Gruppe A mit 367 ± 15 g. Damit wiesen die behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Durchschnittsgewichte auf, ein Effekt, der sich in der statistischen Auswertung der Gewichtszunahmen nach 30 Wochen als nicht signifikant bzw. nach 60 Versuchswochen als signifikant erwies. Für den Zeitpunkt nach 30 Versuchswochen wurden die Kontrolltiere in Untergruppen eingeteilt und ihre Gewichte einer gesonderten Analyse unterzogen (Abb. 3.2). Dabei zeigte sich, dass eine der Teilgruppen signifikant schwerer war.

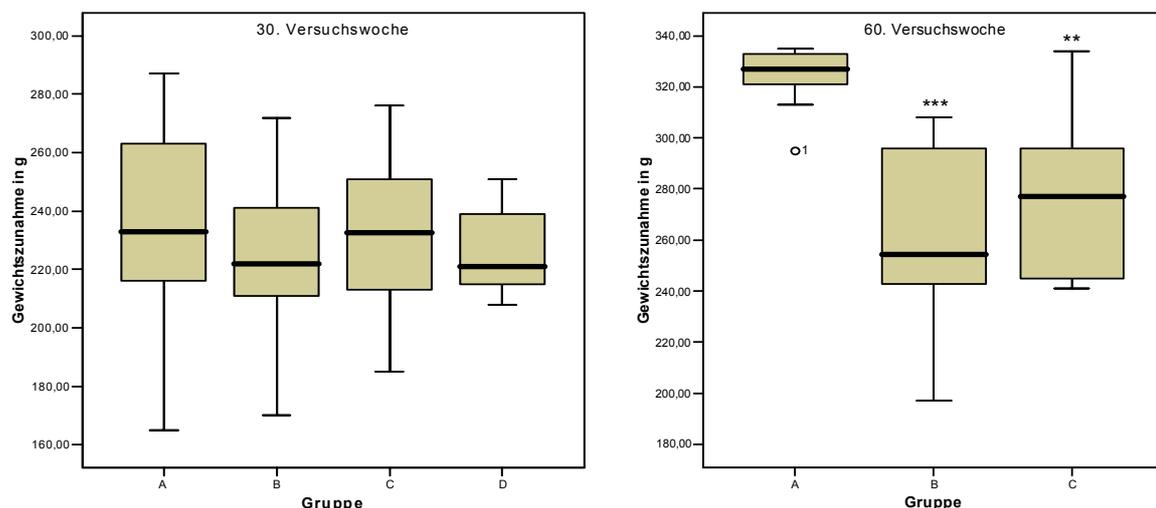


Abbildung 3.1 Statistischer Vergleich der Gewichtszunahme nach 30 bzw. 60 Versuchswochen. Dargestellt sind die Mediane der Gruppen (Querbalken), das erste und dritte Quartil (untere und obere Begrenzung der Boxen), die Extremwerte (untere und obere Linie) sowie ggf. Ausreißerwerte. Die Tiere der Gruppen B, C ($n=30$) und D ($n=10$) wiesen nach 30 Behandlungswochen keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtszunahme auf (H-Test nach Kruksal und Wallis). Nach 60 Versuchswochen ($n=10$) war die Gewichtszunahme von Gruppe B und Gruppe C gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt (H-Test nach Kruksal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney). Signifikanzniveaus sind angegeben mit *** ($p \leq 0,001$) bzw. ** ($\alpha \leq 0,01$).

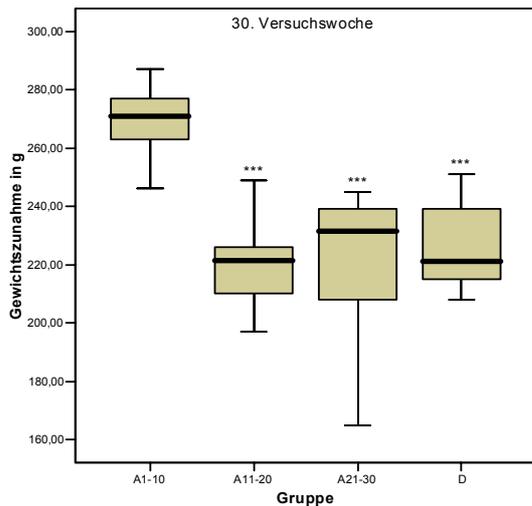


Abbildung 3.2 Vergleich der Gewichtszunahme der Kontrollgruppe, unterteilt in 3 Teilgruppen und der Gruppe D nach 30 Versuchswochen (H-Test nach Kruksal und Wallis, U-Test nach Mann und Whitney). Dargestellt sind die Mediane der Gruppen (Querbalken), das erste und dritte Quartil (untere und obere Begrenzung der Boxen), die Extremwerte (untere und obere Linie) sowie ggf. Ausreißerwerte. Die Tiere A 1-10 weisen bereits nach diesem Zeitraum eine signifikant höhere Gewichtszunahme gegenüber anderen Kontrolltieren und Tieren aus der Gruppe D auf ($n=10$, das Signifikanzniveau ist angegeben mit *** ($p \leq 0,001$)).

3.1.2 Futteraufnahme

Die durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag betrug für die Gruppe A 16,02 g, für die Gruppe B 15,55 g, für die Gruppe C 15,34 g sowie für die Gruppe D 15,34 g. Daraus resultiert für die Gruppen B und C eine durchschnittliche tägliche PhIP-Aufnahme von 0,0015 ng bzw. 1,5341 ng pro Tier. Die Tiere der Behandlungsgruppen nahmen geringfügig weniger Futter auf, ein Effekt der sich in der statistischen Auswertung sowohl nach 30 als auch nach 60 Versuchswochen als nicht signifikant erwies.

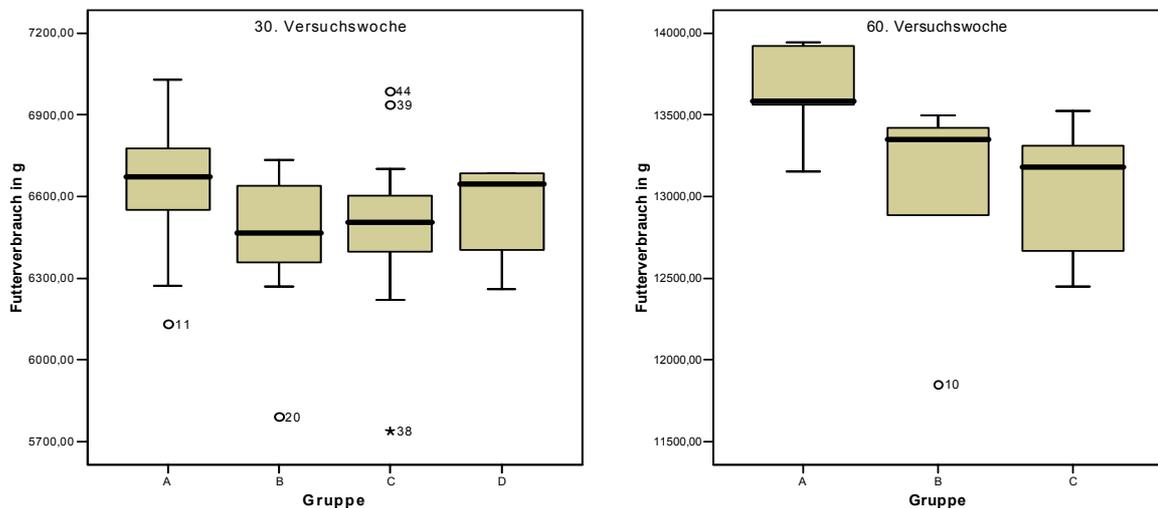


Abbildung 3.3 Statistischer Vergleich des Futterverbrauchs nach 30 bzw. 60 Versuchswochen (H-Test nach Kruksal und Wallis). Dargestellt sind die Mediane der Gruppen (Querbalken), das erste und dritte Quartil (untere und obere Begrenzung der Boxen), die Extremwerte (untere und obere Linie) sowie ggf. Ausreißerwerte. Die Tiere der Gruppen B, C ($n=30$) und D ($n=10$) wiesen nach 30 Behandlungswochen keine signifikanten Unterschiede im Futterverbrauch auf. Nach 60 Versuchswochen ($n=10$) war der Futterverbrauch von Gruppe B und Gruppe C gegenüber der Kontrolle erniedrigt, dieser Unterschied erwies sich jedoch nicht als signifikant.

3.1.3 Organgewichte

Die absoluten Organgewichte nahmen mit der Lebensdauer mit Ausnahme der Leber stetig zu, die relativen Organgewichte nahmen ab oder blieben konstant (Abb. 3.4a und b). Die meisten signifikanten Effekte der Behandlung waren bei Leber und Milz zu einzelnen Zeitpunkten zu beobachten. Für die absoluten Lebergewichte war eine Tendenz zu geringeren Gewichten der Behandlungsgruppen zu erkennen, ein Effekt, der bei der Niere nicht auftrat. Waren für die relativen Lebergewichte signifikante Effekte sichtbar, so waren die Organe leichter im Vergleich zur Kontrolle. Bei den relativen Nierengewichten trat der umgekehrte Effekt auf, die Organe der Behandlungsgruppen waren schwerer. Keines der erhobenen Organgewichte zeigte signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle durchgängig über den gesamten Versuchszeitraum. Es sind jeweils absolute und relative Gewichte der Organe Leber, Magen, Niere und Milz nach 9, 16, 25, 31/33, 41 und 61 Versuchswochen (Tab. 2.2) graphisch dargestellt (Median, halber Quartilsabstand).

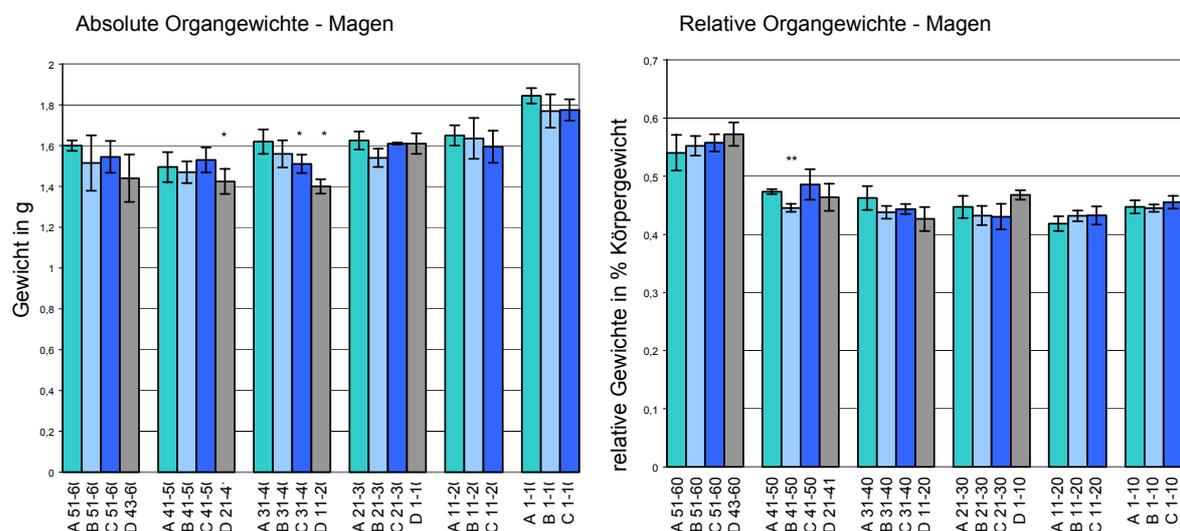


Abbildung 3.4a Absolute und relative Organgewichte des Magens. Aufgetragen sind jeweils die Organgewichte der 10 Tiere der 4 Gruppen eines Tötungstermines (Tab. 2.2). Signifikanzen sind angegeben mit * ($p \leq 0,05$) oder ** ($p \leq 0,01$), U-Test nach Mann-Whitney.

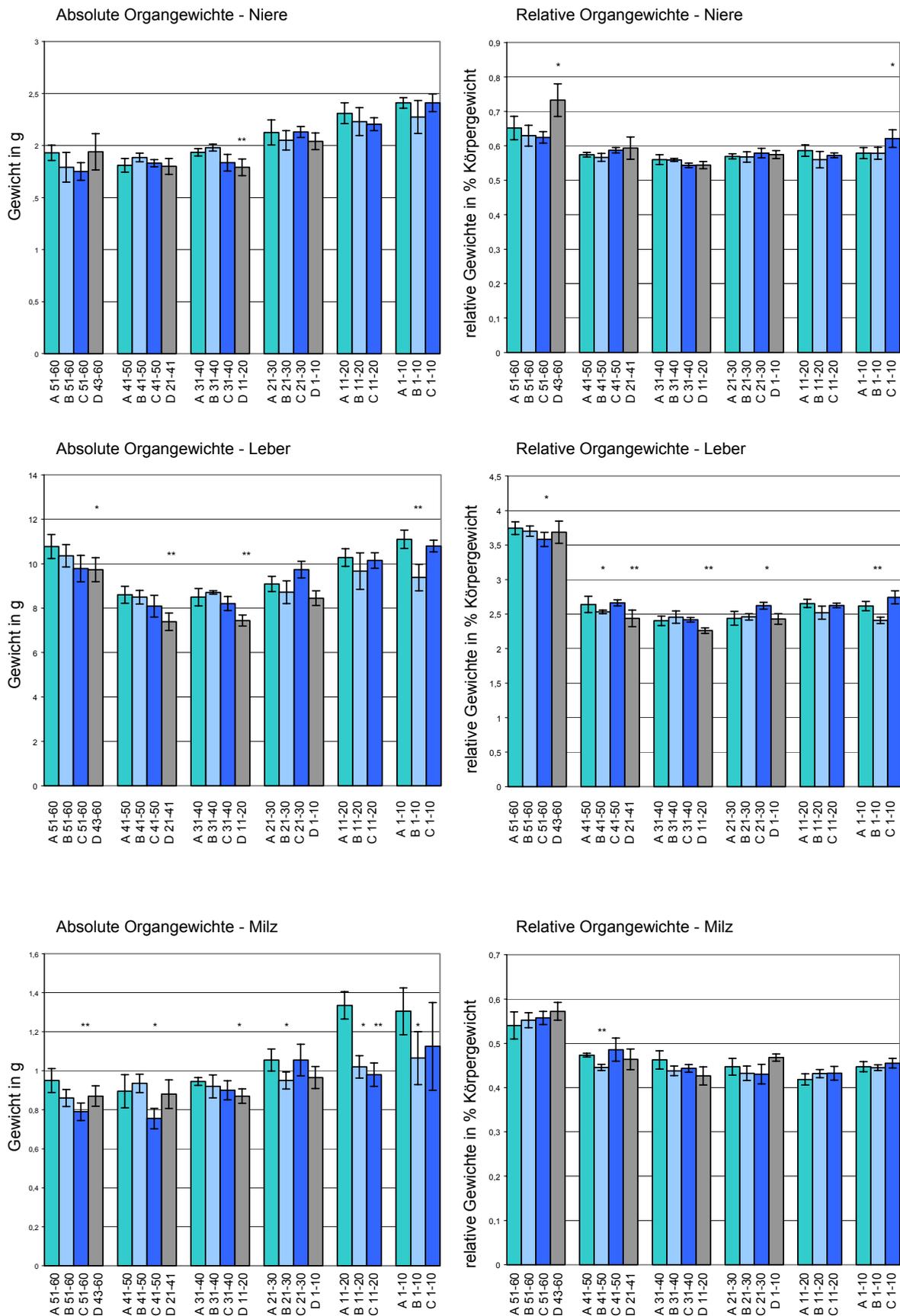


Abbildung 3.4b Absolute und relative Organengewichte von Niere, Leber und Milz. Aufgetragen sind jeweils die Organengewichte der 10 Tiere der 4 Gruppen eines Tötungstermines (Tab. 2.2). Signifikanzen sind angegeben mit * ($p \leq 0,05$) oder ** ($p \leq 0,01$), U-Test nach Mann-Whitney.

3.2 Tierversuch-Makroskopische Beobachtungen

Kein Tier der Kontroll- und PhIP-Behandlungsgruppen verstarb vor Versuchsende. In der DMH-Gruppe verstarben 2 Tiere in der 4. bzw. 6. Versuchswoche. In allen 4 Gruppen traten makroskopische Veränderungen auf. Diese Veränderungen betrafen nicht nur Dün- und Dickdarm, sondern auch Magen, Coecum, Leber, Niere, Milz und Lymphknoten, Geschlechtsorgane sowie Mesenterien und Fettgewebe. Besonders häufig waren Anzeichen von Entzündungen im Gastrointestinaltrakt zu beobachten. Die Begriffe Veränderung und Läsion werden im Folgenden für alle beobachteten Anomalien der Gewebe wie Verfärbungen, Verdickungen, Blutungen oder Wassereinlagerungen benutzt. Mit Knoten oder Tumor wurden neutrale Begriffe für mögliche Neoplasien gewählt, deren Einteilung in benigne oder maligne Neoplasien nur histologisch vorzunehmen ist. Die Methylenblaufärbung einzelner Darmabschnitte ergab keine Hinweise auf ACF.

3.2.1 Kontrollgruppe

In der Kontrollgruppe wurden 11 makroskopische Veränderungen an 10 Tieren protokolliert (Tabelle 3.1). Davon betrafen jeweils 4 die Leber bzw. den Dünndarm, die restlichen entfielen auf Milz, Geschlechtsorgane und Coecum. Läsionen des Dickdarms traten nicht auf. Bei 5 der beobachteten Veränderungen handelte es sich um Anzeichen von Entzündungen, gekennzeichnet durch gerötetes, stark durchblutetes Gewebe mit gelegentlichen Schwellungen. Die höchste Anzahl an Läsionen trat nach 31 Versuchswochen auf. Als möglicher Tumor konnte lediglich ein Knoten in einer Leberprobe gewertet werden.

Tabelle 3.1 Makroskopisch beobachtete Veränderungen in unbehandelten Kontrolltieren. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier-Nr.	Lokalisation	Befund
21	Leber	Knoten Unterseite großer Lappen
23	Dünndarm	Entzündung
26	Leber	schwarze Pünktchen an der Oberfläche
27	Geschlechtsorgane	Hoden stark vergrößert, vergrößerter Lymphknoten im Fettgewebe
29	Leber	schwarze Pünktchen an der Oberfläche
30	Leber	schwarze Pünktchen an der Oberfläche
11	Dünndarm	Entzündung
	Coecum	Entzündung

2	Milz	stark vergrößert, zirka doppeltes Gewicht
5	Dünndarm	Entzündung
10	Dünndarm	Entzündung

3.2.2 Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe

Bei 23 mit der niedrigen PhIP-Konzentration behandelten Tieren wurden insgesamt 38 auffällige Befunde festgestellt (Tabelle 3.2). Davon entfiel mit 13 Läsionen ein Großteil auf den Dünndarm; Leber, Coecum und Dickdarm zeigten jeweils 7 Veränderungen. Bei zwei der im Coecum beobachteten Veränderungen handelt es sich möglicherweise um versehentliche Punktierungen bei der Narkotisierung. Lediglich bei 2 der im Dickdarm beobachteten Veränderungen könnte es sich um Neoplasien handeln (Tiere 6 und 24). Die übrigen Veränderungen entfielen auf Milz, Geschlechtsorgane, Magen sowie Niere. Die am häufigsten protokollierte Veränderung war eine Entzündung des Darms (11 Tiere, 15 Befunde), besonders des Dünndarms (8 Tiere), gekennzeichnet durch gerötetes, stark durchblutetes Gewebe mit gelegentlichen Schwellungen. Die meisten Läsionen waren am Versuchsende nach 61 Wochen zu beobachten.

Tabelle 3.2 Makroskopisch beobachtete Veränderungen in mit 0,00001% PhIP gefütterten Tieren. DC-distales Kolon, PC-proximales Kolon, C-Kolorektum. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier-Nr.	Lokalisation	Befund
58	prox. Dünndarm	punktförm. Verdickung
33	Coecum	Entzündung
	Dickdarm	Entzündung
35	Dünndarm	Entzündung
	Coecum	Entzündung
	Dickdarm	Entzündung
36	Dünndarm	Entzündung
	Coecum	Entzündung
	Dickdarm	Entzündung
	Leber	kleiner Lappen mit Knoten
22	Coecum	vergrößerte Drüsen
	Dünndarm	Entzündung
23	Leber	schwarze Pünktchen an der Oberfläche
24	Dickdarm	Einschnürung, Verdickung der Darmwand
26	Leber	schwarze Pünktchen an der Oberfläche
27	Dünndarm	aufgequollen

	Coecum	vergrößerte Drüsen
12	Dünndarm	Entzündung
14	Coecum-Dickdarm	massive blutige Verdickung (möglicherweise Punktierung)
15	Dünndarm	sehr dünn
	Coecum	entzündet (möglicherweise Punktierung)
16	Leber	schwarze Pünktchen
18	Leber	schwarze Pünktchen
19	Dünndarm	starke Entzündung
20	Dünndarm	Entzündung
	Niere	gelbliche Verfärbung
2	Milz	dunkle Stelle
	Dünndarm	Entzündung
	Geschlechtsorgane	Hoden links verkleinert
3	Dünndarm	Entzündung
4	Milz	extrem vergrößert (zirka 7-fach), Knoten an Unterseite
	Leber	vergrößert, Oberfläche marmoriert
	Magen	klein und dünnwandig, linsenförmige Läsion
	Dünndarm	klein und dünnwandig
6	Dickdarm	Verdickung DC
7	Dünndarm	Entzündung
	Coecum	geröteter Streifen
9	Dickdarm	Entzündung
10	Leber	Knötchen

3.2.3 Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe

Bei 29 mit der hohen PhIP-Konzentration gefütterten Tieren wurden 43 Veränderungen protokolliert (Tabelle 3.3). Die Mehrzahl entfiel auch hier auf den Dünndarm mit 14 Läsionen, gefolgt vom Dickdarm mit 10 Läsionen. Von diesen 10 könnte es sich bei 7 Läsionen um Neoplasien handeln (Tier 27, 20, 18, 13, 7, 6 und 4). Des Weiteren traten 6 Veränderungen in den Geschlechtsorganen, 5 in der Leber und 4 im Coecum auf. Bei einer im Coecum beobachteten Veränderung handelt es sich möglicherweise um eine versehentliche Punktierung bei der Narkotisierung. Die übrigen Auffälligkeiten entfielen auf Milz, Niere sowie Mesenterien. Es wurden 7 Fälle von Entzündungen bei 6 Tieren protokolliert. In der Mehrzahl traten hier Vergrößerungen von Organen oder Knoten im Darm oder Geschlechtsorganen auf. Die Anzahl an Läsionen nahm mit zunehmender Versuchsdauer mit Ausnahme des Termins nach 41 Versuchswochen stetig zu. Ein rapider Anstieg war nach 31 Versuchswochen zu verzeichnen.

