

## 6 Einfluß von Vesikeln auf das mutagene Potential lipophiler Schadstoffe

### 6.1 Bedeutung von Vesikeln im Hinblick auf Mobilisierungserscheinungen

Phospholipiden kommt im Bereich umweltrelevanter Prozesse eine besondere Bedeutung zu. Als natürliche Lösungsvermittler biogenen Ursprungs weisen sie in Form von Vesikeln ein Potential zur Solubilisierung, aber auch zur Mobilisierung lipophiler Substanzen in wäßrigem Milieu auf. Im Bereich der Pedosphäre wird daher bei Anwesenheit von Vesikeln die Mobilisierung lipophiler, wasserunlöslicher Schadstoffe stark begünstigt [13]. Insbesondere persistente Schadstoffe können in die lipophile Doppelschicht von Vesikeln eingelagert und im wäßrigen Milieu im Bereich natürlicher Kompartimente verfrachtet werden. Eine mögliche Folge ist letztendlich die Grundwasserkontamination. Die Solubilisierung in Vesikel erhöht die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe aufgrund der verstärkten Mobilität und einer verminderten Sorptionstendenz an der Bodenmatrix. Mögliche Interaktionen mit Organismen eröffnen Anreicherungspfade innerhalb der Nahrungskette, ein noch wenig berücksichtigter Pfad der Bioakkumulation in Organismen. Vesikel sind überdies in der Lage, die menschliche Haut zu permeieren. Bei einem direkten Kontakt kann es daher zu einem verstärkten Eintrag lipophiler Substanzen in die Blutbahn kommen [10]. Aber auch die Möglichkeit der direkten Ingestion in den Säugetierorganismus ist nach Eintrag solubilisierter Schadstoffe in das Trinkwasser über eine orale Applikation nicht auszuschließen.

Aus diesem Grunde soll in diesem Kapitel eine Studie der Interaktion mutagener Substanzen mit natürlichen Zellsystemen vorgestellt werden. Mit Hilfe des Schwesterchromatidenaustausch-Testes (sister chromatide exchange, SCE) wurde hierzu der potentielle Einfluß der Solubilisierung mutagener Substanzen in Liposomen auf deren gentoxische Wirkung untersucht.

### 6.2 Fremdstoffmetabolismus lipophiler Stoffe in Organismen

Körperfremde, lipophile Substanzen, die von Organismen aufgenommen wurden, zeigen eine Tendenz zur Anreicherung in lipidreichen Geweben und werden in unveränderter Form nur langsam ausgeschieden. Der Organismus verfügt aus diesem Grunde über ein effektives Enzymsystem, welches nach Metabolisierung die Ausscheidung der Stoffe in wasserlöslicher Form ermöglicht. Bei den höheren Organismen ist dieses Enzymsystem vorwiegend in der Leber lokalisiert. Die lipophilen Substanzen werden in **Phase I** mit Hilfe eines Enzymsystems mit breiter Substratspezifität, dem Cytochrom-P450, zu reaktiven, elektrophilen Zwischenprodukten oxidiert und nachfolgend hydrolysiert. Im Anschluß erfolgt in **Phase II** die enzymatische Kopplung der funktionellen Gruppen mit Molekülresten des Intermediärstoffwechsels wie Glutathion, Carbon- oder Aminosäuren zu wasserlöslichen Konjugaten. Diese sind im allgemeinen weniger toxisch als die Ausgangsprodukte und vom Organismus

leicht auszuschleiden. Im Zuge der Metabolisierung ist jedoch auch eine Bioaktivierung von ansonsten wenig toxischen Substanzen möglich. Die Metabolite können durch direkte Reaktion mit funktionell wichtigen Proteinen und Lipiden oder durch kovalente Bindung an der DNS irreversible toxische Wirkungen auslösen. Die Zelle verfügt meist über hinreichende Reparaturmechanismen, die Schäden im Bereich der DNS beheben. Bei schwerwiegenden Defekten kommt es zur Apoptose. Werden diese Defekte nicht erkannt, so können die genetischen Veränderungen nach der Zellteilung in Form von Mutationen manifestiert werden und in der Folge zur Entartung der Zellen führen.

Um Informationen über die toxische Wirkung einer Substanz auf das genetische Material zu erhalten, verwendet man *in-vitro*-Genotoxizitätstests. Diese ermöglichen sowohl eine Abschätzung mutagener Potentiale, als auch die Aufklärung von zugrundeliegenden Wirkmechanismen im Bereich der Gesamtheit der zur Weitergabe der genetischen Information wichtigen Strukturen.

### 6.3 Schwesterchromatidenaustausch-Test (SCE)

Der Schwesterchromatidenaustausch-Test zählt zu den *in-vitro*-Genotoxizitätstests. Er ist durch die hohe Empfindlichkeit und gute Reproduzierbarkeit im Rahmen von Mutagenitätsprüfungen gekennzeichnet. Unter einem Schwesterchromatidenaustausch versteht man reziproke Austausche homologer DNS-Abschnitte der beiden genetisch identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms. SCE spontaner Natur werden durch den Bruch der Elternstränge an der Replikationsgabel und die reziproke Wiedervereinigung der Tochterstränge erklärt. Demgegenüber stehen SCE, die durch physikalische oder chemische Ursachen aufgrund einer DNS-Schädigung induziert werden. Genaue molekulare Mechanismen der Entstehung von SCE sind jedoch noch nicht bekannt. Der Austausch erfolgt vermutlich in der S-Phase des Zellzyklus während der DNS-Replikation. Aber auch S-Phase-unabhängige SCE-Induktionen sind möglich. Diese werden beispielsweise durch ionisierende Strahlung ausgelöst.

