

Genotoxizität des Mykotoxins Ochratoxin A *in vitro*

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Stefan Lebrun

aus Neukirchen-Vluyn

Dortmund 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Frank Wunderlich

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn

Tag der mündlichen Prüfung: 13.10.2003

Diese Dissertation wurde im Rahmen eines DFG-Forschungsprojektes mit dem Titel „Einsatz humaner Urothelzellkulturen zur Untersuchung adverser Effekte des Mykotoxins Ochratoxin A“ in der Zeit von November 1999 bis Februar 2003 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann M. Boldt durchgeführt.

Teile dieser Arbeit sind in folgender Zeitschrift veröffentlicht worden:

Arch Toxicol. 2002 Jan; 75(11-12):734-41

Lebrun S., Föllmann W.

Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Einleitung	1
1.1. Ochratoxin A	1
1.1.1. Vorkommen	1
1.1.2. Toxikokinetik	2
1.1.3. Klinische Bedeutung	4
1.2. Bedeutung von Zellkulturen in der Toxikologie	6
1.2.1. Verwendete Zellkulturen	7
1.3. Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme	9
1.3.1. Cytochrom P450 1A2	10
1.3.2. Gluthation-S-Transferasen M1, T1 und P1	11
1.3.3. N-Acetyltransferase 2	13
1.4. Ziele der Arbeit	14
2. Material	16
2.1. Probenmaterial	16
2.1.1. Humaner Harnleiter und EDTA-Blutproben	16
2.1.2. Harnblase vom Schwein	16
2.2. Permanente Zellkulturen	16
2.3. Zellkulturbedarf	17
2.4. Chemikalien	17
2.5. Medien für die Zellkultur	18
2.6. Lösungen und Kits	20
2.7. Geräte	21

3. Methoden	23
3.1. Zellkultur	23
3.1.1. Isolierung humaner Urothelzellen aus dem Harnleiter (engl.: human urothelial cells = HUC)	23
3.1.1.1. Präparation	23
3.1.1.2. Kulturbedingungen	23
3.1.2. Isolierung von Schweineharnblasenepithelzellen (engl.: porcine urinary bladder epithelial cells = PUBEC)	23
3.1.2.1. Präparation	23
3.1.2.2. Kulturbedingungen	24
3.1.3. Kulturbedingungen permanenter Zelllinien	24
3.1.4. Pasagieren der Zellen mit Trypsin	25
3.1.5. Bestimmung der Zellzahl	25
3.1.6. Bestimmung der Vitalität	25
3.1.7. Cryopräservation	26
3.2. Neutralrot-Assay	26
3.3. Aufnahme von [³H]-OTA	27
3.4. Proteinbestimmung	27
3.5. Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)	28
3.5.1. Vorbereitung der Objektträger	28
3.5.2. Inkubation der Zellen	28
3.5.3. Zellpräparation	29
3.5.4. Alkalidenaturierung und Elektrophorese	30
3.5.5. Neutralisation und Entwässerung der Objektträger	30
3.5.6. Bildanalyse	30
3.5.7. Auswertung	31
3.6. DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	31
3.7. Bestimmung der Konzentration und Reinheit der DNA	32
3.8. Genotypisierung	32
3.8.1. Cytochrom P450 1A2	32
3.8.1.1. PCR	32
3.8.1.2. Auswertung	33
3.8.2. Glutathion-S-Transferase M1 und T1	33
3.8.2.1. PCR	33
3.8.2.2. Auswertung	34
3.8.3. Glutathion-S-Transferase P1	34
3.8.3.1. PCR	34
3.8.3.2. Auswertung	35
3.8.4. N-Acetyl-Transferase 2	35
3.8.4.1. PCR	35
3.8.4.2. Auswertung	38

4. Ergebnisse	39
4.1. PUBEC, MDCK-, IHKE-, und 5637-Zellen	39
4.1.1. Neutralrot-Assay	39
4.1.1.1. OTA Dosis-Wirkungskurve in verschiedenen Zellsystemen nach 24 h Inkubation	39
4.1.1.2. OTA Dosis-Wirkungskurve in verschiedenen Zellsystemen nach 3 h Inkubation	42
4.1.1.3. Zytotoxizität von Cytosinarabinosid und Hydroxyurea (araC/HU)	43
4.1.1.4. Zytotoxizität von Methotrexat	45
4.1.1.5. Neutralrotaufnahme unter physiologischen und sauren pH-Bedingungen	47
4.1.2. Comet Assay	51
4.1.2.1. OTA Dosis-Wirkungs-Beziehung	51
4.1.2.2. Zeitlicher Verlauf der durch OTA induzierten DNA-Schäden	56
4.1.2.3. Co-Inkubation mit Methotrexat	61
4.1.2.4. DNA- Reparatur/Erholung	64
4.1.2.5. Inkubation mit OTA unter physiologischen und sauren pH-Bedingungen in HEPES-Ringer-Puffer	67
4.1.3. Aufnahme von [³ H]-OTA	71
4.2. Humane Harnleiter	74
4.2.1. Comet Assay mit humanen Urothelzellen	74
4.2.1.1. OTA Inkubation	75
4.2.1.2. Medium- und Positivkontrolle	76
4.2.2. CYP1A2, GSTT1, GSTM1, GSTP1 und NAT2 Genotypisierung	77
4.2.3. Verteilung der Genotypen	78
5. Diskussion	79
5.1. Zytotoxizität von OTA	79
5.2. Genotoxizität von OTA	83
5.3. Aufnahme von OTA	87
5.4. Bioaktivierung von OTA	90
5.4.1. Cytochrom P450 1A2	91
5.4.2. Gluthation-S-Transferase	92
5.4.3. N-Acetyltransferase 2	93
5.5. Fazit und Ausblick	93
6. Zusammenfassung	96
7. Literaturverzeichnis	98
8. Anhang	121

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
araC	Cytosine β -D-Arabino-Furanosid
araCTP	Cytosine β -D-Arabino-Furanosidtriphosphat
BEN	Balkan endemic nephropathy
bp	Basenpaar
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
CYP	Cytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinacid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
EB	Ethidiumbromid
ε	millimolarer Extinktionskoeffizient
FCS	fetal calf serum
g	Gravitationskonstante = $9,81 \text{ m/s}^2$
g	Gramm
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-s-Transferase
h	Stunde
HR	HEPES-Ringer-Puffer
HU	Hydroyurea
HUC	Human urothelial cells
IC	Inhibitorische Konzentration
IHKE	Immortalized Human Kidney Epithel cells
l	Liter
KDI	Kaliumdichromat
LMP	(low melting point)-Agarose
Lsg.	Lösung
m	Meter
Max.	maximal
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MT	Methotrexat
min	Minute
μ	mikro
MRP	multidrug-resistance protein
n	nano
NADH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotidphosphat, reduziert
NAT	N-Acetyltransferase
NR	Neutralrot
NMP	(normal melting point)-Agarose
OAT	organische Anionentransporter
oatp	organic anion transporting polypeptid
OD	optische Dichte
OTA	Ochratoxin A
[^3H]OTA	[^3H]Ochratoxin A
OT- α	Ochratoxin-alpha

p	pico
PBS	Phosphatpuffer
PCR	polymerase chain reaktion
PEPT	Proton-Dipeptid Kotransporter
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffkonzentration
PHS	Prostaglandin-H-Synthase
ROS	reactive oxigen species
RT	Raumtemperatur
PUBEC	Porcine urinary bladder epithelial cells
s	Sekunde
S9	90.000 x g; Überstand eines Rattenleberhomogenates
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	unit
UV	ultraviolet

1. Einleitung

1.1. Ochratoxin A

1.1.1. Vorkommen

Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA) ist ein sekundäres Stoffwechselprodukt verschiedener Schimmelpilze, hauptsächlich der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*. OTA wurde erstmalig 1965 aus *Aspergillus ochraceus*-Kulturen isoliert, die daher namensgebend waren (MERWE *et al.* 1965). SCHUH UND SCHWEIGHARDT (1981) geben eine Reihe von *Aspergillus*- und *Penicillium*-Arten an, die in der Lage sind Ochratoxin A zu bilden. Sie gehören zu der Gruppe der Lagerpilze, d.h. sie sind normalerweise auf pflanzlichen Produkten erst nach der Ernte nachzuweisen (GEDEK 1980). Aus der Gruppe der *Penicillien* treten in kühleren Regionen überwiegend *Penicillium verrucosum*-Stämme auf lagerndem Getreide und als Kontaminanten in Lebensmitteln auf. *Aspergillus ochraceus* ist häufiger in wärmeren Gegenden zu finden, kann aber auch auf einheimischen Getreide nachgewiesen werden (SCHMIDT 1989).

Eine Studie von WOLFF UND RICHTER (1992) zeigte, dass im Zeitraum von 1990 bis 1991 Getreide, das die gesamte deutsche Ernte repräsentierte, in 50 bis 80 % des Probenmaterials eine nachweisbare OTA-Kontamination aufwies. Neben Getreide, wie Gerste, Weizen, Mais (WOOD *et al.* 1996), Roggen, Hafer (BAUER UND GAREIS 1987) und Reis (JELINEK *et al.*), können auch Mehl (CHELKOWSKI *et al.* 1980), Bier (PAYEN *et al.* 1983), Kaffeebohnen (MICCO *et al.* 1989), Feigen, gemahlene Haselnüsse, Erdnüsse, Olivenöl (LE TUTOUR *et al.* 1983) und Gewürze (EL-KADY *et al.* 1995) mit OTA kontaminiert sein. Futtergetreide ist in der Regel deutlich höher mit OTA belastet als Getreide für die menschliche Ernährung (SCHWEIGHARDT UND LEIBETSEDER 1981).

Da OTA in tierisches Gewebe übergeht (BUECHMANN UND HALD 1985) und z.B. Blut und -Plasma von Schweinen in verschiedenen Wurstwaren verarbeitet wird (SCHEUER UND LEISTNER 1985), wird OTA auch relativ häufig in Lebensmitteln tierischer Herkunft gefunden. Für Deutschland wurde eine tägliche OTA-Aufnahme von 0,85-0,92 ng/kg Körpergewicht berechnet und es konnte OTA in 92 % humaner Serum-Proben aus sieben Regionen in Deutschland OTA nachgewiesen werden (ROSNER *et al.* 1998). Eine weitere OTA-Quelle ist Hausstaub aus Wohnungen mit Schimmelpilzbefall. Es konnten OTA-Gehalte bis zu 5,1 µg/kg Hausstaub nachgewiesen werden (KASEL *et al.* 1999).

1.1.2. Toxikokinetik

Nach oraler Aufnahme wird OTA von der Magen- und Dünndarmschleimhaut resorbiert (ROTH *et al.* 1988). STUDER-ROHR (1995) zeigte, dass die Halbwertszeit im Serum für den Menschen nach oraler Einnahme 840 h betrug. Die Halbwertszeit von OTA im Serum von Tieren, mit Ausnahme der Rhesusaffen (Makaken, *macaca mulata*), ist deutlich geringer (**Tabelle 1-2**). Dabei liegt die Halbwertszeit bei oral verabreichtem OTA in der Regel deutlich niedriger als bei intravenös (*i.v.*) zugeführtem OTA. Dies ist darin begründet, dass ein Teil des resorbierten Toxins über die Pfortader zur Leber transportiert und dort zum Teil metabolisiert wird („first pass effect“). Teilweise wird OTA auch über die Galle ausgeschieden, so dass OTA auch dem enterohepatischen Kreislauf unterliegt (APPELGREN UND ARORA 1983). Die Clearance in der Leber erfolgt über einen multifunktionalen Gallensäure-Transporter (engl. = organic anion transporting polypeptide carrier; oatp carrier) (KONTAXI *et al.* 1996).

Tab. 1-2: Toxikokinetische Daten für OTA in verschiedenen Tierspezies nach oraler und intravenöser (*i.v.*) Verabreichung von 50 µg OTA (HAGELBERG *et al.* 1989), bzw. von 395 ng OTA in Ethanol beim Menschen (STUDER-ROHR 1995).

	Wachtel	Maus	Schwein	Ratte	Affe	Mensch	Makake
Halbwertszeit ($t_{1/2}$ [h]) <i>i.v.</i>	12	48	150	170	840	-	1400
Halbwertszeit ($t_{1/2}$ [h]) per os	6,7	39	72	120	510	840	840
max. Plasmakonzentration (C_{max})[ng/ml]	260	370	490	390	500	-	-

Die Niere ist ebenfalls wichtig für die Ausscheidung. OTA weist eine Plasmaeiweißbindung von bis zu 99 % auf (HAGELBERG *et al.* 1989), die unter natürlich vorkommenden Konzentrationen von 1 bis 100 nM unlöslich ist (STOJKOVIC *et al.* 1984). Aus diesem Grund wird OTA nicht durch glomeruläre Filtration, sondern vielmehr durch tubuläre Sekretion an den Urin abgegeben. Dieser Prozess wird durch multispezifische organische Anionentransporter (OAT), die in der basolateralen Zellmembran von proximalen Nierentubuluszellen lokalisiert sind, vermittelt (JUNG *et al.* 2001, TAKEUCHI *et al.* 2001, SOKOL *et al.* 1988). OTA kann in allen Nephron-

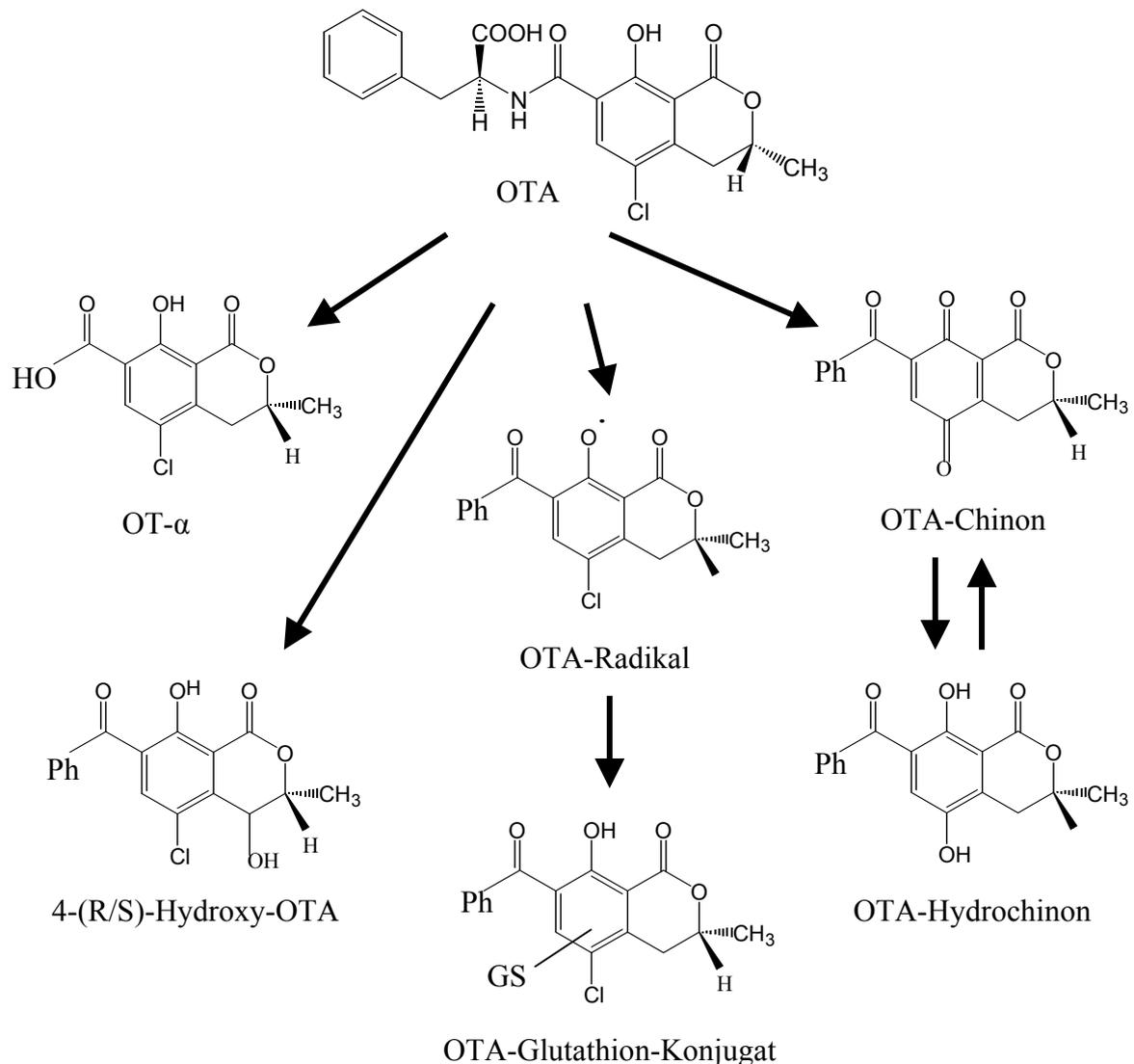
Segmenten wieder resorbiert werden (ZINGERLE *et al.* 1997, DAHLMANN *et al.* 1998). Dies kann zu einer Akkumulation des Toxins im Nierengewebe (SCHWERDT *et al.* 1996) und somit zu einer Erhöhung seiner Toxizität führen, z. B. durch die Störung der pH-Homöostase in der renalen Papilla (KURAMOCHI *et al.* 1997 a,b). Daher treten spezifische toxische Effekte besonders häufig in der Niere auf (ELLING UND MÖLLER 1973, ELLING 1979, GOLINSKI *et al.* 1984, 1985).

Mögliche Mechanismen der Toxizität von OTA werden zur Zeit kontrovers diskutiert. Eine Reihe von Autoren gehen davon aus, dass das OTA-Molekül selbst für die beobachteten adversen Effekte verantwortlich ist (KURAMOCHI *et al.* 1997 a,b, GAUTIER *et al.* 2001, ZEPNIK *et al.* 2001, GROSS-STEINMEYER *et al.* 2002), während andere vermuten, dass bei einer Verstoffwechslung von OTA reaktive Moleküle entstehen können und diese für die Toxizität von OTA verantwortlich sind (MALAVEILLE *et al.* 1994, GROENE *et al.* 1996, GROSSE *et al.* 1997, PFOHL-LESKOWICZ *et al.* 1998, GILLMAN *et al.* 1999, LEWIS *et al.* 1999, EL ADLOUNI *et al.* 2000).

In der Ratte wird OTA unter hydrolytischer Abspaltung von Phenylalanin in das weniger toxische Ochratoxin-alpha (OT- α) umgewandelt (SUZUKI *et al.* 1977). Lebermikrosomen von Schwein, Ratte und Mensch wandeln OTA in (4R)- und (4S)-4-Hydroxy-OTA um (STORMER *et al.* 1981) (**Abbildung 1-1**). Weitere mögliche Stoffwechselwege werden von MALAVEILLE *et al.* (1994) und GILLMAN *et al.* (1999) vorgeschlagen. MALAVEILLE *et al.* postulieren die Bildung eines OTA-Radikals durch eine Peroxidase und die anschließende Konjugation mit Glutathion über Glutathion-S-Transferasen. Die Autoren schreiben die toxische Wirkung des OTA dem Radikal oder einem Thioderivat zu, das aus dem Konjugat entstehen könnte. GILLMAN *et al.* schlagen die Bildung eines OTA-Chinons unter Einfluss eines Eisen-Porphyrin-Systems vor. Das OTA-Chinon könnte dann weiter zu OTA-Hydrochinon reagieren, wobei reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen würden.

Die Ausscheidung von OTA erfolgt über Harn und Fäzes (GALTIER *et al.* 1979), wobei auch ein Teil des OTA unverstoffwechselt ausgeschieden wird (SUZUKI 1977, STOREN 1982).

Abb. 1-1: In der Literatur beschriebene Stoffwechselwege des OTA. (Ph: Phenylalanin; GS: Glutathion)



1.1.3. Klinische Bedeutung

OTA ist kanzerogen, genotoxisch, teratogen, immunotoxisch und nephrotoxisch (KUIPER-GOODMAN und SCOTT 1989, BACH *et al.* 1992, GEKLE UND SILBERNAGL 1996, KUIPER-GOODMAN 1996, DEGEN *et al.* 1996). An Effekten auf zellulärer und molekularer Ebene konnten unter anderem DNA-Schäden (KANE *et al.* 1976, DEGEN *et al.* 1995), Hemmung der Proteinbiosynthese (CREPPY *et al.* 1984, DIRHEIMER UND CREPPY 1991), Hemmung der Atmung in Mitochondrien (MEISNER UND CHAN 1974), Lipidoxidation (OMAR *et al.* 1990) und Apoptose (SCHWERT *et al.* 1999, GEKLE *et al.* 2000) nachgewiesen werden. Diese breite Palette an Effekten und die ungewöhnlich

lange Halbwertszeit des Toxins im Serum unterstreichen die Bedeutung dieser Substanz für die menschliche Gesundheit.

Im Vordergrund der toxischen Wirkung von OTA steht seine Nephrotoxizität. Dabei handelt es sich nicht nur um experimentelle Beobachtungen, sondern es konnten auch spontan auftretende Mykotoxikosen bei Schweinen (KROGH *et al.* 1973) und Geflügel (HAMILTON *et al.* 1982) durch OTA beschrieben werden.

Auch im Bezug auf den Menschen gibt es Hinweise auf Erkrankungen der Niere und der ableitenden Harnsysteme, die durch OTA verursacht werden. DI PAOLO *et al.* (1994) berichteten über einen Fall von akutem Nierenversagen bei Siloarbeitern in Italien nach inhalativer Exposition gegenüber OTA. Erhöhte OTA-Konzentrationen wurden auch in Serum und Urin von Patienten gefunden, die in Gebieten mit endemischer Balkan-Nephropathie („Balkan endemic nephropathy = BEN) leben. Bei an BEN erkrankten Personen zeigt die Niere eine konzentrische Atrophie ohne Narben, eine Atrophie der Nierentubuli und eine interstitielle Fibrose (GODIN *et al.* 1997, DEUTSCHE FORSCHUNGSGESELLSCHAFT 1990). Auffallend ist dabei die Ähnlichkeit in den Änderungen der Nierenfunktion und –histologie zwischen BEN und der Nephropathie der Schweine, die durch OTA im Futter verursacht wurde (KROGH *et al.* 1977). Die Krankheit wurde später mit einer erhöhten Krebsrate im Bereich des Nierenbeckens, der Harnleiter und Blase assoziiert, bei der häufig mehrere Familienmitglieder betroffen waren (NICOLOV *et al.* 1978, MARKOVIC *et al.* 1985). Studien an ausgewanderten Personen oder Zwillingen wiesen nicht auf eine erbliche Disposition für BEN hin, sondern deuten mehr auf ökologische Faktoren (CEOVIC *et al.* 1985). In Bulgarien wurde in hyperendemischen Gebieten ermittelt, dass das relative Risiko an Harntraktumoren zu erkranken, im Vergleich zu Nicht-Endemiegebieten, 90-fach erhöht war (CHERNOZEMSKY 1991).

Zur Zeit ist OTA als ein Karzinogen in Gruppe 2B eingestuft („möglicherweise krebserregend beim Menschen“) (IARC 1993). Studien der letzten Jahre deuten jedoch auf eine Einteilung in die Gruppe 2A („wahrscheinlich krebserregend beim Menschen“) (KUIPER-GOODMAN 1996) hin.

1.2. Die Bedeutung von Zellkulturen in der Toxikologie

Tausende von Chemikalien werden jährlich neu synthetisiert. Sämtliche Substanzen, die einer Neuzulassung bedürfen, und eine Vielzahl von Altchemikalien müssen umfassend toxikologisch untersucht werden, um abschätzen zu können, welche Gefahren für Mensch und Umwelt von ihnen ausgehen. Tierversuche sind in einem solchen Umfang weder zu rechtfertigen noch zeitlich zu bewältigen. Zahlreiche *in vitro*-Testsysteme wurden bereits entwickelt. Zu den wenigen Bereichen in der Toxikologie, in denen *in vitro*-Systeme Tierversuche weitgehend ersetzt haben, gehört die Mutagenitätsprüfung. Da die DNA, das primäre Ziel für die Induktion von Mutationen, universell von Bakterien bis zum Menschen vorkommt, scheinen *in vitro*-Systeme, wie z.B. Ames-Test, Schwester-Chromatid-Austausch-Assay, Mikronukleus-Test und Comet Assay, hier besonders geeignet. Validierungsstudien in den USA, Japan und Europa ergaben, dass 85 bis 90 % der bei Maus und Ratte bekannten Kanzerogene im Salmonella-Säugermikrosomen-Test mutagen sind (ADLER *et al.* 1989). Dabei kann man allerdings nicht ohne weiteres davon ausgehen, dass Mutagene gleich Kanzerogene sind. So gibt es Kanzerogene, die nicht mutagen sind (z.B. Asbestfasern) und Mutagene, die nicht kanzerogen sind (z.B. gewisse Basenanaloge). Häufig findet man bei Labornagern Kanzerogene, die keine genotoxische Aktivität aufweisen (sog. nicht-genotoxische Kanzerogene); (ASHBY UND TENNANT 1988, ASHBY *et al.* 1989). Für Initiations-Kanzerogene, in deren Klasse eine Reihe für den Menschen bekannte Kanzerogene gehören, besteht eine hohe Korrelation zwischen genotoxischer Wirkung und kanzerogener Wirkung (SHELBY 1988). Daher sind Genotoxizitätstests zur Erfassung dieser Kanzerogene weiterhin von großer Bedeutung.

Zellkultur-Systeme bieten zusätzlich eine Reihe von Vorteilen gegenüber *in vivo*-Untersuchungen. Es liegt ein stark vereinfachtes Testsystem vor, da in der Regel nur ein Zelltyp kultiviert wird. Systemische Einflüsse, wie sie im Gesamtorganismus vorkommen, werden so ausgeschaltet. So dienen z.B. Epithelzellen aus der Niere der Untersuchung von Funktionen speziell dieser Zellen, die auf Grund der Heterogenität der Niere *in vivo* nicht durchgeführt werden können. Zudem können die Versuche unter definierten Bedingungen (Temperatur, osmotischer Druck, O₂- und CO₂-Konzentration) mit einem definierten Medium durchgeführt werden, wobei sich durch Hinzufügen oder Wegnahme von Zusatzstoffen physiologische und metabolische Phänomene untersuchen lassen. Testsubstanzen sind in sehr viel geringeren Mengen nötig und die

Tests sind weniger zeitaufwendig als Tierversuche. *In vitro*-Versuche sind daher weniger kostenintensiv als *in vivo*-Versuche.

Allerdings weisen Zellkulturen auch Einschränkungen und Nachteile auf. An erster Stelle ist hier der Verlust systemischer und organspezifischer Effekte zu nennen. Untersuchungen zur Interaktion zwischen Geweben, Organen und Organsystemen sind ebenso wie die Erfassung komplexer toxischer Wirkungen, z.B. in der Reproduktionstoxikologie, nicht möglich. Im Verlauf der Kultur können die Zellen dedifferenzieren, so dass sie nicht mehr die gleichen Eigenschaften wie zu Beginn der Kultivierung zeigen.

Generell wird in der Zellkultur zwischen Primärkulturen und permanenten Zelllinien unterschieden. Bei Primärkulturen handelt es sich um Zellen aus Organen lebender oder unmittelbar vor der Entnahme getöteter Tiere. Diese Zellen unterscheiden sich in vielen Eigenschaften nicht von denen im Ursprungsgewebe. Zur Gewinnung dieser Zellen kann auf Schlachthofmaterial zurückgegriffen werden, was die Tötung von Labortieren mitunter überflüssig macht. Besonders interessant für toxikologische Aspekte ist in diesem Zusammenhang allerdings die Kultivierung von Zellen aus humanen Gewebeproben, z.B. aus Operationsmaterial. An daraus entwickelten Zellkulturmodellen sind toxikologische Untersuchungen möglich, die am Menschen nicht durchführbar sind.

Im Gegensatz zu primären Zellkulturen stammen permanente Zelllinien von Zellen aus Tumorgewebe ab oder sind das Ergebnis einer Transformation von Zellen einer Primärkultur zu immortalen Zellen. Zelllinien können sich unbegrenzt teilen und außerdem kryokonserviert werden, was sie permanent verfügbar macht. Ein besonderer Vorteil besteht darin, dass alle Zellen als Klon aus einer Ausgangszelle hervorgegangen und damit genetisch identisch sind. Deshalb sind molekularbiologische und biochemische Untersuchungen an diesen Zellen gut reproduzierbar. Allerdings weichen diese transformierten Zellen einer Zelllinie mehr oder weniger stark vom Phänotyp der Ursprungszelle ab.

1.2.1. Verwendete Zellkulturen

In der vorliegenden Arbeit wurden fünf verschiedene Zelltypen verwendet. Zum einen Epithelzellen aus der Schweineharnblase (engl.: porcine urinary bladder epithelial cells = PUBEC) und Epithelzellen aus humanen Harnleitern (engl.: human urothelial cells =

HUC) bei denen es sich um Primärzellkulturen handelt. Zum anderen die permanente Zelllinien Madin Darby Canine Kidney (MDCK), Immortalized Human Kidney Epithel (IHKE) und 5637-Zellen.

PUBEC bieten für die Untersuchung adverser Effekte durch OTA eine Reihe von Vorteilen. Das Schweineharnblasenurothel repräsentiert ein Zielorgan für die OTA-Toxizität und da Schweineharnblasen in der Fleischproduktion als Abfallprodukt anfallen, kann Probenmaterial in größeren Mengen vom Schlachthof bezogen werden. Es können umfangreiche Versuche durchgeführt werden, ohne auf Tierversuche zurückgreifen zu müssen. Zudem stellt das Schwein in Bezug auf seine physiologischen Eigenschaften eine dem Menschen ähnlichere Spezies dar, als es z.B. Nagetiere tun. Die Zellen sind unter Kulturbedingungen gut charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass das morphologische Erscheinungsbild typische Eigenschaften der *in vivo*-Verhältnisse aufweist (GUHE UND FÖLLMANN, 1994, GUHE *et al.* 1996).