Tabelle 3.3 Makroskopisch beobachtete Veränderungen in mit 0,01 % PhIP gefütterten Tieren. DC-distales Kolon, PC-proximales Kolon, C-Kolorektum. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier-Nr.	Lokalisation	Befund
56	Dünndarm	kleine Knoten
58	Leber	helle Verfärbungen (Marmorierung)
44	Dünndarm	Entzündung
31	Coecum	2 punktförmige Blutungen (Applikationsunfall?)
32	Leber	kleiner Lappen m. schwarzen Punkten
21	Geschlechtsorgane	Prostata sehr fett
22	Dünndarm	Entzündung
	Leber	schwarze Pünktchen
23	Dünndarm	rötliche Verdickung, Übergang Coecum-Kolon verändert
24	Dünndarm	rötliche Verdickung
25	Geschlechtsorgane	vergrößerter Lymphknoten im Fettgewebe des Hoden
26	Dickdarm	stark durchblutete Einschnürung C
27	Dünndarm	rötliche Verdickung
	Dickdarm	PC, C Verdickung, Ödem
28	Geschlechtsorgane	Prostata sehr klein
	Niere	kleine Zyste
	Dünndarm	Entzündung
29	Dünndarm	rötliche Verdickung
11	Coecum	Entzündung
13	Dünndarm	Entzündung
	Coecum	Entzündung
	Dickdarm	Verdickung DC
17	Dünndarm	Entzündung
	Dickdarm	ohne Einschnürungen
18	Dickdarm	Verdickung DC
20	Leber	schwarze Pünktchen
	Dickdarm	Verdickung DC
1	Milz	vergrößert
	Leber	unterer Lappen vergrößert
	Geschlechtsorgane	Strukturverlust Prostata, nur Fett
2	Coecum	vergrößerte Lymphknoten
	Dickdarm	Einengung Mitte
3	Dünndarm	5 kleine Knoten
	Geschlechtsorgane	Ampullen Strukturverlust
4	Dünndarm	Knoten
	Dickdarm	Knoten PC
5	Dünndarm	mit Bauchwand und Mesenterium verwachsen

6	Dünndarm	Knoten
	Dickdarm	Knoten C
7	Dickdarm	DC Knoten
8	Fettgewebe	linsenförmige Läsion
9	Geschlechtsorgane	Hoden knotige Strukturen
10	Mesenterien	schwarze Punkte im Bindegewebe zwischen Pankreas und Magen

Somit war eine klare Häufung von makroskopischen Läsionen in den PhIP-behandelten Gruppen mit steigender Dosis im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Es bestand eine Tendenz zum vermehrten Auftreten von Läsionen mit fortschreitender Behandlungsdauer der Tiere. Das Spektrum der auftretenden Läsionen verschob sich von einer Häufung von Entzündungen in der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe zu vermehrtem Auftreten von Neoplasien in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe.

3.2.4 DMH-Gruppe

In der DMH-Gruppe wurden 30 Veränderungen bei 21 Tieren beobachtet, von denen 10 auf den Dickdarm und 7 auf den Dünndarm entfielen (Tabelle 3.4). Von diesen Veränderungen könnte es sich bei 7 bzw. 5 um Neoplasien handeln. Im Coecum wurden 4 Läsionen beobachtet, in Geschlechtsorganen und der Niere jeweils 3. Die übrigen Veränderungen entfielen auf Leber und Mesenterien. Die Milz zeigte bei dieser Gruppe keinerlei Auffälligkeiten. Bei der Mehrzahl der Läsionen handelte es sich um Knoten bzw. Tumoren des Darms; Anzeichen für Entzündungen traten nur in 2 Tieren zu Versuchsende auf. Die Anzahl an Läsionen stieg mit fortschreitender Versuchsdauer klar an und war gegenüber der Kontrollgruppe erhöht.

Tabelle 3.4 Makroskopisch beobachtete Veränderungen in DMH-behandelten Tieren. DC-distales Kolon, PC-proximales Kolon, C-Kolorektum. Tiere 42-60: 9 Versuchswochen, Tiere 21-41: 16 Versuchswochen, Tiere 11-20: 25 Versuchswochen, Tiere 1-10: 31 Versuchswochen.

Tier	Lokalisation	Befund
52	Niere	Abszess, Niere mit Bauchfell und Leber verklebt
56	Leber	helle Verfärbungen (Marmorierung)
36	Coecum	stark vergrößert, prall gefüllt, Blutung an der Oberseite (letztes Drittel des Dünndarms ebenfalls stark verdickt, Übergang Dünndarm-Coecum kaum erkennbar)
29	Niere	Abszess, Niere mit Leber und Dünndarm verklebt
30	Dünndarm	Rötung, Knötchen

11	Coecum	stark vergrößert, Übergang Dünndarm-Coecum kaum erkennbar
12	Dickdarm	Läsion PC
13	Dickdarm	Läsion PC
14	Dünndarm	Läsion
15	Dickdarm	Läsion PC (Mesenterium zw. Coecum u. Kolon)
18	Dickdarm	kleine Läsion DC
	Dickdarm	punktförmige Blutungen im Mesenterium
19	Niere	kleine Zyste
	Dünndarm	punktförmige Blutungen im Mesenterium
1	Dünndarm	Entzündung
2	Coecum	Entzündung
	Dünndarm	Entzündung
3	Leber	marmoriert
5	Dünndarm	2 Tumoren
		Blase verwachsen mit Geschlechtsorganen
6	Coecum/Dickdarm	Übergang verändert
	Geschlechtsorgane	Hoden mit linsenförmigen Läsionen
7	Dickdarm	verwachsen mit linsenförmigen Läsionen in den Mesenterien
8	Coecum	verwachsenes Mesenterialgewebe mit abnormaler Färbung
	Dickdarm	Tumor DC
9	Mesenterien	sehr fett, z.T. verdickte Knoten
	Geschlechtsorgane	Ampullen vergrößert und verwachsen
	Dickdarm	Tumor PC/DC
10	Dünndarm	Läsion im Mittelteil
	Dickdarm	Tumor PC/DC
	Geschlechtsorgane	Ampulle vergrößert

3.3 Histologie

Die Einteilung histologisch veränderter Krypten erfolgte in hyperplastische und dysplastische Krypten. Bei einer Hyperplasie handelt es sich um eine Vergrößerung durch Erhöhung der Zellzahl bei konstanter Zellgröße und -zusammensetzung. Eine Dysplasie ist durch eine veränderte Zellzusammensetzung als Folge von vermehrten Mitosen und Entdifferenzierung der Zellen mit einem gestörten Epithelaufbau als Folge charakterisiert. Sie stellt je nach Grad einen fließenden Übergang von präneoplastischen Läsionen zum *Carcinoma in situ* dar. Bei den beobachteten Entzündungszellen handelt es sich um gemischtzellige Populationen aus Lymphozyten, Makrophagen und wenigen Granulozyten.

3.3.1 Kontrollgruppe

Die histologische Auswertung der Gewebeproben der Kontrollgruppe ergab 10 Befunde bei 9 Tieren (Tabelle 3.5). Nach 16 bzw. 25 Versuchswochen traten Ödeme in der Mukosa auf. Im proximalen Kolon eines Tieres trat nach 33 Versuchswochen ein Polyp auf.

Tabelle 3.5 Histologische Befunde in der Kontrollgruppe (Gruppe A). PC-proximales Kolon. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier	Lokalisation	Befund
55	D	lymphatisch infiltriert
48	D	vergrößerte Lymphfollikel
38	Leber	hämorrhagische Granulome
39	Leber	hämorrhagische Granulome
45	DC	Ödem Mukosa
	C	Enteritis
41	D	Enteritis
37	DC	Ödem in Mukosa und Submukosa
33	DC	Ödem Darmwand
27	PC	Polyp

3.3.2 Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe

Die histologische Auswertung der Gewebeproben der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe ergab 15 Befunde (Tabelle 3.6). In der Mehrzahl handelte es sich dabei um veränderte Krypten, bei deren Beurteilung in 4 hyper- und 2 dysplastische unterschieden wurde. Anzeichen von Entzündungen wie Kolitis oder vermehrtes Auftreten von Entzündungszellen traten bei insgesamt 6 Tieren jeweils nach 9, 16, 25 bzw. 33 Versuchswochen auf. Eine Häufung von Läsionen war im distalen Kolon zu beobachten, wo 8 von 15 Befunden protokolliert wurden. Die makroskopisch protokollierten Läsionen der Tiere 6 und 24 konnten nicht bestätigt werden.

Tabelle 3.6 Histologische Befunde in der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe (Gruppe B). PC-proximales Kolon, DC-distales Kolon, C-Kolorektum. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier	Lokalisation	Befund
52	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen, Kriptenarchitektur verändert
60	C	Kriptenarchitektur verändert
45	D	vergrößerte Lymphfollikel
42	DC	Kolitis
47	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen
39	DC-C	Dysplasie Übergang DC-C
40	C	Hyperplasie
39	C	Stroma vermehrt, Entzündungszellen
35	DC	Ödem und Entzündungszellen
23	DC	Stroma vermehrt, Ödem, Kolitis
27	PC	Polyp
16	DC	Hyperplastische Krypte
20	PC	Hyperplastische Krypte
	DC	Dysplastische Krypte
6	C	Hyperplastische Krypten

3.3.3 Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe

Die histologische Auswertung der Gewebeproben der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe ergab 31 Befunde bei 28 Tieren (Tabelle 3.7). Auch hier handelte es sich hauptsächlich um veränderte Krypten (9 hyperplastisch, 8 dysplastisch), sowie in 2 Fällen um Veränderungen an den Geschlechtsorganen. Für Tier 9 ergab sich eine Übereinstimmung mit dem makroskopischen Befund. Anzeichen von Entzündungen bei 2 Tieren traten nach 9, bei 3 Tieren nach 16, bei 2 Tieren nach 25, bei einem Tier nach 33 und bei 4 Tieren nach 41 Versuchswochen auf. Dabei war in 9 Fällen das distale Kolon, in einem Fall das proximale Kolon und in einem Fall das Kolorektum betroffen. Damit überstieg die Zahl von 12 Entzündungen die der makroskopisch beobachteten um 5 Fälle, wobei die Lokalisationen nicht übereinstimmten. Mit 15 Läsionen wies das distale Kolon die meisten Veränderungen auf. Die 7 makroskopisch protokollierten möglichen Neoplasien konnten nicht bestätigt werden. Die Tiere 13, 18 und 20 wiesen sowohl makroskopisch als auch histologisch Befunde auf, wobei letztere makroskopisch nicht sichtbar waren.

Tabelle 3.7 Histologische Befunde in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe (Gruppe C). PC-proximales Kolon, DC-distales Kolon, C-Kolorektum. Tiere 51-60: 9 Versuchswochen, Tiere 41-50: 16 Versuchswochen, Tiere 31-40: 25 Versuchswochen, Tiere 21-30: 33 Versuchswochen, Tiere 11-20: 41 Versuchswochen, Tiere 1-10: 61 Versuchswochen.

Tier	Lokalisation	Befund
52	PC	vermehrtes Stroma, Entzündungszellen
	DC	vermehrtes Stroma, Entzündungszellen, Ödem
53	C	Hyperplastische Krypten
48	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen, Kryptenarchitektur gestört
47	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen
44	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen, Kryptenarchitektur gestört
42	DC	Stroma vermehrt, Ödem Mukosa
41	DC	Hyperplasie
40	Dickdarm	Lymphoepitheliale Läsion
39	DC	Dysplasie
38	DC	Dysplasie
37	Magen	Lymphfollikel
35	DC	Ödem und Entzündungszellen
32	DC	Stroma vermehrt, Entzündungszellen
31	C	2 Hyperplasien
24	PC	Hyperplastische Krypte

	DC	Hyperplastische Krypte
	C	Hyperplasie und Dysplasie
29	C	Stroma vermehrt, Entzündungszellen
11	DC	Dysplastische Krypte
12	C	Dysplastische Krypte
13	DC	Kryptenarchitektur unregelmäßig, vermehrtes Stroma, entzündliche Infiltrate
14	C	vermehrtes Stroma, entzündliche Infiltrate
15	DC	vermehrtes Stroma, entzündliche Infiltrate
17	DC	Hyperplastische Krypte
18	DC	Dysplastische Krypte
19	DC	Dysplastische Krypte, vermehrtes Stroma, entzündliche Infiltrate
20	PC	Dysplastische Krypte
1	PC	Hyperplastische Krypte
9	Geschlechtsorgane	Karzinom in Samenstranglokalisation (Ursprungsgewebe unbekannt)
10	Geschlechtsorgane	Hyperplasie (Prostata oder Koagulationsdrüse)

3.3.4 DMH-Gruppe

Die histologische Auswertung der Gewebeproben der DMH-Gruppe ergab 45 Befunde bei 34 Tieren (Tabelle 3.8). Detektiert wurden 4 Karzinome bei Tieren nach 25 Versuchswochen, wovon je eines im distalen Kolon, im proximalen Kolon bzw. im Dünndarm lokalisiert war, beim vierten Karzinom konnte das Ursprungsgewebe nicht festgestellt werden. Drei der Karzinome (Tiere 13, 14 und 15) fielen bereits bei der makroskopischen Beurteilung auf. In der Mehrzahl zeigten sich auch hier veränderte Krypten (19 hyperplastisch, 20 dysplastisch), es traten jedoch auch 2 hyperplastische Veränderungen im GALT und Anzeichen von Entzündungen in 3 Fällen auf. Diese stimmen nicht mit den makroskopisch beobachteten Läsionen überein. Für die anderen nach makroskopischer Beurteilung vermuteten Neoplasien ließen sich histologisch keine Anzeichen finden. Ähnlich der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe war auch hier eine Häufung der Läsionen im distalen Kolon zu beobachten (27 Stück). Auch hier traten Paneth-Zellen im Dickdarm auf.

Tabelle 3.8 Histologische Befunde in der DMH-Gruppe (Gruppe D). PC-proximales Kolon, DC-distales Kolon, C-Kolorektum, GALT-Darm-assoziiertes Lymphgewebe. Tiere 42-60: 9 Versuchswochen, Tiere 21-41: 16 Versuchswochen, Tiere 11-20: 25 Versuchswochen, Tiere 1-10: 31 Versuchswochen.

Tier	Lokalisation	Befund
51	DC	Hyperplastische Krypte
52	DC	Hyperplastische Krypte
55	DC	Hyperplastische Krypten
56	DC	Hyperplastische Krypten, Stroma vermehrt, Ödem
	C	Hyperplastische Krypten
46	DC	Kolitis, Stroma vermehrt, Entzündungszellen
49	DC	Kolitis
31	PC	Dysplasie
32	DC	Hyperplastische und dysplastische Krypten
35	DC	2 Hyperplasien
36	DC	Dysplasie
37	DC	Dysplastische Krypte
38	DC	Hyperplastische Krypte
40	DC	Hyperplasie
22	PC	Dysplasie, Paneth-Zell-Metaplasie
23	DC	Dysplastische Krypte
24	DC	Hyperplasie
28	DC	Hyperplasie
29	DC	Dysplasie
30	PC	Dysplasie, Paneth-Zell-Metaplasie
11	PC	Dysplastische Krypte
	PC	Karzinom unbekannter Histogenese, Pankreatitis
12	DC	Dysplasie, vermehrtes Stroma, entzündliche Infiltrate
14	DC	Hyperplastische Krypte
	Dünndarm	Hyperplasie GALT, Verkalkung
	Dünndarm	Karzinom
15	C	Hyperplastische Krypte
	C	Karzinom mit Lymphknoten-Metastase
16	DC	Dysplastische Krypte
17	DC	Dysplasie
18	DC	Karzinom
1	DC	Dilatierte hyperplastische Krypte
	C	Dysplastische Krypte
2	DC	Dysplastische und hyperplastische Krypte
4	DC	Dysplastische Krypte
	C	Dysplastische Krypte
5	PC	Dysplastische Krypte

	DC	Dysplasie
6	C	Hyperplastische Krypte
7	DC	Dysplastische Krypte
	PC	Paneth-Zell-Metaplasie
8	C	Hyperplastische Krypte
	DC	Hyperplastische Krypte und Zyste über GALT
9	C	Dysplastische Krypten
	C	Paneth-Zell-Metaplasie

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass frühe, für die Entstehung von Dickdarmkrebs charakteristische Läsionen in den untersuchten Abschnitten vorhanden waren. Beim Vergleich der PhIP-Gruppen mit der Kontrolle war ein klarer Anstieg in der Zahl der Läsionen mit der Dosis zu beobachten (Gr. A: 5, Gr. B: 13, Gr. C: 26). Die DMH-behandelte Gruppe wies mit 38 die höchste Anzahl an Läsionen auf. Ein Anstieg der Anzahl von Läsionen mit fortschreitender Versuchsdauer war nur bei der DMH-Gruppe zu verzeichnen. Das vermehrte Auftreten von Entzündungen im Gewebe war typisch für die PhIP-behandelten Tiere, trat jedoch sowohl makroskopisch als auch histologisch in geringeren Anzahlen bei Kontroll- und DMH-Gruppe auf. Bei beiden Fütterungsgruppen waren diese bereits nach 9 Versuchswochen nachweisbar. Die Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe zeigte eine Tendenz zu höheren Entzündungszahlen als die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe bei den makroskopischen Befunden, nach histologischer Beurteilung kehrt sich diese Tendenz um. Ebenfalls häufig beobachtet, jedoch nicht quantifiziert, wurde das Auftreten von Paneth-Zellen im Dickdarm, sogenannte Paneth Zell-Metaplasien. Paneth-Zellen befinden sich am Kryptengrund in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Stammzellen. Sie sind eosinophil (HE-Färbung), weshalb sie im histologischen Bild rosa erscheinen (Abbildung 3.5). Ein Teil der makroskopischen und histologischen Befunde wurden bereits in den Diplomarbeiten von Stephanie Hompes und Conny Berthold besprochen (Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam, 2004 und 2005). Sie werden hier aus Gründen des besseren Gesamtüberblicks und der Quantifizierung nochmals mit aufgeführt.