Der Schwesterchromatidenaustausch-Test wird in der Regel unter Verwendung permanenter Zelllinien wie CHO-Zellen (chinese hamster ovary) durchgeführt. Diese werden über einen Zeitraum von 1-3 Stunden mit der jeweiligen Testsubstanz in Kontakt gebracht. Hierbei kann zusätzlich ein exogenes Metabolisierungssystem wie der S9-Mix, ein Enzymkonzentrat der Rattenleber, verwendet werden. Die Zellen werden über zwei Zellzyklen (DNS-Syntheszyklen) kultiviert, wobei der erste in Gegenwart eines Überschusses von 5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd) erfolgt. 5-Bromdesoxyuridin wird als synthetisches Nucleosid aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit während der DNS-Synthese anstelle der Pyrimidinbase Thymin (vgl. Abbildung 6-1) in den neu synthetisierten DNS-Strang eingebaut.

Somit liegen nach zwei Zellzyklen Chromosomen mit zwei asymmetrisch BrdUrd-substituierten Chromatiden vor. Die Zugabe des Spindelgiftes *N*-Desacetyl-*N*-methylcolchicin (Colcemid) ermöglicht die Arretierung der Zellen in der Metaphase, in der die Chromosomen in kondensierter Form vorliegen. Durch differentielle Färbung mit Bisbenzimid (Hoechst 33258), einem Fluoreszenzfarbstoff, und anschließender Giemsa-Färbung werden nun selektiv die thymidinreichen Bereiche der Chromosomen markiert.

Auf diese Weise entstehen Chromosomen, die jeweils zwei asymmetrisch mit BrdUrd substituierte Chromatiden (Abbildung 6-2) aufweisen und mikroskopisch nachgewiesen werden können.

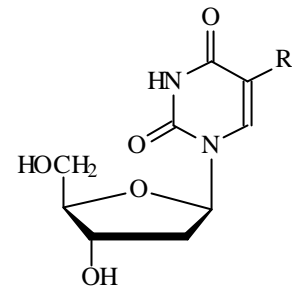


Abbildung 6-1: Vergleich der Nucleosidstruktur von Thymidin ( $R = \text{CH}_3$ ) und 5-Bromdesoxyuridin ( $R = \text{Br}$ ).

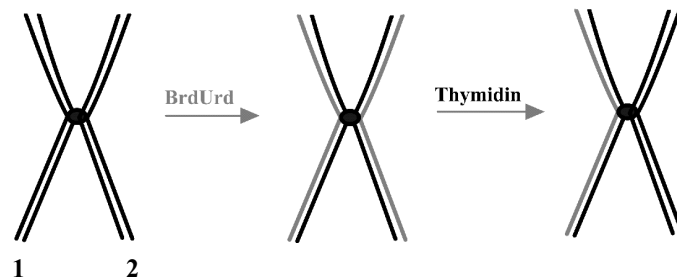


Abbildung 6-2: Schematische Darstellung des BrdUrd-Einbaus zur Erzeugung unterschiedlich substituiert Chromatiden. Die Abbildung zeigt ein kondensiertes Eukaryonten-Chromosom mit den beiden Schwesterchromatiden (1 und 2), die über das Zentromer (●) verbunden sind. Nach der ersten Replikation in Gegenwart von BrdUrd entstehen Metaphasechromosomen mit zwei symmetrisch substituierten Schwesterchromatiden. Nach einer weiteren Replikation in Abwesenheit von BrdUrd resultieren zwei asymmetrisch mit BrdUrd substituierte Chromatiden, wobei eine Chromatide unifilar und eine Chromatide unsubstituiert vorliegt.

Treten nun SCE auf, so sind diese durch Farbwechsel zwischen beiden Chromatiden zu erkennen (Abbildung 6-3). Eine Quantifizierung erfolgt über die Ermittlung der Häufigkeit eines Farbwechsels innerhalb des Chromosoms.

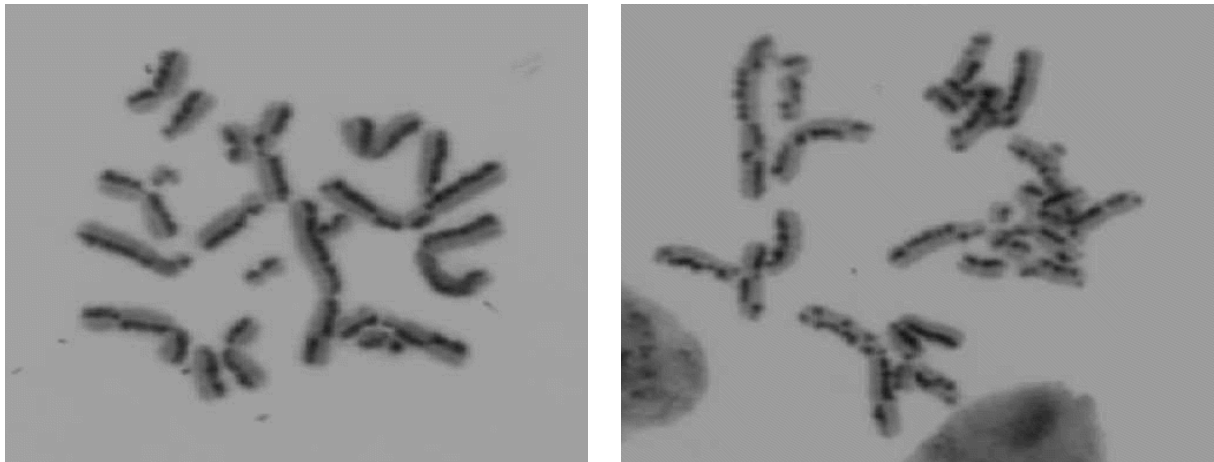


Abbildung 6-3: Mikroskopische Aufnahme des Schwesterchromatidenaustausches in Metaphasechromosomen von CHO-Zellen nach differentieller Färbung.