HUC wurden aus Harnleiterstücken, die bei Nephroektomie-Operationen angefallen waren, gewonnen. Da das Urothel in Harnleiter und Harnblase identisch ist (LEONHARDT 1984), können die Urothelzellkulturen aus dem Harnleiter ebenfalls als ein Zielorgan der OTA-Toxizität angesehen werden. In Kultur bilden primäre Urothelzellen Monolayer aus, die für Epithelien typische Mikrovilli und Desmosomen aufweisen (REZNIKOFF *et al.* 1983). Das humane Urothel ist zudem ein metabolisch aktives Organ. Es konnte gezeigt werden, dass humane Epithelzellen aus der Harnblase in der Lage waren, verschiedene Klassen von Karzinogenen zu metabolisieren (AUTRUP *et al.* 1981). Unter anderem wurde die enzymatische Aktivität von Glutathion-S-Transferasen (GST); (AUTRUP *et al.* 1981, SINGH *et al.* 1990) und Acetyl-Transferasen (SWAMINATHAN UND REZNIKOFF 1992, KLOTH *et al.* 1994) nachgewiesen.

MDCK-Zellen stammen aus dem distalen Tubulus der Hunde-Niere (RICHARDSON *et al.* 1981). Sie zeigen typische Eigenschaften eines Transportepithels. MDCK-Zellen bilden Monolayer mit stark polarisierten Zellen aus, die apikalen Mikrovilli, Desmosomen und basolateralen Einfaltungen aufweisen (CEREJIDO *et al.* 1980). Zudem konnten dem Säugetiernephron vergleichbare Enzymmuster nachgewiesen werden (GSTRANTHALER *et al.* 1985).

IHKE-Zellen sind immortalisierte Nierenzellen humaner Föten. Sie repräsentieren Zellen aus dem proximalen Nierentubulus und weisen, für Epithelzellen typisch, Tonofilamente und Desmosomen (TVEITO *et al.* 1989) sowie Mikrovilli (HIRSCH *et al.* 1999) auf. Ebenso konnten für den proximalen Tubulus typische Enzymaktivitäten in IHKE-Zellen gemessen werden (JESSEN *et al.* 1994).

Die Zelllinie 5637 entstammt einem humanen Blasenepithel-Karzinom (FOGH 1978) und wurde bisher hauptsächlich in der Tumorforschung zur Untersuchung der Expression von Zytokinen (TANAKA UND KANEKO 1992, RUCK *et al.* 1994) und Wachstumsfaktoren (PFLÜGER *et al.* 1986, QUENTMEIER *et al.* 1997) verwendet. Lediglich die Glutathion-S-Transferase Aktivität wurde bisher bestimmt (OLIVE UND BOARD 1994).

PUBEC, MDCK-, IHKE- und 5637-Zellen wurden in dieser Arbeit, auf Grund ihrer guten Verfügbarkeit für Untersuchungen zur Zytotoxizität, Genotoxizität und Aufnahme von OTA verwendet. Da HUC aufgrund begrenzter Probenzahl nur in geringer Quantität zur Verfügung standen, wurde mit ihnen nur die Intensität OTA-induzierter genotoxischer Effekte in den individuellen Proben im Comet Assay verglichen.

1.3. Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme

Die Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme sind in der Toxikologie und Pharmakologie von erheblicher Bedeutung. Der Einfluss der genetischen Prädisposition gegenüber Fremdstoffen wurde zuerst bei Arzneimitteln festgestellt (BÖNICKE UND REIF 1953). Zahlreiche Gene liegen in der Bevölkerung in zwei oder mehr Formen vor, die Isoenzyme mit unterschiedlichen Enzymaktivitäten codieren und somit zur Entstehung unterschiedlicher Phänotypen führen. Derartige Genvariationen werden als Allele bezeichnet. Von einem Polymorphismus spricht man, wenn abweichende Geno- bzw. Phänotypen bei mindestens 1 % der Gesamtpopulation vorkommen. Die Entdeckung von verschiedenen Genotypen für eine Vielzahl von Enzymen wurde durch die Entwicklung einfacher Analyseverfahren, wie der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vorangetrieben (BARTSCH *et al.* 2000). Die Polymorphismen der Acetyltransferasen und der Cytochrom-P450 Monooxygenasen sind besonders hervorzuheben, da diese Enzyme

eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung und Inaktivierung vieler chemischer Kanzerogene besitzen.

1.3.1. Cytochrom P450 1A2

Eine Schlüsselrolle im Stoffwechsel von Fremdstoffen spielen die zum Cytochrom-P450-System zählenden Monooxygenasen (LI *et al.* 1997, SCHMIDER *et al.* 1999). Als Cytochrom P450 (CYP) bezeichnet man eine sehr heterogene Superfamilie von Hämoproteinen, welche die oxidative, peroxidative und reduzierende Umwandlung einer Vielzahl endogener und exogener Substrate katalysieren (GUENGERICH 1993, LIN UND LU 1998). Der Reaktionszyklus der CYP lässt sich folgendermaßen zusammenfassen: Das in der Hämgruppe komplexierte Eisenatom wird nach Bindung des Substrates mit einem Elektron reduziert und bindet im reduzierten Zustand ein Sauerstoffmolekül. Ein Sauerstoffatom wird abgespalten und bildet zusammen mit zwei Protonen ein Molekül Wasser. Mit dem verbleibenden Sauerstoffatom wird nun das Substrat zum Produkt oxydiert, das anschließend abgegeben wird, so dass das aktive Zentrum des CYP-Enzyms wieder frei wird. CYP setzen als größte Gruppe der Phase I-Enzyme auch eine Reihe von Prokarzinogenen um. Adverse Effekte können dann eintreten, wenn die nachfolgenden zellulären „Verteidigungsmechanismen“ (z.B. Phase II-Enzyme) nicht schnell genug greifen oder überlastet werden (VERMEULEN 1996). CYP-Enzyme kommen praktisch in allen lebenden Organismen vor und sind in allen bisher untersuchten Geweben (WONG 1998), einschließlich dem Urothel (GUHE *et al.* 1996), nachgewiesen worden. Bei Eukaryonten sind CYPs hauptsächlich in den Membranen des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert, wo sie in Leberzellen einen Anteil von 5 bis 10 % des Proteins ausmachen (ROBERTS 1997).

Die CYPs werden nach Homologie der cDNA-Sequenz in Familien (> 40 % Übereinstimmung) und Unterfamilien (> 60 % Übereinstimmung) eingeteilt (GUENGERICH 1993). Die Nomenklatur ergibt sich aus der Abkürzung CYP für Cytochrom P450, einer Zahl für die Familie, einem großen Buchstaben für die Subfamilie und einer weiteren Zahl für das individuelle Enzym (NELSON *et al.* 1996). Genetische Polymorphismen mit Einfluss auf Expression und Aktivität der CYP-Enzyme sind beim Menschen für Mitglieder der Familien CYP1 und CYP2 beschrieben worden (RENDIC UND DI CARLO 1997).

Die Isoform CYP1A2 wird hauptsächlich in der Leber, in der Lunge nur schwach, exprimiert (MACE *et al.* 1998). CYP1A2 setzt eine Reihe von Prokarzinogenen wie

Arylamine und heterozyklische Amine um und könnte somit an der Entstehung von Kolon- und Blasenkrebs beteiligt sein (HAMMONS *et al.* 1997). Die Expression wird über das Ah-Rezeptor-System reguliert und beim Menschen von einer Reihe von Substanzen induziert (BARTSCH *et al.* 2000). CYP1A2 weist in seiner Enzymaktivität eine große interindividuelle Variation auf (KALOW UND TANG 1991) und kann in „langsame“, „mittlere“ und „schnelle“ Metabolisierer unterschieden werden (BUTLER *et al.* 1992). Von MACLEOD *et al.* (1998) wurde ein A/C -Polymorphismus im Intron 1 beschrieben, der sich auf die Induzierbarkeit des Enzyms auswirkt. In einem Kollektiv aus Deutschland wurde folgende Verteilung beschrieben: 46% homozygot A/A, 44 % heterozygot A/C und 10 % homozygot C/C (SACHSE *et al.* 1999).

1.3.2. Glutathion-S-Transferasen M1, T1 und P1

Die Glutathion-S-Transferasen (GST) sind Fremdstoff-metabolisierende Enzyme der Phase II. Sie konnten bei Säugern praktisch in allen Organen gefunden werden (MANNERVIK 1985). Die meisten GST-Isoenzyme sind im Cytosol lokalisiert und werden nach ihren katalytischen Eigenschaften und ihrer Sequenzhomologie auf DNA- und Proteinebene in die Klassen α , π , μ (MANNERVIK 1985), σ (MEYER UND THOMAS 1995) und θ eingeteilt (MEYER *et al.* 1991). Die GSTs katalysieren unter anderem die Konjugation des Tripeptids Glutathion (GSH) an elektrophile Substrate (FJELLSTEDT *et al.* 1973). Die cytosolischen GSTs sind Homo- und Heterodimere (HABIG *et al.* 1974), deren aktive Zentren unabhängig voneinander arbeiten (MANNERVIK UND DANIELSON 1988). Das aktive Zentrum besteht aus zwei Bindungsstellen, von denen die GSH-Bindungsstelle sehr spezifisch ist, während die Bindungsstelle für das elektrophile Substrat weniger spezifisch ist. Die GST-vermittelte Katalyse beruht auf der Fähigkeit, gleichzeitig die Bildung von GS^- aus GSH herbeizuführen und es an einer räumlich eng benachbarten Stelle an eine elektrophile Substanz zu binden (JAKOBY 1978). Die Konjugationsreaktion verkörpert den ersten Schritt zur Bildung von Mercaptursäuren, die als wasserlösliche Stoffwechselprodukte leicht renal ausgeschieden werden können. Nach der Konjugationsreaktion mit GSH treten dafür nacheinander γ -Glutamyltranspeptidase, Cysteinglycinase und N-Acetyltransferase in Aktion (BOYLAND UND CHASSEAUD 1969). Obwohl die meisten Glutathionkonjugate Detoxifikationsprodukte darstellen, gibt es Fälle, bei denen das GSH-Konjugat relativ instabil ist, so dass ein reaktiver Metabolit freigesetzt wird (HAYES UND PULFORD 1995). Des Weiteren können Cysteinkonjugate durch die β -Lyase in instabile Thiole

umgewandelt werden, die zu elektrophilen Alkylantien werden können (DEKANT *et al.* 1989). GSTT1 und GSTM1 weisen zusätzlich eine enzymatische Aktivität gegenüber Phospholipid-Peroxiden auf (HURST *et al.* 1998). Dies ließe den Schluss zu, dass GSTs die DNA vor einer Oxidation durch Lipid-Peroxide schützen, die endogen bei oxidativen Stress entstehen (SWEENEY *et al.* 2000).

Bei Menschen bestehen interindividuelle Unterschiede in der Expression einiger GSTs. Genetische Polymorphismen konnten für GSTM1 (SEIDEGÅRD *et al.* 1988), GSTT1 (PEMBLE *et al.* 1994) und GSTP1 (BOARD *et al.* 1989) nachgewiesen werden.

Beim Menschen wird die GSTT1 polymorph exprimiert. In Deutschland lässt sich bei etwa 20-25 % der Bevölkerung weder die Enzymaktivität, noch das Gen für die GSTT1 nachweisen. Diese Personen werden als GSTT1-negativ oder „Nichtkonjugierer“, alle anderen als GSTT1-positiv oder „Konjugierer“ bezeichnet (PETER *et al.* 1989). Die „Konjugierer“ können auf Grund der Enzymaktivität in „schnelle“ und „langsame Konjugierer“ unterteilt werden (HALLIER *et al.* 1990). Demnach sind „Nichtkonjugierer“ homozygot für das GSTT1-Nullallel, „schnelle Konjugierer“ homozygot und „langsame Konjugierer“ heterozygot für das funktionelle GSTT1-Allel. Die Ausprägung der unterschiedlichen „Konjugierer“-Phänotypen lässt sich auf den Gen-Dosis-Effekt zurückführen (WIEBEL *et al.* 1990).

Ebenso wie die GSTT1 wird die GSTM1 beim Menschen polymorph exprimiert. Es lässt sich weder die Enzymaktivität noch das Gen für die GSTM1 nachweisen (REBBECK 1997). Etwa 50 % der deutschen Bevölkerung sind homozygot für das GSTM1-Nullallel und werden als GSTM1 negativ bezeichnet (BROCKMÖLLER 1994, KEMPKE 1996).

Bei der GSTP1 liegt ein A/G-Polymorphismus beim Nukleotid 313 vor, aus dem ein Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Valin am Codon 105 resultiert (HARRIES *et al.* 1997). Der Aminosäureaustausch liegt nahe der hydrophoben Bindungsstelle für elektrophile Substrate (GARCIA-SAÈZ *et al.* 1994). Für das GSTP1 Val¹⁰⁵-Allel konnte eine unterschiedliche spezifische Aktivität und Affinität für elektrophile Substrate nachgewiesen werden (ZIMNIAK *et al.* 1994). Die Verteilung in der deutschen Bevölkerung liegt für den homozygoten A/A-Genotyp etwa bei 44 %, für den heterozygoten A/G-Genotypen bei 34 % und der für den homozygoten G/G-Genotypen bei 22 % (KO *et al.* 2000).

1.3.3. N-Acetyltransferase 2

Die N-Acetyltransferasen (NATs) gehören ebenfalls zu den Phase II-Enzymen des Fremdstoffmetabolismus. Die ausschließlich im Cytosol vorkommenden Enzyme gliedern sich in mindestens zwei Isoenzyme, die sich durch Substratspezifität und Ort der Expression unterscheiden. NAT1 ist u.a. in Leber, Darm, Lunge, Niere und Leukozyten exprimiert. Von größerer toxikologischer und pharmakologischer Bedeutung ist die NAT2 (EVANS 1989). Sie wird hauptsächlich in der Leber exprimiert, konnte aber auch in anderen Geweben nachgewiesen werden, wie z.B. in humanen Harnblasenlinsenepithelzellen (SWAMINATHAN UND REZNIKOFF 1992, KLOTH *et al.* 1994).

NATs übertragen einen Acetylrest vom Cofaktor Acetyl-CoA auf die primäre Amin- bzw. Hydrazingruppe ihrer Substrate. Bei der Acetylierung wird im ersten Schritt Acetyl-CoA an das Enzym gebunden und der Acetylrest auf ein Cystein übertragen. Nach Abspaltung des CoA-Restes wird das Substrat gebunden und die Acetylgruppe auf dessen primäre Aminogruppe übertragen. Nach Freisetzung des Produkts beginnt der Zyklus von neuem (WEBER UND COHEN 1968, KILBANE *et al.* 1991). Des Weiteren spielt die NAT eine Rolle im Mercaptursäure-Stoffwechsel (BOYLAND UND CHASSEAUD 1969). Zu den Substraten der NAT2 gehören primäre Arylamine, Hydrazine, heterozyklische aromatische Amine und eine Vielzahl von Arzneimitteln. In Bezug auf die Entstehung von Harnblasenkrebs ist die Metabolisierung aromatischer Amine von besonderer Bedeutung (MELIK *et al.* 1971, GOLKA *et al.* 2002).

Die NAT2 des Menschen unterliegt einem Polymorphismus. Es sind mindestens 12 Mutationen bekannt, aus denen durch unterschiedliche Kombinationen 27 Genotypen hervorgehen (VATSIS *et al.* 1995, ILETT *et al.* 1999). Dabei können die Mutationen die Translation beeinflussen (CASCORBI *et al.* 1995, HIRVONEN 1999), bei gleichbleibender mRNA-Menge zu reduziertem Proteingehalt führen (BLUM *et al.* 1991), die Halbwertszeit des Enzyms herabsetzen oder sich auf die Substratspezifität auswirken (HICKMAN *et al.* 1995). Phänotypisch wird in „schnelle“ und „langsame Acetylierer“ unterschieden, wobei die „langsamen Acetylierer“ weniger Substrat pro Zeiteinheit umsetzen. Es wurde eine systematische Nomenklatur zur Bezeichnung NAT erarbeitet, die laufend aktualisiert wird (ILETT *et al.* 1999). Der Bezeichnung NAT2 bzw. NAT1 folgt ein Stern sowie eine fortlaufende Nummer in der Reihenfolge der Entdeckung bzw. Beschreibung (VATSIS *et al.* 1995). Ähnliche Allele werden durch gleiche Ziffern zu einer Gruppe zusammengefasst und durch Buchstaben differenziert. Der aktuelle

Stand der Nomenklatur kann ständig unter der Internetadresse <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html> eingesehen werden.

Anhang 8-4 zeigt beispielhaft die Mutationen des NAT2 Gens.

Weltweit sind in den verschiedenen geographischen Regionen ethnische Gruppen mit unterschiedlichen Anteilen schneller und langsamer Acetylierer anzutreffen. In Asien überwiegt der Anteil der schnellen Acetylierer. Bei Japanern sind ca. 6 %, bei Polynesiern Neuseelands 7 % und bei Chinesen 15 bis 22 % der Bevölkerung „langsame Acetylierer“ (PAXTON 1984, HORAI *et al.* 1988). In Mitteleuropa ist das Verhältnis in etwa ausgeglichen (WEBER UND HEIN 1985). In Nordafrika hingegen überwiegen die „langsamen Acetylierer“, so bei Ägyptern mit 83 % und bei Marokkanern mit 90 % (WEBER UND HEIN 1985). Durch Studien von GOLKA (2002) hat sich die Hypothese erhärtet, dass „langsame Acetylierer“ nach einer Exposition mit aromatischen Aminen einem größerem Risiko ausgesetzt sind Harnblasenkrebs zu entwickeln, als „schnelle Acetylierer“ mitteleuropäischen Ursprungs.

1.4. Ziele der Arbeit

Für OTA ist ein weites Wirkungsspektrum bekannt (siehe 1.1.3.) und es muss als Krebsrisikofaktor für den Menschen angesehen werden, dessen Ausprägung gesundheitsschädigender Wirkung primär von der Exposition abhängt. Es werden daher gesetzliche Regelungen für OTA-Höchstmengen in Lebensmitteln angestrebt, um eine Exposition der Verbraucher zu minimieren.

Da der genaue Wirkungsmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist und kontrovers diskutiert wird, ist eine toxikologische Risiko-Abschätzung neben den Daten zur Exposition des Menschen ebenso wichtig. In diesem Zusammenhang ist zu klären, ob OTA selbst oder ein Metabolit für genotoxische Effekte verantwortlich ist. Unterschiede im Metabolismus von OTA könnten zu spezie-, stammes- und geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Ausprägung kanzerogener Wirkungen beitragen. Dies bietet außerdem einen Ansatzpunkt für Studien, in denen untersucht wird, ob Personen mit einer bestimmten genetischen Prädispositionen besonders sensitiv auf eine OTA-Exposition reagieren.

Ziel dieser Arbeit war es das zytotoxische und genotoxische Potential von OTA weiter zu charakterisieren. Im Vordergrund stand dabei der Nachweis der Induktion von DNA-

Schäden mit Hilfe des Comet Assay. Neben der Frage einer Bioaktivierung von OTA wurde auch der Einfluss von DNA-Reparatur und der Einfluss der OTA-Aufnahme auf die Ausbildung von DNA-Schäden untersucht.

Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zellkulturen aus der Niere und der Blase eingesetzt, die Modelle für die Zielorgane der OTA-Toxizität darstellen. Durch den Einsatz von Primärzellkulturen und permanenten Zelllinien aus Niere und Blase wurden zudem Systeme mit unterschiedlichen Eigenschaften in metabolischer Kompetenz, OTA-Aufnahmekapazität und DNA-Reparatur gewählt.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob genetische Prädispositionen beim Menschen in Bezug auf Fremdstoff-metabolisierender Enzyme einen Einfluss auf die OTA-Toxizität haben. Von Harnleiterstücken, die bei Nephroektomie-Operationen anfielen, wurden Epithelzellkulturen etabliert. Das Ausmaß der Induktion von DNA-Schäden durch OTA in diesen individuellen Kulturen wurde mit dem Comet-Assay analysiert und mit der genetischen Prädisposition der jeweiligen Spender korreliert.

2. Material

2.1 Probenmaterial

2.1.1. Humane Harnleiter und EDTA-Blutproben

Im Rahmen einer Zusammenarbeit mit Prof. Dr. H. Schulze, Chefarzt der urologischen Klinik an den städtischen Kliniken der Stadt Dortmund, konnten humane Harnleiterproben und 10 ml EDTA-Blut von Nephrektomie-Patienten erhalten werden.

2.1.2. Harnblase vom Schwein

Harnblasen von frisch geschlachteten Hausschweinen wurden vom Schlachthof der Stadt Lünen bezogen. Es wurde Proben sowohl von weiblichen als auch von männlichen Tieren verwendet.

2.2. Zellkulturen

Madin Darby canine kidney (MDCK)	CLS Cell Lines Service, Heidelberg
ATCC-Nummer	CCL-34
Organismus	Hund, Kocker Spaniel
Gewebe	Niere
Alter/Stadium	adult
Geschlecht	weiblich
Morphologie	epithelial
verwendete Passagen	27 - 39
5637	CLS Cell Lines Service, Heidelberg
ATCC-Nummer	HTB-9
Organismus	human
Gewebe	Karzinom, Blase, Urothel
Alter/Stadium	68 Jahre
Ethnische Gruppe	Kaukasier
Morphologie	epithelial
verwendete Passagen	43-58
Immortalized Human Kidney Epithel cells (IHKE)	IHKE-Zellen wurden freundlicherweise von Prof. Gekle, Uni-Würzburg zur Verfügung gestellt.
Organismus	human
Gewebe	Niere
Alter/Stadium	Embryo
Ethnische Gruppe	Kaukasier
Morphologie	epithelial
verwendete Passagen	202-210

2.3. Zellkulturbedarf

Substanz	Hersteller
8-Kanal-Pipetten (10 µl, 200 µl)	Eppendorf
Collagen R	Serva
Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM)	Gibco
Epidermaler Wachstumsfaktor	Sigma Chemie
Fötales Kälberserum	Seromed®, Biochrom
Fungizone, Amphotericin B (250 µg/ml)	Life Technologies
Ham's F-12-Medium + L-Glutamax	Gibco
Hydrocortison	Sigma Chemie
Insulin	Seromed®, Biochrom
Kulturflaschen 175 cm ²	Greiner
Kulturplatten 6 Well	Falcon
Kulturplatten 24 Well	Costar
Kulturplatten 48 Well	Falcon
Kulturplatten 96 Well	Costar
Nichtessentielle Aminosäuren	Sigma Chemie
Phosphat-Puffer (calcium- und magnesiumfrei)	Life Technologies
Pipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen (10µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Gilson
Pipettenspitzen 1,5 ml	ICN
Polypropylen (PP)-Kryogefäße	Greiner
RPMI 1640 + L-Glutamine	Gibco
Sterilfilter Millipore Ø 0,22 µm	Millipore
Streptomycin/Penicillinlösung	Sigma Chemie
Transferrin	Sigma Chemie
Trypsin 2,5%	Gibco
Tubes (12 ml, 50 ml)	Falcon
Zellschaber	Sarstedt

2.4. Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agarose (low melting)	Life Technologies
Agarose (normal melting)	Life Technologies
Amplitaq DNA Polymerase	Perkin Elmer
BCA Protein Assay Reagenz	Pierce
Diethylether	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
dNTP	Pharmacia Biotech
Cholat	Sigma Chemie
Cytosine β-D-Arabino-Furanosid	Sigma Chemie
EDTA	Sigma
Ethanol, p.A.	Merck
Ethidiumbromid (EB)	Serva
Glukose	Sigma Chemie
Glukose-6-Phosphat	Boehringer Mannheim
Glykodeoxycholol	Sigma Chemie

HEPES	Sigma Chemie
Hydroxyurea (HU)	Sigma Chemie
Kaliumdichromat (KDI)	Merck, Darmstadt
Methotrexate Hydrtate (MT)	Sigma Chemie
Natrium-Selenit	Aldrich
Neutralrot (NR)	Sigma Chemie
N-Laurylsarkoniat	Sigma Chemie
Ochratoxin A (OTA)	Sigma Chemie
[³ H]Ochratoxin A ([³ H]OTA)	Moravek Chemicals
Taurocholat	Sigma Chemie
TRIS-(hydroxymethyl)-amoniomethan	Merck
Triton X-100	Aldrich
Trypanblau-Färbelösung	Serva
S9-Rattenleberfraktion, Aroclor 1254 induziert	Merck
Salzsäure (32%)	Roth
Szintilations-Flüssigkeit	Roth

Weitere Chemikalien und Pufferlösungen wurden in p.a.-Qualität von den Firmen Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen.

Wenn nicht anders erwähnt, wurden zur Herstellung der Pufferlösungen und Verdünnungen von Stammlösungen Aqua bidest. verwendet.

2.5. Medien für die Zellkultur:

Medium für Schweineharnblasenepithelzellen (eng.: porcine urinary bladder epithelial cells, PUBEC)

Als Basiskulturmedium wurde HamsF-12 mit Glutamin (146 mg/l) benutzt, dem folgende Substanzen zugegeben wurden:

Substanz	Menge
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin	1,25 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
Insulin	10 µg/ml
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM
Glucose	2,7 g/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Epidermal Growth Factor (EGF)	20 ng/ml

Medium für humane Urothelzellen aus dem Harnleiter (HUC)

Als Basiskulturmedium wurde HamsF-12 mit Glutamin (146 mg/l) benutzt, dem folgende Substanzen zugegeben wurden:

Substanz	Menge
Transferrin	5 µg/ml
Insulin	10 µg/ml
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM
Glucose	2,7 g/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Epidermal Growth Factor (EGF)	20 ng/ml

Medium für MDCK-Zellen

MDCK-Zellen wurden in einem Gemisch aus Ham's F12 und DMEM (Verhältnis 1:1), dem 10% FCS zugegeben wurde, kultiviert.

Medium für 5637-Zellen

5637-Zellen wurden in RPMI 1640 + Glutamine und 10% FCS kultiviert.

Medium für IHKE-Zellen

Als Basiskulturmedium diente ein Gemisch aus Ham's F12 und DMEM (Verhältnis 1:1), dem folgende Substanzen zugegeben wurden:

Substanz	Menge
Penicillin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
Amphotericin	1,25 µg/ml
Transferrin	5 µg/ml
Insulin	10 µg/ml
nichtessentielle Aminosäuren	0,1 mM
Glucose	2,7 g/ml
Hydrocortison	1 µg/ml
Epidermal Growth Factor (EGF)	20 ng/ml
HEPES	3,57 g/l
Na-Selinit	5 ng/ml
FCS	10%

Alle Medien wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt, bei 4°C gelagert und nicht länger als 14 Tage verwendet.

2.6. Lösungen:**Comet Assay:**

Lysepuffer Stammlösung:

NaCl	146,1 g/l
EDTA	37,2 g/l
TRIZMA	1,2 g/l
N-Lauroylsarcosyl	10 g/l (1:10 verdünnt in den Puffer geben)
NaOH	8-12 g/l
pH 10	

Lysepuffer Gebrauchslösung:

Lysepuffer Stammlösung	178 ml
DMSO	20 ml
Triton X	2 ml

Elektrophoresepuffer Stammlösung:

NaOH	12,0 g/l
Na ₂ EDTA	0,372 g/l

Neutralisationspuffer (Tris-Puffer):

TRIZMA ® - Base	48,44 g/l
pH 7,5	

Agarose:

Normal melting	15 mg/ml PBS
Low melting	5 mg/ml PBS

Neutralrot-Lösung:

Stammlösung:

40 mg Neutralrot in 10 ml Aqua bidest im Ultraschallbad für 1 h lösen, mikroskopisch auf kristalline Nadeln kontrollieren. Nadeln gegebenenfalls abzentrifugieren. Die Lösung kann im Dunkeln und bei 4°C für max. 4 Wochen aufbewahrt werden.

Gebrauchslösung:

12,5 µl Stammlösung pro ml Kulturmedium mischen und ca. 12 h in einem sterilen geöffneten Erlenmeyerkolben im Brutschrank vorinkubieren.

S9-Mix:

Natriumphosphatpuffer:

Lösung 1: NaH₂PO₄ x H₂O 0,2 MLösung 2: Na₂HPO₄ 0,2 M

10 ml von Lösung 1 werden zu 440 ml von Lösung 2 gegeben, einstellen des pH 7,4 mit Lösung 2, Endvolumen 500 ml.

Kofaktorenlösung:

KCl	2,46 mg/ml
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	2,49 mg/ml
Glucose-6-Phosphat	1,52 mg/ml
NADP	3,94 mg/ml
in 0,1 M Natriumphosphatpuffer	

Der S9-Enzymmix wurde mit steriler Kofaktorenlösung (Sterilfiltration) verdünnt, so dass der Proteingehalt des resultierenden S9-Mix eine Konzentration von 2 mg/ml aufwies. Der S9-Mix-Anteil entsprach 4% (v/v) des Gesamtvolumens in den Versuchsansätzen.