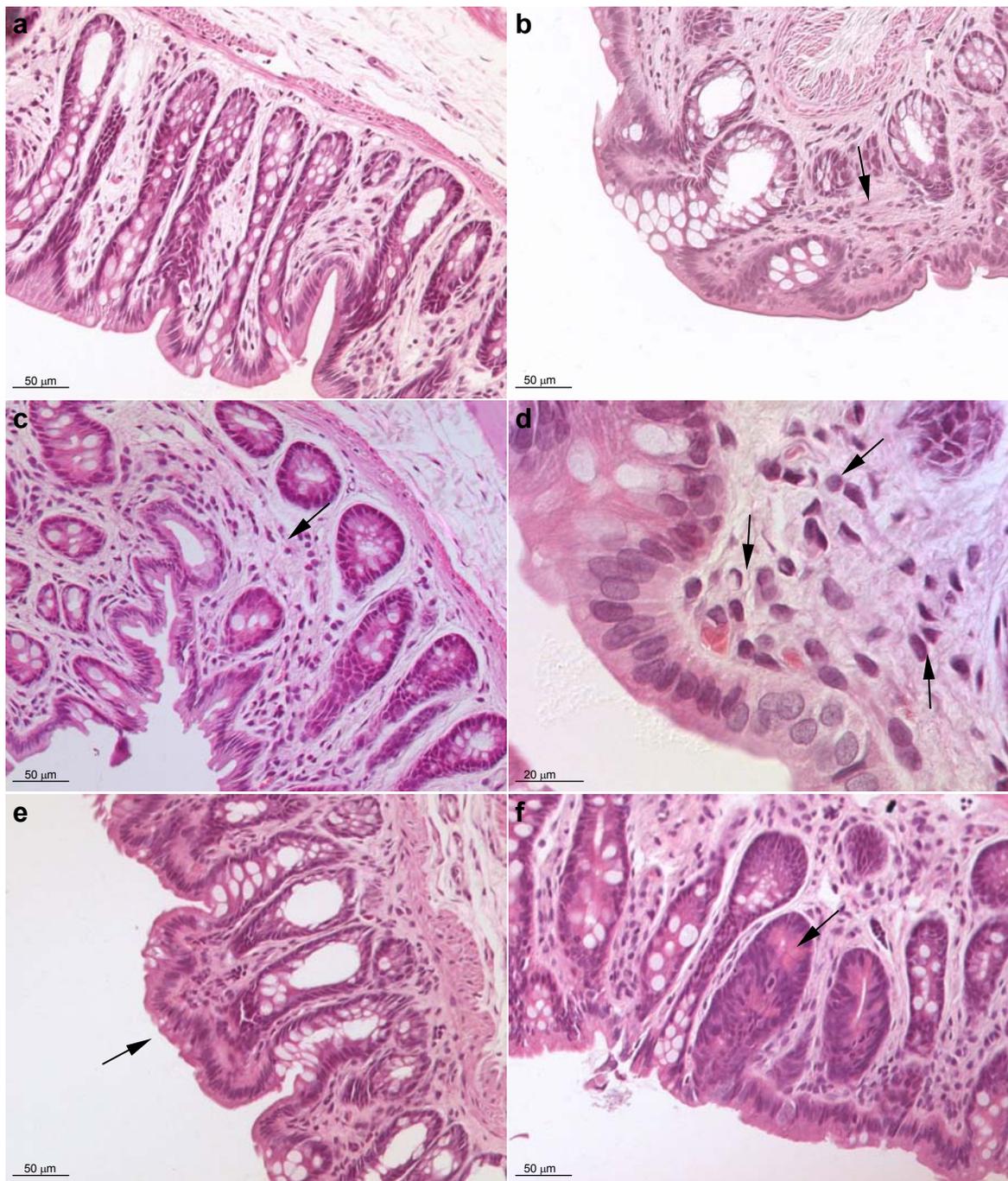


Abbildung 3.5 Läsionen des Dickdarms in HE-gefärbten Schnitten. **a.)** Schnitt durch das Kolorektum eines Kontrolltieres nach 33 Versuchswochen (20 x). **b.)** Schnitt durch das Kolorektum eines Tieres aus der Hoch-Dosis-Gruppe nach 33 Behandlungswochen (20 x). Sichtbar ist eine Entzündung des Gewebes mit Vermehrung des Stromas in den Kryptenzwischenräumen und Infiltration mit Entzündungszellen (Pfeil). **c.)** Schnitt durch das distale Kolon eines Tieres aus der Niedrig-Dosis-Gruppe nach 16 Behandlungswochen (20 x). Sichtbar ist ebenfalls eine Entzündung des Gewebes mit Vermehrung des Stromas in den Kryptenzwischenräumen und Infiltration mit Entzündungszellen (Pfeil). **d.)** vergrößerter Ausschnitt aus c.) (60 x). Zahlreiche Entzündungszellen (Pfeile) infiltrieren das Gewebe. **e.)** Schnitt durch das Kolorektum eines Tieres aus der Hoch-Dosis-Gruppe nach 25 Behandlungswochen (20 x). Hyperplastische Krypten (Pfeil). **f.)** Schnitt durch das distale Kolon eines Tieres aus der DMH-Gruppe nach 31 Versuchswochen (20 x). Sichtbar sind dysplastische Krypten mit einer Depletion der Becherzellen und dem Auftreten von Paneth-Zellen am Kryptengrund (Pfeil).

3.4 Mutationsanalyse

3.4.1 DNA-Isolierung und PCR

Aus allen untersuchten Organen konnte genomische DNA isoliert werden. Die Konzentrationen lagen zwischen 23,61 und 4387,2 ng/ μ l. Alle untersuchten Genabschnitte konnten durch PCR erfolgreich und in für nachfolgende Experimente ausreichender Menge amplifiziert werden. In einigen Fällen gelang jedoch für alle oder nur bestimmte Genfragmente keine Anreicherung aus der genomischen DNA (siehe Tab. 3.9). Die fotometrisch bestimmte DNA-Konzentration dieser Proben lag im oben angegebenen Bereich. Per Agarose-Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass die DNA stark fragmentiert vorlag. Auch eine zweimalige Wiederholung der DNA-Isolierung aus den angegebenen Proben erbrachte keine Verbesserung des Ergebnisses. Eine Verunreinigung der für die Isolierung verwendeten Lösungen konnte durch Mitführen von Kontrollproben ausgeschlossen werden.

Tabelle 3.9 Tiergruppen, -nummern und betroffene Gewebe, bei denen eine Anreicherung bestimmter Genabschnitte aufgrund starker Fragmentierung teilweise oder vollständig nicht möglich war.

	wenig PCR-Produkte		keine PCR-Produkte	
	B	C	B	C
	4-10 C	5-10 C	7 und 8 D	2, 5,7 u. 8 D
Tier und betroffenes Gewebe	2 DC	6 und 10 D 1-10 DC 1 PC	24 D	3 Ampulle 9 Hoden 10 Hoden 10 Fett

3.4.2 SSCP-Analyse

Es wurden insgesamt 84 Laufunterschiede beobachtet. Die meisten Laufunterschiede traten bei den Tieren 21-30 (nach 33 Versuchswochen), die wenigsten bei den Tieren 51-60 (nach 9 Versuchswochen) auf. Die wenigsten Laufunterschiede wies der Darmabschnitt C (Kolorektum) auf, die meisten traten im proximalen Kolon sowie im Dünndarm auf. Auffällig war eine Häufung der aberranten Banden in der Gruppe B, die in absoluten Zahlen die meisten Laufunterschiede zeigte. Die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe C zeigte nur nach 33 Versuchswochen mehr Laufunterschiede als Gruppe B. Ebenfalls nicht erwartet wurde die hohe Anzahl an Laufunterschieden im Dünndarm, der eigentlich als Kontrollgewebe diente.

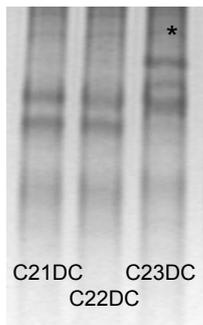


Abbildung 3.6 SSCP für das Fragment APC1. Das in der mit * gekennzeichnete Spur aufgetragene PCR-Produkt zeigt im Vergleich zu den benachbarten Proben einen durch Verschwinden der unteren Bande und einer oberhalb auftretenden zusätzlichen Bande gekennzeichneten Laufunterschied. Es handelt sich um eine Gewebeprobe aus dem distalen Kolon eines Tieres aus der PhIP-Hoch-Dosis-Gruppe nach 33 Versuchswochen (C23DC).

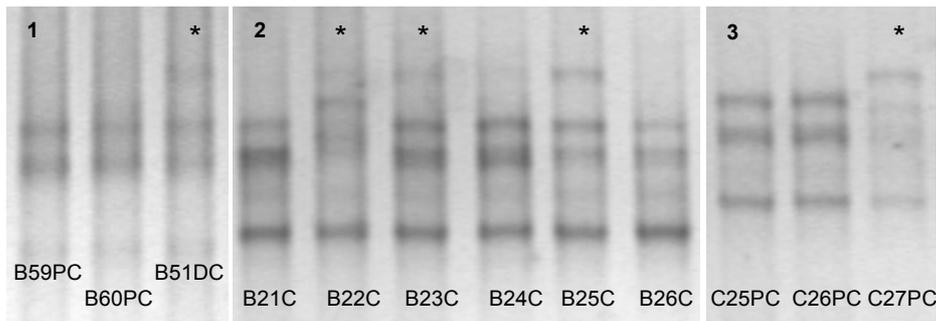


Abbildung 3.7 Ausschnitte aus SSCP-Gelen für das Fragment APC2. Die mit * gekennzeichneten Spuren zeigen jeweils die PCR-Produkte mit zusätzlich auftretenden oder verschobenen Banden. (1) Distales Kolon eines Tieres aus der Niedrig-Dosis-Gruppe nach 9 Versuchswochen (Laufunterschied B51DC); (2) Kolorektum von Tieren aus der Niedrig-Dosis-Gruppe nach 33 Versuchswochen (Laufunterschied B22C, B23C, B25C); (3) Proximales Kolon von 33 Wochen mit 0,01 % PhIP behandelten Tieren (Laufunterschied C27PC).

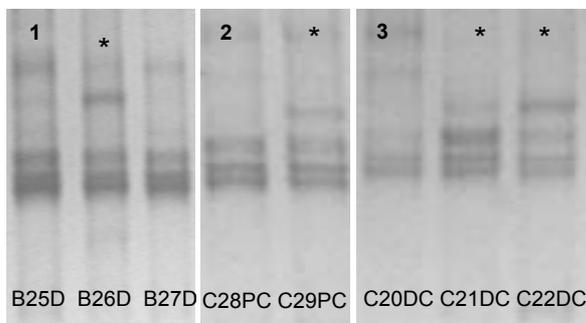


Abbildung 3.8 Beispielhafte Ausschnitte aus SSCP-Gelen für das Fragment APC4. Mit * markierte Laufunterschiede betreffen (1) den Dünndarm eines mit humanrelevanten Dosen PhIP behandelten Tieres (B27D); (2) das proximale Kolon eines mit hohen PhIP-Dosen gefütterten Tieres (C29PC); (3) das distale Kolon von ebenfalls mit hohen PhIP-Dosen gefütterten Tieren (C21DC, C22DC); nach jeweils 33 Versuchswochen. Bei allen Proben ist jeweils die obere Bande nach unten verschoben.

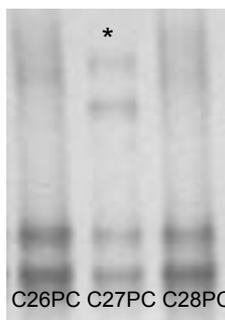


Abbildung 3.9 Exemplarischer Laufunterschied für das Fragment APC8. Die Probe mit aberrantem Laufverhalten (*), gekennzeichnet durch 2 zusätzlich auftretende Banden, entstammt dem proximalen Kolon eines mit hohen PhIP-Dosen gefütterten Tieres (C27PC) nach 33 Wochen Behandlungsdauer.

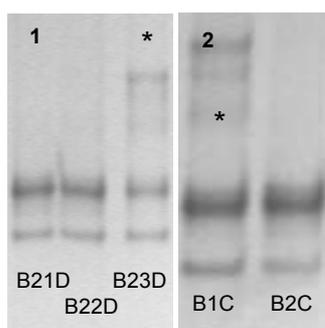


Abbildung 3.10 Beispielhafte Ausschnitte aus SSCP-Gelen für das Fragment APC11. Beide Laufunterschiede (*) sind durch zusätzlich auftretende Banden gekennzeichnet und betreffen Proben aus der mit der humanrelevanten PhIP-Dosis behandelten Tiergruppe. (1) Dünndarm eines Tieres nach 33 Versuchswochen (B23D), (2) Kolorektum eines Tieres nach 60 Versuchswochen (B1C).

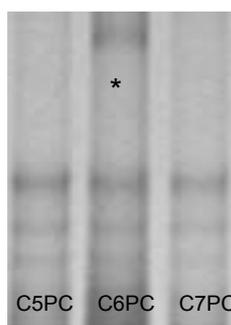


Abbildung 3.11 SSCP für das Fragment APC14. DNA aus dem proximalen Kolon eines Tieres aus der Hoch-Dosis-Gruppe nach 60 Behandlungswochen zeigt verändertes Laufverhalten in Form einer zusätzlich auftretenden Bande (*). (C6PC).

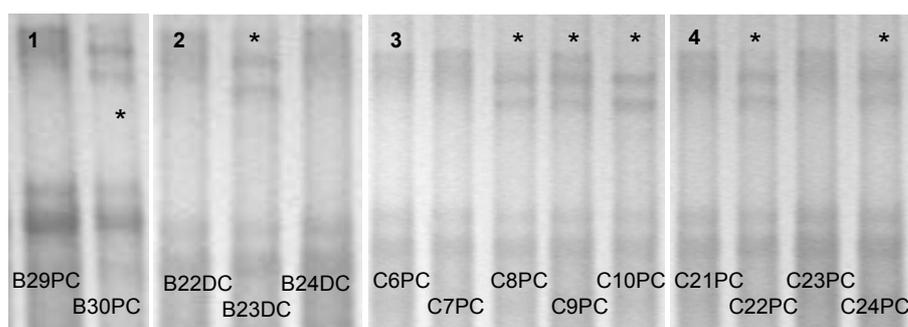


Abbildung 3.12 Ausschnitte aus SSCP-Gelen für das Fragment APC15. Die PCR-Produkte in (1) und (2) wurden aus DNA-Proben von Tieren aus der Niedrig-Dosis-Gruppe nach 33 Versuchswochen amplifiziert und zeigen jeweils eine Verschiebung der beiden oberen Banden (*). (1) Probe aus dem proximalen Kolon (B30PC). (2) Proben aus dem distalen Kolon (B23DC). (3) und (4) Die Proben sind Tieren der Hoch-Dosis-Gruppe nach 60 bzw. 33 Versuchswochen zuzuordnen und wurden aus DNA des proximalen Kolons gewonnen (C8PC, C9PC, C10OC, C22PC und C24PC).

Tabelle 3.10 Verteilung der Laufunterschiede nach untersuchten Darmabschnitten und Geweben, aufgeführt nach Tiergruppen. D-Dünndarm, DC-distales Kolon, PC-proximales Kolon, C-Kolorektum, LK-Lymphknoten.

	Tiere 51-60		Tiere 21-30			Tiere 1-10		Gesamt		
	B	C	A	B	C	B	C	B	C	Σ
D	-	-	-	8	4	9	4	17	8	25
PC	2	3	1	4	5	5	5	11	13	25
DC	1	-	-	2	12	3	-	6	12	18
C	4	-	-	4	3	2	1	10	4	14
LK	-	-	1	-	-	-	-	-	-	1
Milz	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1
Σ	7	3	2	18	24	20	10	45	37	84

Allerdings konnte für einen Teil der nach 61 Versuchswochen gewonnenen Gewebeproben aus den Gruppen B und C keine genomische DNA in für eine PCR ausreichender Qualität isoliert werden (siehe Tab. 3.9). Zusätzlich zu den Darmabschnitten wurden Proben von makroskopisch auffälligem Gewebe aus Milz, Lymphknoten, Geschlechtsorganen sowie Fett verschiedener Tiere entnommen. Laufunterschiede konnten lediglich in DNA aus der Milz eines Tieres aus der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe nach 60 Versuchswochen sowie in DNA aus dem Lymphknoten eines Tieres aus der Kontrollgruppe nach 33 Versuchswochen nachgewiesen werden. Betroffen waren davon die Fragmente APC 11 bzw. APC 13. Allerdings gelang, wie aus Tab 3.9 ersichtlich, für die auffälligen Gewebeproben der Gruppe C keine Isolierung intakter genomischer DNA. Exemplarische Laufunterschiede sind in den Abbildungen 3.6 bis 3.12 gezeigt. Da DNA-Moleküle desselben Fragments 2 und mehr Konformationen annehmen können (Liu et al., 2000; Sunnucks et al., 2000), sind in einigen Abbildungen 2 und mehr Banden sichtbar.

Tabelle 3.11 Verteilung der Laufunterschiede nach Genen und Genabschnitten.

Gen	Anzahl der Laufunterschiede							
	Tiere 51-60		Tiere 21-30			Tiere 1-10		Σ
	B	C	A	B	C	B	C	
APC 1	-	-	-	-	5	-	-	5
APC 2	6	2	-	4	2	3	-	17
APC 3	-	-	-	-	1	-	-	1
APC 4	-	-	-	2	3	-	-	5
APC 7	-	-	-	-	-	1	-	1
APC 8	-	-	-	-	1	-	-	1
APC 11	1	-	-	2	6	10	5	24
APC 13	-	-	1	-	-	1	-	2
APC 14	-	-	-	-	2	-	1	3
APC 15	-	1	1	7	3	-	3	15
β-Catenin	-	-	-	-	1	-	1	2
ki-ras	-	-	-	3	--	5	-	8
Σ	7	3	2	18	24	20	10	84

Eine auffällige Häufung von aberranten Banden war für das Fragment 11 des APC zu verzeichnen. Bei diesem Genabschnitt war auch eine Zunahme der Häufigkeit von Laufunterschieden mit zunehmender Versuchsdauer zu beobachten, ein Effekt, der sich auch bei APC 13 und Ki-ras zeigte. Ebenfalls häufig traten aberrante Banden bei APC 2 sowie APC 15 auf. Die PCR-Produkte für β -Catenin, APC 3 und APC 8 zeigten hingegen sehr wenig Laufunterschiede. Keinerlei Laufunterschiede wurden in den Genabschnitten APC 5, 6, 9, 10 und 12 beobachtet.

3.4.3 Isolierung von DNA aus SSCP-Gelen

Um für die Sequenzierung DNA in ausreichender Menge und Reinheit zu gewinnen, wurden Isolierungen aus SSCP-Gelen durchgeführt. Ein typisches Beispiel für das Ergebnis einer solchen Isolierung zeigt Abbildung 3.13.

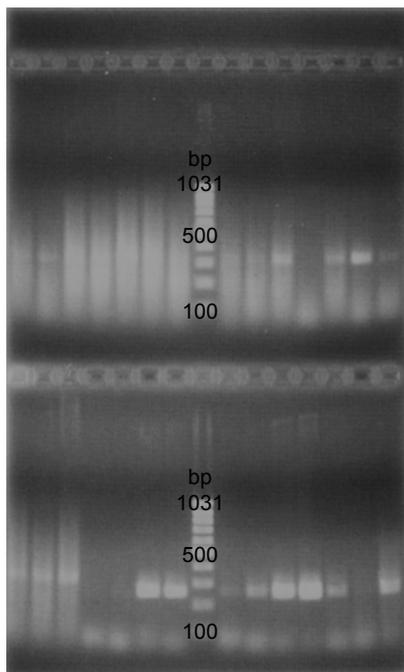


Abbildung 3.13 Typisches Ergebnis einer DNA-Isolierung aus dem SSCP-Gel mit anschließender PCR am Beispiel verschiedener Proben des Fragments APC 15. Die erwartete Produktlänge beträgt 249 bp (2 % Agarose in 1 x TAE, 100 V, 30 min Laufzeit, Basenpaar-Standard: Gene Ruler™, 100 bp DNA Ladder von FERMENTAS).

Die unmittelbar nach der Isolierung durchgeführte PCR verlief nicht für alle Isolate erfolgreich und häufig entstand nur wenig PCR-Produkt, was auf sehr geringe Mengen an isolierter DNA zurückzuführen ist. Fast alle Produkte in obiger Abbildung wiesen zudem Verunreinigungen auf, die im Gel als Schmier sichtbar waren und benötigten aus diesem Grund eine zusätzliche Reinigung durch Gelisolierung. Die Ergebnisse der Gelisolierungen sind in Tab. 3.12 im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt.

3.4.4 Sequenzierung

Von 84 aberranten Banden gelang bei 25 (30 %) eine Gelisolierung mit nachfolgender Anreicherung per PCR, in 18 Fällen konnten vom gewonnenen Probenmaterial Sequenzierungen durchgeführt werden. Sofern genug DNA vorlag, wurden jeweils Sequenzierungen mit dem *sense*- und dem *antisense*-Primer durchgeführt. Bei den nicht erfolgreich verlaufenen Sequenzierungen lag die DNA vermutlich nicht in ausreichender Menge bzw. Reinheit vor, so dass das erhaltene Sequenzierungsprofil nicht auswertbar war. Zeigte ein Sequenzierungsprofil eine mögliche Mutation an, wurde die entsprechende Sequenzierungsreaktion wenn möglich zur Bestätigung des Ergebnisses wiederholt. Als Kontrollen dienten Banden derselben Probe mit normalem Laufverhalten, deren Isolation aufgrund des höheren DNA-Gehalts in den Banden erfolgreicher verlief. Übereinstimmungen mit makroskopischen Befunden traten in 18 Fällen und mit histologischen Befunden in lediglich 2 Fällen auf. Auffällig waren Häufungen von Laufunterschieden für einzelne Tiere (z.B. B1, B3, B4 und B6; C21 und C22), die verschiedene Darmabschnitte und Fragmente betrafen.

Tabelle 3.12 Ergebnisse der durchgeführten Sequenzierungen nach Behandlungsgruppen und Geweben, mit Gen und Art der aufgetretenen Mutationen. A-Kontrollgruppe, B-0,00001 % PhIP, C-0,01 % PhIP im Futter, D-DMH-Gruppe. D-Dünndarm, DC-distales Kolon, PC-proximales Kolon, C-Kolorektrum. Übereinstimmung mit makroskopischen (M) oder histologischen (H) Ergebnissen.