- a) Kontrollexperiment mit wenigen SCE.
- b) Chromosomen nach Einwirkung mutagener Substanzen. Die zahlreichen Schwesterchromatidenaustausche sind deutlich aufgrund des reziproken Färbemusters der „Harlekinchromosomen“ zu erkennen.

#### 6.4 Einfluß von Vesikeln auf die Genotoxizität

Der Einfluß der Solubilisierung einer mutagenen Substanz im lipophilen Bereich von Vesikeln sollte im Hinblick auf genotoxische Eigenschaften unter Verwendung des SCE-Tests untersucht werden. Hierzu wurden mäßig bis schlecht wasserlösliche lipophile Substanzen eingesetzt und deren mutagenes Potential in molekular gelöster Form mit dem des solubiliert vorliegenden Schadstoffes verglichen. Es galt eine Abschätzung vorzunehmen, ob durch die Solubilisierung eines lipophilen Schadstoffs in Vesikeln dessen mutagenes Potential beeinflusst wird.

Denkbar ist sowohl eine negative, als auch eine positive Beeinflussung. Eine Abschwächung der Genotoxizität wäre eine logische Konsequenz der Einlagerung des Mutagens in den lipophilen Doppelschichtbereich der Vesikel, die wiederum zu einer deutlichen Reduktion der Konzentration des Schadstoffs in der wäßrigen Phase führt. So konnte gezeigt werden, daß der akut toxische Effekt von Pyren auf marine Organismen durch Zugabe von organischem Humus aufgrund der Sorption des Polyaromaten und der daraus resultierenden Erniedrigung der Bioverfügbarkeit, deutlich reduziert werden kann. Eine positive Beeinflussung ist hingegen bei der Interaktion der Vesikel mit der zellulären Matrix zu erwarten, wodurch es zu sehr hohen lokalen Konzentrationen des Mutagens im Zellbereich kommen sollte. *In-vitro*-Untersuchung an Rattenleberzellen RL-19 stehen jedoch scheinbar im Widerspruch mit den angeführten Überlegungen, da keinerlei Beeinflussung der genotoxischen

Wirkung durch die Solubilisierung wasserunlöslicher Substanzen wie Benzo[a]pyren in Vesikeln beobachtet werden konnte [149]. Aus diesem Grunde werden im folgenden Untersuchungen unter Verwendung des SCE-Testes vorgestellt, wobei ausschließlich Substanzen mit bekanntem mutagenen Potential eingesetzt wurden. Verglichen wurde das jeweilige mutagene Potential der molekular in der Wasserphase gelösten mit der in Vesikeln solubilierten Spezies. Alle verwendeten Konzentrationen lagen hierbei innerhalb der Wasserlöslichkeit des Mutagens.

#### 6.4.1 Experimentelle Untersuchungen

Die für die Routinetests eingesetzte CHO-Zelllinie verfügt nicht über ein hinreichend aktives, zur Oxidation befähigtes Metabolisierungssystem wie beispielsweise Rattenleberzellen. Unpolare Verbindungen wie Styrol zeigen daher *in-vitro* keinerlei SCE-Induktionen [150]. Styrol wird intrazellulär nicht metabolisiert und weist per se keine genotoxische Wirkung auf. Auch in Anwesenheit von in großen Vesikeln solubiliertem Styrol können keine Unterschiede zu den jeweiligen Kontrollexperimenten beobachtet werden (vgl. Abbildung 6-4).

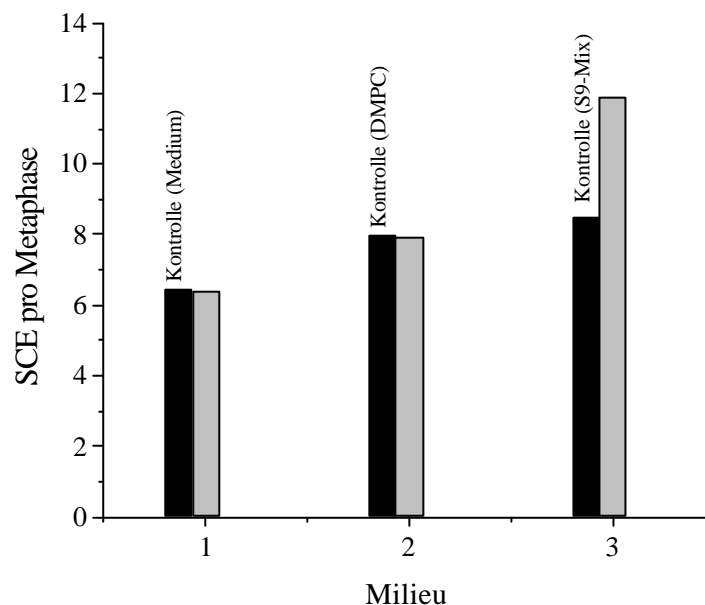


Abbildung 6-4: SCE-Häufigkeit in CHO-Zellen unter dem Einfluß von Styrol ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in wäßriger Lösung und Styrol ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) solubilisiert in großen unilamellaren DMPC-Vesikeln ( $c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Ausgewertet wurden jeweils 50 Metaphasen. Bei Anwesenheit eines exogenen Metabolisierungssystems ist ein deutlicher Anstieg der SCE-Frequenz beobachtbar.