HEPES-Ringer-Puffer:

HEPES	2,383 g/l
NaCl	7,159 g/l
KCl	4,026 g/l
MgCl ₂	0,762 g/l
CaCl ₂	1,332 g/l
NaH ₂ PO ₄	1,419 g/l
Glukose	10,894 g/l

Polymerase Chain Reaktion (PCR):

5 x TBE-Puffer:

TRIS	54 g/l
Borsäure	27,5 g/l
EDTA	10 mmol/l

PCR-Mastermix:

TRIS	1,21 g/l
KCL	3,73 g/l
MgCl ₂	0,14 g/l
dNTP	1,25 mM
Primer	2 µmol/l
Amplitaq DNA Polymerase	0,6 U

Kits:

DNA Master Hybridisation Kit	Roche Diagnostics GmbH
BCA Protein Assay Quantitation Kit	Interchim
QIAamp [®] DNA Blood Maxi Kit	Qiagen

2.7. Geräte

Analysenwaage AE 240	Mettler
Autoklav	Varioklav [®] Dampfsterilisator
Bildanalyse Comet Assay II Software	Perceptive Instruments
Brutschrank	Hereaus
DNA-Thermal Cycler	Perkin Elmer
Dokumentationssystem Gel-Pro	Matrix-Vision
Elektrophoresekammer	BioRad
Fluoreszenzmikroskop DMRB	Leica
Gefrierschrank (-20°C) Öko Plus	Siemens
Hämocytometer	Neubauer
Inverses Lichtmikroskop IM 35	Zeiss
Kühlschrank profi line	Liebherr

Laborwaage PB602	Mettler Toledo
Laborzentrifuge Megafuge 1,0 R	Heraeus
Magnetrührer	IKa [®] Labortechnik
Mikrotiterplattenlesegerät: SLT 340 ATC	SLT-Labinstruments
Mikrowelle	Panasonic
Objektträger	Menzel-Gläser
PH-Meter CG 825	Schott
Spektralphotometer HP 8452A	Hewlett-Packard
Plattenschüttler MTS	IKa [®] Labortechnik
Quarzküvetten	Hellma
Spannungsgeber	BioRad
Sterilbank Lamina Air ELB 2448	Heraeus
Sterilbank Lamina Air HBB 2472	Heraeus
Szintillations-Counter: Tricarb 2200 CA	Canberra Packard
Thermocycler 480	Applied Biosystems
Tiefkühlgefrierschrank (-70°C)	Revko
Trockenschrank	Heraeus
Videokamera Pulnix PE2020P	Pulnix Eurpoe Ltd.
Vortexer	Bender & Hobein AG
Wasserbad	GRL

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Isolierung humaner Urothelzellen aus dem Harnleiter (engl.: human urothelial cells = HUC)

Humane Urothelzellen wurden aus Harnleiterstücken gewonnen, die bei Zystektomie- oder Nephrektomiepatienten angefallen waren. Voraussetzung für die Kultivierung der Probe war die Zustimmung der Patienten in Form eines Einwilligungsbogens (siehe **Anhang 8-1**)

3.1.1.1. Präparation

Die 0,5 bis 3 cm langen Harnleiterstücke wurden in steriler phosphatgepufferter Kochsalzlösung aufgenommen und auf Eis zum Labor transportiert. Die Isolierung der Urothelzellen erfolgte max. 1h nach Organentnahme unter sterilen Bedingungen auf Eis. Der Urether wurde der Länge nach aufgeschnitten und mit Stecknadeln aufgespannt. Die Urothelzellen wurden mit einem kleinen, scharfen Präparierlöffel vorsichtig abgetragen und in Medium suspendiert. Die Suspension wurde 5 min bei 50 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 500 µl Medium resuspendiert.

3.1.1.2. Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden in Kollagen-beschichteten 24 Well-Platten angelegt. Je Well wurden 100.000 bis 150.000 Zellen in 500 µl Medium ausgepflanzt und anschließend in einem wasserdampfgesättigten Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium (siehe 2.5.) wurde am nächsten Tag gewechselt, um nicht angewachsene Zellen zu entfernen. Die Kulturdauer betrug maximal drei Tage.

3.1.2. Isolierung von Schweineharnblasenepithelzellen (engl.: porcine urinary bladder epithelial cells = PUBEC)

3.1.2.1. Präparation

Die Harnblasen wurden frisch geschlachteten Schweinen direkt bei der Schlachtung auf dem Schlachthof entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung in PBS mit 100 g/ml

Streptomycin, 100 U/ml Penicillin und 1,25 µg/ml Amphotericin auf Eis gelagert. Alle nachfolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank auf Eis durchgeführt.

Die Blase wurde mit sterilem Präparationsbesteck geöffnet. Anschließend wurde die Schleimhaut mit einem sterilen Objektträger abgeschabt und die Zellen in einer Petrischale in Kulturmedium resuspendiert. Die Zelllösung wurde in 50 ml Röhrchen überführt und in einer Laborfuge A bei 50 x g 5 min sedimentiert. Das Pellet wurde mit Medium resuspendiert.

3.1.2.2. Kulturbedingungen

Die Zellkulturen wurden zunächst in Kollagen-beschichtete 175 cm² Kulturflaschen ausgepflanzt. Nach einer Stunde wurde das komplette Medium aus den Flaschen entnommen und erneut bei 50 x g 5 min sedimentiert. Da sich zu diesem Zeitpunkt hauptsächlich Fibroblasten auf dem Gefäßboden angeheftet hatten, konnte ein Großteil der nach der Präparation noch vorhandenen Fibroblasten von den Epithelzellen getrennt werden. Das resultierende Pellet wurde mit Medium resuspendiert und die Zellen wurden in Kollagen-beschichtete 175 cm² Kulturflaschen (1 ml, 2000.000 Zellen) ausgepflanzt. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen abtrypsiniert (siehe 3.1.4.) und in 6-Well-Platten (400.000-500.000 Zellen in 3 ml pro Well) oder 96-Well-Platten (20.000 Zellen in 200 µl pro Well) ausgepflanzt. Die Kulturgefäße mit den Epithelzellen wurden in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag gewechselt, um nicht angewachsene Zellen zu entfernen.

3.1.3. Kulturbedingungen permanenter Zelllinien

Für die Kultivierung der permanenten Zelllinien wurden unbeschichtete 175 cm² Kulturflaschen, 96- und 6-Well-Platten verwendet. Die Zellen wurden folgendermaßen ausgepflanzt (Medien siehe 2.5.):

Zelltyp	Flaschengröße	Anzahl der Zellen
MDCK	75 cm ²	1000.000-1500.000
	6 Well	350.000-500.000
	96 Well	12.000
IHKE	75 cm ²	1000.000-1500.000
	6 Well	350.000-500.000
	96 Well	12.000
5637	75 cm ²	1500.000-2000.000
	6 Well	500.000-750.000
	96 Well	15.000

Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte in einem wasserdampfgesättigten Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Ein Mediumwechsel erfolgte 2-3 mal pro Woche.

3.1.4. Passagieren der Zellen mit Trypsin

Ein Passagieren der Zelllinien und der PUBECs erfolgte kurz vor dem Erreichen der Konfluenz im Kulturgefäß. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen zweimal mit Ca²⁺- und Mg²⁺-freien PBS gewaschen und anschließend mit 0,25 %iger Trypsin/EDTA-Lösung (37°C) inkubiert. Es wurde so viel Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben, bis die Zellen vollständig bedeckt waren. Anschließend wurden die Kulturen für 3-7 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert und der Ablöseprozess regelmäßig kontrolliert. Durch vorsichtiges Klopfen der Kulturflasche auf einen harten Untergrund konnte der Ablöseprozess beschleunigt werden. Die Trypsinaktivität wurde anschließend durch die Zugabe von 10% (v/v) FCS zum Kulturmedium gestoppt. Die Zellsuspension wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 2 x bei 50 x g für 5 min zentrifugiert und mit je 5 ml des Kulturmediums gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe 3.1.5.) und die Zellen in den oben genannten Konzentrationen in neue Kulturgefäße ausgepflanzt oder für weitere Untersuchungen verwendet.

3.1.5. Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen erneut resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) ausgezählt. Zur Anheftung des Deckglases auf die Zählkammer wurde dieses leicht angefeuchtet. Das Erscheinen sogenannter Newtonringe zeigt an, dass das Volumen der Kammer korrekt ist (Tiefe: 0,1 mm, Volumen: 0,9 mm³). Ein Aliquot der Zellsuspension wurde in die Zählkammer pipettiert und es wurden vier Quadrate mit einer Fläche von 1 mm² ausgezählt, deren Volumen jeweils 0,1 µl betrug. Der Mittelwert dieser vier Quadrate x 10⁴ entsprach der Zellzahl pro ml Zellsuspension.

3.1.6. Bestimmung der Vitalität

Zur Bestimmung des Anteils an vitalen Zellen wurde das Trypanblauausschlußverfahren verwendet. Die Zellsuspension und eine 0,5%ige Trypanblaulösung wurden 1:10 gemischt und 3-5 min bei 37°C inkubiert. Lebende Zellen werden nicht angefärbt, während tote Zelle im Mikroskop blau erscheinen. Mit

Hilfe einer Neubauer-Zählkammer konnte der Anteil vitaler Zellen bestimmt werden. Der Anteil der lebenden Zellen errechnete sich wie folgt:

$$\text{Anteil vitaler Zellen in \%} = \frac{\text{Anzahl ungefärbter Zellen}}{\text{Gesamtanzahl der Zellen}} \times 100$$

3.1.7. Cryopräservation

Die Zellen wurden in Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in Cryo-Gefäße überführt und bei -70°C eingefroren. Die Zellzahl pro Cryo-Gefäß betrug eine Millionen Zellen pro ml.

3.2. Neutralrot-Assay

Der Neutralrot-Assay wurde nach einer modifizierten Vorschrift von BABICH UND BORENFREUND (1992) durchgeführt. Die benötigten Zellen wurden in 96-Well Mikrotiterplatten für 48 Stunden, wie in 3.1.2.2 und 3.1.3. beschrieben, kultiviert. Am Versuchstag wurde das Medium abgenommen, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit den in Kulturmedium gelösten Testsubstanzen unter Standardbedingungen inkubiert. Die Inkubationen wurden nach folgendem Schema durchgeführt.

Tab. 3-1: Konzentrationen der Testsubstanzen im Neutralrot-Assay

Substanz	Konzentration	Dauer
OTA	1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM	24 h
	10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM	3 h
OTA + S9-Mix (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	1 nM, 10 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μM , 5 μM , 10 μM , 50 μM	24 h
	10 nM, 100 nM, 1 μM , 10 μM , 100 μM , 250 μM , 500 μM	3 h
araC/HU	araC 1,8 mM, HU 10 mM	1h, 3h, 6h
Methotrexat	1 μM , 10 μM , 100 μM , 1mM	3 h
HEPES-Ringer-Puffer	pH 5, pH 7	15 min, 1 h, 3 h

Für den Test wurden zusätzlich eine Mediumkontrolle (ohne Testsubstanz), eine Lösemittelkontrolle (Medium mit 0,5% DMSO) und eine Wachstumskontrolle (ohne Medium, um weiteres Zellwachstum zu unterbinden) durchgeführt.

Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen, durch Neutralrot-Medium (12,5 µl Gebrauchslösung (0,05 %ig)(siehe 2.6.) pro ml Medium) ersetzt und die Zellen wurden für 3 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. Danach wurde das Neutralrot-Medium abgenommen und die Zellen 5 x mit warmen PBS (37°C) gewaschen. Anschließend wurden 200 µl Fixierlösung (1 % Eisessig, 50 % Ethanol in Aqua bidest.) pro Well zugegeben und die Platten für 20 min auf einem Plattenschüttler bewegt. Es folgte eine Extinktionsbestimmung in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Modell 340 ATC, SLT-Labinstruments) bei einer Wellenlänge von 540 nm. Für die Proteinbestimmung wurden die Zellen nochmals 5 x mit PBS gewaschen, durch Zugabe von 10 µl 0,1 % Triton-X-100 in 0,9 % NaCl pro Well lysiert und für 10 min bei -70°C eingefroren. Die Proteinbestimmung erfolgte dann nach der Methode von Bradford (siehe 3.4.).

3.3. Aufnahme von [³H]-OTA

Die PUBEC, MDCK-, IHKE- und 5637-Zellen wurden in 6-Well-Platten, wie in 4.1. beschrieben, ausgepflanzt und für drei Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Am Versuchstag wurde das Medium durch 800 µl HEPES-Ringer-Puffer pH 5 oder pH 7,5 ersetzt. Die Puffer enthielten 500 nM unmarkiertes OTA und 21,7 nM [³H]-OTA (spezifische Aktivität 21,3 Ci/mmol). Die Inkubationsdauer betrug 1, 15, 60 und 180 min. Nach der Inkubation wurde das Medium abgenommen und die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 350 µl 0,1 % Triton-X-100 in 0,9 % NaCl pro Well wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Von der Zellsuspension wurden 200 µl in Szintillationsröhrchen gegeben, die anschließend mit 3,5 ml Szintillationsflüssigkeit befüllt wurden. 100 µl der Zellsuspension wurden in Eppendorfgefäße für die folgende Proteinbestimmung (siehe 3.4.) eingefroren. Die Radioaktivität der einzelnen Proben wurde in einem Szintillations-Counter Tricarb 2200 CA gemessen.

3.4. Proteinbestimmung

Für die Proteinbestimmung wurde ein kommerziell erhältlicher Kit (PIERCE BCA Protein Assay Reagent), dem die Methode nach BRADFORD (1976) zugrunde liegt, verwendet. Als Eichstandard dienten BSA-Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2 mg/ml und 0,2 mg/ml. In 96-Well Mikrotiterplatten wurden je 10 µl

Zellsuspension jeder Probe aus 3.3. (bzw. 10 µl Standardlösung) in Doppelbestimmung mit 200 µl des Reagenzgemisches A:B (Mischungsverhältnis 50:1) pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend auf einem Plattenschüttler für 30 s vorsichtig geschüttelt und anschließend für mindestens 30 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm im Mikrotiterplatten-Lesegerät. Bei der Proteinbestimmung der Proben des Neutralrot-Assays in 96-Well-Platten wurde nach Zugabe der Standards, entsprechend verfahren.

3.5. Alkalische Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay)

Die Durchführung des Comet Assay beruht auf der Methode von SINGH *et al.* (1988) und wurde in modifizierter Form angewandt.

3.5.1. Vorbereitung der Objektträger

Vor der Beschichtung der Objektträger wurden diese für 1 h in eine Diethylether- / Ethanol (70%)- Mischung (1:2) und danach für 30 min in Ethanol (70 %) entfettet. Nachdem die Objektträger vollständig getrocknet waren, wurden sie kurz in eine etwa 60°C heiße normal melting point (NMP) Agaroselösung (1,5%) getaucht, wobei das Beschriftungsfeld etwa bis zur Hälfte benetzt wurde. Die Unterseite der Objektträger wurde abgewischt und die Objektträger in horizontaler Lage bei Raumtemperatur getrocknet. Die so präparierten Objektträger können für mehrere Tage bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.5.2. Inkubation der Zellen

Für den Einsatz im Comet-Assay wurden ausschließlich Monolayerkulturen verwendet, die bis max. 72 h unter Standardbedingungen in 6-Well-Platten kultiviert wurden. Eine Ausnahme bildeten humane Harnleiterkulturen, die in 24-Well-Platten kultiviert wurden. Für die Inkubation mit den Testsubstanzen wurde das Kulturmedium durch FCS-freies Medium, welches die Testsubstanz (gelöst in DMSO, Endkonzentration 0,1%) enthielt, ersetzt. **Tabelle 3-1** beschreibt die Inkubationsansätze für MDCK-, IHKE-, 5637- und PUBEC-Zellen, **Tabelle 3-2** die Inkubationsansätze für die humane Harnleiterepithelzellen. Alle Versuche wurden als Doppelbestimmung in zwei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Es wurden folgende Testansätze durchgeführt:

Tab. 3-2: Inkubationsansätze für MDCK-, IHKE-, 5637- und PUBEC-Zellen

Substanz	Inkubationszeit	Eingesetzte Konzentrationen
Mediumkontrolle	1 und 3 h	Medium; DMSO: 0,1 %
Mediumkontrolle + S9-Mix	3 h	Medium; DMSO: 0,1 %; S9-Mix: 40 µg/ml
Mediumkontrolle + araC/HU	1, 3 und 6 h	araC: 1,8 mM, HU: 10 mM; DMSO: 0,1 %
Mediumkontrolle + Methotrexat	3 h	Methotrexat: 100 µM; DMSO: 0,1 %
HEPES-Ringer-Puffer	1 und 3 h	pH 5 und pH 7,5; DMSO: 0,1 %
OTA	3 h	OTA: 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM
OTA + S9-Mix	3 h	OTA: 10 nM, 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM, 500 µM; S9-Mix: 40 µg/ml
OTA + araC/HU	0,5, 1, 2, 3, 4, 5 und 6 h	OTA: 100 µM; araC: 1,8 mM, HU: 10 mM
OTA + araC/HU + Methotrexat	3 h	OTA: 100 µM; araC: 1,8 mM, HU: 10 mM; Methotrexat: 100 nM, 1 µM, 10 µM, 100 µM
HEPES-Ringer-Puffer + OTA	1 und 3 h	OTA: 100 µM; HEPES-Ringer-Puffer pH 5, pH 7,5

Bei den Versuchen zur Erholung/DNA-Reparatur der Zellen wurde das schadstoffhaltige Medium abgenommen, die Zellen einmal mit warmen PBS (37 °C) gewaschen, und mit Kulturmedium, für weitere 1, 2, und 3 h unter Standardbedingungen kultiviert.

Tabelle 3-3: Inkubationsansätze für humane Harnleiterepithelzellen

Substanz	Inkubationszeit	Eingesetzte Konzentrationen
Mediumkontrolle	3 h	Inkubation mit Medium + 0,1 % DMSO
Positivkontrolle mit KDI	3 h	100 µM
OTA	3 h	100 µM

3.5.3. Zellpräparation

Nach Absaugen des Inkubationsmediums wurden die Zellen einmal mit kaltem PBS gewaschen und, wie in 3.1.4. beschrieben, abtrypsiniert. Die Zellsuspension wurde dann bei 50 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit eiskaltem PBS resuspendiert, die Zellzahl auf 2 Mio./ml eingestellt und 20 µl der Zellsuspension wurden in 500 µl low melting point (LMP) Agarose (37°C) gegeben. Die Agaroselösung wurde auf einen gekühlten, vorbeschichteten Objektträger gebracht und mit einem Deckglas (60 x 40 mm²) abgedeckt. Nach 4-5 min wurden die Deckgläschen seitlich

abgezogen und die Objektträger für mindestens 2 h bei 4°C in die Lysegebrauchslösung (siehe 2.6.) gestellt.

3.5.4. Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse der Zellen wurden die Objektträger kurz in Aqua bidest. getaucht und mit der Gelschicht nach oben auf die Plattform einer Elektrophoresekammer gelegt. Die Kammer wurde mit 8 °C kaltem Elektrophorese-Puffer (siehe 2.6.) gefüllt, so dass die Objektträger ca. 2-3 mm hoch mit Puffer überdeckt waren. Für die Alkalidenaturierung und Entwindung der DNA wurden die Proben für 30 min im Puffer belassen. Um keine UV-induzierten DNA-Schäden zu induzieren, wurden die Alkalidenaturierung und die anschließende Elektrophorese ohne direkten Lichteinfall durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für 30 min bei 25 mV, 300 mA und 8°C.

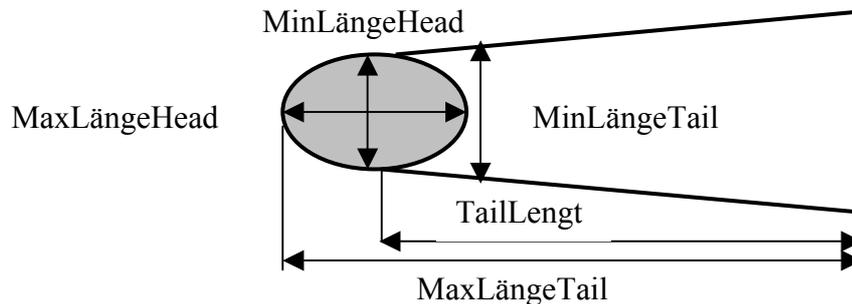
3.5.5. Neutralisation und Entwässerung der Objektträger

Die Objektträger kamen nach der Elektrophorese für 15 min in Neutralisationspuffer (0,4 M Tris in Aqua bidest., pH 7,5) und wurden anschließend mit Hilfe einer Ethanolreihe (50%, 75% und 100%, jeweils 5 min) entwässert. Die entwässerten Objektträger können bei Raumtemperatur über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.5.6. Bildanalyse

Für die Analyse der Zellkerne wurde die DNA mit Ethidiumbromid (EB) (50 µg/ml) angefärbt. Hierzu wurden 50 µl EB auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Objektträger wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (DMRB, Leica) bei 400facher Vergrößerung ausgewertet.

Von jeder Konzentration wurden jeweils 100 Kerne von zwei Objektträgern ausgewertet, und zwar nur Kerne, die nicht im Randbereich des Objektträgers lagen, nicht verklumpt waren oder nicht zu dicht nebeneinander lagen. Die Bildanalyse erfolgte mit der Bildanalysesoftware Comet Assay II von Perceptive Instruments, Suffolk, England.

Abb. 3-1: Schematische Darstellung eines Kometen mit den Meßparametern

Es wurden folgende Parameter erfasst:

MinLängeHead = minimale Kopflänge

MaxLängeHead = maximale Kopflänge

Integrated Optical Density = Fläche x Mittelwert der optischen Dichte im Kopf

MinLängeTail = minimale Schweiflänge

MaxLängeHead = maximale Schweiflänge

IODTail+Head = IOD Schweif + IOD Kopf

TailLength = Schweiflänge (MaxLängeTail – ½ MaxLängeHead)

3.5.7. Auswertung

Es wurden der Median der Taillängen, sowie das 1. und 3. Quartil berechnet. Für die statistische Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Dieser Test für nicht parametrische Daten eignet sich für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, wenn man die Werte mehrere Proben der Reihe nach ordnet und mit Rängen versehen kann. Die Daten wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS Version 9.0 für Windows 95/NT berechnet.

3.6. DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

Die Isolierung der DNA erfolgte mit dem QIAamp[®] DNA Blood Maxi Kit von Qiagen, das auf dem Prinzip der Säulenaffinitätschromatographie beruht. 500 µl QIAGEN Protease wurden zunächst mit 10 ml EDTA-Blut und 12 ml AL-Puffer in einem 50 ml Röhrchen gemischt und dreimal für 5 s auf einem Vortex-Schüttler suspendiert. Nach einer 10minütigen Inkubation im Wasserbad bei 70°C wurden 10 ml Ethanol zugegeben und erneut auf dem Vortex-Schüttler suspendiert. Die Hälfte des Blutgemisches (16,25 ml) wurde auf eine QIAamp Maxi Säule, die sich in einem 50 ml Röhrchen befand,

gegeben und für 3 min bei 1850 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen und der Vorgang wurde mit der zweiten Hälfte des Blutgemisches wiederholt. Das Filtrat wurde wiederum verworfen und die Säule wurde je 1 x mit 5 ml AW1- und AW2-Puffer bei 4500 x g für 1 min gewaschen. Nach einer 5minütigen Inkubation mit 1 ml AE-Puffer bei Raumtemperatur folgte die Eluierung der DNA in einem frischen 50 ml Tube, bei 4500 x g für 5 min. Die isolierte DNA befand sich nun im Eluat und konnte bei -20°C gelagert werden.

3.7. Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der DNA

Die Bestimmung der Konzentration und Reinheit der isolierten DNA erfolgte durch die Messung der optischen Dichte der wässrigen DNA-Lösungen. Es wurden 2 µl der DNA-Lösung aus 3.6. mit 98 µl Aqua bidest. verdünnt (1:50) und die Absorption im Spektrophotometer (Hewlett-Packard 8452A) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die optische Dichte (OD) von 1,0 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 µg/ml. Die DNA-Menge konnte nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{DNA-Konzentration} = \text{OD (Messwert)} \times 50 \text{ µg/ml} \times 50 \text{ (Verdünnungsfaktor)}$$

Die Reinheit der DNA konnte aus den Verhältnissen OD_{DNA} bei einer Wellenlänge von 260 nm zu $\text{OD}_{\text{Protein}}$, bei einer Wellenlänge von 280 nm, bzw. $\text{OD}_{\text{Zucker}}$, bei einer Wellenlänge von 230 nm, ermittelt werden. Das Verhältnis $\text{OD}_{\text{DNA}} / \text{OD}_{\text{Protein}}$ sollte 1,6-2, und das Verhältnis $\text{OD}_{\text{DNA}} / \text{OD}_{\text{Zucker}}$ sollte 0,3-0,9 betragen.

3.8. Genotypisierung

3.8.1. Cytochrom P450 1A2

Die Bestimmung des CYP 1A2 Genotyps beruhte auf der Methode von SACHSE *et al.* (1999).

3.8.1.1. PCR

Es wurden 200 ng der DNA pro Probe zu 47 µl PCR-Mastermix (siehe 2.6.) gegeben (Endvolumen 50 µl) und in der PCR eingesetzt. Es wurden folgende Primer verwendet (siehe Tab. 3-4).

Tab. 3-4: DNA-Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer

Typ	Nr.	Primersequenz
CYP 1A2	P1f	5'-CAA CCC TGC CAA TCT CAA GCA C-3'
CYP 1A2	P4r	5'-AGA AGC TCT GTG GCC GAG AAG G-3'

Die Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler 30 PCR-Zyklen unter folgenden PCR-Bedingungen: Start: 2 min 94°C, 30 sec 94°C, 10 sec 60°C, 1 min 72°C, Ende: 7 min 72°C.

3.8.1.2. Auswertung

Das PCR-Produkt wurde mit Bsp120I verdaut, wobei das mutierte Allel in ein 709 bp und ein 211 bp großes Fragment geschnitten wurde. Die Restriktionsfragmente wurden nach DNA-Längen in einem 3 %igem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Analyse der DNA-Produkte wurden 20 µl der verdauten Probe mit 2 µl Ficoll-Gellade-Puffer gemischt und 15 µl davon in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 30-60 min bei konstant 160 V bzw. bei 120 V bei 3,2% NuSieve in 1 x TBE-Puffer (siehe 2.6.). Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde Ethidiumbromid (7 µl) zugesetzt.

3.8.2. Glutathion-S-Transferase M1 und T1

Die Bestimmung des GST M1 Genotyps erfolgte nach der Methode von BELL *et al.* (1993) und die des GST T1 Genotyps nach der Methode von PEMBLE *et al.* (1994) mit Hilfe der PCR.

3.8.2.1 PCR

Für die multiplexe PCR, in der die GST M1 und GST T1 Genotypen gleichzeitig bestimmt werden konnten, wurden 200 ng der DNA pro Probe zu 47 µl PCR-Mastermix (siehe 2.6.) zugegeben (Endvolumen 50 µl) und in der PCR eingesetzt. Es wurden folgende Primer (**siehe Tabelle 3-5**) gleichzeitig in der PCR verwendet, die Primer für das GST-M1, für das GST T1-Gen und die Primer für das β -Globin-Gen, das als Referenzgen diente.

Tab. 3-5: DNA-Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer

Typ	Nr.	Primersequenz
hGSTM1	G5	5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3'
hGSTM1	G6	5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'
hGSTT1	F1143	5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'
hGSTT1	F1143	5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'
β -Globulin	PC04	5'-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC-3'
β -Globulin	GH20	5'-GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC-3'

Die Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler 30 PCR-Zyklen unter folgenden PCR-Bedingungen: 4 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C, Ende: 10 min 72°C.

3.8.2.2. Auswertung

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel nach DNA-Längen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Analyse der DNA-Produkte wurden 10 μ l des PCR-Gemisches mit 2 μ l Gellade-Puffer (Verhältnis 1:5) gemischt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 160 V über 30 bis 45 min in 1 x TBE-Puffer (siehe 2.6.). Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde Ethidiumbromid (7 μ l) zugesetzt. Bei Spendern, die in keinem, oder nur in einem Allel eine Deletion im GST M1- oder GST T1-Gen trugen, konnten DNA-Fragmente amplifiziert werden. Das GST M1-Fragment besaß eine Größe von 215 bp und das vom GST T1-Fragment 480 bp. Diese Spender wurden als GST M1 bzw. GST T1 positiv bezeichnet. Bei Spendern mit homozygoten Deletionen fehlte die entsprechende DNA-Fragment-Bande. Diese Spender werden als GST M1 bzw. GST T1 negativ bezeichnet.

3.8.3. Genotypisierung GST P1

Die Bestimmung des GST P1 Genotyps erfolgte nach der Methode von KO *et al.* (2000) mit Hilfe der real time PCR.

3.8.3.1. PCR

Für die real-time PCR wurden 200 ng der DNA pro Probe zu 47 μ l PCR-Mastermix (siehe 2.6.) in Kombination mit dem Light-CyclerTM DNA Master Hybridisation Probes Kit (Roche) zugegeben (Endvolumen 50 μ l). Es wurden folgende Primer und eine mit Fluorescein gekoppelte DNA-Sequenz eingesetzt (**Tabelle 3-6**).

Tab. 3-6: DNA-Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer

Typ	Nr.	Primersequenz
hGSTP1	RT66	5'-ACC CCA GGG CTC TAT GGG AA-3'
hGSTP1	RT67	5'-TGA GGG CAC AAG CCC CT-3'
Fluorescein gekoppelte DNA-Sequenz		5'-TGC AAA TAC ATC TCC CTC ATC TAC ACC AAC-3'

Die Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler 45 PCR-Zyklen unter folgenden PCR-Bedingungen: Start: 2 min 95°C, 5 s 95°C, 10 s 55°C, 25 s 72°C.

3.8.3.2. Auswertung

Die beiden GST P1-Allele konnten mit Hilfe von DNA-Schmelzkurven unterschieden werden. Diese wurden nach dreiminütiger Denaturierung bei 95°C durchgeführt und bei einem Temperaturanstieg von 50°C bis 80°C (0,4°C/s) mit dem Light-Cycler™ aufgezeichnet. Bei einem Ile/Val-Polymorphismus am Codon 105 wurde eine höhere Schmelztemperatur für den Wildtyp erwartet. Die Schmelzkurven wurden mit dem Dokumentationssystem Gel-Pro (Matrix-Vision) ausgewertet.