Bezeichnung	Gelisolierung	Sequen-	Fragment	Mutation	
Gr. Tier Organ	erfolgreich?	zierung			
A 25 PC	ja	ja	APC 15	ATG → CTG (Met → Leu) Pos. 4623	
27 LK	nein	nein	APC 13	---	M
B 1 DC	ja	ja	APC 13	Profil nicht auswertbar	
1 C	nein	nein	APC 2	---	
1 C	nein	nein	APC 11	(Abb. 3.10) ---	
1 D	nein	nein	APC 11	---	
1 PC	ja	ja	APC 7	Profil nicht auswertbar	
1 D	nein	nein	Ki-ras	---	
2 D	nein	nein	APC 11	---	
3 D	nein	nein	Ki-ras	---	M
3 D	nein	nein	APC 11	---	M
3 PC	nein	nein	APC 11	---	M
4 Milz	nein	nein	APC 11	---	M
4 D	nein	nein	APC 11	---	M
4 DC	nein	nein	APC 2	---	
B 6 DC	nein	nein	APC 2	---	

6	D	nein	nein	Ki-ras	---	
6	PC	nein	nein	APC 11	---	
7	PC	nein	nein	APC 11	---	
9	PC	nein	nein	APC 11	---	M
9	D	nein	nein	Ki-ras	---	M
10	D	nein	nein	Ki-ras	---	
21	PC	ja	ja	APC 15	Profil nicht auswertbar	
21	D	nein	nein	APC 11	---	
22	PC	ja	ja	APC 15	Wildtyp	
22	D	ja	ja	APC 15	Profil nicht auswertbar	M
22	C	ja	nein	APC 2	(Abb. 3.7)---	
23	D	nein	nein	APC 11	(Abb. 3.10)---	
23	DC	ja	ja	APC 15	Profil nicht auswertbar (Abb. 3.11)	H
23	C	nein	nein	APC 2	(Abb. 3.7)---	
25	C	ja	nein	APC 2	(Abb. 3.7)---	
26	D	nein	nein	APC 4	(Abb. 3.8)---	
26	PC	nein	nein	APC 15	---	
26	DC	nein	nein	Ki-ras	---	
27	D	ja	ja	APC 4	Profil nicht auswertbar	M
28	D	ja	ja	APC 15	Wildtyp	
28	D	nein	nein	Ki-ras	---	
29	D	nein	nein	Ki-ras	---	
30	C	nein	nein	APC 2	---	
30	PC	nein	nein	APC 15	(Abb. 3.12)---	
51	C	nein	nein	APC 11	---	
51	PC	nein	nein	APC 2	---	
51	DC	nein	nein	APC 2	(Abb. 3.7)---	
52	C	nein	nein	APC 2	---	
53	C	nein	nein	APC 2	---	
57	C	ja	nein	APC 2	---	
60	PC	nein	nein	APC 2	---	
C	1	D	nein	nein	APC 11	---
	2	D	nein	nein	APC 11	---
	3	D	nein	nein	APC 11	---
	4	D	nein	nein	APC 11	---
	4	C	nein	nein	APC 11	---
	4	PC	ja	nein	β -Catenin	---
	6	PC	nein	nein	APC 14	(Abb. 3.11)---
	8	PC	ja	ja	APC 15	AAT \rightarrow AAA (Asn \rightarrow Lys) Pos. 4649 (Abb. 3.12)

C	9	PC	ja	ja	APC 15	CAG→ CGC(Gln→ Ala) Pos. 4600-1 AAT→ AAG (Asn→ Lys) Pos. 4649 (Abb. 3.12)	
	10	PC	ja	ja	APC 15	TTT→ TTG (Phe→ Leu) Pos. 4596 Insertion A (Frameshift) Pos. 4628 (Abb. 3.12)	
	21	DC	ja	ja	APC 4	Wildtyp (Abb. 3.8)	
	21	DC	ja	nein	APC 3	---	
	21	C	nein	nein	APC 14	---	
	21	D	nein	nein	APC 11	---	
	22	DC	nein	nein	APC 11	---	
	22	DC	nein	nein	APC 2	---	
	22	DC	ja	ja	APC 4	TTA→ CTA (Leu→ Leu) Pos. 2383 (Abb. 3.8)	
	22	PC	ja	ja	APC 15	Wildtyp (Abb. 3.12)	
	22	C	nein	nein	APC 14	---	
	22	D	nein	nein	APC 11	---	
	23	DC	nein	nein	APC 1	(Abb. 3.6) ---	
	23	DC	nein	nein	APC 11	---	
	24	PC	ja	ja	APC 15	Wildtyp (Abb. 3.12)	H
	25	DC	ja	nein	β-Catenin	---	
	25	DC	nein	nein	APC 1	---	
	27	PC	ja	nein	APC 2	(Abb. 3.7) ---	M
	27	PC	ja	ja	APC 8	Wildtyp (Abb. 3.9)	M
	28	DC	nein	nein	APC 1	---	
	29	D	nein	nein	APC 11	---	M
	29	C	nein	nein	APC 4	(Abb. 3.8) ---	
	29	DC	nein	nein	APC 1	---	
	30	C	ja	ja	APC 15	TCA→ GCA (Ser→ Ala) Pos. 4789	
	30	DC	nein	nein	APC 1	---	
	30	D	nein	nein	APC 11	---	
	56	PC	nein	nein	APC 15	---	
	57	PC	nein	nein	APC 2	---	
	58	PC	nein	nein	APC 2	---	

Es wurden 9 Mutationen bei 6 Tieren protokolliert (1 Tier Kontrollgruppe, 5 Tiere Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe). Dabei handelte es sich um 6 Transversionen, 2 Transitionen und eine Insertion, wobei bei einem Tier 2 Transversionen innerhalb eines Triplets auftraten. Eine Transition führte dabei nicht zu einem Basenaustausch, die Insertion hatte eine Verschiebung des Leserasters mit vorzeitigem Kettenabbruch zur Folge. Am häufigsten trat der Austausch eines Thymidins gegen eine andere Base, in 3 von 5 Fällen gegen Guanin, auf. Dabei waren verschiedene Positionen des APC-Gens betroffen, lediglich an Position 4649 traten bei 2 Tieren Mutationen auf, die allerdings nicht identisch waren. Die Sequenzierung der Kontrollbanden mit normalem Laufverhalten ergab ohne Ausnahme die Wildtypsequenz. Sechs der untersuchten Proben wiesen trotz abweichendem Laufverhalten die Wildtyp-Sequenz auf. Für einige weitere Proben ergaben sich Hinweise auf Mutationen, die jedoch nicht über eine weitere Sequenzierung abgesichert werden konnten.

4 Diskussion

Das heterozyklische aromatische Amin PhIP entsteht bei der Erhitzung proteinreicher Nahrungsmittel, insbesondere Fleisch, und löst in hohen Dosen Dickdarmkrebs in Ratten aus. Es steht im Verdacht, für die hohen Fallzahlen der Dickdarmkrebserkrankungen westlicher Industrienationen mitverantwortlich zu sein. Zahlreiche Studien zeigten diesen Zusammenhang, allerdings ausschließlich im Hoch-Dosis-Bereich. Aufgrund des Mangels an Daten zur Wirkung humanrelevanter Konzentrationen des PhIP zu Beginn dieser Arbeit wurde ein Fütterungsversuch mit 0,00001 % PhIP im Futter in F344-Ratten konzipiert und auf histologischer und molekularbiologischer Ebene nach Anzeichen für die Entstehung von Dickdarmkrebs gesucht. Die Aufnahme der Substanz mit der Nahrung in geringen Dosen über einen langen Zeitraum entsprach dem Expositionsweg des Menschen. Die histologische Analyse ergab, dass präneoplastische Läsionen im Dickdarm der behandelten Tiere vorhanden waren. Die Untersuchung von Dickdarmkrebs-relevanten Genen mittels SSCP erbrachte Hinweise auf Mutationen, die sich außerhalb der bekannten *Hot Spots* des *Apc*-Gens zeigten. Die Zahl der Tumoren war jedoch in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe sehr gering im Vergleich zu ähnlichen Untersuchungen mit diesem Tiermodell. In der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe traten im Versuchszeitraum gar keine Tumoren auf und die Zahl der aberranten Krypten lag deutlich unter dem Niveau der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass PhIP in humanrelevanten Dosen allein nicht für die hohen Zahlen an Kolonkrebserkrankungen des Menschen ursächlich ist.

4.1 Biometrische Beobachtungen

4.1.1 Körpergewichte

Diese Entwicklung der Tiere verlief in Übereinstimmung mit den Daten aus der wissenschaftlichen Literatur für die männliche F344-Ratte, die eine schnelle Gewichtszunahme für die ersten 17 Lebenswochen, eine verlangsamte Zunahme bis zur 77. Lebenswoche und erst dann ein konstantes Körpergewicht bzw. Gewichtsverlust beschreibt. Bei unbehandelten Männchen beträgt das durchschnittliche Körpergewicht bei einem Alter von 67 Wochen 450 g, das durchschnittliche maximale Körpergewicht 468 g (Solleveld et al., 1984). Die in diesem Versuch ermittelten finalen Körpergewichte der Tiere entsprachen diesen Beobachtungen, wobei eine Tendenz zu niedrigeren Körpergewichten bei den Behandlungsgruppen festzustellen war. Ähnliche Beobachtungen machten Ito et al. (1991), die eine verminderte Gewichtszunahme bei mit 0,04 % PhIP gefütterten F344-Ratten von der ersten Versuchswoche an fanden. Bei Versuchsende nach 52 Wochen waren die männlichen Tiere durchschnittlich 36 % leichter als die Kontrollgruppe, was auf eine verminderte Futteraufnahme zurückgeführt wurde. In einer weiteren Studie lagen die Körpergewichte von mit 0,01 % PhIP behandelten Tieren bei 97,5 % der Kontrollgruppe. Für eine ACF-Analyse wurden Tiere mit 0,04 % PhIP gefüttert, diese wiesen bereits nach 8 Wochen ein gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigtes Körpergewicht auf (Hasegawa et al., 1993). Fukushima et al. (2004) stellten bei einem relativ kurzen Versuchszeitraum von 16 Wochen unter 8 PhIP-Dosen (0,0000001, 0,000001, 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01 und 0,04 %) lediglich in der mit der höchsten Dosis gefütterten Gruppe ein zur Kontrolle signifikant erniedrigtes Körpergewicht fest.

Aufgrund dieser Daten aus der Literatur wäre für den hier gewählten Versuchsansatz lediglich für die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Gewichtszunahme zu erwarten. Die statistische Auswertung zeigte nach 60 Wochen signifikante Unterschiede in der Gewichtszunahme für beide PhIP-behandelte Gruppen im Vergleich zur Kontrolle. Überraschend war somit der Befund, dass auch die Gewichtszunahme der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe signifikant erniedrigt war. Es könnte also für beide PhIP-Gruppen von einer Wirkung der Substanz auf den Zustand des Gesamtorganismus ausgegangen werden. Eine detaillierte Analyse der Daten der 10 verwendeten Kontrolltiere ergab jedoch, dass diese bereits nach 30 Versuchswochen eine

signifikant erhöhte Gewichtszunahme im Vergleich zu anderen Kontrolltieren und Tieren der Gruppe D aufweisen (Abb. 3.2). Trotz randomisierter Einteilung der Tiere in die einzelnen Gruppen und Teilgruppen weicht die Gewichtszunahme der Kontrolltier-Teilgruppe A 1-10 signifikant von anderen Kontrolltier-Teilgruppen ab und die signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den PhIP-behandelten Tieren nach 60 Versuchswochen könnten allein auf diesen schwer erklärbaren Effekt und nicht auf die PhIP-Behandlung zurückzuführen sein. Die ebenfalls mit einem Kolonkanzerogen behandelten Tiere der Gruppe D wiesen nach 30 Versuchswochen keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gewichtszunahme auf.

4.1.2 Futtermittelaufnahme

Dieser Parameter wurde in der Literatur selten erhoben, so dass nur Vergleichsdaten von einer Studie vorliegen. Dort trat eine nicht quantifizierte verminderte Futtermittelaufnahme bei mit 0,04 % PhIP gefütterten Ratten auf (Ito et al., 1991). Für die beiden hier verfütterten PhIP-Konzentrationen (ebenso für DMH) war keine verminderte Futtermittelaufnahme, jedoch eine verminderte Gewichtszunahme bei den behandelten Tieren zu beobachten.

4.1.3 Organengewichte

Signifikante Unterschiede zwischen den Organengewichten der einzelnen Fütterungsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe sind vorhanden, jedoch treten sie nicht durchgängig für alle untersuchten Zeitpunkte bzw. Organe auf (Kapitel 3.1.3). Insofern erscheint eine Interpretation der tatsächlichen Effekte der Behandlung auf die Entwicklung der Organe unmöglich. Auch die verfügbaren Vergleichsdaten sind nicht eindeutig. Die von Hasegawa et al. (1993) durchgeführte Studie brachte keine Hinweise auf Änderungen der absoluten Leber- und Organengewichte. In einer anderen Studie traten bei einem relativ kurzen Versuchszeitraum von 16 Wochen unter 8 PhIP-Dosen (0,0000001, 0,000001, 0,00001, 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01 und 0,04 %) in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe signifikant erniedrigte Leber- und Nierengewichte auf (Fukushima et al., 2004).

4.2 Makroskopie

Bei der Sektion wurden sämtliche Organe jedes Tieres einer umfangreichen Untersuchung unterzogen, wodurch ein Überblick über den Gesamtzustand der Tiere während der gesamten Versuchsdauer gewonnen wurde. Erwartet wurde dabei das vermehrte Auftreten von Tumoren in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe sowie in der DMH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe wurde für den Fall des Auftretens von Tumoren angenommen, dass diese kleiner und in geringer Zahl vorhanden sind. Überraschend war die geringe Tumorzahl im Kolongewebe von mit 0,01 % PhIP und DMH behandelten Tieren, die deutlich niedriger ausfiel als bei anderen Arbeiten mit diesen Tiermodellen zur Induktion von Kolonkrebs (Hasegawa et al., 1993). Die Entwicklung von Tumoren über einen mehrstufigen Prozess verbunden mit der Anhäufung verschiedener Mutationen findet möglicherweise bei den hier eingesetzten Konzentrationen über einen längeren Zeitraum als den Versuchszeitraum von 60 Wochen statt. In Gruppe B wurde eine klare Übereinstimmung von einem vermehrten Auftreten makroskopischer Läsionen des Dünndarms mit einer Häufung von SSCP-Laufunterschieden der DNA aus diesem Organ festgestellt. Überraschend war das häufige Auftreten von Entzündungen des Intestinaltraktes der PhIP-behandelten Ratten. Die Kontroll- und DMH-Gruppe zeigten makroskopisch und histologisch weniger Anzeichen von Entzündungen im Gewebe. Damit ist die Induktion von Entzündungen als eine typische Folge der PhIP-Behandlung anzusehen.

4.3 Histologie

Bei der histologischen Untersuchung standen Läsionen des Dickdarms, die als Vorstufen für Karzinome gelten, im Vordergrund. Ebenfalls untersucht wurden Läsionen anderer, bei der makroskopischen Beurteilung auffälliger Organe, insbesondere der Geschlechtsorgane, da PhIP bekanntermaßen auch ein Prostata-Karzinogen ist. Zu erwarten war eine Häufung der Läsionen-Anzahl mit fortschreitender Versuchsdauer sowie mit steigender PhIP-Dosis. Da das als Positivkontrolle eingesetzte DMH auch ein Dünndarm-Karzinogen ist, könnte in der DMH-Gruppe auch der Dünndarm betroffen sein. Diese Erwartungen wurden nur bedingt bestätigt (Kap. 3.3), da lediglich ein Tumor der Geschlechtsorgane in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe und 2 Tumoren des Dickdarms in der DMH-Gruppe bestätigt wurden. Einen Überblick über Fütterungsprotokolle und Tumorzahlen in

vergleichbaren Fütterungsstudien mit PhIP gibt Tabelle 4.1. Dabei verfütterten lediglich Hasegawa et al. (1993) eine Dosis von 0,01 % PhIP, jedoch über einen wesentlich längeren Zeitraum. Das wäre eine Erklärung für die niedrige Tumorausbeute der hier durchgeführten Studie.

Tabelle 4.1 Vergleich der Fütterungsprotokolle und Tumorausbeute bei männlichen F344-Ratten

Autor	Tierzahl	PhIP-Dosis, Wochen	Tumorzahl
Ito et al., 1991	30	0,04 %, 52 Wochen	16 von 29 Tieren (Kolon)
Shirai et al., 1999	20	0,04 %, 20 Wochen + 40 Wochen PhIP-freie Diät	4 von 20 Tieren (Kolon) 11 von 20 Tieren (Prostata)
Shirai et al., 1997	30	0,04 %, 52 Wochen	18 von 27 Tieren (Prostata)
Hasegawa et al., 1993	30	0,01 %, 104 Wochen 0,0025 %, 104 Wochen	13 von 30 (43 %, Kolon) keine
Kakiuchi et al., 1995	20	0,04 %, mehr als 43 Wochen	18 Tumore in 9 Ratten

4.3.1 Veränderte Krypten

In den histologischen Schnitten der hier ausgewerteten Gewebeproben wurden zahlreiche aberrante Krypten gefunden, die in hyperplastisch und dysplastisch unterschieden wurden (Kap. 3.3). Aufgrund der Tatsache, dass für die histologische Beurteilung nur Längsschnitte vorhanden waren, konnte nicht bewertet werden, ob tatsächlich histologische ACF vorliegen, da häufig nur eine einzelne Krypte angeschnitten wurde. Einen besseren Überblick über die Anzahl der Krypten, die einen Herd bilden, hätten Schnitte quer zur Kryptenachse gegeben, die jedoch methodisch aufwändiger sind. Von besonderem Interesse ist hier die Frage, welche der beobachteten aberranten Krypten als präneoplastische Läsionen und damit als Tumorstufen einzuordnen sind.

Die Untersuchung von ACF zeigte, dass sie morphologisch sehr heterogen sind und als Sammelbegriff für eine Reihe von frühen Läsionen dienen, deren Potential zur Entwicklung einer Neoplasie sehr unterschiedlich zu bewerten ist. Als ACF werden Herde in der Kolonmukosa bezeichnet, die durch Methylenblau anfärbbar sind. Dieser Parameter wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht erhoben. ACF treten jedoch auch spontan in unbehandelten Tieren auf (Tanakamaru et al., 2001; Furukawa et al., 2002) und ihre Anzahl übersteigt die der später auftretenden Tumore. Sie unterscheiden sich bei histologischer Betrachtung in hyperplastisch und dysplastisch (Nakagama et al., 2002; Ochiai et al., 2003),

wobei ca. 25 % der PhIP-induzierten ACF als dysplastisch eingestuft wurden. Diese zeigen im Gegensatz zu hyperplastischen Krypten strukturelle Abweichungen wie gestörte Kryptenarchitektur, Becherzell-Depletion, und vergrößerte Zellkerne sowie zu 83 % Akkumulation des β -Catenin-Proteins. Das hier festgestellte Verhältnis von hyperplastischen zu dysplastischen Krypten von 4:2 für die Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe und von 9:8 für die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe weicht davon ab, was jedoch unterschiedlichen Fütterungsprotokollen und unterschiedlicher Aufarbeitung geschuldet sein kann. Dysplastische Krypten sind wie bereits erwähnt u.a. durch einen verringerten Besatz mit Becherzellen gekennzeichnet. In Übereinstimmung mit letzterem Befund ist in PhIP-induzierten Tumoren eine verminderte Expression von Mucin-Genen, deren Produkte in den Becherzellen enthalten sind, beschrieben (Fujiwara et al., 2004).

Ebenso wie ACF können Mucin-depletierte Krypten (MDF) leicht durch Färbung der Kolon-Oberfläche visualisiert werden. Sie wurden erstmalig von Caderni et al. (2003) im Kolon AOM-behandelter Ratten nach Alzianblau-Färbung beschrieben und sind durch fehlende oder stark verminderte Mucin-Produktion, veränderte Expression des β -Catenin-Proteins und Mutationen im β -Catenin-Gen gekennzeichnet (Femia et al., 2005). Dysplastische ACF und MDF teilen nicht nur die vermehrte Akumulation des β -Catenin-Proteins in den Kryptenzellen im Vergleich zu makroskopischen ACF, sondern treten auch in geringerer Anzahl auf, die sich eher mit den zu späteren Zeitpunkten beobachteten Tumorzahlen korrelieren lassen als ACF-Zahlen. Aufgrund dieser Eigenschaften werden sie als präneoplastische Läsionen und wahrscheinlichere Tumorstufen eingestuft. Das Auftreten von MDF nach PhIP-Behandlung ist noch nicht nachgewiesen, aber die hier in dysplastischen Krypten beobachtete Depletion der Becherzellen entspricht im mikroskopischen Bild den bei Caderni et al. (2003) im histologischen Schnitt gezeigten MDF.

β -Catenin-akkumulierende Krypten (BCAC) sind im Gegensatz zu ACF und MDF nur in histologischen Schnitten nachweisbar und durch Akkumulation des β -Catenin-Proteins in Zellplasma und -kern und Häufung von Mutationen im β -Catenin-Gen gekennzeichnet (Yamada et al., 2000). Weiterhin auffällig ist das Auftreten von Paneth-Zellen innerhalb der BCAC (Yamada et al., 2001). Da in den hier untersuchten Gewebeproben Paneth-Zell-Metaplasien auftraten, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den betroffenen Krypten um BCAC handeln

könnte. Eine Bestätigung dieser Vermutung durch eine β -Catenin-Färbung war aufgrund des hier verwendeten Fixierungsprotokolls der Gewebeschnitte nicht möglich. Paneth-Zell-Metaplasien traten auch in der DMH-Gruppe auf. Aufgrund der genannten Eigenschaften wird BCAC ebenfalls neoplastisches Potential zugesprochen (zusammengefasst von Mori et al., 2005), zumal β -Catenin in Adenomen zu einem größeren Prozentsatz mutiert vorliegt als in ACF und infolge dessen eine Mutation in diesem Gen die Entwicklung von Vorläuferläsionen zu Tumoren zu begünstigen scheint (Tsukamoto et al., 2000). Untersuchungen zur Wirkung des selektiven COX-2-Hemmers Celecoxib bei AOM-behandelten Ratten zeigten, dass die Bildung von ACF und BCAC unterdrückt wird. Der hemmende Effekt war dabei für die BCAC stärker als für ACF (Yamada et al., 2001). Da andere COX-Hemmer (Nichtsteroidale Entzündungshemmer, z.B. Aspirin, Sulindac) eine protektive Wirkung auf die Entwicklung von Kolonkrebs bei Nagern und Menschen haben (zusammengefasst von DuBois und Smalley, 1996), ist die verstärkte Hemmung der BCAC ein weiterer Hinweis dafür, dass sie als präneoplastische Läsionen eine wichtige Rolle bei der Dickdarmkrebsentstehung spielen.