Erst unter dem Einfluß eines exogenen Metabolisierungssystems, dem S9-Mix, kommt es zu einem deutlichen Anstieg der SCE-Frequenz. Grund hierfür ist die enzymatische Oxidation von Styrol zu elektrophilem 1-Phenyl-1,2-epoxyethan. Dieses kann nukleophil an die

DNS addiert oder konkurrierend in Phenylglycol transformiert und in Form von Glucoriniden ausgeschieden werden [150]. Tritt eine Inhibierung der Epoxid-Hydrase auf, so wird vermutlich die Phase-II-Metabolisierung zu nicht mutagenem 1-Phenyl-1,2-dihydroxyethan gehemmt und die Reaktion mit der DNS begünstigt [150]. Weiterhin ist ein oxidativer Abbau von Styrol zu Benzoesäure möglich [132].

Zudem zeigt Abbildung 6-4 anhand der Kontrollexperimente, daß selbst bei Abwesenheit eines Mutagens SCE beobachtet werden. Die Substitution des Thymidin durch BrdUrd führt innerhalb der Chromosomen per se zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz [151]. Grund hierfür sind Radikalreaktionen, die durch die Abspaltung eines Bromradikals ausgelöst werden und SCE induzieren können. Aus diesem Grunde sind Kontrollexperimente unerlässlich.

Bei Abwesenheit einer mutagenen Substanz ist eine Erhöhung der SCE-Frequenz allein durch die Präsenz der Vesikel zu beobachten. Abbildung 6-5 verdeutlicht die Konzentrationsabhängigkeit dieser Induktion. Da die molekulare Löslichkeit von DMPC vernachlässigbar klein ist, kann dies als deutlicher Hinweis auf eine Interaktion der Vesikel mit den CHO-Zelle gewertet werden.

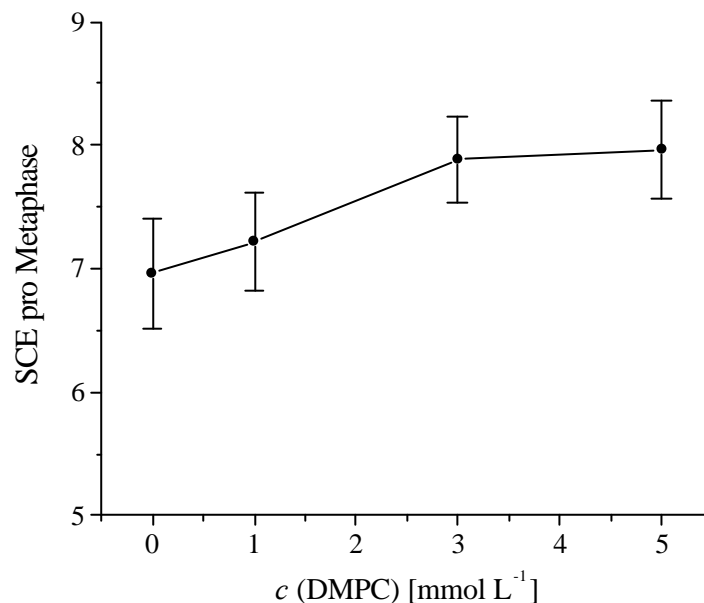


Abbildung 6-5: Konzentrationsabhängige SCE-Induktion unter dem Einfluß großer unilamellarer DMPC-Vesikel (LUV) in Abwesenheit mutagener Substanzen. Die Balken bezeichnen den Standardfehler des Mittelwertes von jeweils 50 untersuchten Metaphasen.

Die Induktion der SCE erfolgt in diesem Falle vermutlich auf indirektem Wege durch einen verstärkten Einbau vesikulärer Lipide in die Plasmamembran. Hierdurch wird der Ordnungszustand der Membran gestört, ein Vorgang, der nachfolgend die Integrität der Plasmamembran und der hierin verankerten Membranproteine in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigen kann [132]. Eine veränderte Permeabilität sowie Aktivität wichtiger Enzymsy-

steme aufgrund einer veränderten Zusammensetzung der Plasmamembran sind die Folge [6]. Erfolgt hierdurch eine Beeinträchtigung der zur exakten Replikation notwendigen Zellfunktionen, oder den Reparaturenzymen, so wird eine Erhöhung der SCE möglich.

Da der verwendete Zelltyp über ein sehr eingeschränktes Metabolisierungssystem verfügt, wurden nachfolgende Versuche mit reaktiven Spezies wie beispielsweise Phase-I-Metaboliten durchgeführt. Verglichen wurde wiederum die Wirkung des Mutagens in wäßriger Lösung mit derjenigen der, im lipophilen Membranbereich von Vesikeln, solubilierten Substanz. Die eingesetzten Mutagene können aufgrund ihrer unterschiedlichen Wirkungsweise und Wasserlöslichkeit klassifiziert werden. Benzylchlorid [152] mit einer Wasserlöslichkeit von  $0.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  [132] und Ethylmethansulfonat ( $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) [153] schädigen die DNS durch Alkylierung, bzw. Benzilylierung. 1-Phenyl-1,2-epoxypropan kann nukleophil an die Basen der DNS addiert werden [154]. Aber auch eine indirekte Induktion von SCE durch Inhibition von Enzymen, die an der DNS-Reparatur beteiligt sind, ist möglich. So bewirkt 3-Aminobenzamid eine Hemmung der Poly(ADP-ribose)polymerase, die an der Exzisionsreparatur in Säugetierzellen beteiligt ist. Diese Inhibierung führt zu einer Anhäufung unreparierter Stellen in der DNS, die während der S-Phase des Zellzyklus zu SCE führen können [155]. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Abbildung 6-6 dargestellt.