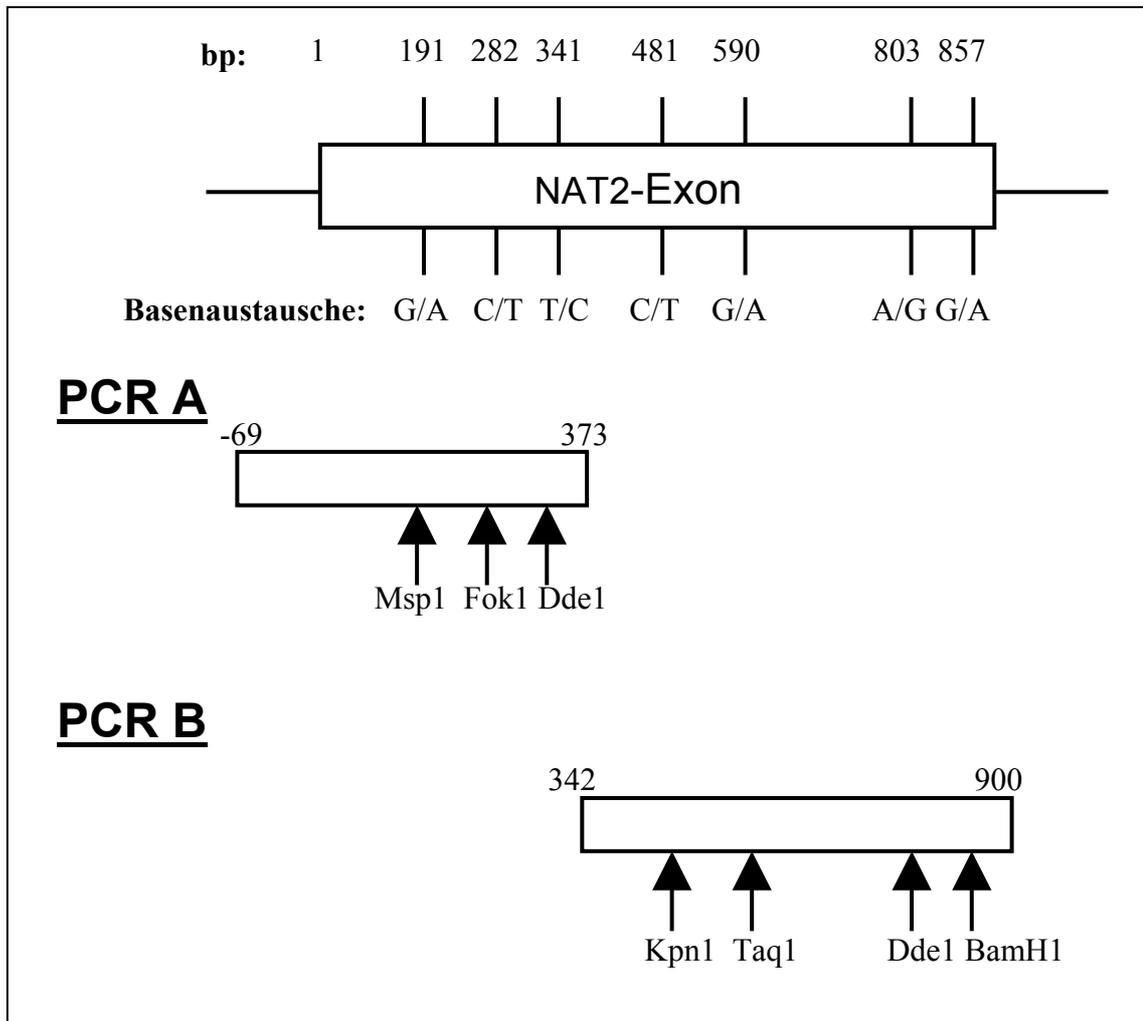
3.8.4. Genotypisierung der N-Acetyltransferase 2 (NAT 2)

Die Bestimmung des NAT 2 Genotyps beruhte auf der Methode von CASCORBI *et al.* (1995). In zwei PCR-Ansätzen wurden zwei unterschiedliche DNA-Fragmente gewonnen, die anschließend mit Hilfe von Restriktionsenzymen verdaut und im Agarosegel aufgetrennt wurden.

3.8.4.1. PCR

Es wurden 200 ng der DNA pro Probe zu 47 µl PCR-Mastermix (siehe 2.6.) zugegeben (Endvolumen 50 µl) und in der PCR eingesetzt. Die verwendeten Primer sind in **Tabelle 3-7** dargestellt. Mit der PCR-A wurde ein DNA-Fragment von 442 Basenpaaren amplifiziert, welches die Mutationsstellen für die Restriktionsenzyme Msp 1 (Mutationsstelle 191 bp), Fok 1 (Mutationsstelle 282 bp) und Dde 1 (Mutationsstelle 341 bp) enthielt. Mit der PCR-B wurde ein zweiter Teil des NAT 2-Exons mit einer Länge von 559 Basenpaaren amplifiziert, welches die Mutationsstellen für Kpn 1 (Mutationsstelle 481 bp), Taq 1 (Mutationsstelle 590 bp), Dde (Mutationsstelle 803 bp) und BamH 1 (Mutationsstelle 857 bp) enthielt (Abb. 3-2)

Abb. 3-2: Schematische Darstellung des NAT 2 Exons und der Restriktionsschnittstellen.



Tab. 3-7 : DNA-Sequenzen der für die Genotypisierung verwendeten Primer

Typ	Primersequenz
PCR A:	
NAT 1	S: 5'-GTC ACA CGA GGA AAT CAA ATG C-3'
NAT 3	AS: 5'-ACC CAG CAT CGA CAA TGT AAT TCC TGC CCT CA-3'
PCR B:	
NAT 5	S: 5'-ACA CAA GGG TTT ATT TTG TTC C-3'
NAT 7	AS: 5'-AAT TAC ATT GTC GAT GCT GGG T-3'

Die Reaktionsansätze durchliefen im Thermocycler 35 PCR-Zyklen unter folgenden Bedingungen:

PCR A: Start: 3 min 94°C, 0,5 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C, Ende: 10 min 72°C.

PCR B: Start: 3 min 94°C, 0,5 min 94°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C, Ende: 10 min 72°C.

Die PCR-Produkte wurden auf einem 1,5 %igen Agarosegel kontrolliert. Dann erfolgten die Restriktionsverdauung der Ansätze A und B (**Tabelle 3-8** und **3-9**), bei denen man eine Reihe von Restriktions-Fragmenten erhielt (**Tabelle 3-10**).

Tab. 3-8: Restriktionsverdauung des PCR A-Produktes

Restriktionsenzym	Msp 1	Fok 1	Dde 1
PCR A-Produkt	5 µl	5 µl	5 µl
Enzymmenge	0,25 µl (5U)	0,5 µl (2U)	0,25 µl (2,5U)
10 x Enzym-Puffer	1 µl	1 µl	1 µl
Aqua bidest	3,75 µl	3,5 µl	3,75 µl
Inkubationszeit	2 h		
Inkubationstemperatur	37°C		
Agarosegel	3,2% NuSieve: Agarose = 3:1	1,5% Agarose	3,2% NuSieve 3:1
Gellade-Puffer	Ficoll	bjb	Ficoll

Tab. 3-9: Restriktionsverdauung des PCR B-Produktes

Restriktionsenzym	Kpn 1	Taq 1	Dde 1	BamH 1
PCR B-Produkt	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Enzymmenge	0,5 µl (5U)	0,25 µl (5U)	0,25 µl (2,5U)	0,25 µl (5U)
10 x Enzym-Puffer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Aqua bidest	3,4 µl	3,65 µl	3,75 µl	3,65 µl
Inkubationszeit	2 h	6-18 h	2,5 h	2 h
Inkubationstemperatur	37°C	65°C	37°C	37°C
Agarosegel	1,5% Agarose	3,2% NuSieve 3:1	3,2% NuSieve 3:1	1,5% Agarose
Gellade-Puffer	bjb	Ficoll	Ficoll	bjb

Tab. 3-10: DNA-Fragmentlängen aus den Restriktionsschnitten

Restriktionsschnitt	Mutationsstelle (bp)	Sequenz	Fragmentlänge (bp)
Msp 1 (PCR A)	191	Wildtyp	168 181 93
		Mutante	168 274
Fok 1 (PCR A)	282	Wildtyp	337 105
		Mutante	442
Dde 1 (PCR A)	341	Wildtyp	163 58 221
		Mutante	164 58 189 32
Kpn 1 (PCR B)	481	Wildtyp	135 424
		Mutante	559
Taq 1 (PCR B)	590	Wildtyp	21 142 226 170
		Mutante	21 142 396
Dde 1 (PCR B)	803	Wildtyp	345 90 124
		Mutante	345 90 97 27
BamH 1 (PCR B)	857	Wildtyp	515 44
		Mutante	559
PCR A = 442 bp		PCR B = 559 bp	

3.8.4.2. Auswertung

Die Restriktionsfragmente wurden nach DNA-Längen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Analyse der DNA-Produkte wurden 20 µl der verdauten Probe mit 2 µl Ficoll-Gellade-Puffer gemischt und 15 µl in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte für 30-60 min bei konstant 160 V bzw. bei 120 V bei 3,2% NuSieve in TBE-Puffer (siehe 2.6.). Zur UV-Detektion der DNA-Banden wurde Ethidiumbromid (7 µl) zugesetzt.

Um die Allel-Varianten, die sich aus den gefundenen DNA-Fragmenten nachweisen ließen (**Tabelle 3-9**), zu bestimmen, wurden die Ergebnisse der untersuchten Proben in einen Auswertebogen (siehe **Anhang Abbildung 8-2**) eingetragen. Mit Hilfe einer Auswerteschablone (siehe **Anhang Abbildung 8-3**), konnten die Allelkombinationen in den Proben ermittelt werden. Stimmt nur eine Schablonenzeile mit den Eintragungen in der Auswertezeile überein, handelte es sich um einen homozygoten Allelträger. Ließen sich zwei oder mehrere Zeilen mit der Schablone zur Deckung bringen, war der Allelträger heterozygot. Es waren unterschiedliche Allelkombinationen möglich. Die Bezeichnung der Allele und der daraus abgeleitete Phänotyp richteten sich dabei nach der Position des Nukleotidaustausches (siehe **Anhang Tabelle 8-4**).

4. Ergebnisse

4.1. PUBEC, MDCK-, IHKE- und 5637-Zellen

4.1.1. Neutralrot-Assay

Mit Hilfe des Neutralrot-Assays wurde die Konzentration ermittelt, bei der OTA eine zytotoxische Wirkung auslöste. Zur Quantifizierung der Zytotoxizität wurden die IC30-, IC50-, und IC70-Werte (inhibitorische Konzentrationen, bei denen die Neutralrotaufnahme im Vergleich zur Lösemittel-Kontrolle noch 30 %, 50 % und 70 % betragen) ermittelt. Als weiterer Parameter für die zytotoxische Wirkung wurde die Proliferation der Zellen anhand der Zellproteinkonzentrationen mit dem BCA-Assay (siehe 3.4.) bestimmt.

Da im nachfolgenden Genotoxizitäts-Assay neben OTA verschiedene andere Substanzen zugesetzt werden sollten, wurden (4.1.1.2.) auch potentielle zytotoxische Effekte der DNA-Reperaturenzym-Hemmer Cytosinarabinosid (araC) / Hydroxyurea HU (4.1.1.3.), von Methotrexat (4.1.1.4) und von HEPES-Ringer-Puffer (4.1.1.5) im Neutralrot-Assay getestet. Diese Informationen wurden benötigt, da zytotoxische Effekte im Genotoxizitäts-Assay, eine falsch positive Aussage vermitteln oder die genotoxischen Effekte von OTA verstärken oder überdecken.

4.1.1.1. OTA Dosis-Wirkungskurve in verschiedenen Zellsystemen nach 24 h Inkubation

In PUBEC traten erste zytotoxische Effekte durch OTA bereits im niedrigen nanomolaren Bereich auf, während sich in den Zelllinien zytotoxische Effekte erst bei einer 10 bis 100-fach höheren OTA-Konzentration zeigten (**Tabelle 4-1**). Die IC-Werte innerhalb der verwendeten Zelllinien lagen etwa im gleichen Bereich und waren maximal um einen Faktor 5 von einander verschieden (**Abbildung 4-1**).

Es ließ sich folgenden Reihenfolge für die Empfindlichkeit gegenüber OTA aufstellen: PUBEC >> 5637 > IHKE > MDCK. Der Zusatz von S9-Mix wirkte sich unterschiedlich auf die Zytotoxizität von OTA aus. In PUBEC wurde die Zytotoxizität nicht erhöht, in 5637-Zellen nur bei hohen OTA-Konzentrationen, in MDCK-Zellen bereits bei niedrigen OTA-Konzentrationen und in IHKE-Zellen wurde die Zytotoxizität

verringert (**Abbildung 4-2**), so dass sich folgende Reihenfolge ergab: PUBEC >> 5637 > MDCK > IHKE.

In keinem Zellkulturmodell führte OTA zu einer vollständigen Reduktion der Neutralrotaufnahme oder der Proteingehalte.

Tabelle 4-1: IC-Werte für Neutralrot-Aufnahme und Proteingehalt

Zelltyp	S9-Mix	zytotox. ab (μM)	IC ₃₀ (μM)		IC ₅₀ (μM)		IC ₇₀ (μM)	
			NR	Prot.	NR	Prot.	NR	Prot.
PUBEC	-	0,001	0,004	0,006	0,2	0,7	0,5	1
	+	0,001	0,004	0,006	0,2	0,8	0,5	2,5
MDCK	-	1	13	31	50	58	200	85
	+	1	4	10	20	30	60	50
IHKE	-	0,1	4	32	18	53	120	75
	+	0,1	5	27	30	48	210	70
5637	-	0,1	2	18	10	37	70	60
	+	0,1	2	19	10	42	25	65

Abb. 4-1: IC-Werte für die Neuralrot-Aufnahme ohne S9-Mix (24 Inkubation)

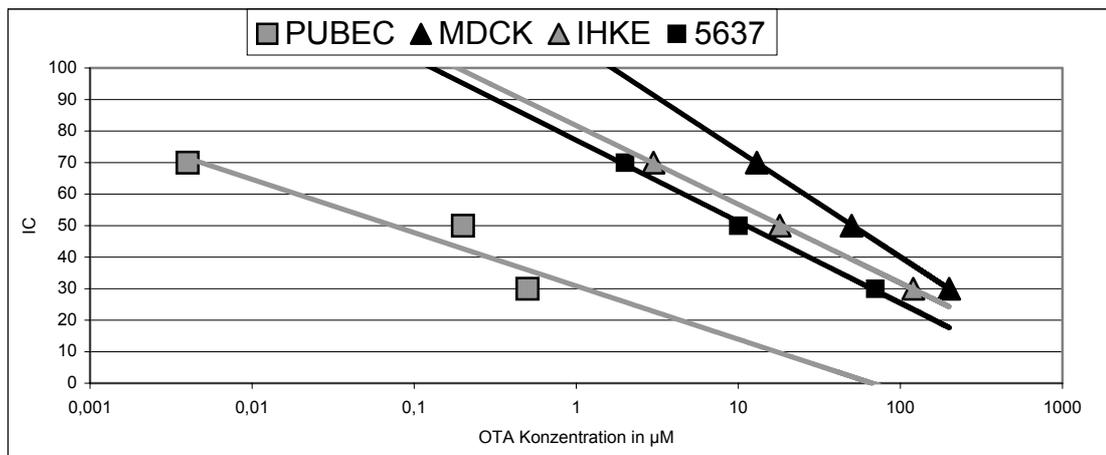
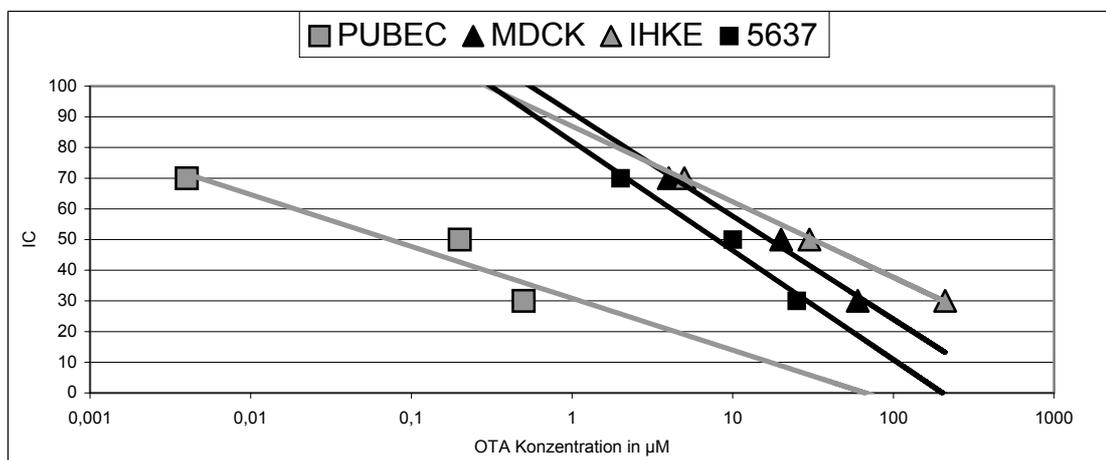


Abb. 4-2: IC-Werte für die Neuralrot-Aufnahme mit S9-Mix (24 Inkubation)



Wurden die IC-Werte anhand der Proteingehalte bestimmt, lagen diese in einem vergleichbaren Konzentrationsbereich wie die IC-Werte für die Neutralrot-Aufnahme (**Tabelle 4-1**). Die Kurven der Zelllinien fallen jedoch steiler ab als bei der Neutralrot-Aufnahme (**Abbildung 4-3** und **4-4**), so dass der OTA-Effekt auf die Zell-Proliferation stärker ist, als auf die Neutralrot-Aufnahme.

Abb. 4-3: IC-Werte für die Proteingehalte ohne S9-Mix (24 Inkubation)

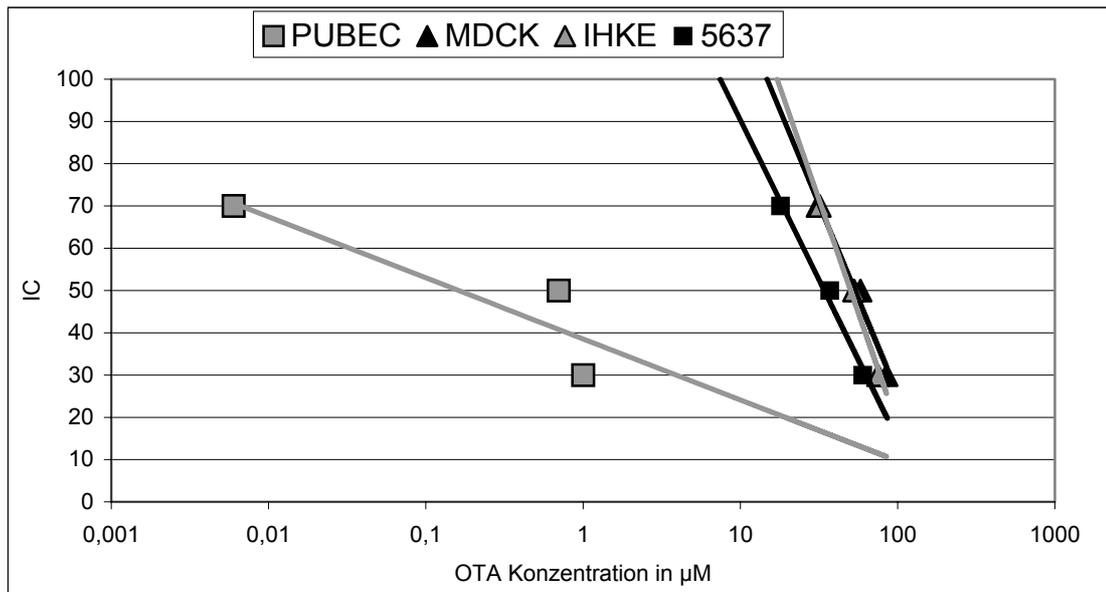
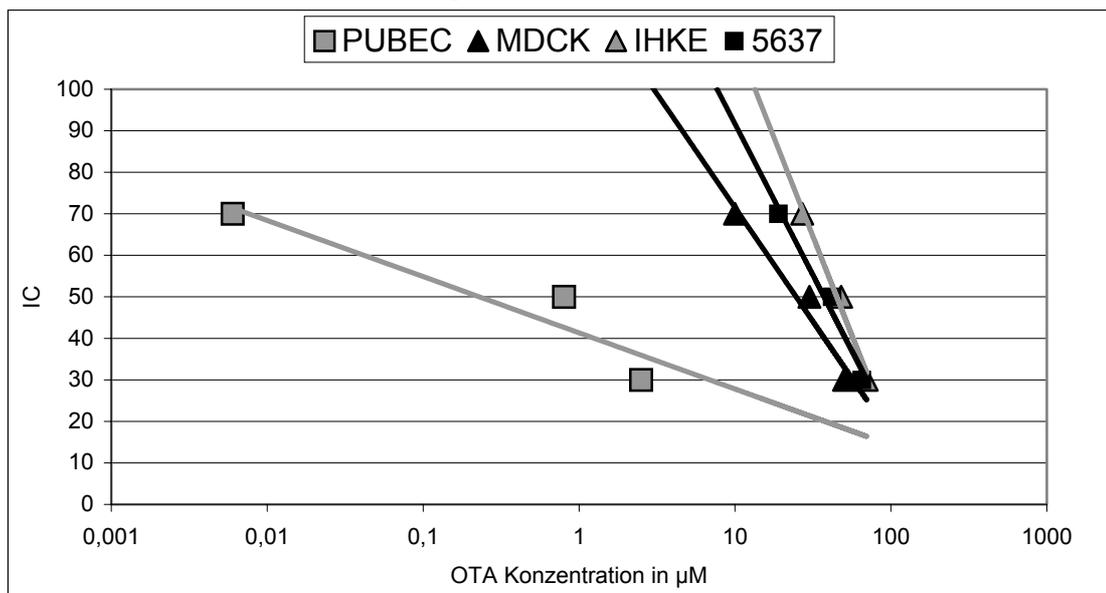


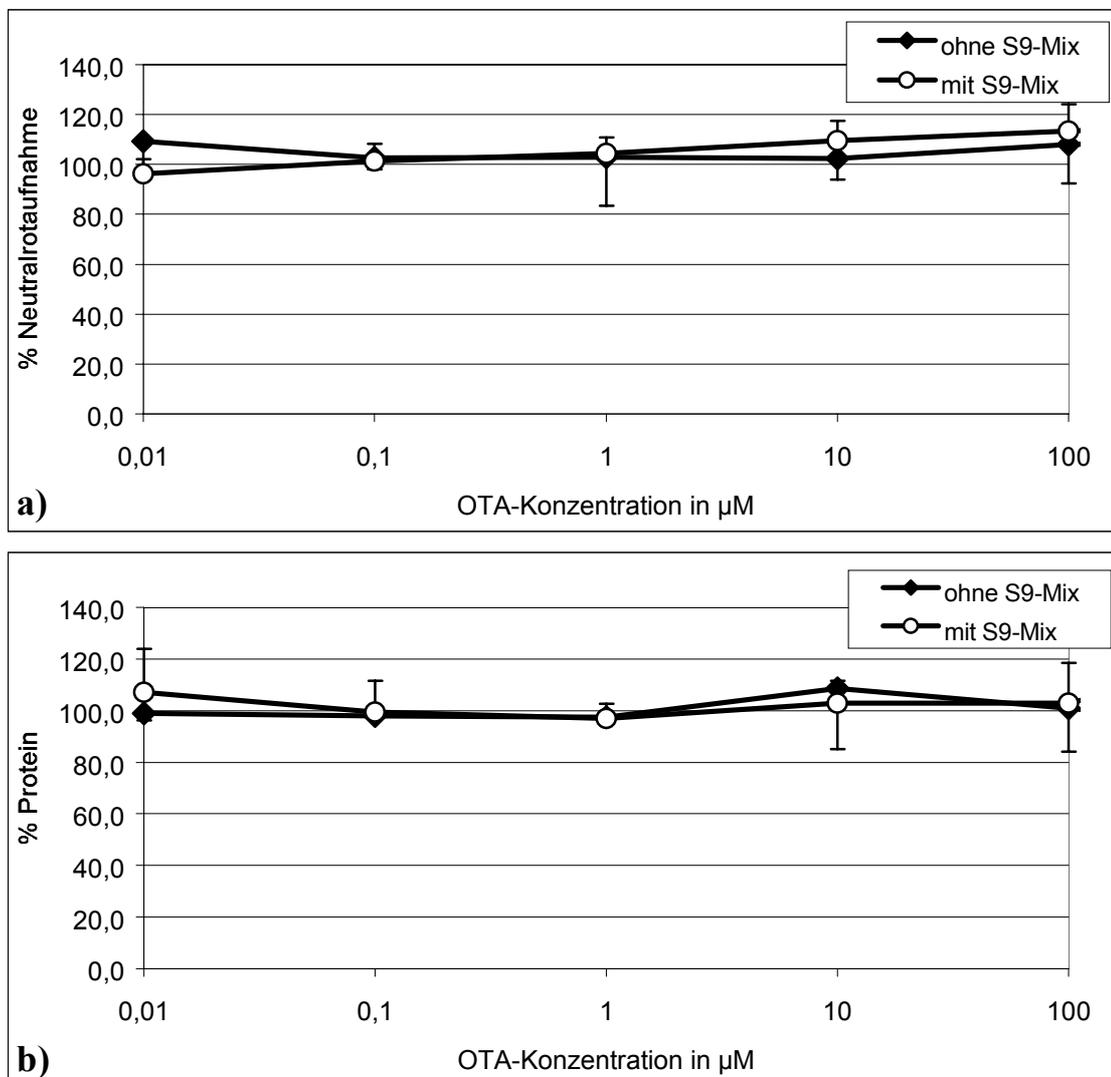
Abb. 4-4: IC-Werte für die Proteingehalte mit S9-Mix (24 Inkubation)



4.1.1.2. OTA Dosis-Wirkungskurve in verschiedenen Zellsystemen nach 3 h Inkubation

Wurden die Inkubationen über einen kürzeren Zeitraum von 3 Stunden durchgeführt, konnte in keinem der verwendeten Zelltypen ein zytotoxischer Effekt beobachtet werden. Sowohl die Neutralrot-Werte, als auch die Proteinkonzentrationen lagen jeweils im Bereich um 100 % (bezogen auf die Lösemittel-Kontrolle). (Abbildung 4-3, beispielhaft für PUBECs gezeigt)

Abb. 4-3: Neutralrotaufnahme (a) und Proteinkonzentration (b) von PUBEC nach 3-stündiger OTA-Inkubation mit und ohne Zusatz von S9-Mix; n = 3.



4.1.1.3. Zytotoxizität von Cytosinarabinosid/Hydroxyurea (araC/HU)

Als Vorversuch für den nachfolgenden Genotoxizitätsassay (Comet-Assay) bei dem die Substanzen D-Arabinofuranosyl-cytosin und Hydroxyurea (araC/HU) als DNA-Reparatur-Hemmstoffe eingesetzt werden sollten, wurden diese Substanzen auf ihre zytotoxische Wirkung im NR-Assay untersucht. Die Inkubationsdauer im Comet Assay beträgt bis zu 6 h, daher wurden die verschiedenen Zelltypen bis zu 6 h mit 1,8 mM araC und 10 mM HU (für den Comet Assay relevante Konzentrationen) inkubiert.

Eine Inkubation mit araC/HU bis zu 360 min führte zu keiner signifikanten Reduktion der Neutralrotaufnahme und der Proteingehalte in PUBECs (**Abbildung 4-4**) und MDCK-Zellen (**Abbildung 4-5**).

Abb. 4-4: Neutralrotaufnahme und Proteinkonzentration von PUBEC nach araC/HU-Inkubation; n = 3.

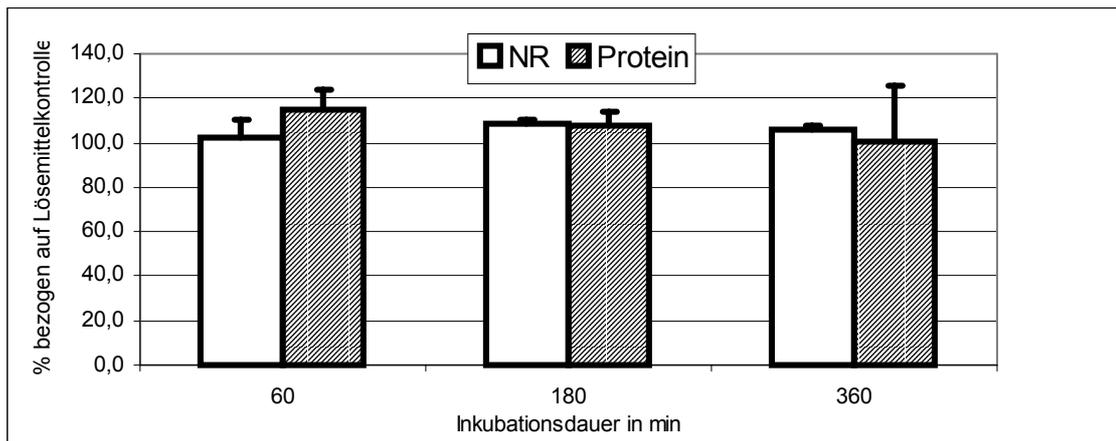
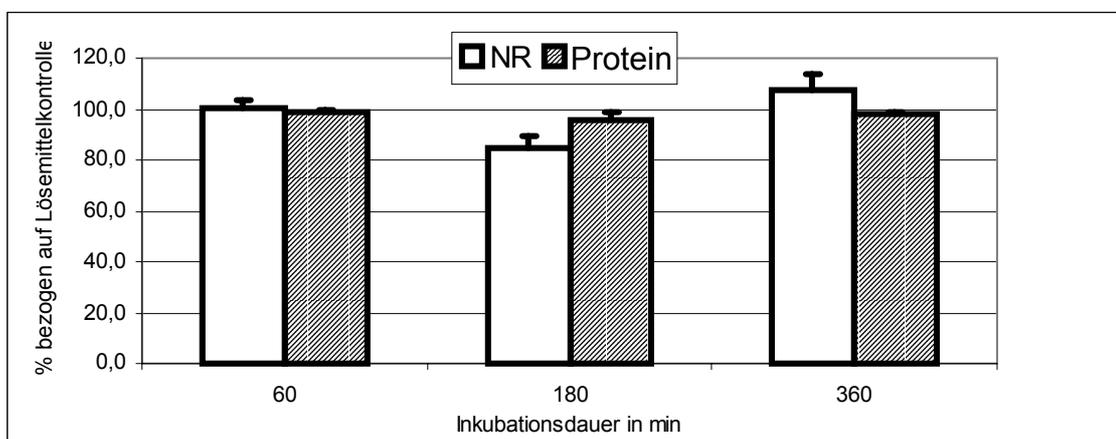
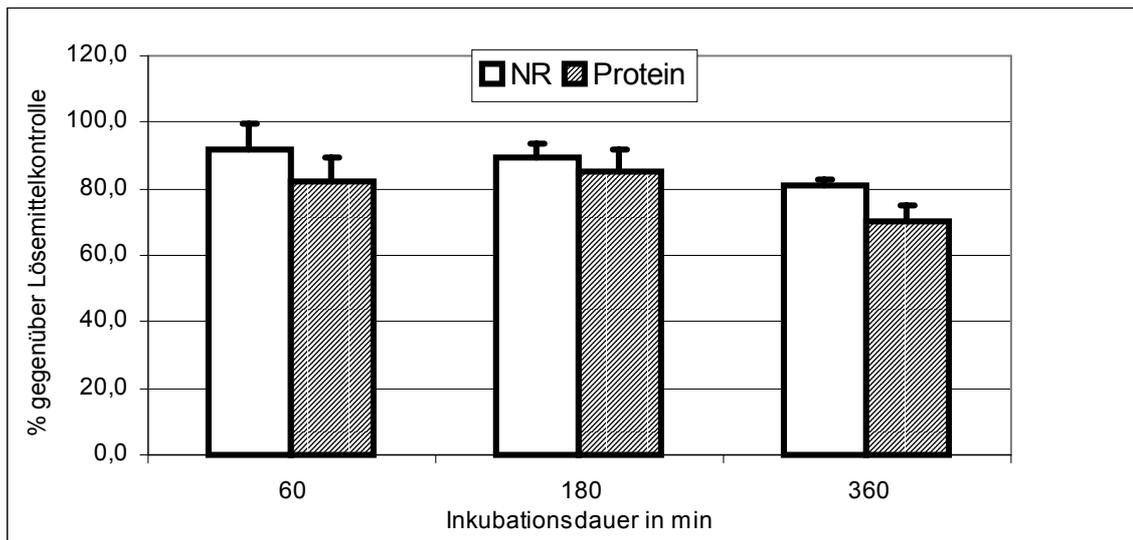


Abb. 4-5: Neutralrotaufnahme und Proteinkonzentration von MDCK-Zellen nach araC/HU-Inkubation; n = 3.