Somit weisen die in der Literatur erwähnten aberranten Krypten verschiedene Gemeinsamkeiten auf, inwiefern sich jedoch Überschneidungen bzw. Übereinstimmungen ergeben, lässt sich aufgrund der unterschiedlichen Methoden der Gewebeaufarbeitung schwer bestimmen. Yoshimi et al. (2004) untersuchten zur Klärung dieser Frage Dickdärme DMH-behandelter Ratten sowohl makroskopisch mit Alzianblau- und Methylenblau-Färbung als auch histologisch an HE-gefärbten Schnitten. Es konnte eine Überlappung zwischen dysplastischen ACF und MDF festgestellt werden. Des Weiteren wiesen jeweils ein großer Teil dieser überlappenden Läsionen sowie der MDF im histologischen Schnitt eine Akkumulation des β -Catenin-Proteins auf und sind folglich als BCAC einzustufen. Zusammenfassend können Dysplasie, Akkumulation des β -Catenin-Proteins und Mutation des β -Catenin-Gens als entscheidende Kriterien für präneoplastische Herde des Kolons herausgestellt werden. Dysplastische Krypten traten bei beiden PhIP-Behandlungsgruppen und der DMH-Gruppe auf. Akkumulation des β -Catenin-Proteins konnte nicht untersucht werden und SSCP-Laufunterschiede des β -Catenin-Gens traten selten auf, jedoch waren gelegentlich Paneth-Zellen am Grund dysplastischer Krypten zu beobachten.

4.3.2 Entzündungen

Bei der makroskopischen Beurteilung der beiden PhIP-Fütterungsgruppen wurden zahlreiche Entzündungen protokolliert (Kap. 3.2). Diese Beobachtung konnte durch die histologische Untersuchung bestätigt werden (Kap. 3.3). Makroskopisch wurden für die Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe mehr Entzündungen protokolliert, die histologische Begutachtung zeigte jedoch mehr Entzündungen für die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe. Führt man makroskopische und histologische Ergebnisse zusammen, sind die Zahlen für beide Gruppen gleich, da es für die Niedrig-Dosis-Gruppe eine bzw. für die Hoch-Dosis-Gruppe zwei übereinstimmende Befunde gab.

Eine Vermehrung des Gewebes zwischen den Krypten, hier als „vermehrtes Stroma“ bezeichnet, tritt in Übereinstimmung mit der Literatur sowohl bei dysplastischen als auch bei hyperplastischen Krypten auf (Nakagama et al., 2002). Zusätzlich ist eine Infiltration der Kryptenzwischenräume mit Entzündungszellen zu beobachten (Abb. 3.5). Dieser Befund könnte auf eine Enteritis und somit ebenfalls auf eine Entzündung hinweisen. Ebenfalls Folge einer Entzündung könnte die unregelmäßige Kriptenarchitektur ohne Veränderung der Zellzusammensetzung sein. Dies ist nicht als Präneoplasie zu werten, könnte aber ein Vorstadium zu einer solchen sein.

Die Literatur bietet wenig Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen PhIP und Entzündungen. In Herzen von PhIP-behandelten F344-Ratten wurden Bereiche chronischer Entzündung gefunden (Davis et al., 1994, siehe auch Kap. 4.6). Eine Genexpressionsanalyse von PhIP-induzierten Kolontumoren der F344-Ratte ergab eine Überexpression von Genen, deren Produkte an Entzündungsreaktionen beteiligt sind, wie z.B. Interleukin 1-beta (Fujiwara et al., 2004). Das Auftreten von Entzündungen nach Fütterung mit PhIP in zwei verschiedenen Dosen ist somit hier zum ersten Mal beobachtet worden.

4.3.3 Paneth-Zellen

Überraschend war das Auftreten von Paneth-Zellen am Grund von dysplastischen Krypten des Dickdarms. Paneth-Zell-Metaplasien traten bei der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe und der DMH-Gruppe auf (Abb. 3.5). Paneth-Zellen kommen bei Ratten und auch beim Menschen normalerweise nur im Dünndarm und im Coecum vor. Paneth-Zell-Metaplasie im Kolon ist als pathologischer Befund zu werten, da die

Paneth-Zellen aus den Stammzellen in den Krypten hervorgehen und ihr Auftreten im Dickdarm auf eine Fehldifferenzierung von Kolonstammzellen hinweist (Fujiwara et al., 2004). Es handelt sich um sekretorische Zellen mit charakteristischen Granula, die Defensine, Lysozyme Phospholipase A2 und Matrilysine (Matrix-Metalloproteasen, MMP) enthalten. Diese Sekrete werden ins Darmlumen sezerniert und haben antibakterielle Wirkung. Die Defensine (auch Cryptidine genannt) gehören zu einer Gruppe kleiner Peptide mit antimikrobieller Aktivität. Diese Kanalproteine werden in die Zellwände der Mikroorganismen eingebaut und depolarisieren diese, wodurch die Mikroben sterben. Entgegen früherer Annahmen werden bestimmte Defensine auch in benachbarte Kryptenzellen integriert und lösen dort über einen unbekanntem Mechanismus eine langsame Aktivierung von NF- κ B und p38 MAPK und damit eine Entzündungsantwort aus (Lin et al., 2004). Für *Apc^{Min}*-Mäuse wurde eine Verringerung des Connexin-Gehaltes der Paneth-Zellen des Dünndarms mit nachfolgender verstärkter Sekretion von Matrilysin und erhöhter Adenomzahl im Dünndarm gezeigt (Husoy et al., 2004). Eine Dysregulation von Paneth-Zellen bzw. ihr Auftreten im Dickdarm kann somit an der Entstehung einer Entzündung beteiligt sein. Sowohl Entzündungen als auch Paneth-Zell-Metaplasien wurden makroskopisch und histologisch vermehrt bei den mit PhIP behandelten Tieren beobachtet. Fujiwara et al. (2004) konnten zeigen, dass Gene für Defensine und Matrilysine, deren Expression charakteristisch für Paneth-Zellen ist, in Kolontumoren von PhIP-behandelten Ratten überexprimiert werden und dass in Tumoren und dysplastischen ACF Paneth-Zellen auftreten. Gleichzeitig wurde eine Überexpression von Genen, deren Produkte bei Entzündungsreaktionen eine Rolle spielen, nachgewiesen. Damit könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Entzündung und Paneth-Zellen bei den PhIP-behandelten Tieren bestehen. Als Ursache für die Fehldifferenzierung von Kryptenstammzellen in Paneth-Zellen wird eine Aktivierung des Wnt-Signaltransduktionsweges diskutiert (Kielman et al., 2002). Dies würde mit dem Auftreten von Paneth-Zellen in BCAC übereinstimmen. Der Zusammenhang zwischen dauerhaftem Wnt-Signaltransduktionsweg, verstärkter Sekretion von Matrilysin und Dickdarmkrebs ist auch für den Menschen nachgewiesen (Brabletz et al., 1999). Da die hier gefundenen dysplastischen Krypten mit den in der Literatur beschriebenen übereinstimmen, sind sie als präneoplastische Läsionen mit dem

Potential zur Tumorentwicklung einzustufen. Das Auftreten von Becherzell-Depletion und Paneth-Zell-Metaplasien läßt außerdem vermuten, dass zumindest ein Teil der dysplastischen Krypten als MDF oder BCAC eingestuft werden könnten. Diese Vermutung konnte jedoch weder über die immunhistochemische Färbung noch über die Mutationsanalyse des β -Catenin-Gens bestätigt werden.

4.3.4 Andere Organe

Das PhIP-induzierte Auftreten von Läsionen der Geschlechtsorgane, insbesondere der Prostata, ist aus der Literatur bekannt (Shirai et al., 1997). In Konzentrationen von 0,04 % über 52 Wochen verabreicht wurden bei 18 von 27 Tieren (67 %) Karzinome der Prostata festgestellt. In der vorliegenden Arbeit entwickelten lediglich 2 Tiere aus der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe Läsionen, eine Hyperplasie und ein Karzinom unbekanntes Ursprungs in Samenstrang-lokalisierung. Beim Vergleich von mit 0, 0,0025 und 0,01 % PhIP über 104 Wochen behandelten Tieren entwickelten ca. 30 % der Tiere jeder Gruppe Prostatakarzinome und ca. 90 % Intestinalzelltumore der Hoden (Hasegawa et al., 1993). Letztere treten allerdings in vergleichbaren Zahlen spontan auf; historische Kontrolldaten geben Werte zwischen 80,5 % (Goodman et al., 1979) und 95,6 % (Solleveld et al., 1984) an. Die Studie zeigt jedoch kaum Unterschiede zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppen, wodurch der Vergleich mit den hier erzielten Ergebnissen schwierig ist. Die Kontrollgruppe sowie die Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe in diesem Fütterungsversuch wiesen keinerlei Läsionen der Prostata auf, was zum Teil der um 44 Wochen kürzeren Versuchsdauer geschuldet sein kann. Spontane Tumore der Prostata traten mit 0,17 % (Goodman et al., 1979) bzw. 0,6 % (Solleveld et al., 1984) extrem selten auf.

4.3.5 Methodische Limitierungen

Die analysierten histologischen Schnitte zeigen die Morphologie der induzierten Läsionen und eine Tendenz ihrer Häufigkeit an. Aufgrund der Art der Probengewinnung liegen jedoch keine absoluten Zahlen von Läsionen für jedes Tier vor. Die Darmabschnitte für DNA-Gewinnung und Histologie wurden zufällig von einem Darm entnommen, so dass ein Teil der Läsionen und Mutationen vermutlich nicht erfasst wurde. Die einzige Möglichkeit, diesen Umstand zu beseitigen, wäre gewesen, den Versuch 2- bzw. 3-strängig laufen zu lassen (d.h.

jeweils ein Tier pro Zeitpunkt und Gruppe für die DNA-Gewinnung, die histologischen Schnitte bzw. die eventuelle ACF-Zählung durch Methylenblau-Färbung einzusetzen). Dies war jedoch aufgrund der ohnehin schon hohen Ausgangstierzahl nicht möglich. Der statistische Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen den Fütterungsgruppen ist nicht möglich, da aufgrund oben beschriebener Limitierung absolute Zahlen für die untersuchten Läsionen nicht vorliegen.

4.3.6 Mögliche Ursachen für die geringen Tumorraten

Obwohl frühe präneoplastische Läsionen im histologischen Schnitt diagnostiziert wurden, traten Tumore im Gegensatz zu vergleichbaren Studien (Tab. 4.1) sehr selten auf. Welches könnten die Ursachen dafür sein, dass sich die induzierten präneoplastischen Läsionen nicht zu Tumoren weiterentwickelten?

Die Substanzwirkung scheint generell geringer ausgefallen zu sein, da kein Tier aus den PhIP-Gruppen vorzeitig verstarb. Dies könnte an der mit 60 Wochen relativ kurzen Versuchsdauer liegen. Hasegawa et al. (1993) fütterten männliche F344-Ratten mit 0,01 und 0,0025 % PhIP im Futter und beobachteten für die hohe Dosis eine Spontanodesrate von 5 % ab der 58. Versuchswoche, die nach der 66. Versuchswoche auf 10 % anstieg und bei Versuchsende nach 104 Wochen bei 70 % lag. Für die niedrigere Dosis traten erst nach 78 Versuchswochen Todesfälle auf, nach 104 Wochen lag die Rate bei 30 %.

Das geringe Auftreten von Tumoren in der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe der hier dargestellten Untersuchung war überraschend. Ein Grund dafür könnte wiederum die mit 60 Wochen kürzere Versuchsdauer sein, die vielleicht nicht ausreichend war, um Tumore zu induzieren oder diese auf sichtbare Größe wachsen zu lassen. Jedoch kommen eine Reihe weiterer Gründe für die Abweichungen von vergleichbaren Fütterungsstudien in Frage. Eine interessante Beobachtung den Tierstamm betreffend machten Xu et al. (1999). Bei der Fütterung von F344-Ratten von zwei verschiedenen Züchtern mit IQ nach dem gleichen Protokoll entwickelten die Tiere eines Züchters eine bis zu 4-fach höhere Anzahl an ACF. Ratten, die dem gleichen Stamm angehören, aber von unterschiedlichen Züchtern bezogen werden, können demzufolge in ihrer Reaktion auf toxische Substanzen sehr variabel reagieren. Der Großteil der hier zitierten Vergleichsstudien wurde in Japan mit Tieren von dortigen Züchtern durchgeführt, die sich möglicherweise

trotz der Zugehörigkeit zum selben Stamm erheblich von den in Deutschland erworbenen unterscheiden.

Ähnliches beobachtete Haseman (1983) beim Vergleich der Spontantumorraten von Kontrolltieren (F344-Ratten) von 25 an 4 verschiedenen Laboratorien durchgeführten Studien, die erhebliche Unterschiede in den Tumorinzidenzen innerhalb eines Labors bzw. zwischen den Laboren zeigten. Ob alle Tiere dieser 25 Studien vom selben Züchter bezogen wurden, ist nicht angegeben. Selbst unter standardisierten Haltungsbedingungen können also unbekannte Faktoren einen Einfluss auf die Versuchstiere und damit den Ausgang einer Studie nehmen. Die Ratten der vorliegenden Studie hatten durch die Barriere-Haltung im SPF-Bereich ausschließlich Kontakt zu autoklavierten Materialien. Im Gegensatz zu Tieren aus konventioneller Haltung ist anzunehmen, dass die Tiere mit weniger Bakterien und Viren in Kontakt kamen. Es handelte sich zwar nicht um keimfreie Ratten, womöglich ist aber durch die sehr hygienischen Bedingungen die Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota verändert. Diese veränderte Mikrobiota könnte einen Einfluß auf die Entstehung von Läsionen des Darms ausüben. Hollnagel (2004) fand beispielsweise bei keimfreien Tieren ein um bis zu 40 % verringertes PhIP-DNA-Addukt-Niveau in Darm sowie Prostata. Diese Beobachtung deutet auf eine Interaktion der Substanz mit der Mikrobiota hin.

Möglicherweise wurde das PhIP auch auf unterschiedliche Weise gelöst und dem Futter beigemischt, worüber allerdings in der Literatur keine Angaben zu finden sind. Möglicherweise wies das in den japanischen Fütterungsstudien standardmäßig verabreichte Futter eine andere Zusammensetzung, etwa in Bezug auf Ballaststoffe und Vitamine, auf. Die Vitaminangaben in Deutschland beziehen sich auf die mindestens enthaltene Vitaminmenge, also die Menge, die auch nach längerer Lagerung oder Autoklavieren noch enthalten ist. Diese Angaben können daher deutlich überschritten werden, weshalb hier ein unbeabsichtigter protektiver Effekt aufgetreten sein könnte. Ähnliches wurde von Lehr et al. (1999) bei Versuchen zu Vitamin E und reaktiven Sauerstoffspezies beobachtet. Beim Vergleich von Tiermodellen für verschiedene Krankheiten wie Herzinfarkt oder Diabetes und verschiedenen Vitamin E-Konzentrationen im Futter wurden für die regulär in Deutschland im Tierfutter enthaltenen Mengen an Vitamin E die untersuchten Krankheiten häufig gar nicht oder in milderer Ausprägung beobachtet. Dies wurde auf die protektive Wirkung des Vitamin E zurückgeführt,

welches von Versuchstieren im Vergleich zu Artgenossen in der freien Wildbahn und zum Menschen in wesentlich höheren Dosen aufgenommen wird. Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Diäten sind die Ergebnisse aus Tierversuchen, die in verschiedenen Ländern durchgeführt wurden, nur noch schwer reproduzierbar und vergleichbar. Es gibt Hinweise auf einen protektiven Effekt des Vitamin E auf die KolonkrebSENTSTEHUNG (Exon et al., 2004). Weitere unbeabsichtigt protektive Effekte könnten durch die Verwendung von Pflanzenöl als PhIP-Lösungsmittel durch seinen Anteil an ungesättigten Fettsäuren (Kap. 4.6) und seine Anreicherung mit Vitamin E entstanden sein. Folsäure, ein Vitamin der B-Gruppe, ist ein weiterer Nahrungsbestandteil, der aufgrund epidemiologischer Studien invers mit dem Risiko einer KolonkrebSENTSTEHUNG assoziiert ist (Giovannucci et al., 1993). Dem Tierfutter waren von Seiten des Herstellers 3 mg Folsäure pro kg zugesetzt.

4.4 Verteilung der Laufunterschiede SSCP

Zeigt die im SSCP-Gel aufgetrennte DNA ein von der Wildtyp-DNA abweichendes Laufverhalten, so ist dies ein Hinweis auf eine veränderte Basensequenz und folglich auf eine Mutation. Zu erwarten war eine Häufung solcher Laufunterschiede in den Proben der Behandlungsgruppen gegenüber den Kontrollproben, eine zusätzliche Häufung für die Proben der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe, eine Zunahme an Laufunterschieden mit fortschreitender Versuchsdauer, das Auftreten von aberranten Banden in DNA, die aus veränderten Gewebeproben gewonnen wurde und eine Häufung an aberranten Banden in PCR-Produkten, die bekannte *Hot Spots* enthalten.

Die Häufung von Laufunterschieden in der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe entsprach nicht den Erwartungen (Kap. 3.4.2). Betrachtet man den Versuchsverlauf, so zeigten lediglich die nach 33 Versuchswochen gewonnenen Gewebeproben die erwartete Häufung für die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe. Für diesen Termin fällt ebenfalls auf, dass hier mit 44 (52 %) mehr als die Hälfte aller beobachteten Laufunterschiede auftraten, die wenigsten wurden aber mit 10 (12 %) nach 9 Versuchswochen gefunden, was den Erwartungen entsprach. Auf den letzten Termin nach 60 Versuchswochen entfielen 30 (36 %) der aberranten Banden.

Ebenfalls auffällig war die Häufung aberranter Banden im Dünndarm, ein Gewebe, welches aufgrund der Dickdarm-spezifischen Wirkung des PhIP als

Kontrollgewebe gewählt wurde und genauso viele Laufunterschiede zeigte wie das proximale Kolon. Dies stimmt mit der makroskopisch beobachteten Häufung von Veränderungen des Dünndarms für beide PhIP-Fütterungsgruppen überein (Kap. 3.2.2 und 3.3.3). Im Gegensatz dazu zeigte die histologische Untersuchung eine geringe Anzahl von Läsionen im Dünndarm (Kap. 3.3.2 und 3.3.3). Die Sequenzierungsergebnisse ergaben, dass hier keine Mutationen nachweisbar waren.

Die zusätzlich entnommenen Gewebeproben zeigten auffällig wenige Laufunterschiede. Betrachtet man die histologischen Ergebnisse, so fallen besonders zwei Proben der Geschlechtsorgane von Tieren aus der Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe nach 60 Versuchswochen auf, die ein Karzinom bzw. eine Hyperplasie aufwiesen, die in der SSCP jedoch durchgängig negative Ergebnisse zeigten. Für diese Proben können Mutationen nicht ausgeschlossen werden, da die SSCP-Analyse aufgrund nicht intakter DNA für diese Proben nicht durchgeführt werden konnte.

Die drei aus der Literatur bekannten *Hot Spots* des *Apc*-Gens (Kakiuchi et al., 1995) betreffen die PCR-Fragmente APC 1, 2, 5, 6 und 13, wobei aufgrund der überlappenden Primer-Anordnung (Abb. 2.2) die Fragmente 1 und 2 sowie 5 und 6 jeweils denselben *Hot Spot* beinhalten. Eine Häufung an Laufunterschieden in diesen Abschnitten konnte für APC 2 festgestellt werden, wobei die Häufigkeit mit fortschreitender Versuchsdauer abnahm. Für Fragment 13 waren lediglich 2 Laufunterschiede und in den Fragmenten 5 und 6 keinerlei Laufunterschiede zu beobachten. Die Anzahl aberranter Banden für Ki-ras bewegte sich im mittleren Bereich. Damit wich die Häufigkeit von Laufunterschieden in bestimmten Fragmenten deutlich von den theoretisch zu erwartenden ab. Möglicherweise ergab sich hier aufgrund anderer Versuchsbedingungen (Kap. 4.3.6) als in den Vergleichsstudien auch eine Verschiebung im Mutationsspektrum. In den hier genauer analysierten aberranten Banden ließen sich jedoch keine *Hot Spots* feststellen, vielmehr waren die Mutationen zufällig verteilt.