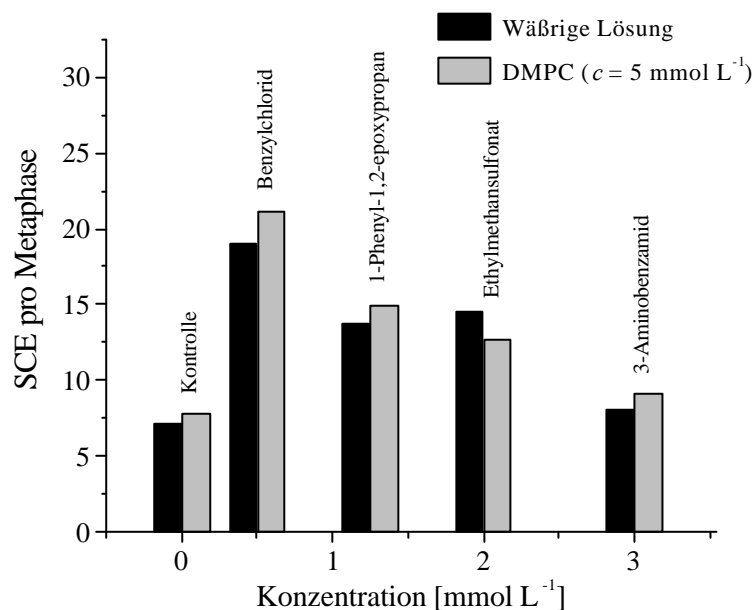


Abbildung 6-6: Vergleich der SCE-Häufigkeit in CHO-Zellen nach Einwirkung unterschiedlicher Mutagene jeweils in wäßriger Lösung und in großen unilamellaren DMPC-Vesikeln (LUV) solubiliert. Die Substanzen wurden in unterschiedlichen Konzentrationen entsprechend Literaturdaten [152, 154, 156, 157] eingesetzt.

Auffällig zeigt sich bei dem Vergleich der Effektivität der SCE-Induktionen (Abbildung 6-6), daß bei der Verwendung von solubilisierten Mutagenen in großen Vesikeln in fast allen Fällen eine geringfügige Erhöhung zu beobachten ist. Einzig im Falle des Ethylmethansulfonat wird ein gegensätzlicher Effekt beobachtet. Dieser läßt sich jedoch gut mit der um einem Faktor 100 höheren Wasserlöslichkeit im Vergleich zu dem in der Wirkungsweise ähnlichen Benzylchlorid erklären.

In Abbildung 6-7 ist die vergleichende Untersuchung in Form einer dosisabhängigen SCE-Induktion am Beispiel von 1-Phenyl-1,2-epoxypropan dargestellt. Diese läßt eine leichte dosisabhängige Erhöhung geschädigter Metaphasen nach Solubilisierung des Metabolits in Phospholipidvesikeln im Vergleich zum nicht solubilisierten Mutagen erkennen. Diese ist jedoch nicht statistisch signifikant.

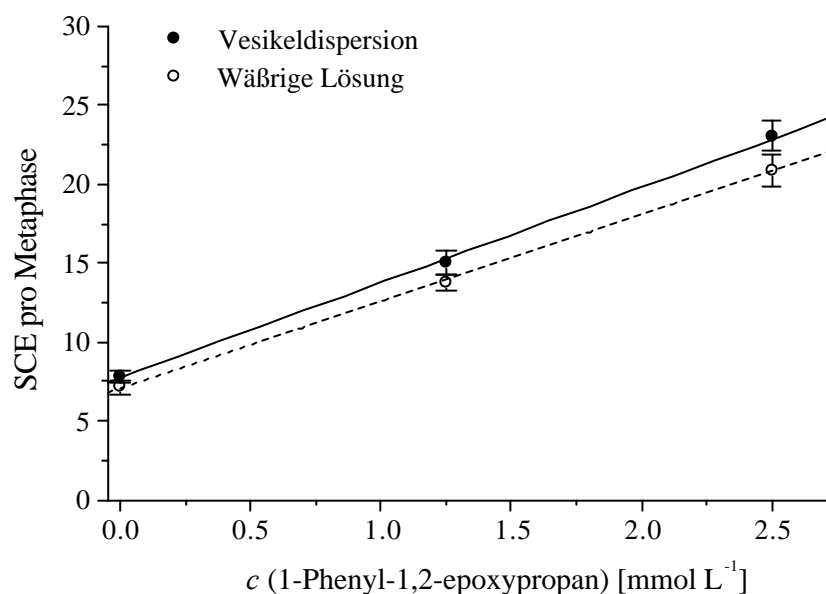


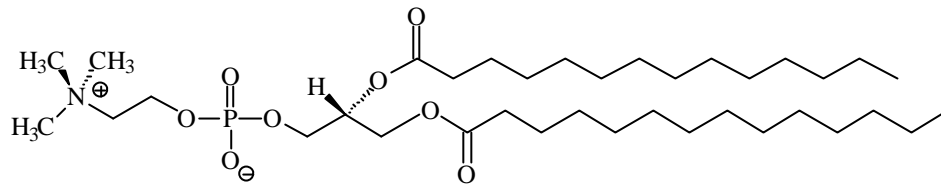
Abbildung 6-7: SCE-Induktion durch in Vesikeln solubilisiertes (●) und nicht solubilisiertes (○) 1-Phenyl-1,2-epoxypropan. Die letale Dosis konnte in beiden Fällen bei einer Konzentration von  $3.75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ermittelt werden. Die Balken repräsentieren den Fehler des Mittelwertes.