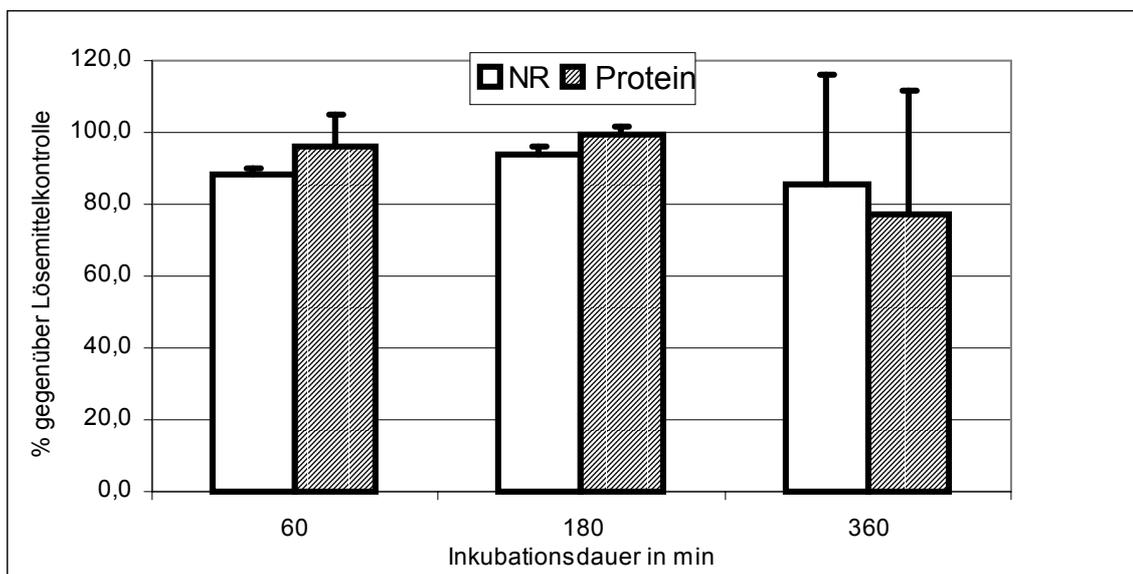
In IHKE-Zellen konnten sinkende Werte für die Neutralrotaufnahme und für die Proteingehalte nach 3-stündiger Inkubation mit araC/HU beobachtet werden. Die Neutralrotwerte sanken auf 80 %, die Proteinwerte auf 70 % ab (**Abbildung 4-6**).

Abb. 4-6: Neutralrotaufnahme und Proteinkonzentration von IHKE-Zellen nach araC/HU- Inkubation; n = 3.



In 5637-Zellen ging die Neutralrotaufnahme nach 6h araC/HU-Inkubation auf 85 % zurück. Die Proteinwerte gingen auf 80 % zurück (**Abbildung 4-7**).

Abb. 4-7: Neutralrotaufnahme und Proteinkonzentration von 5637-Zellen nach araC/HU- Inkubation; n = 3.

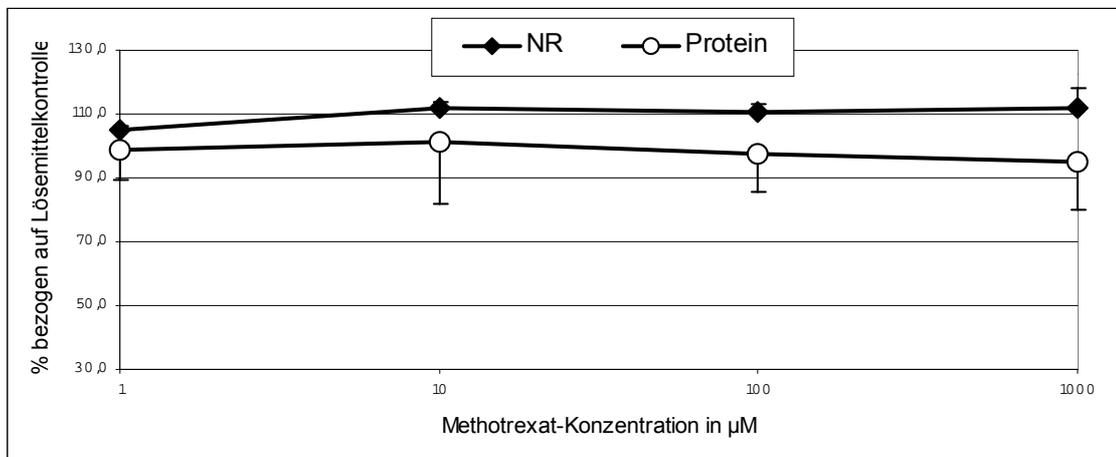


4.1.1.4. Zytotoxizität von Methotrexat

Da im nachfolgenden Comet Assay die Aufnahme von OTA in die Zellen durch Zugabe vom Methotrexat (MT) inhibiert werden sollte, wurde die Zytotoxizität vom MT im NR-Assay untersucht (**Abbildung 4-8 bis 4-11**).

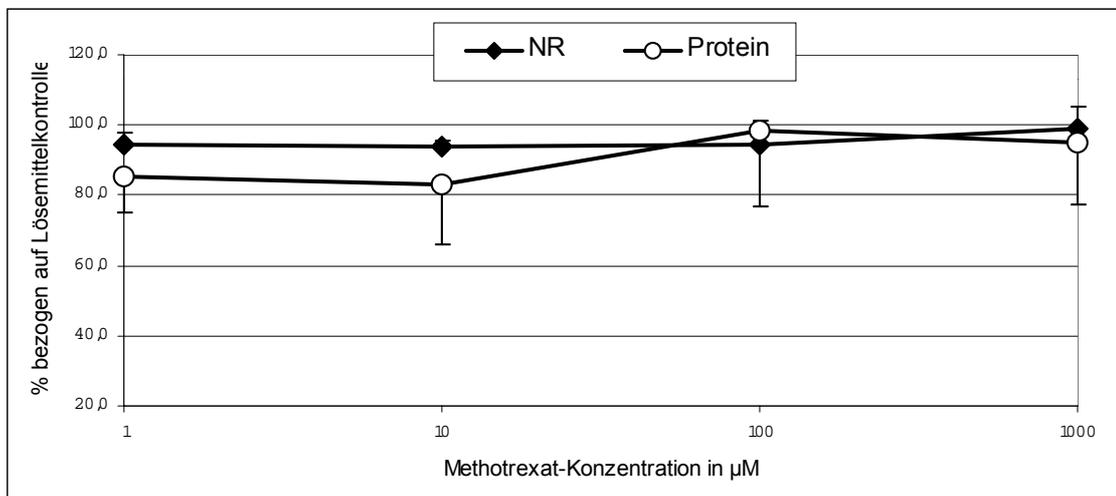
In PUBEC führte eine MT-Konzentration bis zu 1 mM zu keiner Reduktion des Neutralrotwertes. Eine leichte Abnahme des Proteinwertes war ab einer MT-Konzentration von 100 μM zu beobachten (**Abbildung 4-8**).

Abb. 4-8: Neutralrotaufnahme und Proteingehalte in PUBEC nach 3-stündiger MT-Inkubation; n = 3.



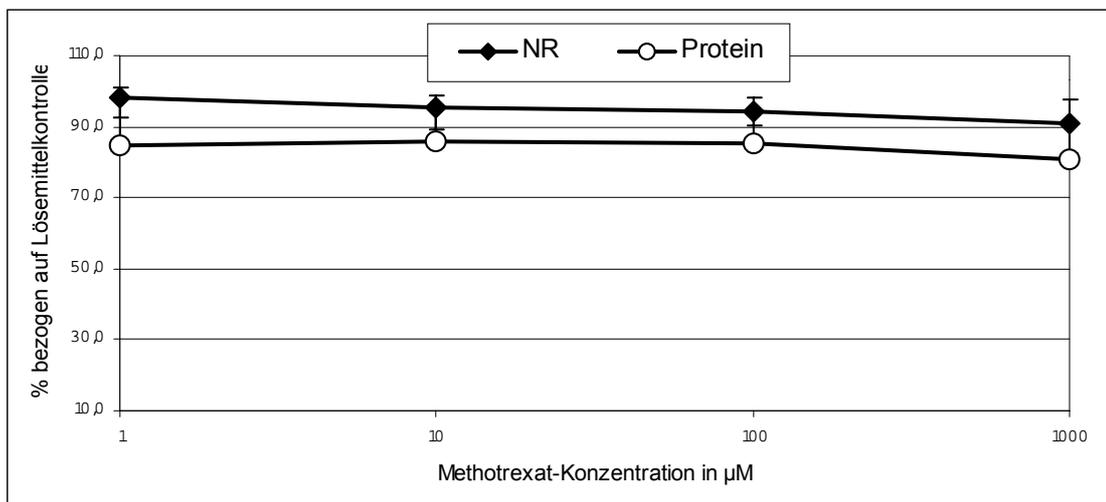
In MDCK-Zellen führte die Zugabe von MT (**Abbildung 4-9**) zu keiner signifikanten Reduktion der Neutralrotaufnahme und Proteingehalte.

Abb. 4-9: Neutralrotaufnahme und Proteingehalte in MDCK-Zellen nach 3-stündiger MT-Inkubation; n = 3.



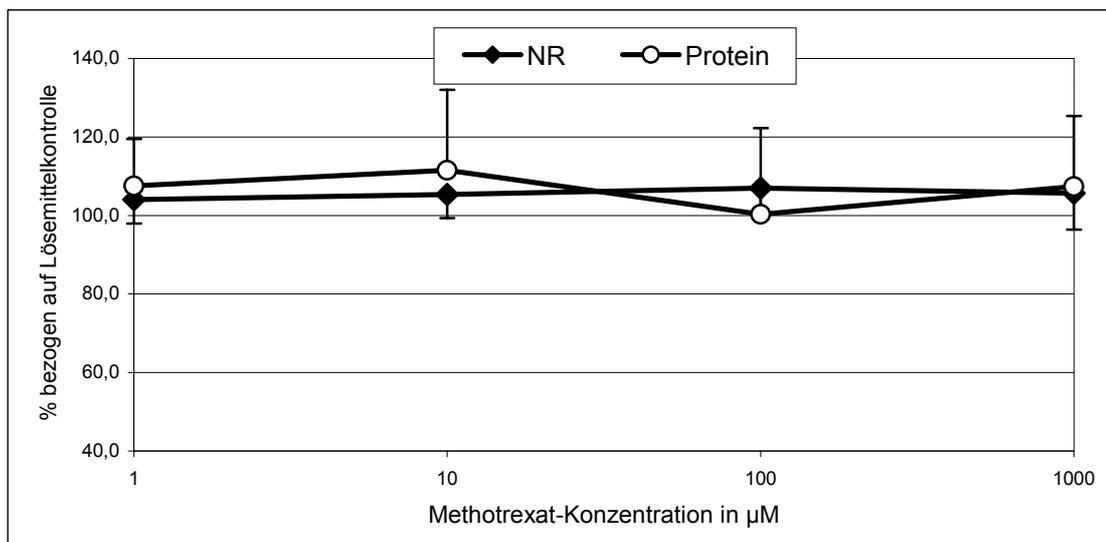
In IHKE-Zellen führte die Zugabe von 1 mM MT zu einer Reduktion der Neutralrotaufnahme auf 90 %. Für die Proteingehalte wurde kein signifikanter Abfall beobachtet (**Abbildung 4-10**).

Abb. 4-10: Neutralrotaufnahme und Proteingehalt in IHKE-Zellen nach 3-stündiger MT-Inkubation; n = 3.



In 5637-Zellen konnte ebenfalls kein signifikanter Abfall von Neutralrotaufnahme oder Proteingehalt bis zu einer MT-Konzentration von 1 mM beobachtet werden (**Abbildung 4-11**).

Abb. 4-11: Neutralrotaufnahme und Proteingehalt von 5637-Zellen nach 3-stündiger MT-Inkubation; n = 3.



4.1.1.5. Neutralrotaufnahme unter physiologischen und sauren pH-Bedingungen

Da in den nachfolgenden Genotoxizitäts-Assays verschiedene pH-Bedingungen angewendet werden sollten, wurden die Auswirkungen dieser pH-Wert-Änderungen ebenfalls im NR-Assay getestet. Dazu wurde HEPES-Ringer-Puffer (HR) mit saurem (pH 5) und neutralem pH-Wert (pH 7,5) verwendet.

PUBECs zeigten unter neutralen pH-Bedingungen keine, unter sauren Bedingungen eine leichte Abnahme der Neutralrotaufnahme (**Abbildung 4-12**), während die Proteinwerte bei beiden Versuchsbedingungen weitgehend konstant blieben (**Abbildung 4-13**).

Abb. 4-12: PUBECs: Neutralrotaufnahme nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.

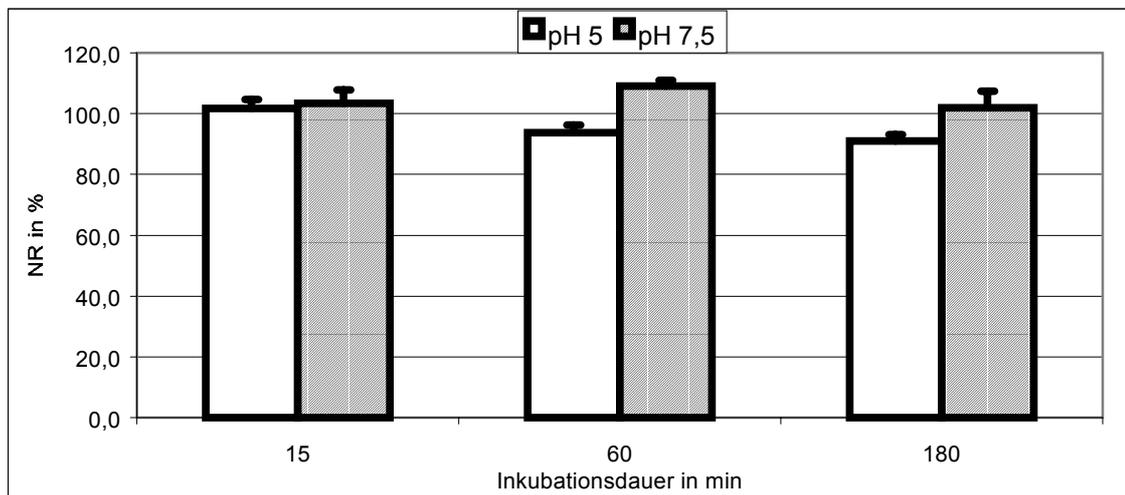
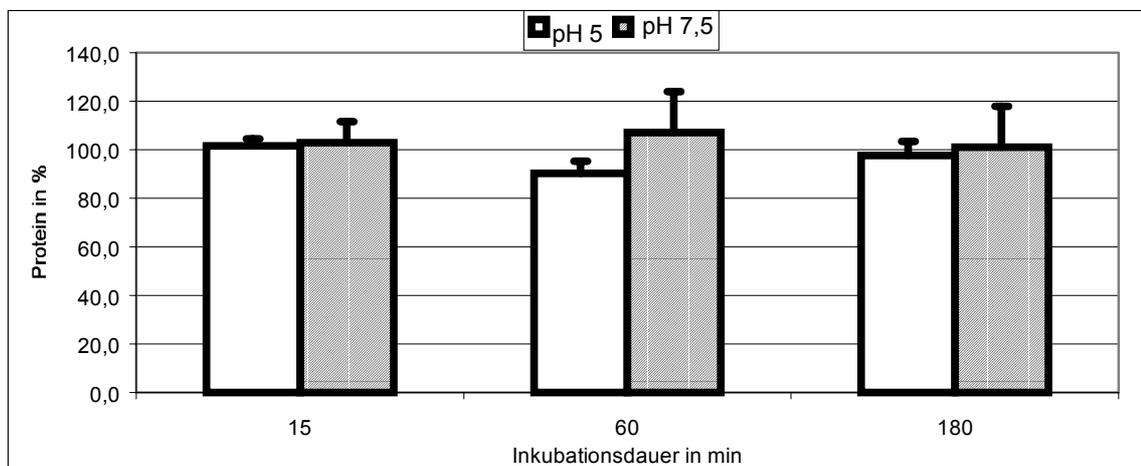


Abb. 4-13: PUBECs: Proteingehalte nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.



In MDCK-Zellen war unter beiden pH-Bedingungen keine Abnahme der Neutralrotwerte zu beobachten (**Abbildung 4-14**). Die Proteinwerte sanken hingegen bei beiden Versuchsbedingungen auf 80 % (**Abbildung 4-15**).

Abb. 4-14: MDCK-Zellen: Neutralrotaufnahme nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.

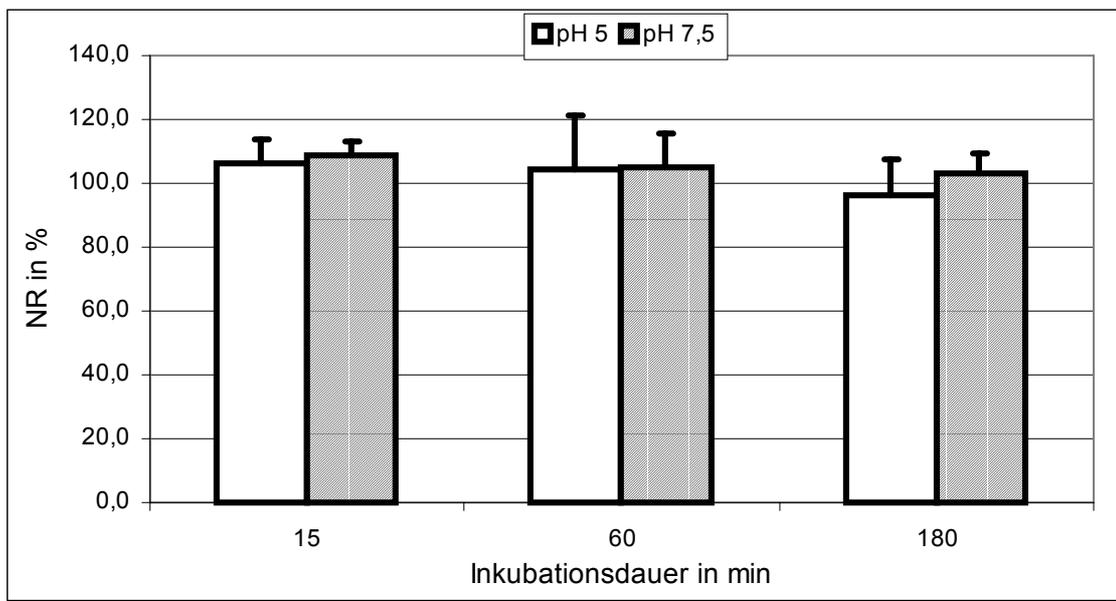
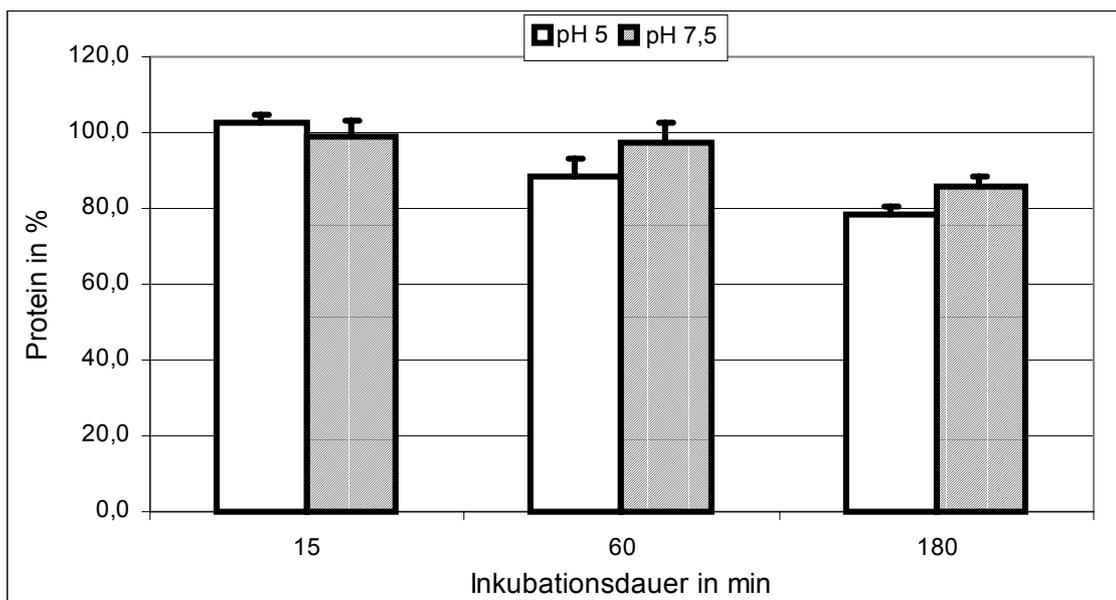


Abb. 4-15: MDCK-Zellen: Proteingehalte nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.



In den IHKE-Zellen zeigte sich unter sauren pH-Bedingungen bereits nach 15 min eine Abnahme der Neutralrotaufnahme auf 80 %. Nach 180 min betrug die Neutralrotaufnahme nur noch 60 %. Bei neutralem pH-Wert war keine Abnahme der Neutralrotaufnahme zu beobachten (**Abbildung 4-16**). Die Proteinwerte blieben bei neutralen pH-Bedingungen konstant bei 100 % und nahmen unter sauren pH-Bedingungen im gleichen Maß wie die Neutralrotaufnahme ab (**Abbildung 4-17**).

Abb. 4-16: IHKE-Zellen: Neutralrotaufnahme nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.

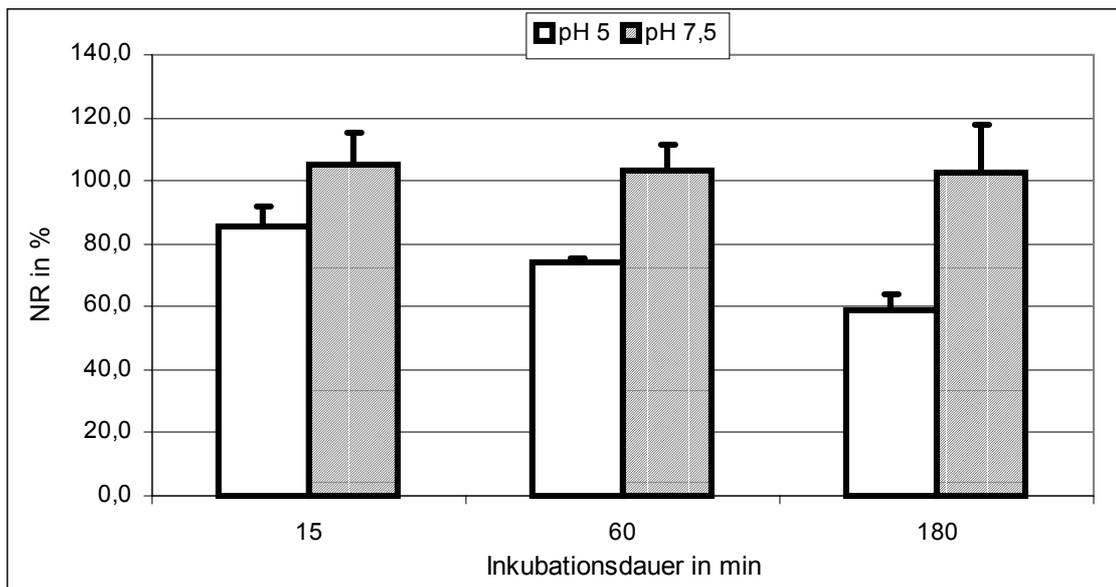
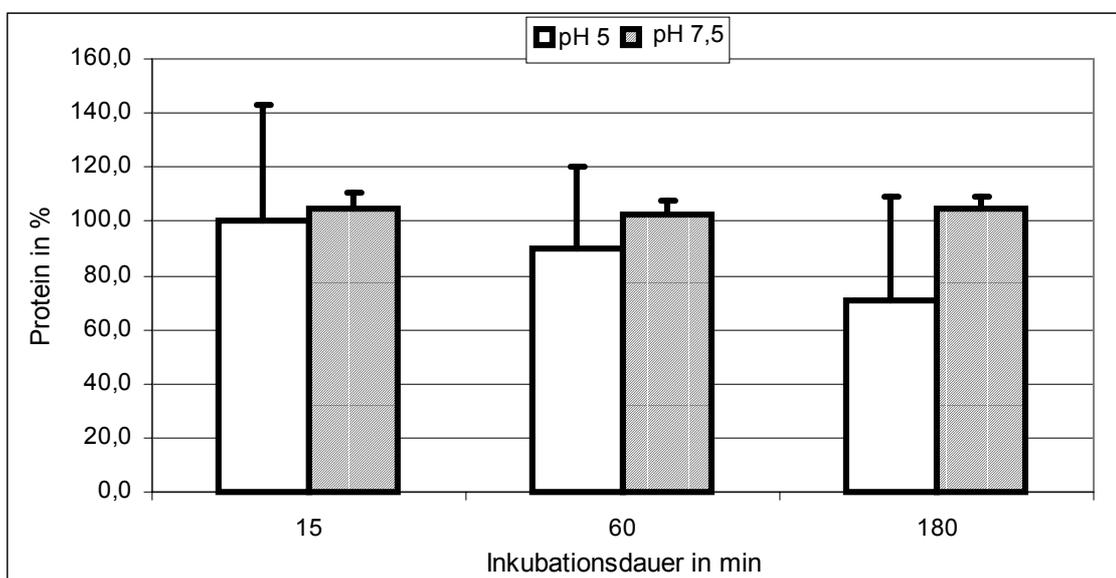


Abb. 4-17: IHKE-Zelle: Proteingehalte nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.



In 5637-Zellen war nur eine leichte Abnahme der Neutralrotaufnahme und Proteingehalte unter beiden pH-Bedingungen zu beobachten (**Abbildung 4-18** und **4-19**). Die Werte sanken um etwa 5-10 % ab.

Abb. 4-18: 5637-Zellen: Neutralrotaufnahme nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.