Abschließend lässt sich feststellen, dass 84 veränderte Banden in der Gesamtzahl der untersuchten Proben nur einen geringen Anteil ausmachen und somit die SSCP-Analyse möglicherweise nicht ausreichend sensitiv ist, wenn wenig verändertes DNA-Material in einer Probe vorliegt. Die SSCP-Methode weist darüber hinaus weitere methodische Limitierungen auf.

Die SSCP ist eine empirische Methode, da es (noch) keine Möglichkeit gibt, die Sekundärstruktur einzelsträngiger DNA unter einer bestimmten Bedingung und folglich ihr Laufverhalten vorherzusagen. Deshalb ist es auch nicht möglich, die optimalen Laufbedingungen, unter denen eine Mutation zu einem Laufunterschied führt, im Vorfeld festzulegen. Die verschiedenen Laufbedingungen müssen empirisch getestet werden, wenn man in einem bestimmten DNA-Abschnitt eine Mutation vermutet. Insofern steigt die Aussagekraft mit der Zahl der verwendeten Bedingungen. Hier erfolgte die Analyse aus Zeitgründen jedoch nur unter einer Bedingung. Es wäre also möglich, dass die Zahl der entdeckten Mutationen bei Analyse mit einer zweiten oder dritten Laufbedingung bzw. speziellen Bedingungen für jedes untersuchte Fragment steigen könnte (zusammengefasst von Hayashi und Yandell, 1993). Im Gegensatz dazu fanden Sheffield et al. (1993) durch eine zweite Laufbedingung nur eine minimale Steigerung der Detektionseffizienz. Eine weitere Limitierung stellt die Anzahl der untersuchten Gene dar. Für Dickdarmkrebs sind eine Reihe weiterer Mutationen in verschiedenen Genen beschrieben, die für eine Analyse mittels PCR-SSCP geeignet sind. Dazu gehören z.B. *p53*, verschiedene Gene des MMR-Systems und SMAD. *p53* wurde hier nicht untersucht, weil es nicht zu den Zielgenen der PhIP-vermittelten Mutagenese gehört (Makino et al., 1994; Shen et al., 1998).

Falsche oder nicht eindeutige Ergebnisse können auch durch die Tatsache erhalten werden, dass ein denaturierter DNA-Strang mehrere Konformationen annehmen kann. Auf dem Gel erscheinen dann pro Doppelstrang mehr als 2 Banden (Liu et al., 2000; Sunnucks et al., 2000). Möglicherweise gab es hier Abweichungen im Bandenmuster der Proben eines Fragments, z.B. durch unterschiedliche DNA-Konzentrationen, die fälschlicherweise als Laufunterschied interpretiert wurden. Das könnte eine Erklärung für das trotz Wildtyp-Sequenz abweichende Laufverhalten einiger Proben sein (Kap. 3.4.4).

Unter Sensitivität versteht man den Anteil an mutierter DNA, der aus dem Überschuss an unveränderter DNA mit dieser Methode als mutiert erkannt werden kann. Dazu lassen sich in der Literatur wenige Angaben finden. Die meisten Arbeiten, die diese Methode anwendeten, untersuchten jedoch Tumormaterial, welches die mutierten Gene zu einem hohen Anteil enthalten sollte. Ein Teil der in frühen Läsionen vorhandenen Mutationen könnte unter die Detektionsgrenze gefallen sein. Hier muß allerdings auch die Detektion der DNA im Gel

berücksichtigt werden. Für die hier verwendete Silberfärbung wird eine Sensitivität von 0,03 ng DNA/mm² Gel angegeben (Sambrook und Russell, 2001). Wenn also der Anteil der mutierten DNA sehr gering ist, könnte diese aufgrund der Silberfärbung nicht mehr detektiert werden.

Für die geplante Übertragung des hier verfolgten Ansatzes auf einen Früherkennungstest beim Menschen muss berücksichtigt werden, dass es sich bei dem hier verwendete Tiermodell um einen Inzuchtstamm handelt, dessen Individuen in 99 % ihrer Merkmale homozygot sind. Das bedeutet, dass bei der elektrophoretischen Auftrennung von einzelsträngiger DNA dieser Tiere so gut wie immer Doppelbanden (Homozygote) und sehr selten Vierfachbanden (Heterozygote) auftreten (siehe Abb. 2.7). Für den Menschen ist der genetische Hintergrund jedoch variabler. Für Patienten müßte deshalb als Kontrolle immer DNA aus Blut oder Mundschleimhaut parallel zur Fäzes-DNA untersucht werden.

4.5 Sequenzierungs-Muster

Die Sequenzierung eignet sich hervorragend, um die genaue Art einer Mutation zu klären, allerdings nur, wenn diese in der Template-DNA mindestens im Verhältnis 1:1 vorliegt. Dies wäre der Fall bei einer heterozygoten Probe. Liegt der Anteil an mutierter DNA unterhalb dieses Bereichs, so wird das Sequenzierungsprofil dem der Wildtyp-DNA entsprechen. Mutierte DNA kann zwar mit Hilfe der SSCP elektrophoretisch von einem Überschuß an Wildtyp-DNA getrennt werden. Zur Aufklärung der genauen Art dieser potentiellen Mutation kann man jedoch nicht das PCR-Produkt sequenzieren, sondern muss die DNA der aberranten Banden aus dem Gel isolieren und mittels PCR amplifizieren, um eine ausreichende Menge an „reiner“ mutierter DNA zu erhalten. Diese Prozedur gelingt jedoch häufig nicht. Für viele Proben kann deshalb nur die Aussage getroffen werden, dass aufgrund eines in der SSCP aufgetretenen Laufunterschiedes eine Mutation in einem bestimmten Fragment vorliegt. Art und Ort einer Mutation kann jedoch aufgrund der oben genannten methodischen Beschränkungen nicht über eine Sequenzierung spezifiziert werden.

Bei der Untersuchung der „*mutation cluster region*“ in Exon 14 und der 5'-Hälfte des Exons 15 des *Apc*-Gens, bei der als Fingerprint-Mutation für PhIP die Deletion eines Guanins aus einer 5'-GGGA-3'-Sequenz auftritt, wurden mit Hilfe der Sequenzierung 8 Mutationen spezifiziert. Dabei entsprach keine dieser Mutationen

den Fingerprint-Mutationen. Ebenso konnte für die beobachteten Mutationen kein *Hot Spot* ausgemacht werden. Lediglich an einer Position des *Apc*-Gens traten 2 Mutationen bei verschiedenen Tieren auf, diese hatten jedoch nicht denselben Basenaustausch zur Folge. Das häufigere Auftreten von Transversionen zeigt jedoch an, dass die Mutationen auf einer tatsächlichen Substanzwirkung beruhen, da der Austausch von Pyrimidin und Purin im Gegensatz zu Transitionen selten spontan auftritt. Auffällig ist ebenfalls, dass häufig Thymidin und Adenin, Guanin, die Base mit der PhIP Addukte bildet, jedoch nur einmal betroffen war. Eine Analyse der umliegenden Sequenzen jeder Mutation ergab keine Auffälligkeiten, lediglich bei einer Mutation war ein Guanin unmittelbar zur betroffenen Base benachbart. Zusätzlich wurde bei der Fütterung von PhIP in Verbindung mit einer fettreichen Diät eine G→T Transversion im Exon 10 beobachtet (Ubagai et al., 2002). Diese Region im *Apc*-Gen wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da jedoch Pflanzenöl als Lösungsmittel für PhIP eingesetzt wurde, könnten zusätzliche Mutationen dort aufgetreten sein.

Aus Analysen aberranter Krypten ist bekannt, dass die Akkumulation des β -Catenin-Proteins häufiger auftritt als Mutationen des β -Catenin-Gens (Femia et al., 2005; Ochiai et al., 2003). Die Akkumulation des Proteins in Zytoplasma tritt auch auf, wenn andere Komponenten des Wnt-Signaltransduktionsweges mutiert sind. Möglicherweise erklärt sich die geringe Zahl an Laufunterschieden und Mutationen des β -Catenin-Gens mit dem Auftreten von Mutationen in anderen, hier nicht untersuchten Genen dieses Signaltransduktionsweges. Bei den gehäuft auftretenden Laufunterschieden der Niedrig-Dosis-PhIP-Gruppe und außerhalb der *Hot Spots* könnte es sich auch um Ansammlungen zufälliger Mutationen handeln, die jedoch für den Prozeß der Dickdarmkrebsentstehung keine Rolle spielen. Solche willkürlich verteilten Mutationen treten in frühen Läsionen häufiger auf. In Untersuchungen zu den Mutationsspektren von PhIP und IQ mit dem *supF* Shuttle Vector-System konnte gezeigt werden, dass diese sich in Reparatur-profizienten und -defizienten Zelllinien unterscheiden (Endo et al., 1994). In Gewebeproben mit zusätzlich mutierten Reparaturgenen, die hier allerdings nicht untersucht wurden, wäre auf der Annahme beruhend, dass zahlreiche Mutationen nicht repariert werden, ein abweichendes Mutationsspektrum möglich. In MMR-defizienten Kolonkrebs-Zelllinien änderte sich nach PhIP-Behandlung jedoch nicht

das Mutationsspektrum, sondern lediglich die Mutationshäufigkeit (Glaab et al., 2000).

Eine Möglichkeit, die anfangs erwähnten methodischen Limitierungen zu umgehen, wäre die Anreicherung einer bestimmten DNA-Population mittels Klonierung gewesen. Bei dieser Methode wird das zu sequenzierende DNA-Fragment in Bakterien eingebracht und von diesen amplifiziert. Allerdings ist fraglich, ob das Ausgangsmaterial nicht auch für diese Methode in zu geringen Mengen und zu geringer Reinheit vorlag. Außerdem ist die Klonierung sehr zeitaufwändig. Es gibt eine Reihe weiterer Methoden zur DNA-Isolierung aus SSCP-Gelen (wie Eluierung über Säulen oder Elektroelution), die möglicherweise Ausbeute und Reinheit erhöhen könnten (zusammengefasst von Kurien und Scofield, 2002). Allerdings zeigten diese Methoden in Vorversuchen keine besseren Ergebnisse. In Bezug auf die Detektion von Mutationen in DNA-Gemischen muß man deshalb davon ausgehen, dass die SSCP die sensitivere Methode darstellt (Tucker et al., 2003; Hongyo et al., 1993).

Eine weitere Fehlerquelle könnte auf PCR, die einige Proben im Vorfeld der Sequenzierung bis zu 3-mal durchliefen, zurückzuführen sein. Mutationen, die nicht auf einer Substanzwirkung beruhen, können durch Taq-Polymerase bedingte Basenfehlpaarungen hervorgerufen werden (zur Fehlerrate der verwendeten Taq-Polymerase werden vom Hersteller keine Angaben gemacht).

4.6 Addukte

Zahlreiche Studien haben die Bildung von PhIP-DNA-Addukten als Marker primärer DNA-Schädigungen mit der ³²P-Postlabeling-Methode in Tiermodellen untersucht. Obwohl dieser Marker hier nicht erhoben wurde, lassen sich aus diesen Studien jedoch Zusammenhänge zwischen der Interaktion mit Nahrungsbestandteilen und alternativen Wegen der PhIP-Aktivierung ableiten. Diese geben Hinweise auf die organspezifische Wirkung des PhIP.

Im Unterschied zu anderen HAA, wie z.B. IQ, treten bei PhIP wenig Addukte in der Leber auf. Dies stimmt einerseits mit der Tatsache überein, dass die Leber nicht zu den Zielorganen der PhIP-vermittelten Kanzerogenese gehört, ist andererseits aber auch verwunderlich, da die Leber als Hauptorgan der PhIP-Aktivierung angesehen wird. Betrachtet man Kolon und Prostata als Zielorgane der Kanzerogenese, so zeigen sich widersprüchliche Ergebnisse, da sich die Bildung

von PhIP-DNA-Addukten nicht direkt mit der kanzerogenen Organspezifität der Substanz korrelieren lässt. So wurden beim Vergleich der Adduktbildung in der Prostata in 7 Rattenstämmen für alle Tierstämme ähnliche Adduktlevel bei unterschiedlicher Empfindlichkeit hinsichtlich der Entwicklung von Prostata-Tumoren festgestellt (Inaguma et al., 2003). In einer von Takayama et al. (1989) mit F344-Ratten durchgeführten Studie wiesen Lunge, Pankreas und Herz die höchsten Adduktzahlen aller untersuchten Organe auf, wohingegen das Kolon mittlere und der Hoden sehr niedrige Adduktlevel aufwies. Schut und Herzog (1992) fanden im Gegensatz dazu die meisten Addukte im Dickdarm, gefolgt von Leukozyten, Magen, Niere, Dünndarm und Leber, während Hollnagel (2004), beginnend mit den höchsten Adduktzahlen, folgende Reihenfolge fand: Pankreas, Thymus, Prostata, Kolonwand und -mukosa, Caecum-Wand, Lunge, Dünndarm-Wand, Caecum-Mukosa, Niere, Dünndarm-Mukosa und Leber. Interessant ist die von Hollnagel (2004) gemachte Beobachtung, dass Kolon und Prostata von keimfreien Tieren um bis zu 40 % erniedrigte Adduktlevel aufwiesen, was einen Zusammenhang zwischen Darmmikrobiota und einem Teil der Addukte nahelegt. Ebenfalls auffallend sind die im Vergleich zum Kolon verminderten Adduktzahlen im Dünndarm, die möglicherweise ihre Ursache im Ballaststoffanteil der Nahrung haben. Ballaststoffe sind in der Lage, HAA zu binden (Barnes et al., 1983; Takeuchi et al., 1988). Ein Teil dieser HAA wird bei der Metabolisierung der Ballaststoffe durch Darmbakterien während der Dünndarmpassage wieder freigesetzt und bildet Addukte im Dickdarm. Bei keimfreien Tieren findet diese Freisetzung nicht statt, was die verminderten Adduktlevel dieser Tiere erklären würde. Als weitere Einflüsse wären Freisetzung gebundener HAA durch pH-Änderungen im Darmmilieu und die Konzentrierung der HAA durch die Wasserrückresorption im Dickdarm möglich.

PhIP verursacht bei Affen und Ratten relativ hohe Adduktlevel im Herzen. Die Herzen der behandelten Tiere zeigten eine Degeneration der Myozyten verbunden mit vergrößerten Mitochondrien und der Infiltrierung des Muskels mit Entzündungszellen. Diese Veränderungen waren bei beiden Geschlechtern zu beobachten, der genaue Zusammenhang zwischen hohen Adduktleveln und den Symptomen ist unklar. Ein möglicher Zusammenhang wird in den abnormalen Mitochondrien und der Bildung von Addukten mit mitochondrialer DNA vermutet (Davis et al., 1994; Takahashi et al., 1996; Snyderwine et al., 1994).

Es ist jedoch generell schwierig, das Auftreten von Addukten als primäre DNA-Schädigungen mit dem von Läsionen oder Tumoren in Fütterungsstudien zu vergleichen. Die meisten Addukt-Messungen erfolgten nach 24-48 h, da danach aufgrund der Reparaturmechanismen die Nachweisgrenze für PhIP-DNA-Addukte unterschritten wird. Das zeigt, dass sich nur ein geringer Teil der Addukte im Genom als Mutation manifestieren kann. Zum anderen unterscheidet sich die Applikationsform der Substanz, da den Tieren für die Adduktmessung die gesamte Dosis per Schlundsonde in nüchternem Zustand oder i.p. verabreicht wurde und somit keine Interaktion mit Nahrungsbestandteilen auftrat.

Untersuchungen zum Einfluss von konjugierter Linolsäure (CLA) auf die PhIP-DNA-Adduktbildung nach Gabe der Substanz über das Futter zeigten, dass bei weiblichen F344-Ratten die Adduktbildung in der Leber reduziert wurde. Die Adduktzahlen in Kolon- und Brustgewebe blieben hingegen unbeeinflusst. Der Mechanismus dieser Wirkung ist unbekannt, verläuft jedoch unabhängig von CYP1A2, welches in seiner Expression durch CLA nicht beeinflusst wurde (Josyula et al., 1998). Dies zeigt, dass die PhIP-Aktivierung bei der organspezifischen Wirkung eine wichtige Rolle spielt und teilweise durch Nahrungsbestandteile beeinflusst wird. Dies ist jedoch nicht der Fall in den Zielorganen und könnte ein Grund für die ungewöhnliche Organspezifität des PhIP sein.

Ebenfalls auf einen Zusammenhang von mehrfach ungesättigten Fettsäuren und der PhIP-DNA-Adduktbildung deutet eine Untersuchung mit einer humanen Kolonadenokarzinom-Zelllinie hin, die eine Erhöhung der Adduktzahlen bei niedrigen und mittleren Konzentrationen und eine Verminderung der Adduktzahlen bei hohen Konzentrationen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren zeigte (Moonen et al., 2004). Dabei fand eine Aktivierung des PhIP durch Kooxidation mit den Fettsäuren durch die Cyclooxygenase-2 (COX-2) statt. COX-2 ist u.a. durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Entzündungen induzierbar und könnte eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des PhIP in extrahepatischen Geweben wie dem Kolon spielen. Die erhöhte Expression von COX-2 in kolorektalen Karzinomen ist in zahlreichen Studien nachgewiesen (u.a. DuBois et al., 1996).

4.7 Das Tiermodell

Die Wirkungen des PhIP auf die F344-Ratte weichen zum Teil erheblich von den in anderen Rattenstämmen ab. Jedes Tiermodell hat in Abhängigkeit von Tierart und –stamm besondere Eigenschaften, die bei der Interpretation der erzielten Ergebnisse und der Übertragung auf andere Spezies berücksichtigt werden müssen.

Die F344-Ratte ist ein Inzuchtstamm, dessen Individuen durch konsequente Geschwisterverpaarung in 99 % ihrer Merkmale homozygot sind. Dieser Tierstamm wird für Kanzerogenitätsstudien häufig eingesetzt, da Neoplasien sehr selten Metastasen bilden. Ein weiterer Inzuchtstamm, die ACI-Ratte, ist jedoch gegenüber PhIP wenig empfindlich und zeigt eine geringe Neigung zur Bildung von ACF und Kolonkrebs nach PhIP-Behandlung (Ishiguro et al., 1999, Inaguma et al., 2003). Beim Vergleich der Genexpressionsprofile des unveränderten Dickdarmepithels nach PhIP-Fütterung zwischen F344- und ACI-Ratten konnten erhebliche Unterschiede zwischen beiden Stämmen festgestellt werden, z.B. eine Hochregulation von Fettsäure-bindenden Proteinen und ebenfalls eine Hochregulation der Genexpression von *Msh2*, einem Mismatch-Reparatur-Gen in der F344-Ratte (Fujiwara et al., 2003). In Kolontumoren der beiden Tierstämme glichen sich die Genexpressionsprofile jedoch einander an (Fujiwara et al., 2004). Als möglicher Genort für die erhöhte Empfindlichkeit der F344-Ratte gegenüber PhIP wurde auf Chromosom 16 der Abschnitt zwischen den Loci *D16Rat17* und *D16Wox3* beschrieben (Nakagama et al., 1999). Um welches Gen es sich dabei genau handelt, ist allerdings noch unklar. Außerdem zeigt die F344-Ratte einen genetischen Polymorphismus in Bezug auf die NAT2, die bei der Aktivierung von PhIP eine bedeutende Rolle spielt, und ihr den Status eines „schnellen Acetylierers“ verleiht. Dieser Status wird im Gegensatz zu dem eines „langsamen Acetylierers“ mit einem erhöhten Risiko für Dickdarmkrebs in Verbindung gebracht. Bei F344-Ratten konnte die vermehrte Bildung von ACF und PhIP-DNA-Addukten im Vergleich zu Wistar-Kyoto-Ratten, einem Inzuchtstamm mit dem Status eines „langsamen Acetylierers“, gezeigt werden (Purewal, 2000).

Beim Vergleich von 7 Rattenstämmen nach Fütterung mit PhIP zeigten F344-, ACI- und SHR-Ratten die höchsten Überlebensraten, der Effekt der Substanz auf die Entstehung von Prostatatumoren war jedoch je nach Teil der Prostata und Art des Tumors bei SHR-, ACI-, Lewis- oder Brown-Norway-Ratten am stärksten

(Inaguma et al., 2003). Bei der direkten Sequenzierung von DNA aus Leber, Kolon und Magen von Sprague-Dawley-Ratten wurden nach 27 Wochen Fütterung mit einer bei hohen Temperaturen zubereiteten Rindfleisch-Diät (72 ng PhIP/g Futter) keine Mutationen in den untersuchten Genen *p53* und *APC* gefunden. Addukte traten ebenfalls nicht auf (Shen et al., 1998).

PhIP wurde in einer zweiten Nagerspezies, der Maus, getestet, wo es in gleicher Menge verabreicht weder Kolon- noch Mammatumore verursachte. Allerdings war eine hohe Inzidenz an Lymphomen zu beobachten (Esumi et al., 1989). Es gibt also erhebliche Unterschiede in der Organwirkung von PhIP zwischen Ratte und Maus, die die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen schwerer erscheinen lassen. Beide Tiermodelle stimmen jedoch darin überein, dass im Unterschied zu anderen HAA eine Induktion von Lebertumoren nicht beobachtet werden konnte (Fukushima et al., 2004). Durch die geringe genetische Variabilität der Individuen des F344-Stammes untereinander erhält man zwar reproduzierbare Ergebnisse, auf die große genetische Variabilität des Menschen sind diese jedoch schwer übertragbar. Der genetische Hintergrund beeinflusst den Metabolismus, die DNA-Reparaturmechanismen und die Immunantwort. Da der Mensch einen breiteren genetischen Hintergrund hat, ist auch seine Reaktion auf Verbindungen wie HAA weitaus variabler als im Versuchstier. Die uneinheitlichen Ergebnisse epidemiologischer Studien könnten dies widerspiegeln. Diese Faktoren sind beim nachfolgenden Versuch einer Abschätzung des Risikos für den Menschen zu berücksichtigen.