#### 6.4.2 Einfluß der Oberflächenladung auf die Vesikel-Zell-Interaktion

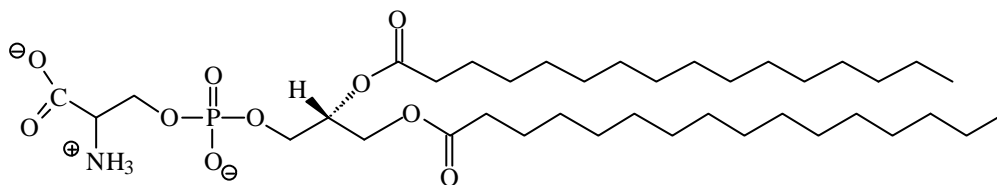
Die Oberflächenladung von Vesikeln kann den Mechanismus der Wechselwirkung mit Zellen dirigieren. So konnte nachgewiesen werden, daß negativ geladene Vesikel über Prozesse der Endocytose ins Zellinnere gelangen [158]. Aus diesem Grund wurde ein möglicher Einfluß der Oberflächenladung der Vesikel auf die Induktion von Schwesterchromatidenaustauschen in CHO-Zellen unter Verwendung von solubilisiertem 1-Phenyl-1,2-epoxypropan analysiert.



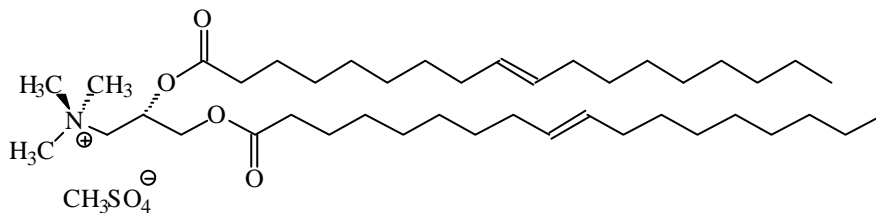
Neben dem bei  $\text{pH} = 7$  zwitterionischen DMPC wurden aus diesem Grunde zusätzlich äquimolare Gemische von DMPC mit geladenen Lipiden (vgl. Abbildung 6-8) verwendet. Auf die Verwendung einkettiger kationischer Tenside wurde verzichtet, da diese eine wesentlich höhere Cytotoxizität aufweisen als vergleichbare zweikettige [11]. Somit wurde auf DOTAP (vgl. Abbildung 6-8) zurückgegriffen. Dieses Amphiphil findet Anwendung in der liposomen-vermittelten Transfektion, dem Einschleusen von Polynucleotiden in lebende Zellen.



1,2-Dimyristoylphosphatidylcholin (DMPC)



1,2-Dipalmitoylphosphatidylserin (DPPS)



*N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP)

Abbildung 6-8: Vergleich der verwendeten Amphiphile unterschiedlicher Ladung.

Ein signifikanter Einfluß der Oberflächenladung großer Vesikel (LUV) auf die beobachtete SCE-Frequenz konnte jedoch bei Anwesenheit von solubilisiertem 1-Phenyl-1,2-epoxypropan nicht beobachtet werden (vgl. Abbildung 6-9).

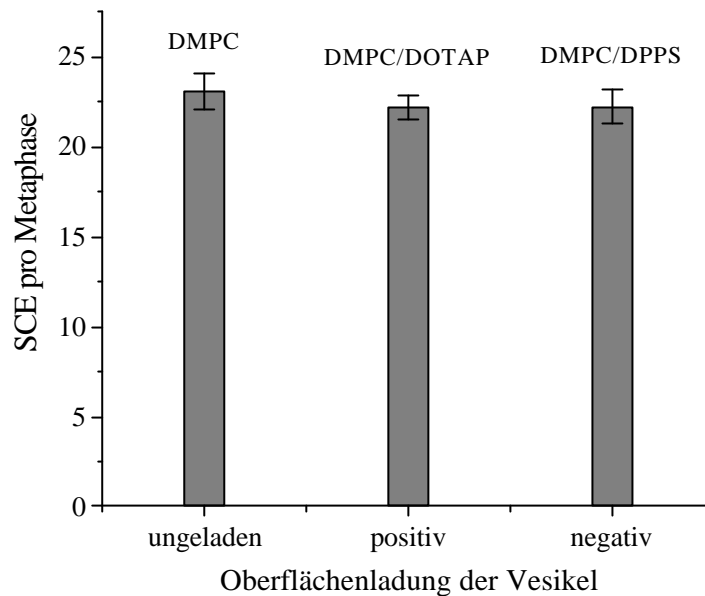


Abbildung 6-9: Einfluß der Oberflächenladung großer unilamellarer Vesikel ( $c = 5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) auf die SCE-Induktion durch solubilisiertes 1-Phenyl-1,2-epoxypropan ( $c = 2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

#### 6.4.3 Einfluß der Vesikelgröße auf die Vesikel/Zell-Interaktion

Die Größe der verwendeten Vesikel zeigt keinerlei Einfluß auf die SCE-Induktion in Abwesenheit einer mutagenen Substanz (Daten nicht aufgeführt). Auffällig ist jedoch die Erhöhung der SCE-Frequenz in Anwesenheit eines Mutagens (Abbildung 6-10) bei Verwendung kleiner unilamellarer Vesikel. Diese ist sowohl im Vergleich zur wäßrigen Lösung des Mutagens, als auch gegenüber der Verwendung großer Vesikel signifikant.