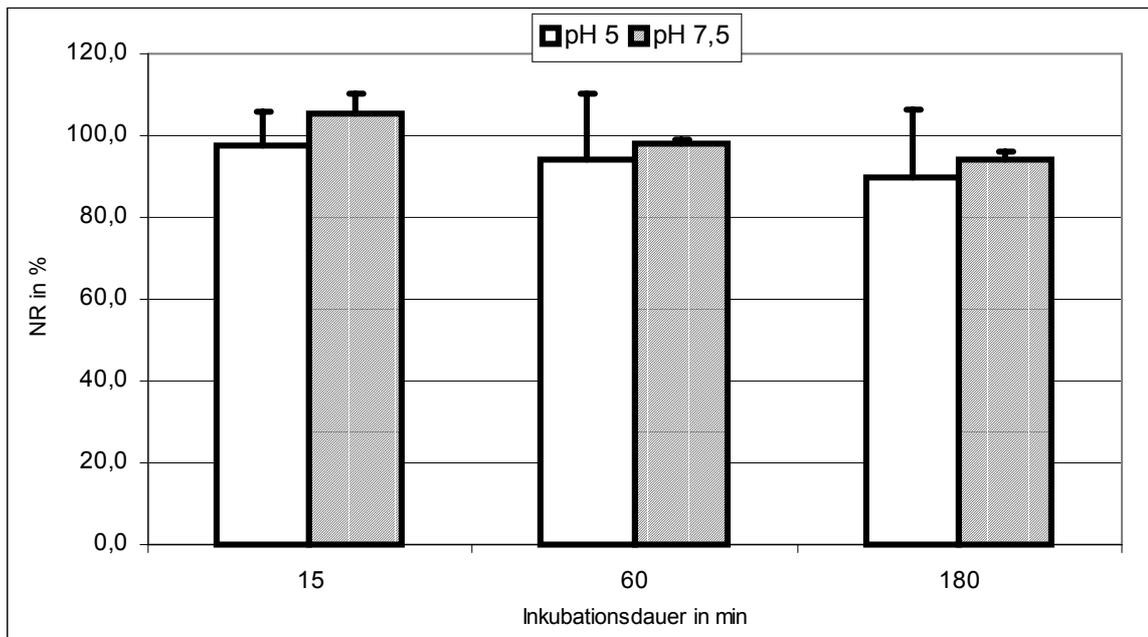
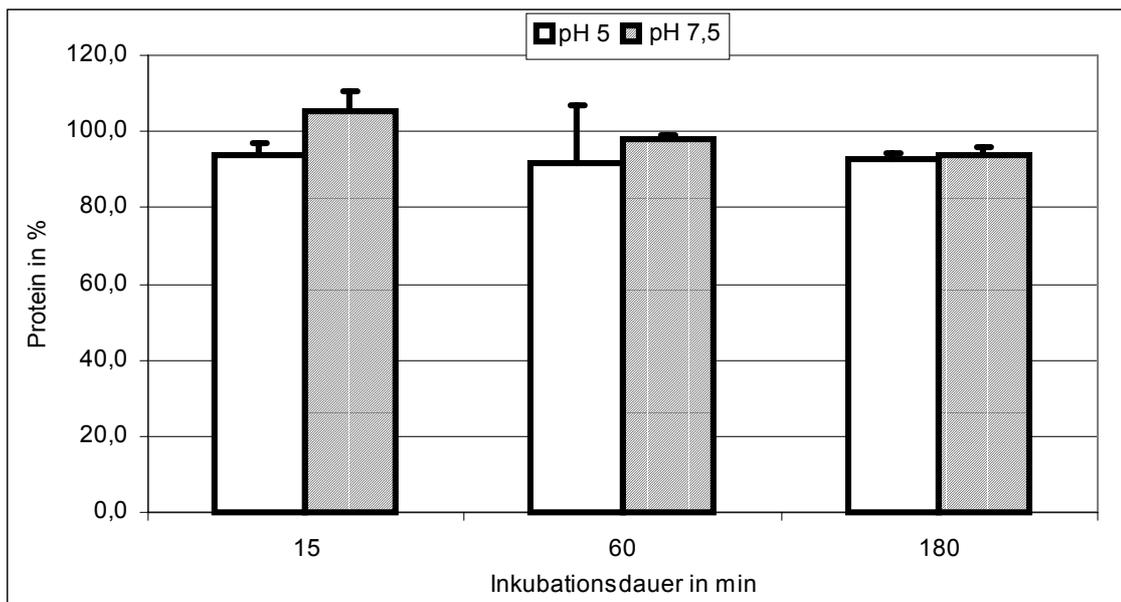


Abb. 4-19: 5637-Zellen: Proteingehalte nach Inkubation in saurem (pH 5) und neutralem (pH 7,5) HEPES-Ringer-Puffer; n = 3.



4.1.2. Comet-Assay

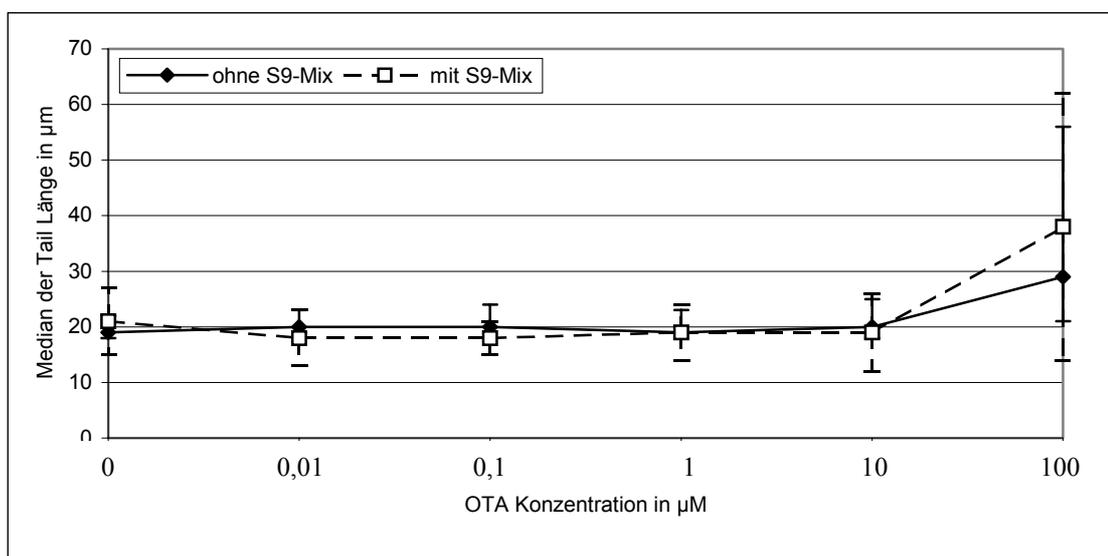
Für die Prüfung der genotoxischen Wirkung von OTA wurde die Methode der alkalischen Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet Assay) eingesetzt. Als Parameter für das Ausmaß der DNA-Schäden wurde die Tail Länge bestimmt. Dazu wurden mindestens 100 Zellkerne pro Konzentration aus zwei unabhängigen Versuchen ausgewertet.

4.1.2.1. OTA Dosis-Wirkungs-Beziehung

In den folgenden Abbildungen sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für die verschiedenen Zelltypen dargestellt. Es ist der Median der Tail Länge gegen die OTA-Konzentration aufgetragen. Zusätzlich sind noch die 1. und 3. Quartile als Balken dargestellt. Die OTA-Konzentrationen, bei denen ein signifikanter Anstieg der Tail Längen zu beobachten waren, sowie die Minima und Maxima der Mediane sind in **Tabelle 4-2** zusammengefasst.

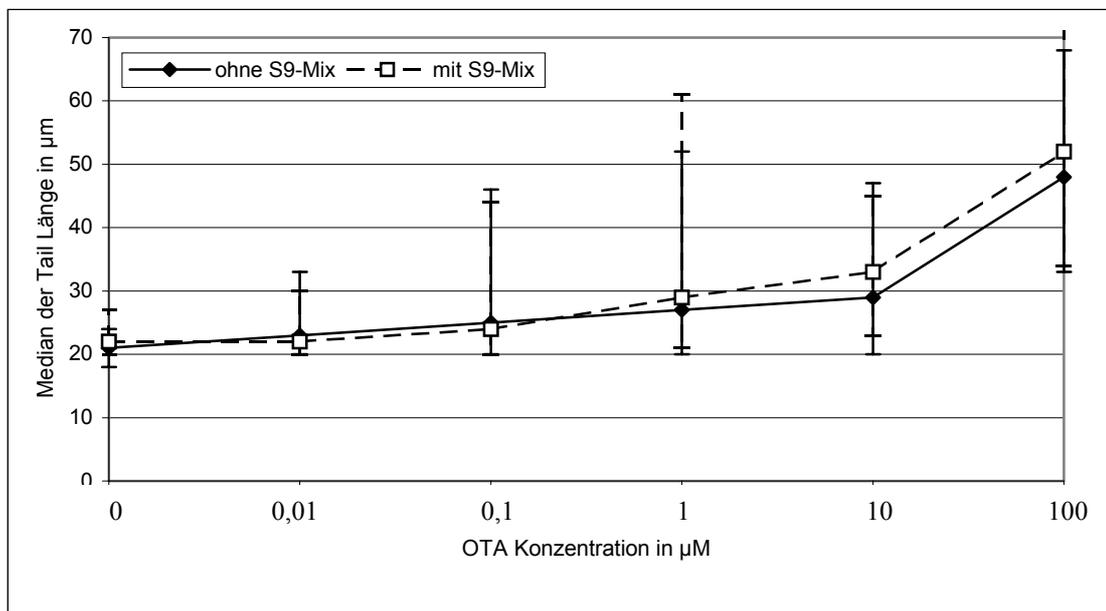
In PUBEC war keine Induktion von DNA-Schäden in Abhängigkeit von der OTA-Konzentration zu beobachten (**Abbildung 4-20**). Nur bei einer OTA-Konzentration von 100 μM OTA waren die Tail Längen signifikant erhöht und etwa doppelt so hoch wie in der Kontrolle. Die Zugabe von S9-Mix führte ebenfalls erst bei einer OTA-Konzentration von 100 μM zu einem signifikanten Anstieg der Tail Länge.

Abb. 4-20: Tail Längen in PUBEC nach 3 Stunden OTA-Inkubation.



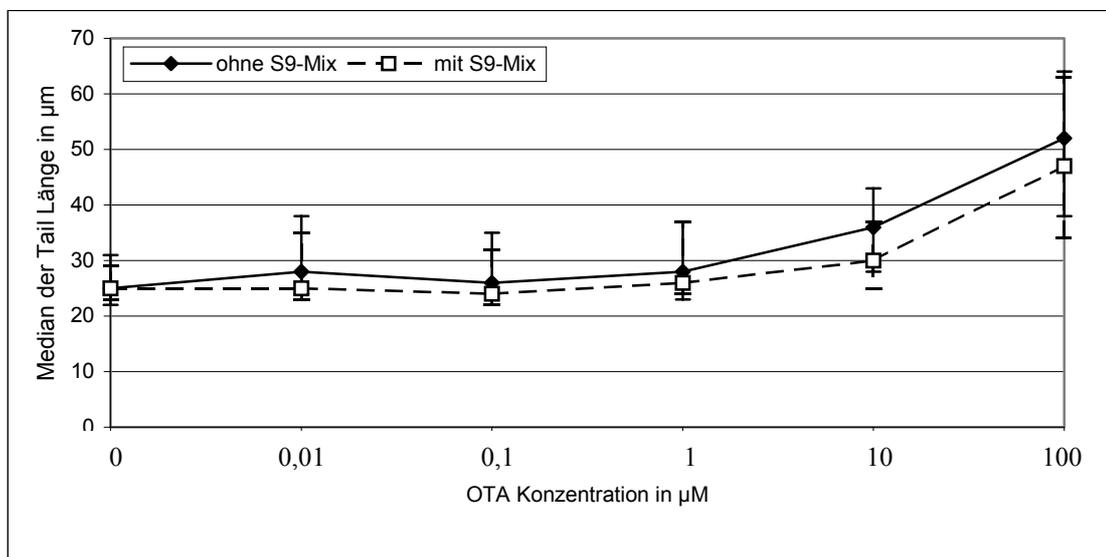
In MDCK-Zellen kam es zu einer konzentrationsabhängigen Induktion von DNA-Schäden durch OTA (**Abbildung 4-21**). Eine signifikante Erhöhung des Medians der Tail Längen trat ab einer OTA-Konzentration von 100 nM OTA auf. Der maximale Median-Wert wurde bei 100 μM OTA erreicht und war im Vergleich zur Kontrolle um etwa das 2.5-fache erhöht. Nach Zugabe von S9-Mix zum Kulturmedium waren die Mediane ab einer OTA-Konzentrationen von 1 μM signifikant gegenüber denen ohne S9-Mix Zugabe gestiegen.

Abb. 4-21: Tail Längen in MDCK-Zellen nach 3 Stunden OTA- Inkubation.



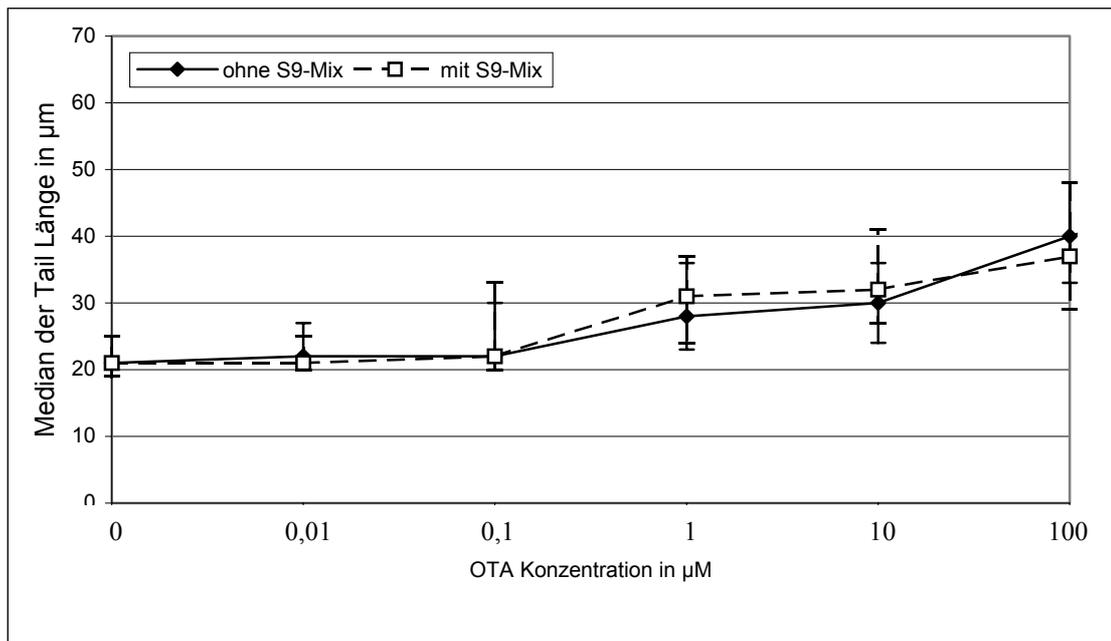
Eine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Schäden durch OTA war ebenfalls in IHKE-Zellen zu verzeichnen (**Abbildung 4-22**). Ab einer OTA-Konzentration von 1 μM kam es zu einem signifikanten Anstieg der Tail Länge. Der Median der Tail Länge stieg bis zu einer OTA-Konzentration von 100 μM um das Doppelte an. Die Zugabe von S9-Mix führte zu einer Abnahme der Tail Längen. Eine signifikante Erhöhung des Medians der Tail Längen war erst bei einer OTA-Konzentration von 10 μM zu erkennen. Die Dosis-Wirkungskurve war in Anwesenheit von S9-Mix parallel zu kleineren Tail Längen hin verschoben.

Abb. 4-22: Tail Längen in IHKE-Zellen nach 3 Stunden OTA- Inkubation.



Die Dosis-Wirkungskurven in 5637-Zellen (**Abbildung 4-23**) mit und ohne S9-Mix verliefen fast deckungsgleich. Ein signifikanter Anstieg der Tail Länge war ab einer OTA-Konzentration von 1 μM zu verzeichnen. Die Mediane der Tail Länge hatten sich bei einer Konzentration von 100 μM etwa verdoppelt.

Abb. 4-23: Tail Längen in 5637-Zellen nach 3 Stunden OTA- Inkubation.



In MDCK-Zellen traten bei der geringsten OTA-Konzentration eine Induktion von DNA-Schäden auf. In IHKE- und 5637-Zellen war ein signifikanter Anstieg des Medians der Tail Länge bei einer 10-fach höheren Konzentration, bei PUBEC erst bei einer 1000-fach höheren OTA-Konzentration im Vergleich zu den MDCK-Zellen erfolgt. Die Zugabe von S9-Mix zum Inkubationsmedium führte in keinem der verwendeten Zelltypen zu einer früheren Induktion von DNA-Schäden. In IHKE-Zellen erfolgte durch den Zusatz von S9-Mix ein Anstieg der Tail Längen erst bei einer 10-fach höheren OTA-Konzentration im Vergleich zum Versuch ohne S9-Mix-Zugabe.

Die Minima der Tail Längen, welche die ungeschädigten Zellkerne der Kontrollen darstellten, liegen für alle verwendeten Zelltypen etwa im gleichen Bereich (**Tabelle 4-2**). Die Maxima der Mediane lagen bei PUBEC, IHKE- und 5637-Zellen etwa doppelt so hoch wie in der Kontrolle, in MDCK-Zellen etwa dreimal höher. Die OTA-Konzentrationen, bei denen der Median der Tail Länge sein Maximum erreichte, lag bei allen verwendeten Zelllinien bei 100 μM . In PUBEC und MDCK-Zellen wurden die

Tail Längen durch die Zugabe von S9-Mix bei hohen OTA-Konzentrationen leicht erhöht, bei IHKE- und 5637-Zellen leicht gesenkt.

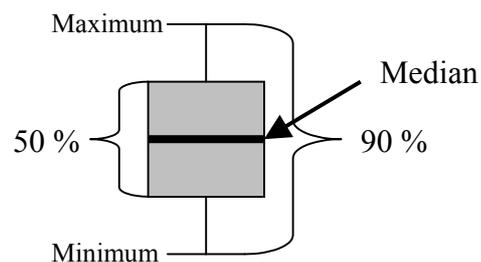
Tab. 4-2: Maxima und Minima der Mediane der Tail Längen bei den verschiedenen Zelltypen, sowie die OTA-Konzentration, bei der ein signifikanter Anstieg der Tail Länge zu beobachten war.

Zelltyp				+ S9-Mix		
	Median der Tail Länge		OTA-Konz.	Median der Tail Länge		OTA-Konz.
	Minimum	Maximum		Minimum	Maximum	
PUBEC	19 µm	36 µm	100 µM **	21 µm	38 µm	100 µM **
MDCK	21 µm	49 µm	0,1 µM **	22 µm	51 µm	0,1 µM **
IHKE	25 µm	52 µm	1 µM *	25 µm	47 µm	1 µM *
5637	21 µm	40 µm	1 µM **	22 µm	38 µm	1 µM **

Signifikanz: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

Unter den Punkten **4.1.2.2.**, **4.1.2.3.** und **4.1.2.4.** sind die ermittelten Daten in Form von Box-Plots dargestellt (**Abbildung 4-24**). Die „Box“ umfasst den Median als das Zentrum der Daten, sowie die 1. und 3. Quartile. Durch die Box werden die mittleren 50 % der Daten repräsentiert. Von der Box ausgehend wird das Minimum (5. Perzentile) und das Maximum (95. Perzentile) der Daten markiert.

Abb. 4-24: Box-Plot



4.1.2.2. Zeitlicher Verlauf der durch OTA induzierten DNA-Schäden

Alle Zelltypen wurden mit 100 μ M OTA bis zu 360 min inkubiert. In einem zweiten Versuch wurden zusätzlich 1,8 mM Cytosiarabinosid (araC) und 10 mM Hydroxyurea (HU) zur Hemmung der DNA-Reparatursynthese zum Inkubationsmedium hinzugegeben.

Die Zeiten, bei denen ein signifikanter Anstieg der Tail Länge erfolgte sind in **Tabelle 4-3** zusammengefasst.

In PUBEC war ein signifikanter Anstieg der Tail Länge nach 120 min zu beobachten. Nach 180 min wurde das Maximum erreicht, danach fielen die Werte wieder bis auf das Niveau der Kontrolle ab (**Abbildung 4-25**). Nach Zugabe von araC/HU war ein signifikanter Anstieg der Tail Länge nach 60 min zu erkennen (**Abbildung 4-26**). Die Tail Längen stiegen stärker an und fielen mit der Zeit auch nicht wieder ab.

Abb. 4-25: Tail Längen in PUBEC nach Inkubation mit 100 μM OTA

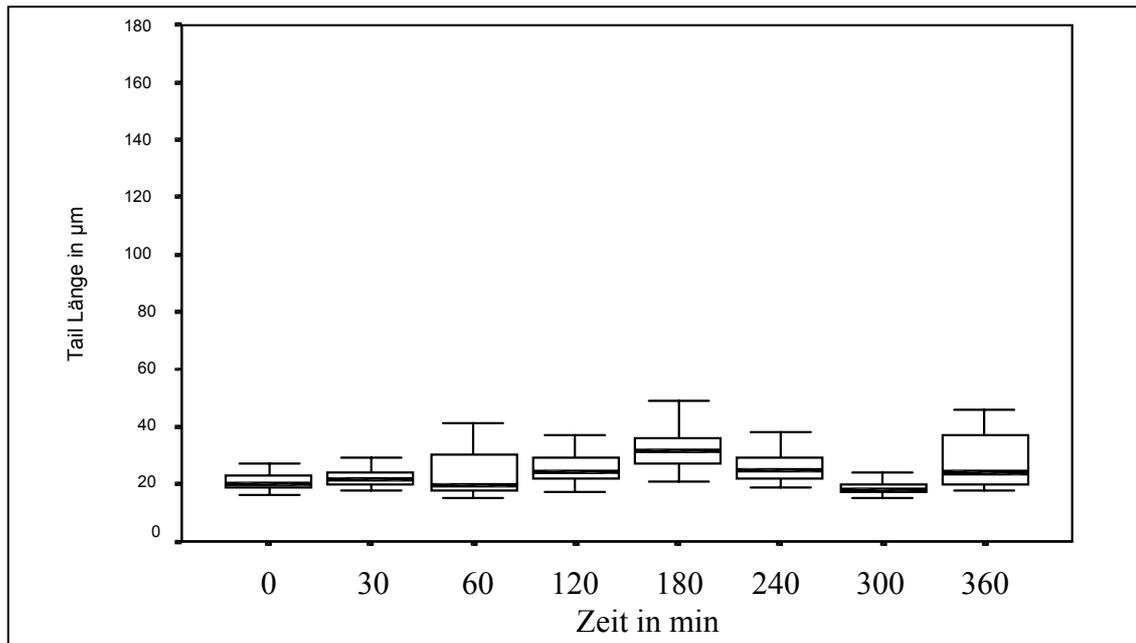
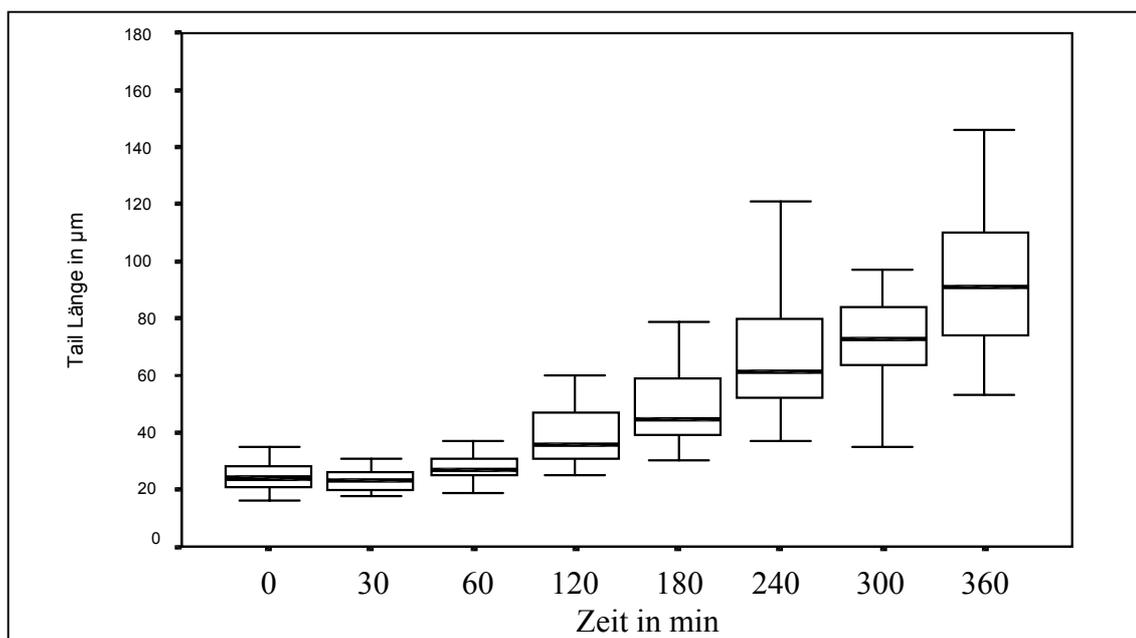


Abb. 4-26: Tail Längen in PUBEC nach Inkubation mit 100 μM OTA in Anwesenheit von araC/HU



In MDCK-Zellen war ein signifikanter Anstieg der Tail Länge nach 30 min zu erkennen (**Abbildung 4-27**). Die Tail Längen stiegen mit der Zeit weiter an und erreichten ihr Maximum nach 240 min. Nach 360 min fielen die Werte auf das Niveau bei 30 min ab. Durch die Zugabe von araC/HU (**Abbildung 4-28**) stiegen die Tail Längen bereits in der Kontrolle signifikant gegenüber der Kontrolle ohne araC/HU-Zusatz an. Die Tail Längen stiegen bis 360 min stetig an, wobei die Werte der Mediane über den Werten lagen, die ohne araC/HU Zugabe gemessen wurden.

Abb. 4-27: Tail Längen in MDCK-Zellen nach Inkubation mit 100 μ M OTA

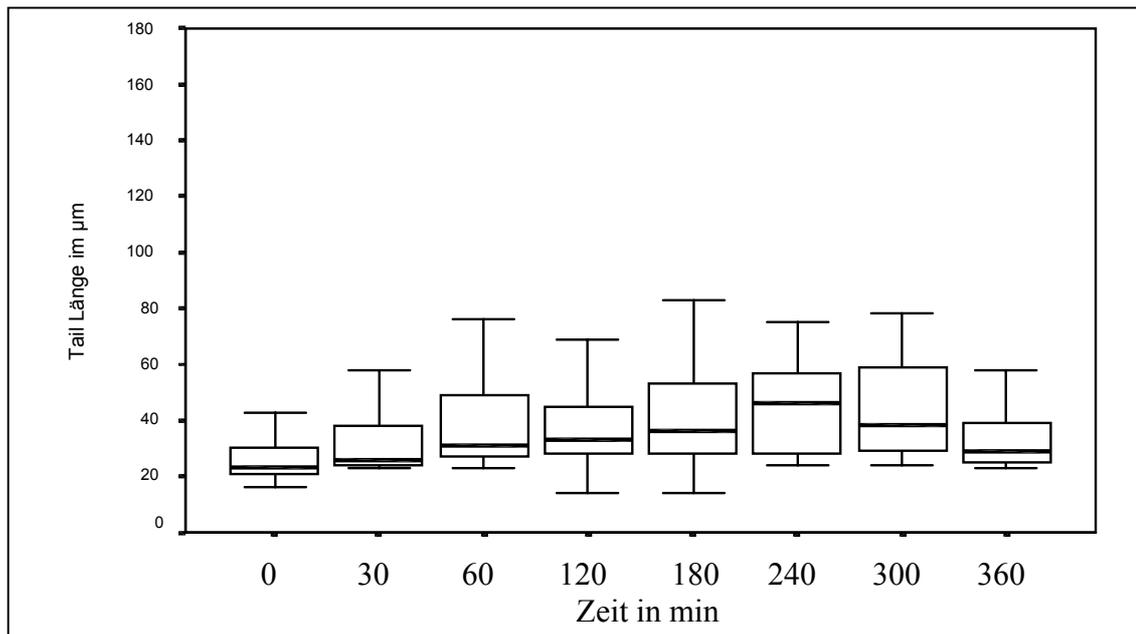
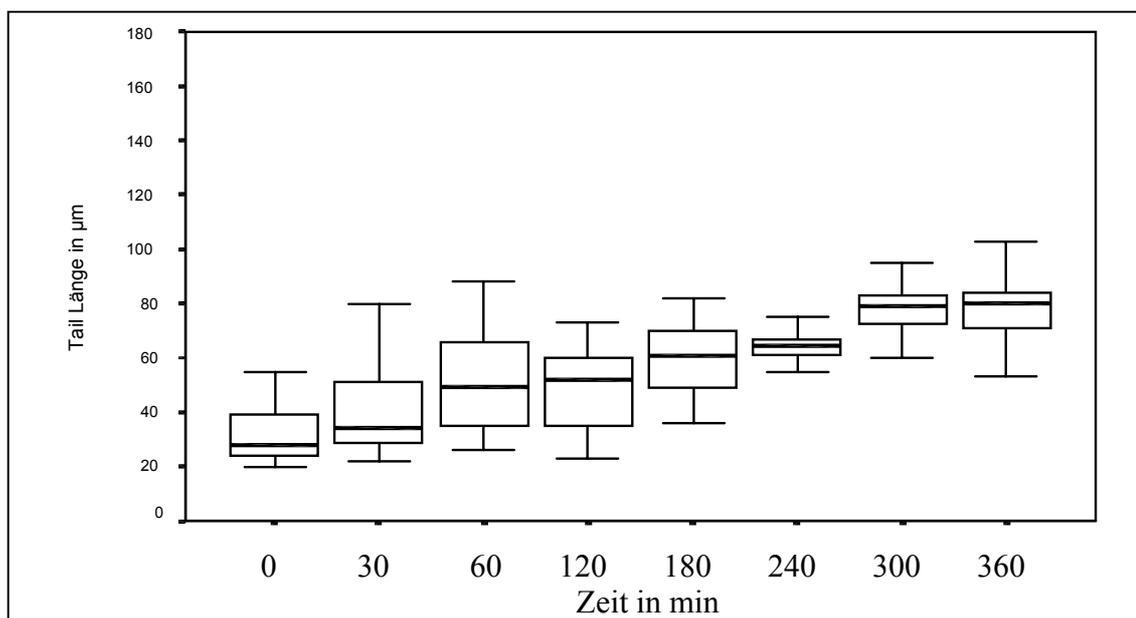


Abb. 4-28: Tail Längen in MDCK-Zellen nach Inkubation mit 100 μ M OTA in Anwesenheit von araC/HU



In IHKE-Zellen begann der signifikante Anstieg des Medians der Tail Länge nach 60 min (**Abbildung 4-29**). Die Tail Längen wurden mit der Zeit stetig größer. Die Werte fielen nicht wieder ab und ein Maximum wurde erst nach 360 min erreicht. Nach Zugabe von araC/HU (**Abbildung 4-30**) wies bereits die Kontrolle erhöhte Tail Längen auf. Ein signifikanter Anstieg der Tail Längen gegenüber der Kontrolle fand nach 60 min statt. Die Tail Längen stiegen stark an und erreichten ihr Maximum nach 240 min. Im Gegensatz zu PUBEC und MDCK-Zellen verringerten sich die Tail Längen nach 240 min wieder.