4.8 Abschätzung des Risikos für den Menschen

Für PhIP sind in verschiedenen Modellsystemen zahlreiche Wirkungen beschrieben worden. Bei der Beurteilung der Relevanz dieser Ergebnisse für den Menschen müssen mehrere Faktoren wie die eingesetzte Dosis, das Modellsystem, die verwendete Spezies, sowie der Applikationsweg berücksichtigt werden. Durch die Zusammenführung der im durchgeführten Fütterungsversuch erzielten Ergebnisse mit Daten aus der Literatur soll an dieser Stelle der Versuch unternommen werden, das durch PhIP verursachte Risiko für den Menschen abzuschätzen.

Der Mensch ist PhIP in geringer Dosis aber über einen wesentlich längeren Zeitraum als die Versuchstiere ausgesetzt, im Grunde genommen lebenslang. Die

in den ersten Fütterungsversuchen mit Ratten verwendeten PhIP-Konzentrationen von 0,04 % entsprechen, auf die menschliche Nahrungsmenge bezogen einer täglichen Aufnahme von 400-500 kg Fleisch. Da diese Mengen nicht humanrelevant sind und die Ergebnisse keine Aussage über ein tatsächliches Risiko für den Menschen zulassen, wurde die verfütterte PhIP-Dosis abgesenkt und der Fütterungszeitraum verlängert. Damit wurde die chronische Aufnahme geringer PhIP-Dosen durch den Menschen imitiert. Im Rahmen einer ersten Studie mit diesem Ansatz über 104 Wochen zeigten bei einer Dosis von 0,01 % PhIP 43 % der männlichen Tiere Kolontumore, während bei 0,0025 % PhIP keine Tumore mehr auftraten. Da 0,0025 % PhIP im Futter noch weit von humanrelevanten Konzentrationen entfernt sind, wurde eine weitere Fütterungsstudie mit geringeren Konzentrationen des Toxins durchgeführt, die aufgrund des Fehlens von Tumoren Addukt- und ACF-Bildung analysiert (Fukushima et al., 2004). Bei der Behandlung von F344-Ratten mit 0,000001 % - 0,04 % PhIP im Futter für 16 Wochen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Adduktlevel bereits ab der humanrelevanten Dosis von 0,00001 %, eine signifikante Erhöhung der ACF jedoch erst ab 0,005 % PhIP im Futter. Die Autoren dieser Arbeit setzen die humanrelevante Dosis um den Faktor 10 niedriger an als in der hier vorliegenden Arbeit, so dass die Beobachtung einer geringen Substanzwirkung im Niedrig-Dosis-Bereich in Übereinstimmung mit den hier erzielten Ergebnissen ist. In einem Initiations-Promotions-Modell, welches die Behandlung mit Azoxymethan gefolgt von der Fütterung mit PhIP umfasste, war im Dosisbereich von 0,000001 - 0,01 % PhIP keine Verstärkung der kolorektalen Kanzerogenese feststellbar (Doi et al., 2005). Da die zur Induktion von ACF benötigte Dosis um den Faktor 5000 über der zur Bildung von Addukten notwendigen liegt, argumentieren die Autoren, dass eine bestimmte Adduktanzahl überschritten werden muss, damit es überhaupt zur ACF-Bildung kommt. Begründet wird dieser Effekt mit der von Kitchin und Brown (1994) gemachten Beobachtung, dass sehr geringe Konzentrationen von chemischen Kanzerogenen DNA-Schädigungen verringern, vermutlich durch Induktion von Reparaturenzymen, Hochregulation von Tumorsuppressorgenen und andere Adaptationsmechanismen. Damit ergeben sich Hinweise auf einen Schwellenwert für die genotoxische Wirkung des PhIP, wobei angenommen wird, dass die Schwelle für die kanzerogene Wirkung oberhalb der menschlichen Exposition liegt

(Fukushima et al., 2004). Die Autoren schlagen aufgrund der oben genannten Ergebnisse einen NOEL-Wert von 0,001 % PhIP vor, der erst mit der Aufnahme von 10 kg Fleisch pro Tag und Person erreicht wird. Ebenfalls die Beobachtung einer ausschließlichen Wirkung von PhIP im Hoch-Dosis-Bereich wurde in einer von Ikeda et al. (1999) durchgeführten Teratogenitätsstudie gemacht. PhIP zeigte eine teratogene Wirkung, die sich bei den Nachkommen PhIP-behandelter F344-Ratten im Fehlen der Augäpfel und Hydrocephalus äußerte. Diese Missbildungen treten jedoch nur bei Gabe von 0,02 % PhIP im Futter auf und sind bei einer Dosis von 0,01 % nicht mehr zu beobachten.

Außerdem ist anders als bei Inzucht-Versuchstieren der Genpool der menschlichen Population sehr heterogen und aus zahlreichen Subpopulationen zusammengesetzt. Dementsprechend kann die Empfindlichkeit der Menschen gegenüber toxischen Agenzien erheblich variieren, wie das bereits bei Tieren des gleichen Stammes, aber unterschiedlicher Züchter nachgewiesen worden ist (Xu et al., 1999). In letzterer Arbeit wurde ebenfalls die Beobachtung gemacht, dass die Kurzzeitbehandlung von F344-Ratten mit einem Toxin (IQ) in einer hohen Dosis ACF induziert, die gleiche Dosis auf einen längeren Zeitraum verteilt, was der ständigen Exposition des Menschen mit geringen PhIP-Dosen entspricht, jedoch ohne Wirkung bleibt.

Eine weitere Schwierigkeit bei der Abschätzung der Folgen der PhIP-Exposition liegt darin, dass die Gründe für die organspezifische Wirkung bei Ratten ungeklärt sind. Versuche mit F344-Ratten zeigten das Fehlen der Enzymausstattung für die Aktivierung des PhIP bei gleichzeitig hohen Adduktleveln im Dickdarm (Hollnagel, 2004). Der Weg, auf dem PhIP spezifisch die Zellen von Kolon, Prostata und Mamma angreift, ist unbekannt. Im Ganztier und in humanen TK6-Zellen konnten jedoch übereinstimmend gesteigerte Apoptoseraten gezeigt werden. F344-Ratten zeigten nach einmaliger Gabe von 100 mg/kg KG und nach 24 h eine erhöhte Apoptoserate im Kolon; die zusätzliche Gabe eines CYP4501A2-Induktors verstärkte diesen Effekt (Hirose et al., 1998). Für die TK6-Zellen konnte zusätzlich zur gesteigerten Apoptose eine Verzögerung der S-Phase nachgewiesen werden, die eine Folgereaktion der genotoxischen Wirkung des PhIP und der damit verbundenen notwendigen DNA-Reparatur sein könnte (Zhu et al., 2000). Die Autoren spekulieren aufgrund dieser Ergebnisse, dass die erhöhte Empfindlichkeit des Kolons gegenüber PhIP möglicherweise auf seiner hohen proliferativen

Aktivität beruht, wodurch sich Schäden schneller manifestieren und ausbreiten können.

Die bereits erwähnten charakteristischen Mutationen treten übereinstimmend bei verschiedenen Spezies wie Ratte und Maus, sowie Zelllinien aus Hamstern und Menschen auf (Kakiuchi et al., 1995; Yadollahi-Farsani et al., 1996; Endo et al., 1994). Für PhIP typische Mutationen des *APC*-Gens konnten in menschlichen Tumorproben nachgewiesen werden (Huang et al., 1996). PhIP wirkt jedoch nicht ausschließlich auf genotoxischem Weg, sondern kann in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 eine Östrogen-ähnliche Wirkung durch Bindung an den Östrogen Rezeptor- α (ER- α) und anschließende Stimulation der Proliferation durch Aktivierung des MAPK-Weges bewirken (Lauber et al., 2004). Des Weiteren ist eine Verbindung zwischen dem Wnt/ β -Catenin-Signaltransduktionsweg und dem Östrogen-„Signaling“ beschrieben, wobei es zu einer Assoziation von β -Catenin und ER- α kommt (Kouzmenko et al., 2004). Bemerkenswert an der Östrogen-ähnlichen Wirkung des PhIP ist vor allem, dass es keiner vorherigen Aktivierung bedarf und der ER- α bei Mensch und Ratte im Kolon exprimiert wird (Campbell-Thompson et al., 2001; Pereira et al., 2004). Zahlreiche weitere Nahrungsbestandteile entfalten ebenfalls eine östrogene Wirkung, so dass es zu additiven Effekten mit PhIP kommen könnte.

In vitro Testsysteme oder das F344-Tiermodell wurden für zahlreiche Studien genutzt, die sich mit den inhibitorischen Effekten zahlreicher Lebensmittel auf die PhIP-induzierte Mutagenese und Kanzerogenese beschäftigen. Untersucht wurden mit diesen Modellen verschiedene Tee- und Biersorten (Nozawa et al., 2004), Milchprodukte (Tavan et al., 2002), Kohlgemüse (Vang et al., 2001) und Kaffee (Turesky et al., 2003). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen deuten, mit Ausnahme uneindeutiger Effekte bei Kaffee und Kohlgemüse, auf eine tatsächliche Inhibition der Kanzerogenese durch Nahrungsbestandteile hin. Dies macht es umso schwieriger eine generelle Abschätzung des Risikos für den Menschen vorzunehmen, da individuell und geographisch erhebliche Unterschiede in der Nahrungszusammensetzung bestehen. Die Dickdarmkrebsentstehung beim Menschen wird durch epidemiologische Studien mit einer fettreichen und ballaststoffarmen Kost in Zusammenhang gebracht. Insofern ist es eine interessante Beobachtung, dass relativ geringe PhIP-Mengen, mit einer fettreichen

Diät verabreicht, bei männlichen F344-Ratten zu einer gesteigerten KolonkrebSENTSTEHUNG führen (Ubagai et al., 2002).

Die Wirkung des PhIP ist durch den variableren genetischen Hintergrund beim Menschen und der Interaktion mit verschiedenen Nahrungsbestandteilen komplexer als im Versuchstier. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass die vom Menschen täglich konsumierten PhIP-Mengen allein nicht ursächlich für Dickdarmkrebserkrankungen sind. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die heterozyklischen aromatischen Amine IQ, MeIQ und A α C ebenso wie PhIP Addukte an der C8-Position des Guanin bilden (Endo et al., 1994; Okonogi et al., 1997) und es somit zu additiven Effekten dieser und möglicherweise auch anderer HAA kommen kann. Allerdings hat auch die eine Guanin-Base umgebende Sequenz einen Toxin-spezifischen Einfluss; die *Hot Spots* und Zielgene von PhIP und IQ stimmen beispielsweise nicht überein (Okonogi et al., 1997).

4.9 Ausblick

Der Einfluss von PhIP in niedrigen Dosen auf die Entstehung von Entzündungen müsste eingehender untersucht werden. Besonders von Interesse wäre dabei der Mechanismus, über den die Induktion einer Entzündung vermittelt wird und ob andere Verbindungen dieser Substanzklasse ähnliche Reaktionen auslösen. Ein Zusammenhang zwischen DarmkrebSENTSTEHUNG und Entzündung wird seit längerem vermutet, ist jedoch im Zusammenhang mit HAA ein neuer Wirkungsmechanismus. Zunächst könnte an vorhandenen histologischen Schnitten mittels immunhistochemischem Nachweises von Lymphozytenmarkern die Lokalisation der Entzündungen genauer charakterisiert werden.

Nachdem die Wirkung des PhIP auf verschiedenen Ebenen und Modellsystemen isoliert betrachtet wurde, könnten die vorhandenen Hinweise auf eine protektive oder synergistische Wirkung mit Lebensmittelbestandteilen, Hormonen oder Enzymausstattungen weiter verfolgt werden. Möglicherweise lassen sich auf diesem Wege das Risiko für den Menschen und die Ursachen für die organ-spezifische Wirkung klären.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Dickdarmkrebs wird durch eine Reihe von Lebens- und Essgewohnheiten sowie Umweltfaktoren begünstigt. Den letzteren beiden sind Substanzen zuzurechnen, die bei der Zubereitung der Nahrung entstehen und mit ihr aufgenommen werden. Zu diesen Verbindungen gehört das 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP) aus der Substanzklasse der heterozyklischen aromatischen Amine. Es entsteht bei der Erhitzung zahlreicher proteinhaltiger Nahrungsmittel und die Zielorgane in Nagerstudien stimmen mit der Häufung von Krebsinzidenzen in westlichen Industrienationen überein. Dieser Zusammenhang konnte jedoch bis heute nicht endgültig bewiesen werden. Fütterungsversuche mit Ratten wurden mit Konzentrationen der Substanz durchgeführt, die weit über der menschlichen Exposition liegen. Durch das Verfüttern einer humanrelevanten Dosis PhIP sollte geklärt werden, ob auch geringe Konzentrationen dickdarmkrebstypische Mutationen, präneoplastische Läsionen oder Tumore induzierten. Die mit humanrelevanten Dosen gefütterten Tiere wiesen weniger Läsionen als die Hoch-Dosis-PhIP-Gruppe auf, in der allerdings keinerlei maligne Tumoren des Dickdarms auftraten. Hinweise auf dickdarmkrebstypische Mutationen fanden sich ebenfalls in beiden Gruppen, wobei hier keine Dosisabhängigkeit beobachtet werden konnte. Die Sequenzierung ergab ein deutlich von Literaturdaten abweichendes Spektrum. In Bezug auf das verwendete Tiermodell wurden erhebliche Abweichungen in der Empfindlichkeit der Tiere gegenüber der Substanz im Vergleich zu ähnlichen Studien festgestellt. Beide Fütterungsgruppen zeigten deutlich weniger Läsionen; als mögliche Gründe wurden Unterschiede in der Futterzusammensetzung und –zubereitung sowie in der Tierhaltung und –herkunft ausgemacht. Es konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen PhIP in niedrigen Dosen in der Nahrung und der Induktion von Entzündungen gezeigt werden. Diese waren sowohl makroskopisch als auch histologisch sichtbar, der genaue Mechanismus ihrer Entstehung ist jedoch unbekannt.

Die zusammenfassende Betrachtung aller Ergebnisse lässt vermuten, dass PhIP allein über lange Zeiträume aber in geringen Dosen verabreicht nicht für die hohe Zahl an Krebserkrankungen in westlichen Industrienationen ursächlich ist.

6 Summary

The development of colon cancer is associated with several nutritional, life style, and environmental factors. Among the environmental factors probably involved are substances formed during food processing and taken up with food. One of these substances is the heterocyclic aromatic amine (HAA) 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine (PhIP), which is formed during the heating of proteinaceous food such as meat and fish. In rodent studies the target organs for HAA-derived cancer development are identical with human organs showing high tumor incidences in western countries. Whether there is an association between exposure to PhIP and high tumor incidences in humans is still uncertain. The amount of PhIP administered to rodents in several studies was far above the levels of human exposure towards HAA. Thus, the aim of this study was to elucidate whether low concentrations of the substance are able to induce finger-print colon cancer gene mutations, preneoplastic lesions or tumors in rats. Animals fed with high amounts of PhIP developed fewer lesions than animals fed with a human-relevant concentration of PhIP. However none of the groups developed tumors of the colon. Both groups showed finger-print mutations for colon cancer, but not in a dose-dependent manner. Sequencing showed that the mutations were different from the known mutation spectrum of PhIP. The susceptibility of the F344 rats to PhIP used in this study differed from that in previous feeding studies, with both groups showing much less lesions of the colon. Differences in composition and processing of the animal diets as well as animal maintenance and –origin may explain this discrepancy. For the first time an association between low doses of PhIP in the diet and induction of inflammation was shown. Signs of inflammation were observed macroscopically as well as in histological slices, but the mechanism of its induction remains to be clarified.

Taken together the results suggest that a chronic exposure to low doses of PhIP alone is not sufficient to explain the high incidences of colon cancer in western countries.

7 Literaturverzeichnis

- Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland** (2004) Krebs in Deutschland – Häufigkeiten und Trends. (Saarbrücken) 4. Auflage
- Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Dickman PW, Steineck G** (1999) Dietary heterocyclic amines and cancer of the colon, rectum, bladder, and kidney: a population-based study. *Lancet* 353(9154): 703-7
- Augustsson K, Skog K, Jagerstad M, Steineck G** (1997) Assessment of the human exposure to heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 18(10): 1931-5
- Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Paraskeva C, Markowitz S, Willson JK, Hamilton S, Vogelstein B** (1990) p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* 50(23): 7717-22
- Barnes WS, Maiello J, Weisburger JH** (1983) In vitro binding of the food mutagen 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline to dietary fibers. *J Natl Cancer Inst* 70(4): 757-60
- Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B** (1987) Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 327(6120): 293-7
- Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T** (1999) b-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155(4): 1033-8
- Caderni G, Femia AP, Giannini A, Favuzza A, Luceri C, Salvadori M, Dolara P** (2003) Identification of mucin-depleted foci in the unsectioned colon of azoxymethane-treated rats: correlation with carcinogenesis. *Cancer Res* 63(10): 2388-92
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B** (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ER-b isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61(2): 632-40
- Dashwood RH, Suzui M, Nakagama H, Sugimura T, Nagao M** (1998) High frequency of beta-catenin (ctnnb1) mutations in the colon tumors induced by two heterocyclic amines in the F344 rat. *Cancer Res* 58(6): 1127-9
- Davis CD, Farb A, Thorgeirsson SS, Virmani R, Snyderwine EG** (1994) Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 124(2): 201-11
- Davis CD, Schut HA, Snyderwine EG** (1994) Adduction of the heterocyclic amine food mutagens IQ and PhIP to mitochondrial and nuclear DNA in the liver of Fischer-344 rats. *Carcinogenesis* 15(4): 641-5

- Dingley KH, Curtis KD, Nowell S, Felton JS, Lang NP, Turteltaub KW** (1999) DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(6): 507-12
- Doi K, Wanibuchi H, Salim EI, Morimura K, Kinoshita A, Kudoh S, Hirata K, Yoshikawa J, Fukushima S** (2005) Lack of large intestinal carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine at low doses in rats initiated with azoxymethane. *Int J Cancer* 115(6): 870-8
- DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ** (1996) Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 110(4): 1259-62
- DuBois RN, Smalley WE** (1996) Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. *J Gastroenterol* 31(6): 898-906
- Dukes CE, Bussey HJR** (1958) The spread of rectal cancer and its effect on prognosis. *Brit. J. Cancer* 12: 309-20
- Edenharder R, Sager JW, Glatt H, Muckel E, Platt KL** (2002) Protection by beverages, fruits, vegetables, herbs, and flavonoids against genotoxicity of 2-acetylaminofluorene and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in metabolically competent V79 cells. *Mutat Res* 521(1-2): 57-72
- Endo H, Schut HA, Snyderwine EG** (1994) Mutagenic specificity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in the supF shuttle vector system. *Cancer Res* 54(14): 3745-51
- Esumi H, Ohgaki H, Kohzen E, Takayama S, Sugimura T** (1989) Induction of lymphoma in CDF1 mice by the food mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn J Cancer Res* 80(12): 1176-8
- Exon JH, South EH, Taruscio TG, Clifton GD, Fariss MW** (2004) Chemopreventive effect of dietary d-alpha-tocopheryl succinate supplementation on precancer colon aberrant crypt formation and vitamin E analogue levels in young and old rats. *Nutr Cancer* 49(1): 72-80
- Fearon ER** (1991) A genetic basis for the multi-step pathway of colorectal tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp* 22: 37-48
- Fearon ER, Vogelstein B** (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5): 759-67
- Felton JS, Knize MG, Shen NH, Lewis PR, Andresen BD, Happe J, Hatch FT** (1986) The isolation and identification of a new mutagen from fried ground beef: 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 7(7): 1081-6

- Femia AP, Bendinelli B, Giannini A, Salvadori M, Pinzani P, Dolara P, Caderni G** (2005) Mucin-depleted foci have beta-catenin gene mutations, altered expression of its protein, and are dose- and time-dependent in the colon of 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Int J Cancer* 116(1): 9-15
- Frandsen H, Grivas S, Andersson R, Dragsted L, Larsen JC** (1992) Reaction of the N2-acetoxy derivative of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) with 2'-deoxyguanosine and DNA. Synthesis and identification of N2-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-PhIP. *Carcinogenesis* 13(4): 629-35
- Fujiwara K, Ochiai M, Ohta T, Ohki M, Aburatani H, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H** (2004) Global gene expression analysis of rat colon cancers induced by a food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Carcinogenesis* 25(8): 1495-505
- Fujiwara K, Ochiai M, Ubagai T, Ohki M, Ohta T, Nagao M, Sugimura T, Nakagama H** (2003) Differential gene expression profiles in colon epithelium of two rat strains with distinct susceptibility to colon carcinogenesis after exposure to PhIP in combination with dietary high fat. *Cancer Sci* 94(8): 672-8
- Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Iwai S, Nakae D, Kishida H, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F** (2004) Existence of a threshold for induction of aberrant crypt foci in the rat colon with low doses of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol Sci* 80(1): 109-14
- Furukawa F, Nishikawa A, Kitahori Y, Tanakamaru Z, Hirose M** (2002) Spontaneous development of aberrant crypt foci in F344 rats. *J Exp Clin Cancer Res* 21(2): 197-201
- Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, Rimm EB, Trichopoulos D, Rosner BA, Speizer FE, Willett WC** (1993) Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer Inst* 85(11): 875-84
- Glaab WE, Kort KL, Skopek TR** (2000) Specificity of mutations induced by the food-associated heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo-[4,5-b]-pyridine in colon cancer cell lines defective in mismatch repair. *Cancer Res* 60(17): 4921-5
- Goodman DG, Ward JM, Squire RA, Chu KC, Linhart MS** (1979) Neoplastic and nonneoplastic lesions in aging F344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 48(2): 237-48
- Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Imaida K, Shirai T, Nagao M, Sugimura T, Ito N** (1993) Dose-dependence of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) carcinogenicity in rats. *Carcinogenesis* 14(12): 2553-7
- Haseman JK** (1983) Patterns of tumor incidence in two-year cancer bioassay feeding studies in Fischer 344 rats. *Fundam Appl Toxicol* 3(1): 1-9
- Hayashi K, Yandell DW** (1993) How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2(5): 338-46