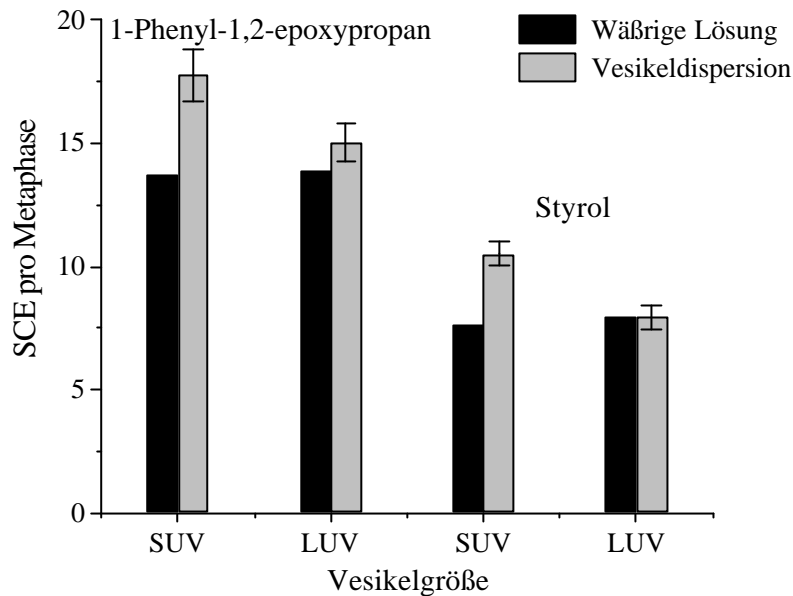


Abbildung 6-10: Einfluß der Vesikelgröße auf die SCE-Induktion durch solubilisiertes 1-Phenyl-1,2-epoxypropan ( $c = 1.25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und Styrol ( $c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in kleinen (SUV) und großen Vesikeln (LUV). Zum Vergleich sind die jeweiligen SCE-Häufigkeiten des im phospholipidfreien Medium gelösten Mutagens gleicher Konzentration angeführt.

Die beobachteten Unterschiede der SCE-Induktion kleiner ( $d < 40 \text{ nm}$ ) und großer Vesikel ( $d \approx 100 \text{ nm}$ ) sind innerhalb einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % signifikant. Bei gleicher Konzentration des solubilisierten Mutagens bewirken kleine Vesikel (SUV) somit eine effektivere Erhöhung des mutagenen Potentials gegenüber großen Vesikeln (LUV). Desweiteren zeigen selbst mit Styrol beladene, kleine unilamellare Vesikel eine deutliche Induktion von SCE bis zu Werten von 10.2 SCE pro Zelle (Abbildung 6-10). Die Ergebnisse der Untersuchungen weisen jedoch in diesem Fall eine schlechte Reproduzierbarkeit auf. Insbesondere direkt nach der Vesikelbeladung eingesetzte Dispersionen induzieren vergleichbar mehr SCE.

Je nach Vesikelgröße liegen somit vermutlich unterschiedliche Mechanismen der Interaktion von Vesikel und Zelle vor, die im folgenden detailliert betrachtet werden.

Die Tatsache, daß die SCE-Induktion mäßig wasserlöslicher Mutagene nur unwesentlich davon abhängt, ob die Substanz molekular gelöst, oder in Vesikeln solubilisiert vorliegt, ist zunächst überraschend. Dies deutet darauf hin, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Induktion der SCE im Zellinneren lokalisiert ist. Die Komplexität des Systems erschwert jedoch eine exakte, detaillierte Aussage über potentielle Mechanismen. In Abbildung 6-11 sind mögliche Interaktionen von Vesikeln mit einer Zelle dargestellt, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Mechanismen des Eintrags einer solubilisierten lipophilen Substanz in das Cytoplasma differenziert werden können.

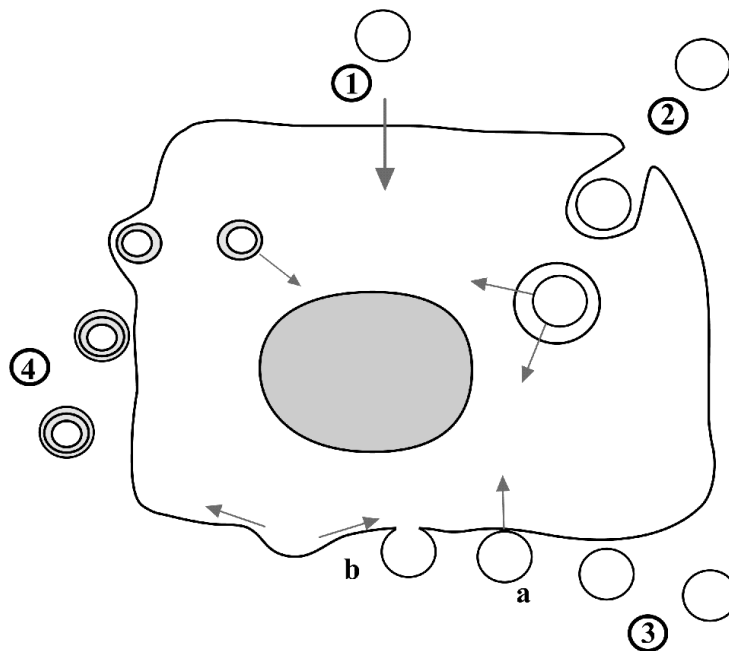


Abbildung 6-11: Schematische Darstellung möglicher Interaktionen schadstoffbelasteter Vesikel mit kultivierten Zellen.

1. Diffusion der lipophilen Substanz über die Wasserphase durch die Zellmembran.
2. Endocytose unilamellarer Vesikel und anschließende Auflösung der Vesikel durch lysosomale Enzyme nach Wechselwirkung mit Lysosomen.
3. Diffusion unilamellarer Vesikel zur Plasmamembran und
  - a) Adhäsion unter Freisetzung der lipophilen Substanz in hoher Konzentration im Bereich der Zelloberfläche und anschließendem Eintrag des Mutagens in Bereiche der Plasmamembran sowie ins Cytosol.
  - b) Fusion mit der Plasmamembran unter Assimilation der Komponenten der Vesikelmembran.
4. Fusion multilamellarer Vesikel mit der Plasmamembran unter Eintrag innerer Lamellenstrukturen ins Cytosol.