Abb. 4-29: Tail Längen in IHKE-Zellen nach Inkubation mit 100 μM OTA

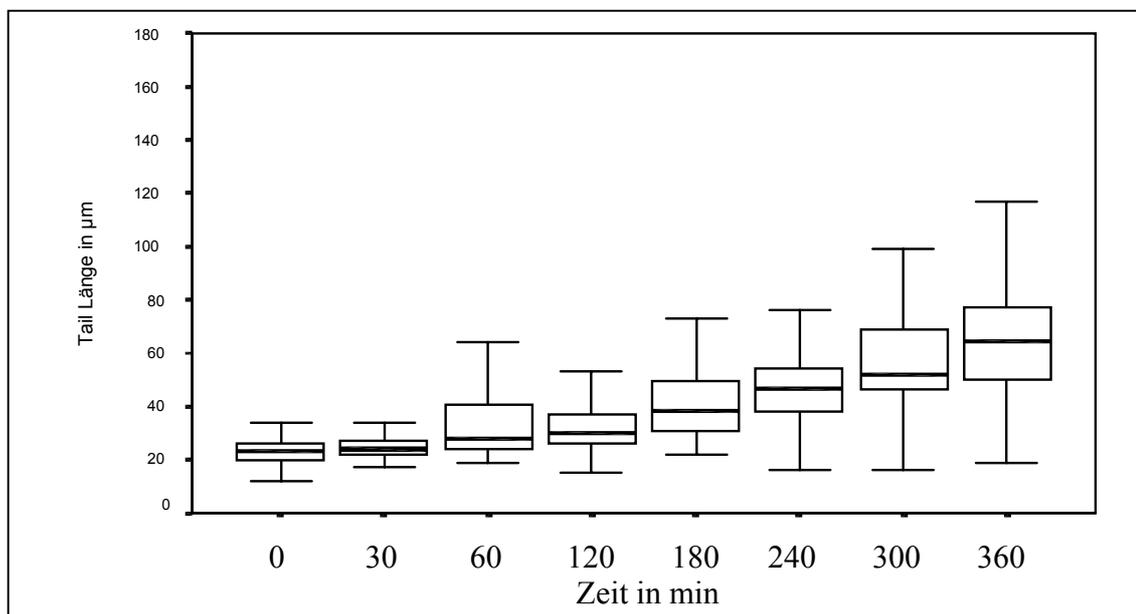
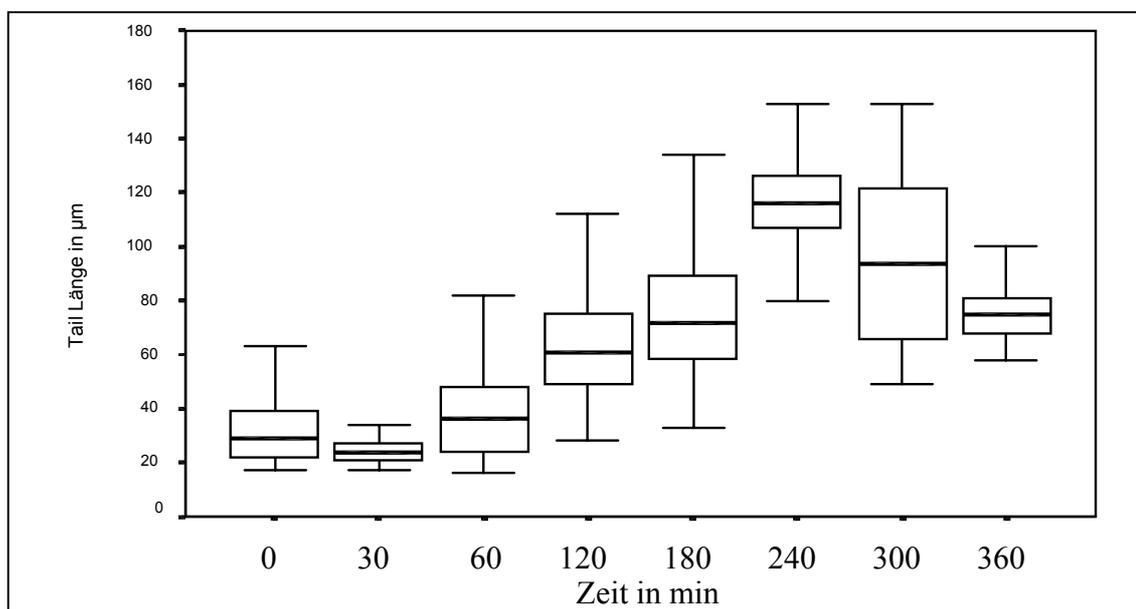


Abb. 4-30: Tail Längen in IHKE-Zellen nach Inkubation mit 100 μM OTA in Anwesenheit von araC/HU



In den 5637-Zellen begann ein signifikanter Anstieg der Tail Längen nach 30 min. Ein Anstieg war bis 180 min zu beobachten, danach stagnierten die Werte (**Abbildung 4-31**). Die Zugabe von araC/HU führte nach 30 min ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg der Tail Längen (**Abbildung 4-32**). Dabei waren die Tail Längen bis 240 min beider Versuche vergleichbar. Unter araC/HU-Zugabe stagnierten die Werte im weiteren Zeitverlauf jedoch nicht, sondern die Tail Längen stiegen weiter an.

Abb. 4-31: Tail Längen in 5637-Zellen nach Inkubation mit 100 μM OTA

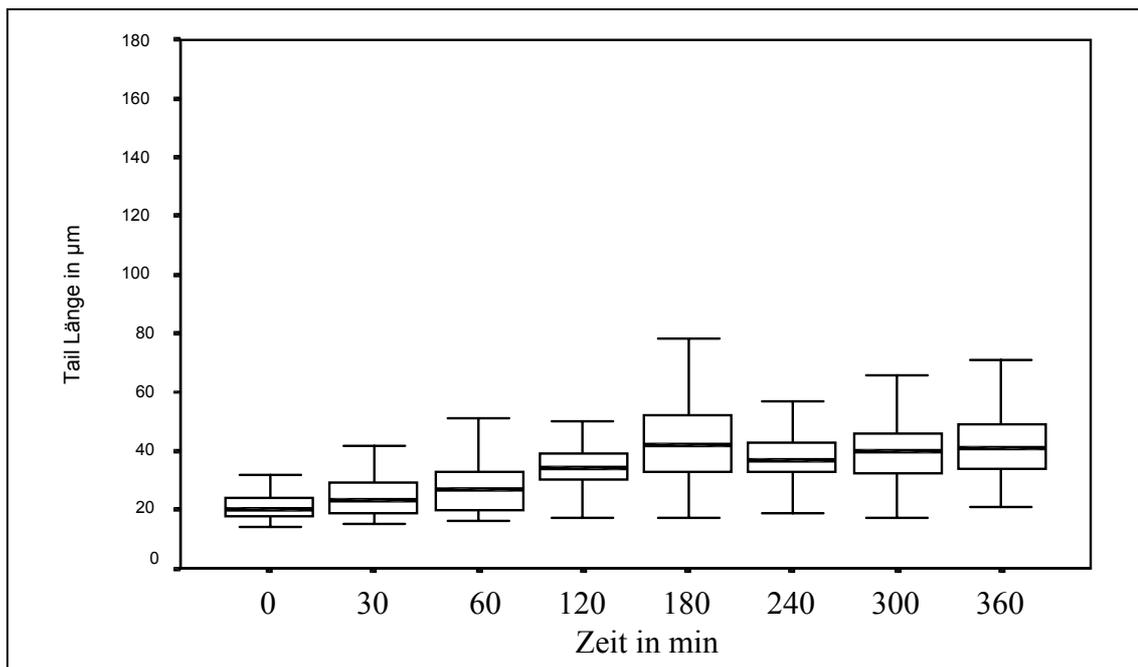
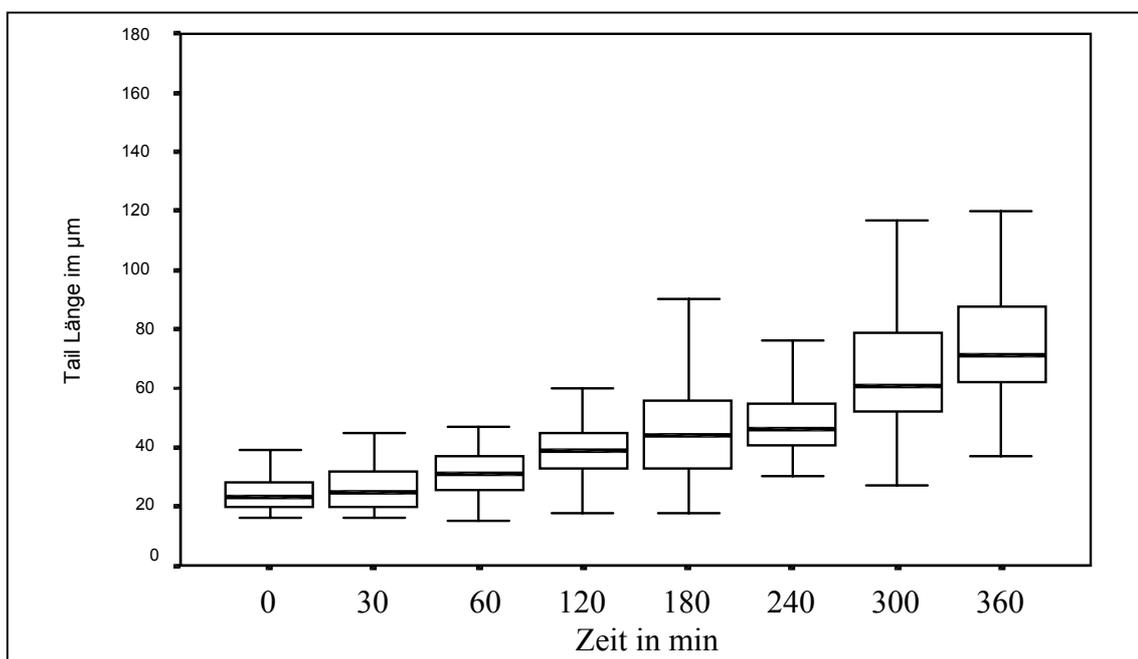


Abb. 4-32: Tail Längen in 5637-Zellen nach Inkubation mit 100 μM OTA in Anwesenheit von araC/HU



Der Einsatz von araC/HU veränderte nur in PUBEC den Zeitpunkt des Tail Längen Anstieges gegenüber der Kontrolle von 120 auf 60 min. In MDCK- und IHKE-Zellen waren durch die Zugabe von araC/HU bereits die Tail Längen in den Kontrollen gegenüber der Kontrolle ohne araC/HU-Zugabe erhöht. Der Zeitpunkt des Median-Maximums wurde, außer in den IHKE-Zellen, zu höheren Inkubationszeiten verschoben. In den IHKE-Zellen lag das Maximum am Versuchsende und wurde durch die Zugabe von araC/HU zu einen früheren Zeitpunkt hin verschoben. Das Maximum der Tail Länge verdreifachte sich in PUBEC durch den Einsatz von araC/HU, in MDCK-, IHKE- und 5637-Zellen wurde das Maximum der Tail Länge etwa verdoppelte.

Tab 4-3: Maxima der Mediane der Tail Längen bei den verschiedenen Zelltypen, sowie der Zeitpunkt, bei dem ein signifikanter Anstieg der Tail Länge zu beobachten war.

Zelltyp	Tail Länge	Zeit.	Tail Länge	Zeit.
			mit araC/HU	
PUBEC	32 µm	120 min **	87 µm	60 min **
MDCK	46 µm	30 min **	80 µm	30 min **
IHKE	65 µm	60 min **	116 µm	60 min **
5637	40 µm	30 min **	72 µm	30 min **

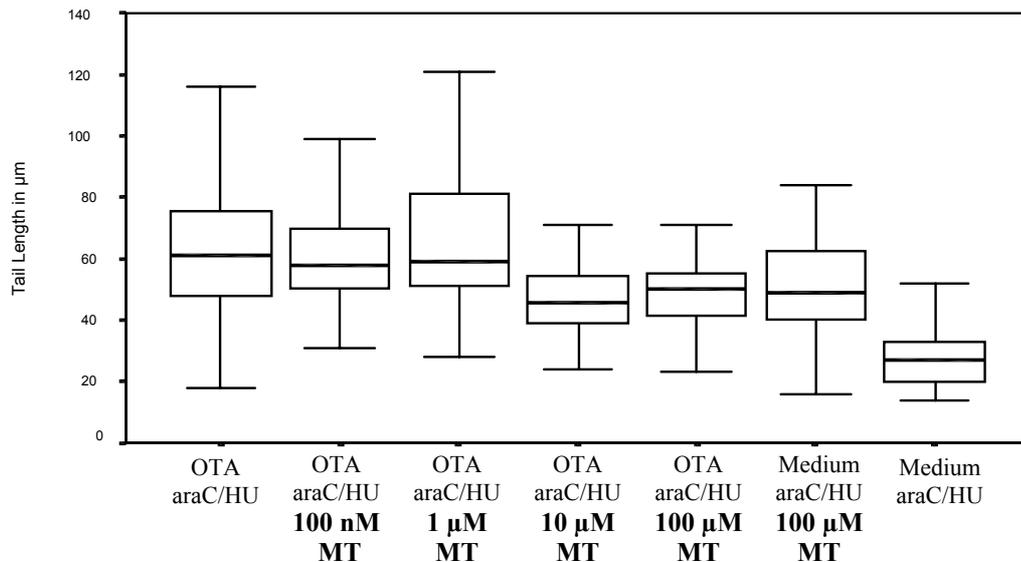
Signifikanz: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

4.1.2.3. Co-Inkubation mit Methotrexat

Um den Einfluss einer Hemmung der OTA-Aufnahme in die Zellen zu testen wurde dem Inkubationsmedium Methotrexat (MT) zugesetzt. PUBEC, MDCK-, und 5637-Zellen wurden für 3 h mit 100 µM OTA, 1,8 mM araC und 10 mM HU, IHKE-Zellen ohne araC/HU inkubiert. Zusätzlich wurde MT von 100 nM bis 100 µM zum Inkubationsmedium gegeben. Als Kontrollen dienten 3-stündige Inkubationen mit 100 µM OTA und araC/HU, eine Mediumkontrolle mit araC/HU und eine Mediumkontrolle mit araC/HU und 100 µM MT. Für IHKE-Zellen wurden diese Ansätze ohne araC/HU durchgeführt.

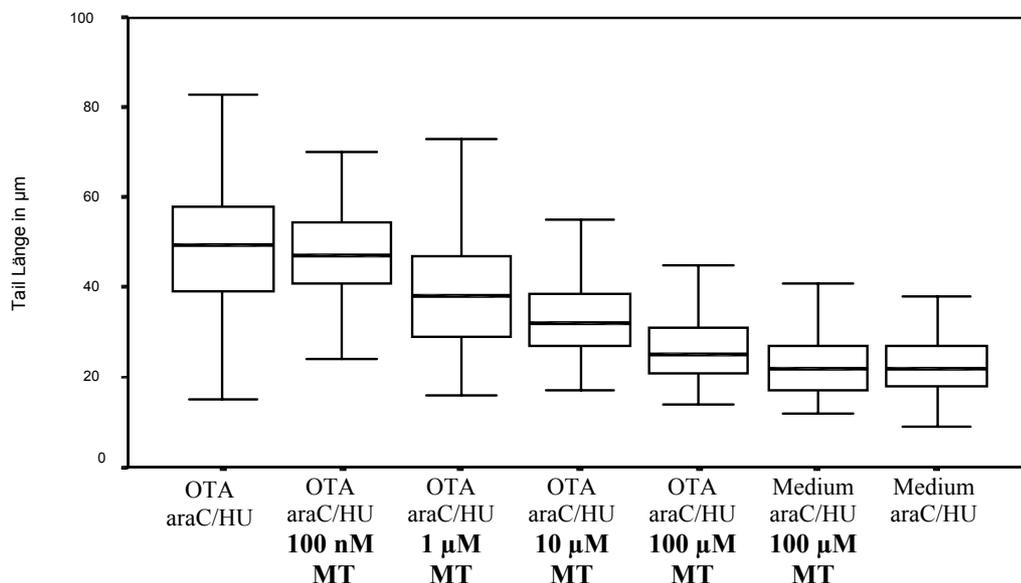
In PUBEC wurde der Median der Tail Längen, im Vergleich zur OTA-Kontrolle, bei einer Co-Inkubation von 10 μM MT um etwa die Hälfte reduziert (**Abbildung 4-33**). Die Inkubation mit 100 μM MT bewirkte einen Anstieg der Tail Längen, sowohl mit als auch ohne OTA. In dieser Konzentration wirkte MT selbst genotoxisch.

Abb. 4-33: Tail Längen in PUBEC nach 3 h Inkubation mit 100 μM OTA, araC/HU und Methotrexat.



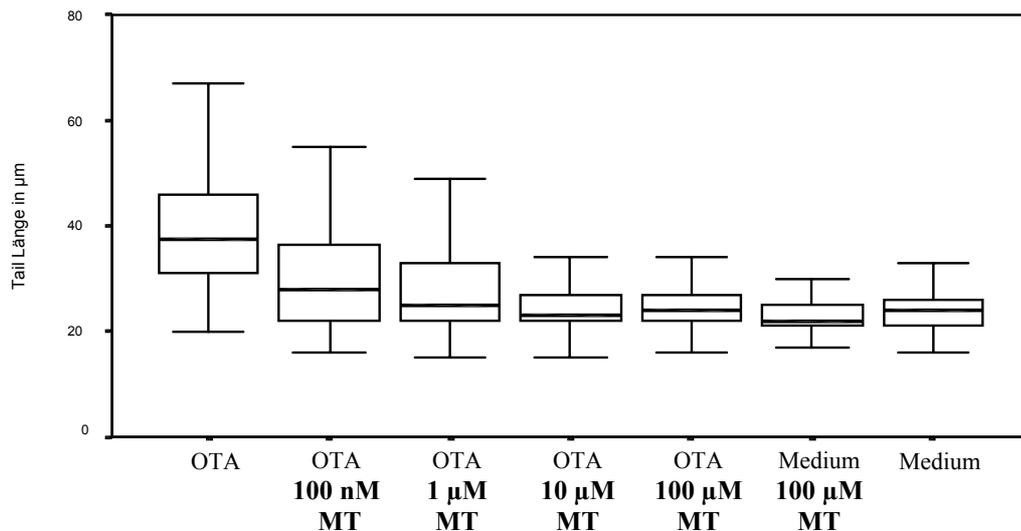
MDCK-Zellen zeigten mit zunehmender MT-Konzentration eine Abnahme der Tail Längen. Der Median der Tail Länge ging bei einer Co-Inkubation mit 100 μM MT um 90 % zurück. MT selbst hatte keinen Einfluss auf die Tail Länge (**Abbildung 4-34**).

Abb. 4-34: Tail Längen in MDCK-Zellen nach 3 h Inkubation mit 100 μM OTA, araC/HU und Methotrexat.



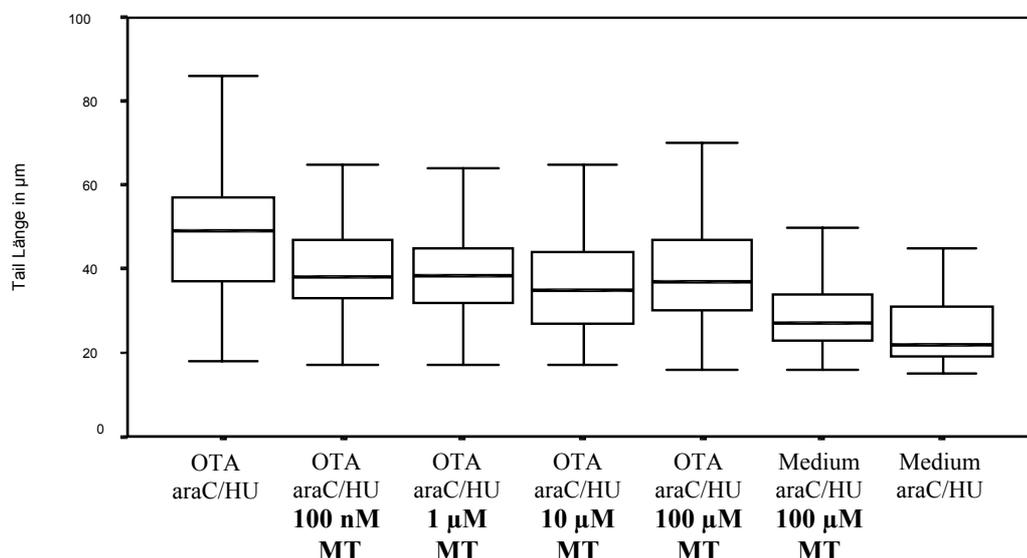
In IHKE-Zellen, die ohne araC/HU inkubiert wurden, da dies zytotoxisch wirkte, zeigte sich eine vollständige Reduktion des Medians der Tail Längen bei einer Co-Inkubation mit 10 μM MT. Die alleinige Zugabe von MT zum Kontrollmedium führte zu keiner Erhöhung der Tail Länge. (**Abbildung 4-35**)

Abb. 4-35: Tail Längen in IHKE-Zellen nach 3 h Inkubation mit 100 μM OTA, araC/HU und Methotrexat.



Eine Co-Inkubation mit MT führte in 5637-Zellen bei allen Konzentrationen zu einer Reduktion der Tail Längen (**Abbildung 4-36**). Die größte Verringerung des Medians der Tail Länge, um etwa die Hälfte, erfolgte bei einer MT-Konzentration von 10 μM . Eine Co-Inkubation mit 100 μM MT wiederum hatte eine Erhöhung der Tail Länge zur Folge. Ebenso stieg die Tail Länge der Mediumkontrolle mit MT gegenüber der Mediumkontrolle ohne MT signifikant an.

Abb. 4-36: 5637-Zellen 3 Stunden mit 100 μM OTA und MT inkubiert.

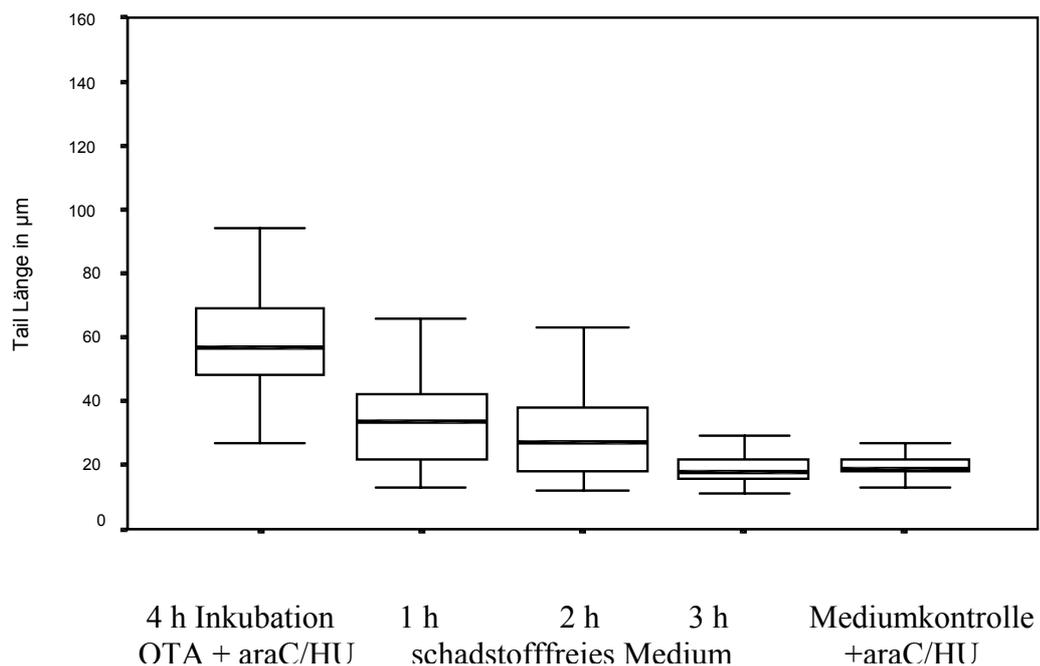


4.1.2.4. DNA-Reparatur/Erholung

Um das Potential zur Reparatur von DNA-Schäden in den verschiedene Zelltypen zu testen, wurden alle Zellen für 4 h mit 100 μM OTA und araC/HU inkubiert und anschließend für 1 h bis 3 h in schadstofffreiem Medium kultiviert. IHKE-Zellen wurden nach nur 2-stündiger OTA-Inkubation mit schadstofffreiem Medium weiterkultiviert, da nach einer 4-stündige OTA-Inkubation alle Zellen abgestorben waren.

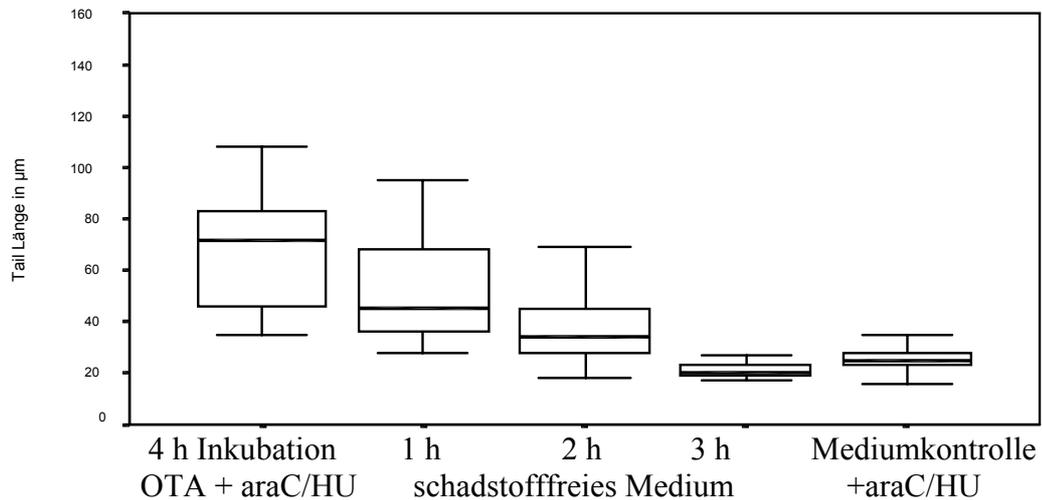
In PUBEC nahm der Median der Tail Länge mit zunehmender Kulturdauer in schadstofffreiem Medium ab. Nach 3 h waren keine DNA-Schäden mehr zu beobachten. Der Median der Tail Länge erreichte das Niveau der Medienkontrolle (Abbildung 4-37).

Abb. 4-37: Regeneration von PUBEC nach 4-stündiger Inkubation mit 100 μM OTA und araC/HU.



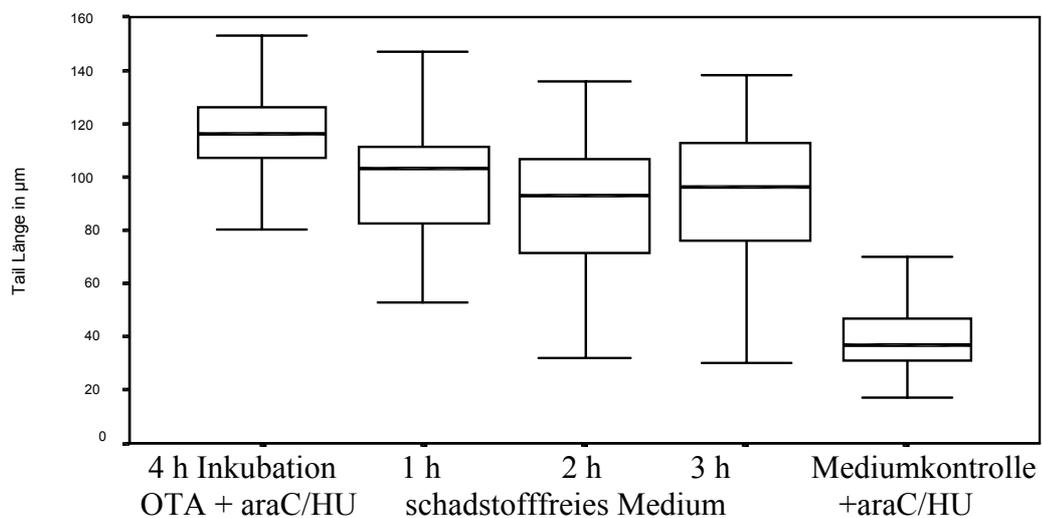
In MDCK-Zellen fiel der Median der Tail Länge nach 2 Stunden Kultivierung in schadstofffreiem Medium fast auf das Niveau der Mediumkontrolle (**Abbildung 4-38**). Nach 3 h lag der Median unter dem der Mediumkontrolle.

Abb. 4-38: MDCK-Zellen wurden 4 h mit 100 μ M OTA und araC/HU und anschließend für 1 bis 3 Stunden mit schadstofffreiem Medium inkubiert.



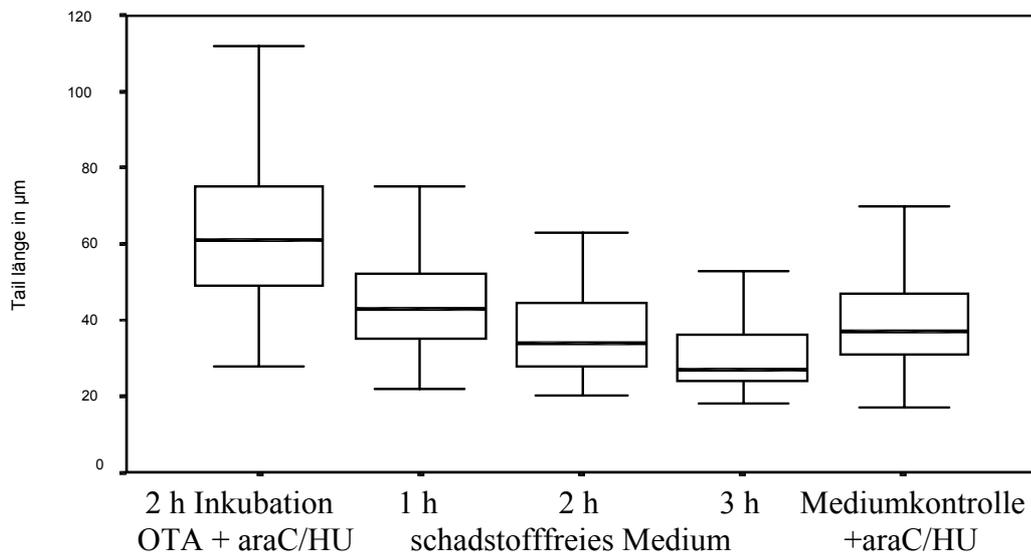
In IHKE-Zellen sanken die Werte der Tail Längen nach einer 4-stündiger OTA-Inkubation nur geringfügig ab und waren auch nach 3 h Kultivierung in schadstofffreiem Medium nicht signifikant gesunken (**Abbildung 4-39**).