- Hirose Y, Sugie S, Yoshimi N, Matsunaga K, Hara A, Mori H** (1998) Induction of apoptosis in colonic epithelium treated with 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and its modulation by a P4501A2 inducer, beta-naphthoflavone, in male F344 rats. *Cancer Lett* 123(2): 167-72
- Hollnagel HM** (2004) 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin: Bioaktivierung und DNA-Adduktbildung in V79-Zelllinien und verschiedenen Rattengeweben. Dissertation, Universität Potsdam
- Holme JA, Wallin H, Brunborg G, Soderlund EJ, Hongslo JK, Alexander J** (1989) Genotoxicity of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP): formation of 2-hydroxamino-PhIP, a directly acting genotoxic metabolite. *Carcinogenesis* 10(8): 1389-96
- Hongyo T, Buzard GS, Calvert RJ, Weghorst CM** (1993) 'Cold SSCP': a simple, rapid and non-radioactive method for optimized single-strand conformation polymorphism analyses. *Nucleic Acids Res* 21(16): 3637-42
- Huang J, Papadopoulos N, McKinley AJ, Farrington SM, Curtis LJ, Wyllie AH, Zheng S, Willson JK, Markowitz SD, Morin P, Kinzler KW, Vogelstein B, Dunlop MG** (1996) APC mutations in colorectal tumors with mismatch repair deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(17): 9049-54
- Husoy T, Olstorn HB, Knutsen HK, Loberg EM, Cruciani V, Mikalsen SO, Goverud IL, Alexander J** (2004) Truncated mouse adenomatous polyposis coli reduces connexin32 content and increases matrilysin secretion from Paneth cells. *Eur J Cancer* 40(10): 1599-603
- IARC** (1993) Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 56, IARC Press (Lyon)
- Ikeda Y, Takahashi S, Kimura J, Cho YM, Imaida K, Shirai S, Shirai T** (1999) Anophthalmia in litters of female rats treated with the food-derived carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Toxicol Pathol* 27(6): 628-31
- Inaguma S, Takahashi S, Ohnishi H, Suzuki S, Cho YM, Shirai T** (2003) High susceptibility of the ACI and spontaneously hypertensive rat (SHR) strains to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) prostate carcinogenesis. *Cancer Sci* 94(11): 974-9
- Ishiguro Y, Ochiai M, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H** (1999) Strain differences of rats in the susceptibility to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo- [4,5-b]pyridine: no implication of Apc and Pla2g2a genetic polymorphisms in differential susceptibility. *Carcinogenesis* 20(6): 1063-8

- Ito N, Hasegawa R, Sano M, Tamano S, Esumi H, Takayama S, Sugimura T** (1991) A new colon and mammary carcinogen in cooked food, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 12(8): 1503-6
- Josyula S, He YH, Ruch RJ, Schut HA** (1998) Inhibition of DNA adduct formation of PhIP in female F344 rats by dietary conjugated linoleic acid. *Nutr Cancer* 32(3): 132-8
- Kakiuchi H, Ushijima T, Ochiai M, Imai K, Ito N, Yachi A, Sugimura T, Nagao M** (1993) Rare frequency of activation of the Ki-ras gene in rat colon tumors induced by heterocyclic amines: possible alternative mechanisms of human colon carcinogenesis. *Mol Carcinog* 8(1): 44-8
- Kakiuchi H, Watanabe M, Ushijima T, Toyota M, Imai K, Weisburger JH, Sugimura T, Nagao M** (1995) Specific 5'-GGGA-3'-->5'-GGA-3' mutation of the Apc gene in rat colon tumors induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(3): 910-4
- Kielman MF, Rindapaa M, Gaspar C, van Poppel N, Breukel C, van Leeuwen S, Taketo MM, Roberts S, Smits R, Fodde R** (2002) Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nat Genet* 32(4): 594-605
- Kitchin KT, Brown JL** (1994) Dose-response relationship for rat liver DNA damage caused by 49 rodent carcinogens. *Toxicology* 88(1-3): 31-49
- Kouzmenko AP, Takeyama K, Ito S, Furutani T, Sawatsubashi S, Maki A, Suzuki E, Kawasaki Y, Akiyama T, Tabata T, Kato S** (2004) Wnt/beta-catenin and estrogen signaling converge in vivo. *J Biol Chem* 279(39): 40255-8
- Kurien BT, Scofield RH** (2002) Extraction of nucleic acid fragments from gels. *Anal Biochem* 302(1): 1-9
- Lauber SN, Ali S, Gooderham NJ** (2004) The cooked food derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) is potently oestrogenic: a mechanistic basis for its tissue specific carcinogenicity. *Carcinogenesis* 25(12): 2509-17
- Lehr H, Vajkoczy P, Menger MD, Arfors KE** (1999) Do vitamin E supplements in diets for laboratory animals jeopardize. *Free Radic Biol Med* 26(3-4): 472-81
- Lightfoot TJ, Coxhead JM, Cupid BC, Nicholson S, Garner RC** (2000) Analysis of DNA adducts by accelerator mass spectrometry in human breast tissue after administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and benzo[a]pyrene. *Mutat Res* 472(1-2): 119-27
- Lin D, Kaderlik KR, Turesky RJ, Miller DW, Lay JO, Jr., Kadlubar FF** (1992) Identification of N-(Deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine as the major adduct formed by the food-borne carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, with DNA. *Chem Res Toxicol* 5(5): 691-7

- Lin PW, Simon PO, Jr., Gewirtz AT, Neish AS, Ouellette AJ, Madara JL, Lencer WI** (2004) Paneth cell cryptdins act in vitro as apical paracrine regulators of the innate inflammatory response. *J Biol Chem* 279(19): 19902-7
- Liu Q, Scaringe WA, Sommer SS** (2000) Discrete mobility of single-stranded DNA in non-denaturing gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 28(4): 940-3
- Makino H, Ushijima T, Kakiuchi H, Onda M, Ito N, Sugimura T, Nagao M** (1994) Absence of p53 mutations in rat colon tumors induced by 2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazole, 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline, or 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn J Cancer Res* 85(5): 510-4
- Manabe S, Kurihara N, Wada O, Izumikawa S, Asakuno K, Morita M** (1993a) Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, in airborne particles and diesel-exhaust particles. *Environ Pollut* 80(3): 281-6
- Manabe S, Suzuki H, Wada O, Ueki A** (1993) Detection of the carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in beer and wine. *Carcinogenesis* 14(5): 899-901
- Manabe S, Tohyama K, Wada O, Aramaki T** (1991) Detection of a carcinogen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP), in cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* 12(10): 1945-7
- Marquardt H, Schäfer S** (2004) *Toxikologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH (Stuttgart), 2. Auflage
- Moonen HJ, Dommels YE, van Zwam M, van Herwijnen MH, Kleinjans JC, Alink GM, de Kok TM** (2004) Effects of polyunsaturated fatty acids on prostaglandin synthesis and cyclooxygenase-mediated DNA adduct formation by heterocyclic aromatic amines in human adenocarcinoma colon cells. *Mol Carcinog* 40(3): 180-8
- Mori H, Hata K, Yamada Y, Kuno T, Hara A** (2005) Significance and role of early-lesions in experimental colorectal carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 155(1-2): 1-9
- Mori H, Yamada Y, Kuno T, Hirose Y** (2004) Aberrant crypt foci and beta-catenin accumulated crypts; significance and roles for colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* 566(3): 191-208
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW** (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275(5307): 1787-90
- Nakagama H, Ochiai M, Ubagai T, Tajima R, Fujiwara K, Sugimura T, Nagao M** (2002) A rat colon cancer model induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Mutat Res* 506-507: 137-44

- Nakagama H, Souda K, Ochiai M, Ishiguro Y, Sugimura T, Nagao M** (1999) Genetic analysis of the susceptibility in rats to aberrant crypt foci formation by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine, PhIP. *Cancer Lett* 143(2): 205-9
- Nozawa H, Tazumi K, Sato K, Yoshida A, Takata J, Arimoto-Kobayashi S, Kondo K** (2004) Inhibitory effects of beer on heterocyclic amine-induced mutagenesis and PhIP-induced aberrant crypt foci in rat colon. *Mutat Res* 559(1-2): 177-87
- Ochiai M, Ushigome M, Fujiwara K, Ubagai T, Kawamori T, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H** (2003) Characterization of dysplastic aberrant crypt foci in the rat colon induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Am J Pathol* 163(4): 1607-14
- Okonogi H, Ushijima T, Zhang XB, Heddle JA, Suzuki T, Sofuni T, Felton JS, Tucker JD, Sugimura T, Nagao M** (1997) Agreement of mutational characteristics of heterocyclic amines in lacI of the Big Blue mouse with those in tumor related genes in rodents. *Carcinogenesis* 18(4): 745-8
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T** (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2766-70
- Pereira MA, Tao L, Wang W, Li Y, Umar A, Steele VE, Lubet RA** (2004) Modulation by celecoxib and difluoromethylornithine of the methylation of DNA and the estrogen receptor- α gene in rat colon tumors. *Carcinogenesis* 25(10): 1917-23
- Persson E, Sjöholm I, Nyman M, Skog K** (2004) Addition of various carbohydrates to beef burgers affects the formation of heterocyclic amines during frying. *J Agric Food Chem* 52(25): 7561-6
- Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW** (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359(6392): 235-7
- Pretlow TP, Barrow BJ, Ashton WS, O'Riordan MA, Pretlow TG, Jurecsek JA, Stellato TA** (1991) Aberrant crypts: putative preneoplastic foci in human colonic mucosa. *Cancer Res* 51(5): 1564-7
- Purewal M** (2000) 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin induces a higher number of aberrant crypt foci in Fischer 344 (rapid) than in Wistar Kyoto (slow) acetylator inbred rats. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 529-532
- Rogers AE, Nauss KM** (1985) Rodent models for carcinoma of the colon. *Dig Dis Sci* 30(12 Suppl): 87S-102S
- Rohrmann S, Becker N** (2001) Die Aufnahme heterozyklischer aromatischer Amine in Deutschland. *Ernährungs-Umschau* 48: 447-450

- Sambrook J, Russell DW** (2001) Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press 3. Auflage
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7
- Schulmann K, Schmiegel W** (2002) Nichthereditäre Tumorerkrankungen, Kapitel 8: Kolorektales Karzinom, S. 231-256
- Schut HA, Herzog CR** (1992) Formation of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in male Fischer-344 rats. Cancer Lett 67(2-3): 117-24
- Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM** (1993) The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. Genomics 16(2): 325-32
- Shen CL, Purewal M, San Francisco S, Pence BC** (1998) Absence of PhIP adducts, p53 and Apc mutations, in rats fed a cooked beef diet containing a high level of heterocyclic amines. Nutr Cancer 30(3): 227-31
- Shioya M, Wakabayashi K, Sato S, Nagao M, Sugimura T** (1987) Formation of a mutagen, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]-pyridine (PhIP) in cooked beef, by heating a mixture containing creatinine, phenylalanine and glucose. Mutat Res 191(3-4): 133-8
- Shirai T, Cui L, Takahashi S, Futakuchi M, Asamoto M, Kato K, Ito N** (1999) Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in the rat prostate and induction of invasive carcinomas by subsequent treatment with testosterone propionate. Cancer Lett 143(2): 217-21
- Shirai T, Sano M, Tamano S, Takahashi S, Hirose M, Futakuchi M, Hasegawa R, Imaida K, Matsumoto K, Wakabayashi K, Sugimura T, Ito N** (1997) The prostate: a target for carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) derived from cooked foods. Cancer Res 57(2): 195-8
- Sinha R, Kulldorff M, Chow WH, Denobile J, Rothman N** (2001) Dietary intake of heterocyclic amines, meat-derived mutagenic activity, and risk of colorectal adenomas. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 10(5): 559-62
- Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, Levander OA, Knize MG, Lang NP, Kadlubar FF** (1994) Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. Cancer Res 54(23): 6154-9
- Snyderwine EG, Schut HA, Sugimura T, Nagao M, Adamson RH** (1994) DNA adduct levels of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in tissues of cynomolgus monkeys after single or multiple dosing. Carcinogenesis 15(12): 2757-61

- Solleveid HA, Haseman JK, McConnell EE** (1984) Natural history of body weight gain, survival, and neoplasia in the F344 rat. *J Natl Cancer Inst* 72(4): 929-40
- Srivastava S, Verma M, Henson DE** (2001) Biomarkers for early detection of colon cancer. *Clin Cancer Res* 7(5): 1118-26
- Sunnucks P, Wilson AC, Beheregaray LB, Zenger K, French J, Taylor AC** (2000) SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol* 9(11): 1699-710
- Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K** (1991) Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal Biochem* 192(1): 82-4
- Takahashi S, Imaida K, Shirai T, Wakabayashi K, Nagao M, Sugimura T, Ito N** (1996) Chronic administration of the mutagenic heterocyclic amine 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine induces cardiac damage with characteristic mitochondrial changes in Fischer rats. *Toxicol Pathol* 24(3): 273-7
- Takahashi S, Ogawa K, Ohshima H, Esumi H, Ito N, Sugimura T** (1991) Induction of aberrant crypt foci in the large intestine of F344 rats by oral administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Jpn J Cancer Res* 82(2): 135-7
- Takayama K, Yamashita K, Wakabayashi K, Sugimura T, Nagao M** (1989) DNA modification by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats. *Jpn J Cancer Res* 80(12): 1145-8
- Takeuchi M, Hara M, Inoue T, Kada T** (1988) Adsorption of mutagens by refined corn bran. *Mutat Res* 204(2): 263-7
- Tanakamaru Z, Mori I, Nishikawa A, Furukawa F, Takahashi M, Mori H** (2001) Essential similarities between spontaneous and MeIQx-promoted aberrant crypt foci in the F344 rat colon. *Cancer Lett* 172(2): 143-9
- Tavan E, Cayuela C, Antoine JM, Trugnan G, Chaugier C, Cassand P** (2002) Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* 23(3): 477-83
- Tsukamoto T, Tanaka H, Fukami H, Inoue M, Takahashi M, Wakabayashi K, Tatematsu M** (2000) More frequent beta-catenin gene mutations in adenomas than in aberrant crypt foci or adenocarcinomas in the large intestines of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-treated rats. *Jpn J Cancer Res* 91(8): 792-6
- Tucker E, Buda A, Janghra B, Cpod J, Moorghan M, Havler M, Dettmar P, Pignatelli M** (2003) Abnormalities of the cadherin-catenin complex in chemically-induced colo-rectal carcinogenesis. *Proc Nutr Soc* 62(1): 229-36

- Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF** (1991) Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 12(10): 1839-45
- Turesky RJ, Richoz J, Constable A, Curtis KD, Dingley KH, Turteltaub KW** (2003) The effects of coffee on enzymes involved in metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in rats. *Chem Biol Interact* 145(3): 251-65
- Ubagai T, Ochiai M, Kawamori T, Imai H, Sugimura T, Nagao M, Nakagama H** (2002) Efficient induction of rat large intestinal tumors with a new spectrum of mutations by intermittent administration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in combination with a high fat diet. *Carcinogenesis* 23(1): 197-200
- Vang O, Frandsen H, Hansen KT, Sorensen JN, Sorensen H, Andersen O** (2001) Biochemical effects of dietary intakes of different broccoli samples. I. Differential modulation of cytochrome P-450 activities in rat liver, kidney, and colon. *Metabolism* 50(10): 1123-9
- Walters DG, Young PJ, Agus C, Knize MG, Boobis AR, Gooderham NJ, Lake BG** (2004) Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans. *Carcinogenesis* 25(9): 1659-69
- Weisburger JH** (1971) Colon carcinogens: their metabolism and mode of action. *Cancer* 28(1): 60-70
- Xu M, Chen R, Dashwood RH** (1999) Effect of carcinogen dose fractionation, diet and source of F344 rat on the induction of colonic aberrant crypts by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. *Carcinogenesis* 20(12): 2293-8
- Yadollahi-Farsani M, Gooderham NJ, Davies DS, Boobis AR** (1996) Mutational spectra of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP) at the Chinese hamsters hprt locus. *Carcinogenesis* 17(4): 617-24
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Hara A, Shimizu M, Kuno T, Katayama M, Qiao Z, Mori H** (2001) Suppression of occurrence and advancement of beta-catenin-accumulated crypts, possible premalignant lesions of colon cancer, by selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Jpn J Cancer Res* 92(6): 617-23
- Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Kawabata K, Matsunaga K, Shimizu M, Hara A, Mori H** (2000) Frequent beta-catenin gene mutations and accumulations of the protein in the putative preneoplastic lesions lacking macroscopic aberrant crypt foci appearance, in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* 60(13): 3323-7

Yamada Y, Yoshimi N, Hirose Y, Matsunaga K, Katayama M, Sakata K, Shimizu M, Kuno T, Mori H (2001) Sequential analysis of morphological and biological properties of beta-catenin-accumulated crypts, provable premalignant lesions independent of aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis. *Cancer Res* 61(5): 1874-8

Yoshimi N, Morioka T, Kinjo T, Inamine M, Kaneshiro T, Shimizu T, Suzui M, Yamada Y, Mori H (2004) Histological and immunohistochemical observations of mucin-depleted foci (MDF) stained with Alcian blue, in rat colon carcinogenesis induced with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride. *Cancer Sci* 95(10): 792-7

Zhu H, Boobis AR, Gooderham NJ (2000) The food-derived carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine activates S-phase checkpoint and apoptosis, and induces gene mutation in human lymphoblastoid TK6 cells. *Cancer Res* 60(5): 1283-9

Danksagung

Viele Menschen waren an der Entstehung dieser Arbeit beteiligt und haben mich auf vielfältige Weise unterstützt. Ihnen soll an dieser Stelle gedankt werden.

Prof. Steinberg danke ich für Vergabe des interessanten Themas und die Möglichkeit, diese Arbeit unter seiner Anleitung anzufertigen. Bei Dr. Bettina Scholtka möchte mich für zahlreiche fachliche Anregungen bedanken. Urte Blume, Gunnar Drewes, Judith Fuchs, Heidi Mahler, Brun Mietzner, Carsten Müller, Mandy Schneider, Dr. Wera Teubner, Anja Voigt und Ingrid Zschaler danke ich für die angenehme, von Hilfsbereitschaft geprägte Arbeitsatmosphäre der Arbeitsgruppe und den Zwang zu sportlichem Ausgleich. Besonderer Dank geht an meine beiden Doktoranden-Mitstreiter Uta Herbst und Rene Thierbach, die mir im Labor-Alltag eine große Unterstützung waren. Monika Haseloff hat mich durch die Durchführung zahlreicher Sequenzierungen sehr unterstützt. Durch viele fachliche Diskussionen während der Durchführung ihrer Diplomarbeiten haben mir Conny Berthold, Stephanie Hompes und Peter Wend viele Impulse für diese Arbeit gegeben.

Der Arbeitsgruppe „Biochemie der Ernährung“ danke ich für die Möglichkeit der Nutzung ihres Sequenzier-Geräts.

Allen Mitarbeitern des MRL möchte ich für die Unterstützung bei der Durchführung des Tierversuchs danken, besonders Svetlana König, Elke Thom und Dr. Christa Thöne-Reineke. Dr. Felicitas Taugner danke ich für die histologische Beurteilung und Elisabeth Meyer und Dr. Simone Florian aus der Abteilung für Molekulare Toxikologie des DfE für die Durchführung immunhistochemischer Färbungen.

Prof. Dr. Dombrowski und Dr. Evert vom Institut für Pathologie der Universität Magdeburg möchte ich für die Anfertigung von histologischen Schnitten und ihre Beurteilung danken.

Für die Synthese des PhIP geht mein Dank an PD Dr. Albrecht Seidel.

Für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten danke ich Prof. Dr. Hannelore Liero vom Institut für Mathematik, sowie Dagmar Drogan und Dr. Ada Garcia.

Allen, die geduldig das Manuskript korrigiert und mit Kritik und Anregungen nicht gespart haben, sei an dieser Stelle ebenfalls herzlich gedankt.

Und den Mitgliedern meiner Familie danke ich dafür, dass sie immer hinter mir stehen.

Erklärung

Diese Arbeit ist bisher an keiner anderen deutschen Hochschule eingereicht worden und wurde ausschließlich mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt.

Dana Kühnel

Potsdam, den