Die Untersuchungen in Abwesenheit eines Mutagens zeigen, daß eine Wechselwirkung großer unilamellarer Vesikel mit der Zelle vermutlich nach Adsorption unter Einbau vesikulärer Lipide in die Plasmamembran erfolgt (Schritt 3a in Abbildung 6-11). Direkte Fusionen mit der Plasmamembran (Schritt 3b) werden im Falle großer Vesikel kaum beobachtet [2]. In Gegenwart einer lipophilen mutagenen Substanz sollten beim Auftreten adsorbierter Vesikel lokal hohe Dosen des Mutagens freigesetzt werden. Diese können nahezu ungehindert durch die Plasmamembran diffundieren und gelangen somit in das Zellinnere und letztendlich zum Zellkern, wobei im Cytoplasma eine starke Verdünnung erfolgt. Falls die Dispersionen aufgrund ihrer Präparation auch multilamellare Vesikel aufweisen, gelangen hierbei die inneren Lamellen direkt ins Cytosol (Schritt 4).

Die Wechselwirkung kleiner unilamellarer Vesikel (SUV) mit der Plasmamembran unterscheidet sich vermutlich von der großer (LUV).

Kleine unilamellare Vesikel weisen eine vergleichsweise hohe Brown'sche Dynamik auf. Sie können vermutlich sterische Barrieren wie die Glykokalix nahezu ungehindert überwinden und interagieren statistisch häufiger mit der Plasmamembran. Aber nicht nur die Größe, sondern auch die im Vergleich zu großen Vesikeln abweichenden Eigenschaften sollten das Verhalten entscheidend dominieren. Die diskutierten hohen Krümmungen führen innerhalb kleiner Vesikel zu hohen Membranspannung. Dies verstärkt deutlich die Neigung zu Fusionen, insbesondere mit der Plasmamembran. Ferner zeigen diese hochgespannten Aggregate kaum noch thermisch bedingte Undulationen, die im Falle großer Vesikel als abstoßende Kräfte bei der Annäherung an Oberflächen wirken.

Im Falle kleiner Vesikel existieren eine Reihe von zum Teil widersprüchlichen Hinweisen auf eine Vesikel/Zell-Interaktion in Form einer verstärkten Fusion der Vesikel mit der Zellmembran [159] sowie auf das Eindringen der Vesikel mittels Endocytose [160]. Dies zeigen beispielsweise Untersuchungen unter Verwendung von wasserlöslichem Carboxyfluorescein [159]. Die Fluoreszenz von Carboxyfluorescein wird im wäßrigen inneren Kompartiment kleiner Vesikel aufgrund der hohen lokalen Konzentration gequenchet. Die Wechselwirkung mit Zellen führt zur Freisetzung von Carboxyfluorescein ins Cytosol und zum Auftreten einer Fluoreszenz aufgrund des Verdünnungseffektes. Hiermit läßt sich jedoch nicht eindeutig klären, ob die Fusion der Vesikel mit der Plasmamembran der Zellen (Schritt 3b) als passiver Mechanismus auftritt oder ein Einschleusen der Vesikel via Endocytose (Schritt 2) erfolgt. Letztgenannter Mechanismus wird im Falle kleiner Vesikel oftmals diskutiert. Die Endocytose ist bei kleinen Vesikeln im Gegensatz zu großen möglich. Der Grund hierfür liegt im eigentlichen Aufbau der Plasmamembran begründet. Auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht ist ein Polymernetzwerk, das sogenannte Cytoskelett verankert, welches die elastischen Eigenschaften der Membran maßgeblich bestimmt. Um ein Vesikel zu phagozytieren, muß die Plasmamembran gekrümmt werden (vgl. Schritt 2 in Abbildung 6-11). Dies ist jedoch nur bis zu einer bestimmten Vesikelgröße möglich, da oberhalb einer Größe von etwa 100 nm die Maschengröße des Cytoskeletts limitierend wirkt. Aus diesem Grund gelangen vermutlich nur sehr kleine Vesikel in die Zelle, wobei diese nach Eindringen ins Zellinnere in der Regel mit Lysosomen verschmelzen. Die lysosomalen Enzyme bewirken einen schnellen interzellulären Abbau der Vesikel unter Freisetzung der solubilisierten mutagenen Substanzen. Ferner können nicht mutagene Substanzen während des Abbauprozesses metabolisiert werden. Letztendlich erfolgt somit ein effektiver Eintrag der reaktiven Spezies ins Cytosol, woraus eine erhöhte Wahrscheinlichkeit der Reaktion mit der Erbsubstanz resultiert. Das Eindringen kleiner unilamellarer Vesikel in die Zelle sowie die verstärkte Fusion mit der Plasmamembran ist folglich eine Erklärung für die in Abbildung 6-10 gezeigte Abhängigkeit der SCE-Induktion von der Vesikelgröße.

## 6.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend kann angeführt werden, daß unter dem Einfluß von DMPC-Vesikeln in Abwesenheit eines Mutagens eine Erhöhung der SCE-Frequenz bei CHO-Zellen als Folge der Vesikel/Zell-Interaktion zu beobachten ist. Diese Erhöhung führt bei Verwendung großer unilamellarer Vesikel vermutlich zu einer Beeinträchtigung der Funktion membrangebundener Enzymsysteme.

Die Solubilisierung eines lipophilen Mutagens in großen Vesikeln hat keinen signifikanten Einfluß auf die Frequenz induzierter Schwesterchromatidenaustausche für Konzentrationen innerhalb der Wasserlöslichkeit der Substanz. Eine erhöhte Anzahl SCE kann jedoch nach Solubilisierung in kleinen Vesikeln beobachtet werden, die aufgrund ihrer Größe und strukturellen Eigenschaften effektiver *in-vitro* mit CHO-Zellen interagieren und vermutlich über die Phagozytose direkt ins Zellinnere gelangen.