Abb. 4-39: IHKE-Zellen wurden 4 Stunden mit 100 μ M OTA und araC/HU und anschließend für 1 bis 3 Stunden mit schadstofffreiem Medium inkubiert.



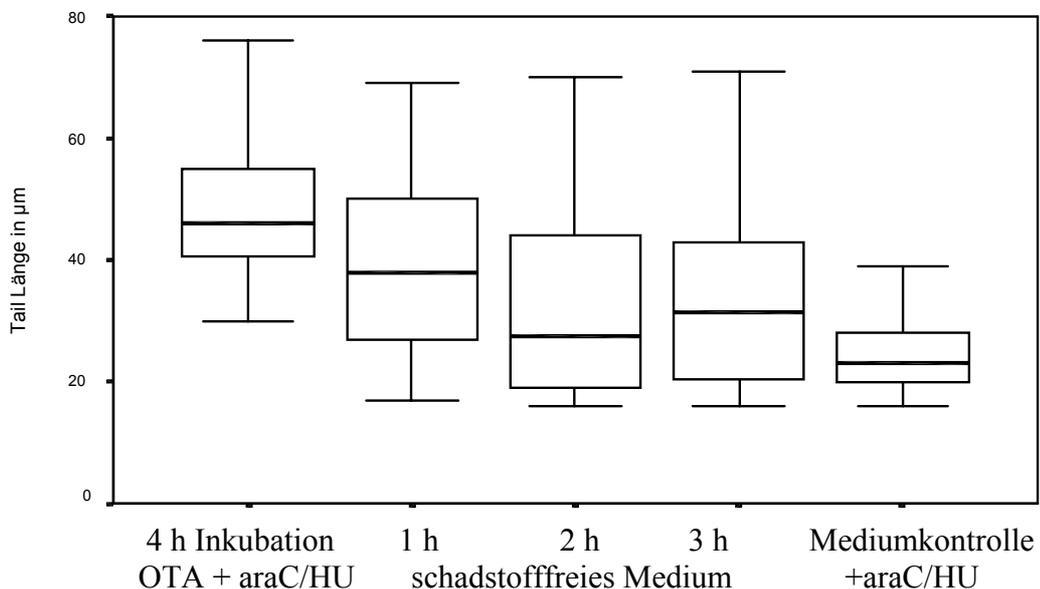
Nach einer 2-stündiger Inkubation mit 100 μM OTA und araC/HU sanken die Werte der Tail Längen nach einer Kultivierung von 2 h in schadstofffreiem Medium auf das Niveau der Medienkontrolle zurück (**Abbildung 4-40**).

Abb. 4-40: IHKE-Zellen wurden 2 Stunden mit 100 μM OTA und araC/HU und anschließend für 1 bis 3 Stunden mit schadstofffreiem Medium inkubiert.



In 5637-Zellen sanken die Mediane der Tail Längen nach Inkubation in schadstofffreiem Medium (**Abbildung 4-41**). Nach 3 h waren die Tail Längen jedoch nicht auf das Niveau der Kontrolle gesunken.

Abb. 4-41: 5637-Zellen wurden 4 Stunden mit 100 μM OTA und araC/HU und anschließend für 1 bis 3 Stunden mit schadstofffreiem Medium inkubiert.

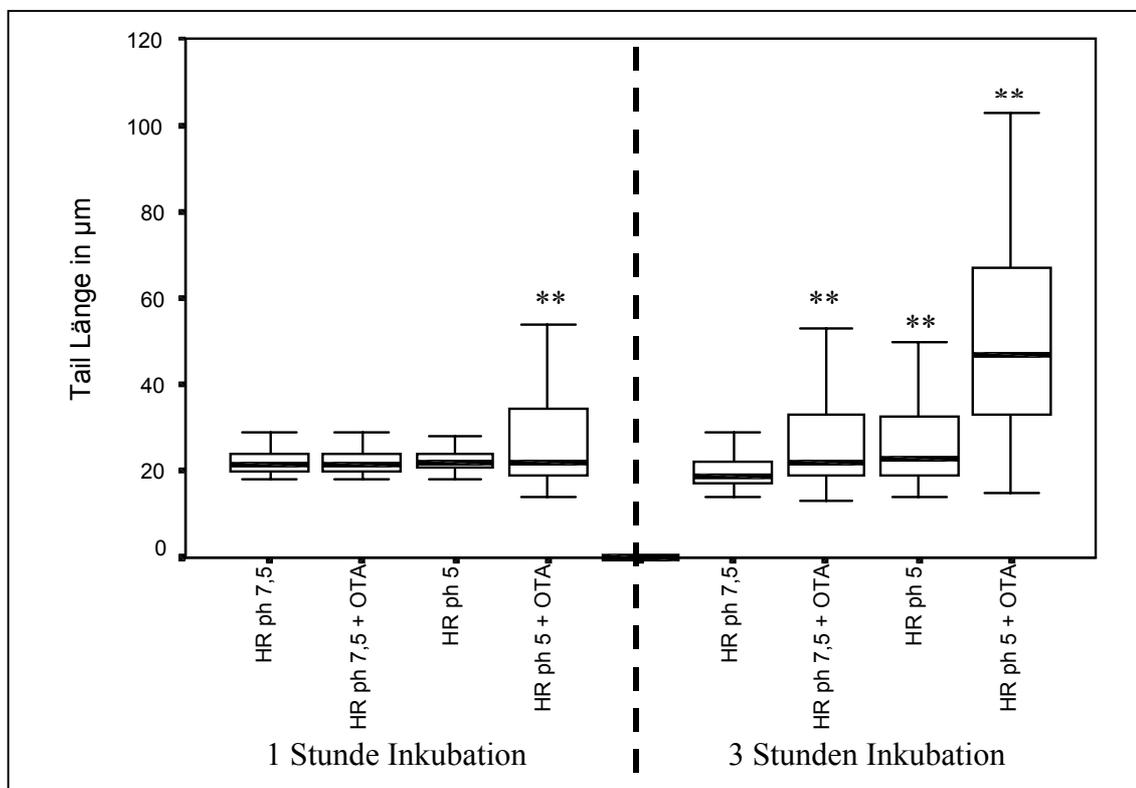


4.1.2.5. Inkubation mit OTA unter physiologischen und sauren pH-Bedingungen in HEPES-Ringer-Puffer

Um den Einfluss verschiedener pH-Bedingungen zu testen wurde der Comet Assay unter neutralen (pH 7,5) und unter sauren pH-Bedingungen (pH 5) durchgeführt (Abbildung 4-42 bis 4-45). Dazu wurden die Zellen für 1 h und 3 h inkubiert. Im Inkubationsmedium HEPES-Ringer-Puffer (HR) wurden die Zellen unter beiden pH-Bedingungen jeweils mit und ohne 100 μ M OTA inkubiert.

Die Inkubation mit HR ohne OTA-Zusatz unter neutralen Bedingungen führte in PUBEC (Abbildung 4-42) zu keiner Erhöhung der Tail Längen. Nach Zugabe von 100 μ M OTA konnte ein signifikanter Anstieg der Tail Längen nach 3 h beobachtet werden. Wurden PUBEC im saurem HR inkubiert, kam es auch ohne OTA-Zugabe zu einer signifikanten Erhöhung der Tail Längen nach 3 h. Bei der Inkubation in saurem HR mit 100 μ M OTA war ein signifikanter Anstieg der Tail Längen bereits nach 1 h zu beobachten. Nach 3 h Inkubation war das Ausmaß der DNA-Schäden weiter angewachsen und stieg etwa auf das 2,5-fache der HR-Kontrolle.

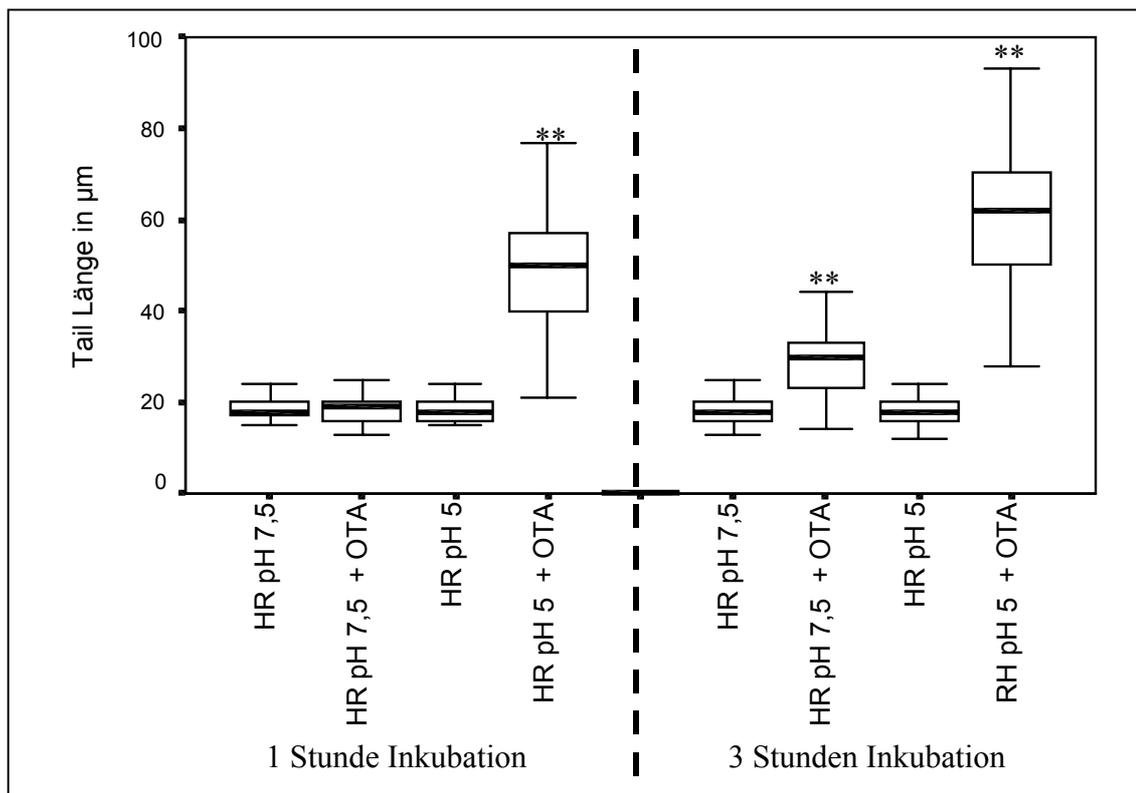
Abb. 4-42: Inkubation von PUBEC mit OTA in Heps-Ringer-Puffer.



Signifikanz gegenüber HR pH 7,5: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

In MDCK-Zellen wurden unter den unterschiedlichen pH-Bedingungen ohne OTA-Zusatz keine DNA-Schäden induziert. Erste DNA-Schäden traten in saurem pH nach 1 h Inkubation mit OTA auf. Der Median der Tail Länge stieg auf etwa das 2,5-fache an. Nach 3-stündiger Inkubation mit OTA wurden DNA-Schäden unter beiden pH-Bedingungen induziert. Der Median der Tail Länge stieg bei neutralem pH auf etwa das 1,5-fache, unter saurem pH auf etwa das 3-fache.

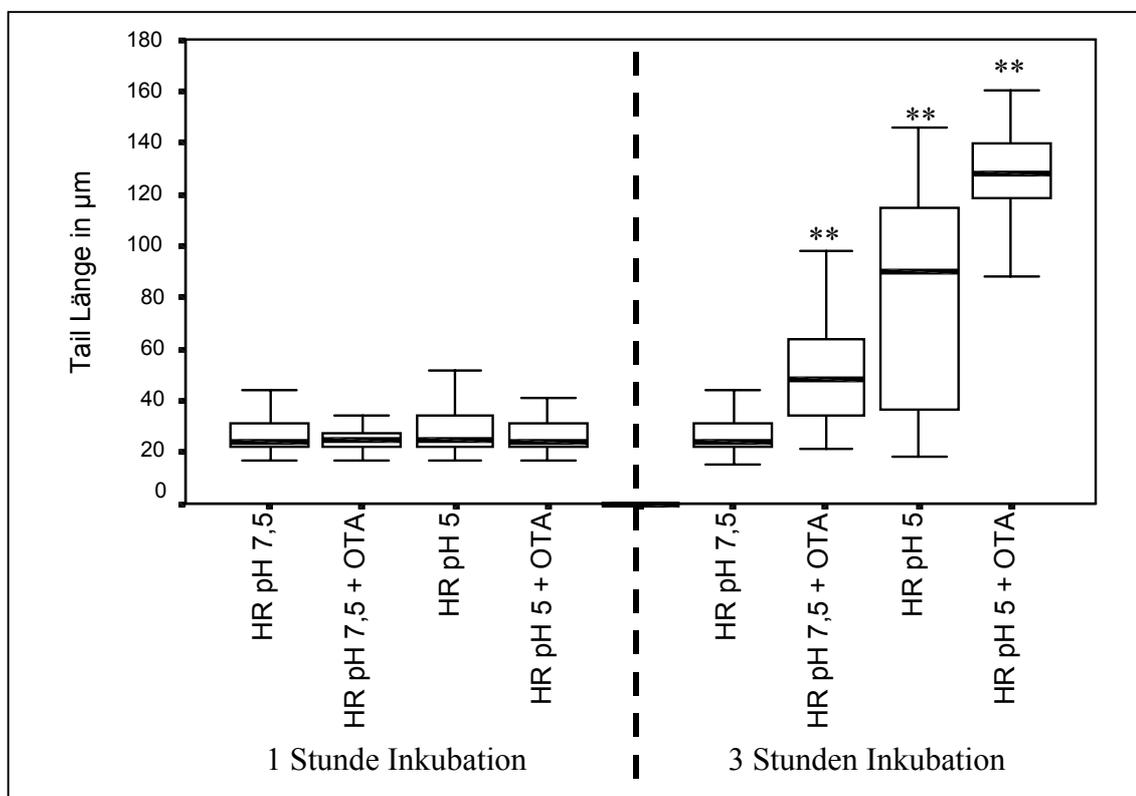
Abb. 4-43: Inkubation von MDCK-Zellen mit OTA in Hepes-Ringer-Puffer.



Signifikanz gegenüber HR pH 7,5: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

In IHKE-Zellen war nach einer Inkubationszeit von 1 h mit OTA weder unter neutralen noch unter sauren pH-Bedingungen eine Induktion von DNA-Schäden zu verzeichnen. Nach 3-stündiger Inkubation wurden nur in IHKE-Zellen, die mit neutralem HR ohne OTA inkubiert wurden, keine DNA-Schäden induziert. Nach einer 3-stündigen Inkubation in neutralem HR und OTA verdoppelte sich der Median der Tail Länge. Unter sauren Bedingungen wurden DNA-Schäden größeren Ausmaßes sowohl bei der Inkubation mit und ohne OTA induziert. In saurem HR ohne OTA stieg der Median der Tail Länge etwa auf das 4,5-fache. Bei der zusätzlichen Inkubation mit OTA war der Median der Tail Länge nach 3 h auf das 6,5-fache gestiegen.

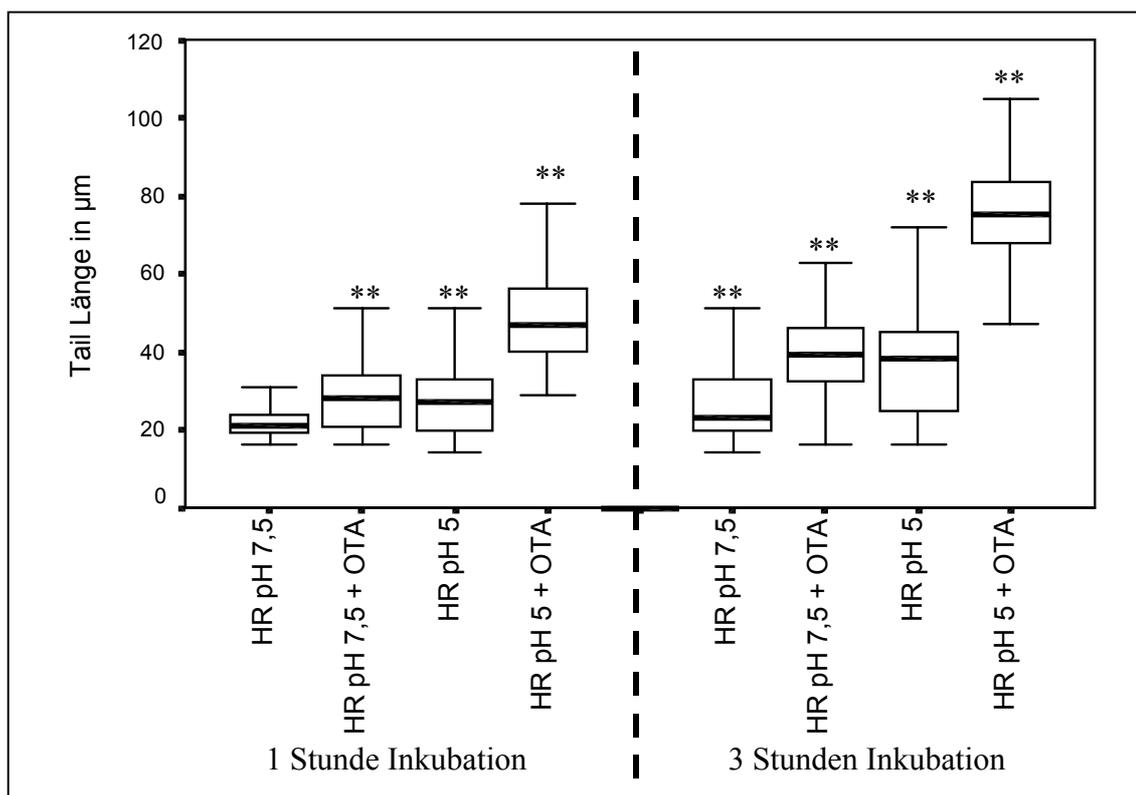
Abb. 4-44: Inkubation von IHKE-Zellen mit OTA in Hepes-Ringer-Puffer.



Signifikanz gegenüber HR pH 7,5: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

In 5637-Zellen war unter neutralen pH-Bedingungen nach 1 h ein Anstieg des Medians der Tail Länge bei der Inkubation mit OTA um das 1,5-fache zu erkennen. Unter neutralen Bedingungen ohne OTA konnten keine DNA-Schäden beobachtet werden. Nach 3 h unter sauren pH-Bedingungen trat ein signifikanter Anstieg der Tail Länge ein. Nach Zugabe von OTA stiegen die DNA-Schäden weiter an. Der Median der Tail Länge verdoppelte sich. Unter sauren pH-Bedingungen ohne OTA wurden DNA-Schäden bereits nach 1 h verursacht. Der Median der Tail Länge stieg um das 1,5-fache. Unter sauren Bedingungen mit OTA stieg der Median der Tail Länge nach 1 h bereits auf das 2,5-fache. Nach 3 h Inkubation verdoppelte sich der Median der Tail Länge. Bei der Inkubation mit OTA war ein deutlicher Anstieg der Tail Längen zu erkennen. Der Median der Tail Länge stieg auf das 4-fache.

Abb. 4-45: Inkubation von 5637-Zellen mit OTA in HEPES-Ringer-Puffer.



Signifikanz gegenüber HR pH 7,5: * $0,001 < p < 0,0125$, ** $p < 0,001$ (Mann-Whitney-U-Test)

4.1.3. Aufnahme von [³H]-OTA

Mit Hilfe von radioaktiv markiertem OTA wurde untersucht, wie schnell und in welchem Ausmaß [³H]-OTA von den verschiedenen Zelltypen aufgenommen werden kann. Die Inkubation erfolgte dabei in HR bei saurem und neutralem pH. Ein pH-Wert von 7,5 repräsentierte die Bedingungen in der Zellkultur, der pH-Wert von 5 die sauren Bedingungen im Nierentubulus.

Unter neutralen pH-Bedingungen stieg der [³H]-OTA-Gehalt über einen Zeitraum von 180 min in allen Zellentypen an. Die intrazelluläre Radioaktivität stieg in PUBEC und 5637-Zellen auf etwa 2,5 pmol OTA /mg Zellprotein an (**Abbildung 4-46**), während die Aufnahme in MDCK- und IHKE-Zellen unter neutralen pH-Bedingungen geringer war (MDCK-Zellen 0,75 pmol OTA / mg Zellprotein, IHKE-Zellen 1 pmol OTA /mg Zellprotein) (**Abbildung 4-47**).

Die Aufnahme von OTA erfolgte bei allen Zelltypen zum größten Teil in den ersten 60 min (**Tabelle 4-4**).

Unter sauren pH-Bedingungen wurde von PUBEC, MDCK- und IHKE-Zellen mehr OTA aufgenommen als unter neutralen pH-Bedingungen. 5637-Zellen nahmen unter beiden pH-Bedingungen etwa gleich viel OTA auf. In PUBEC war der Anstieg mit bis zu 10,13 pmol OTA /mg Zellprotein nach 180 min fast doppelt so hoch wie in MDCK-Zellen mit etwa 5,25 pmol OTA /mg Zellprotein. Dabei wurde in PUBEC 2/3 der Radioaktivität und in MDCK-Zellen 95 % der Radioaktivität in den ersten 60 min aufgenommen. In IHKE-Zellen war bis 15 min ein Anstieg der Radioaktivität vergleichbar mit dem in PUBEC und MDCK-Zellen zu beobachten. Die Menge des aufgenommenen OTA stieg bis auf etwa 3,75 pmol OTA /mg Zellprotein an, und sank danach auf 2,28 pmol OTA /mg Zellprotein (**Abbildung 4-47**). In 5637-Zellen war nach 15 min kein Anstieg der Radioaktivität mehr zu beobachten.

Tab. 4-4: Ergebnisse der [³H]-OTA Aufnahme bei sauren und physiologischen pH-Bedingungen.

Zelltyp	pH-Wert	OTA [pmol] / mg Zellprotein			
		30 sec	15 min	60 min	180 min
PUBEC	5	2,54 ± 0,51	3,98 ± 1,5	7,91 ± 1,62	10,13 ± 1,68
	7,5	0,61 ± 0,05	1,91 ± 0,54	2,51 ± 0,25	2,5 ± 0,15
MDCK	5	0,74 ± 0,11	3,88 ± 0,93	5,08 ± 1,12	5,25 ± 1,55
	7,5	0,28 ± 0,05	0,47 ± 0,04	0,52 ± 0,05	0,75 ± 0,03
IHKE	5	0,75 ± 0,15	3,75 ± 1,08	2,5 ± 1,58	2,28 ± 1,13
	7,5	0,3 ± 0,08	0,32 ± 0,08	0,79 ± 0,3	1,0 ± 0,36
5637	5	0,99 ± 0,3	2,56 ± 0,93	1,63 ± 0,31	2,51 ± 0,85
	7,5	0,96 ± 0,3	3,0 ± 1,46	2,25 ± 0,68	2,49 ± 0,81

Abb. 4-46: Anstieg der Radioaktivität in PUBEC und 5637-Zellen.

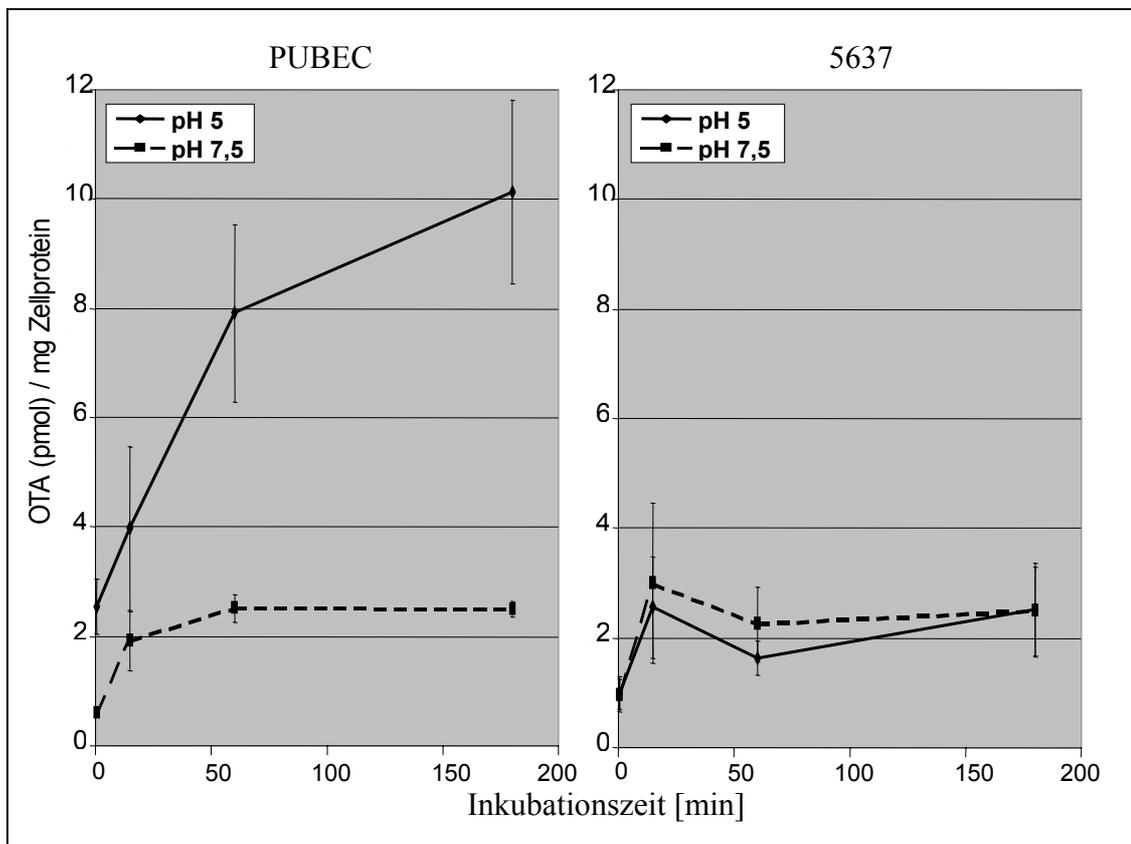
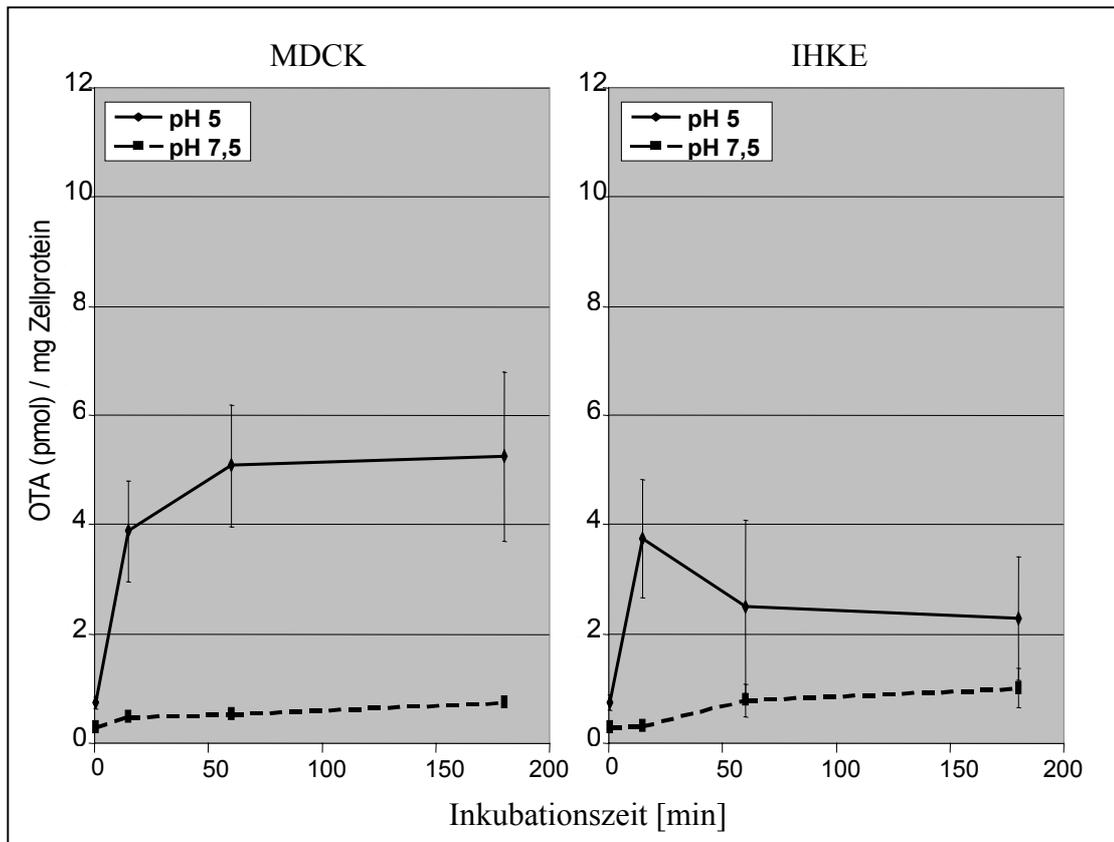


Abb. 4-47: Anstieg der Radioaktivität in MDCK- und IHKE-Zellen.

4.2. Humane Harnleiter

4.2.1. Comet Assay mit humanen Urothelzellen

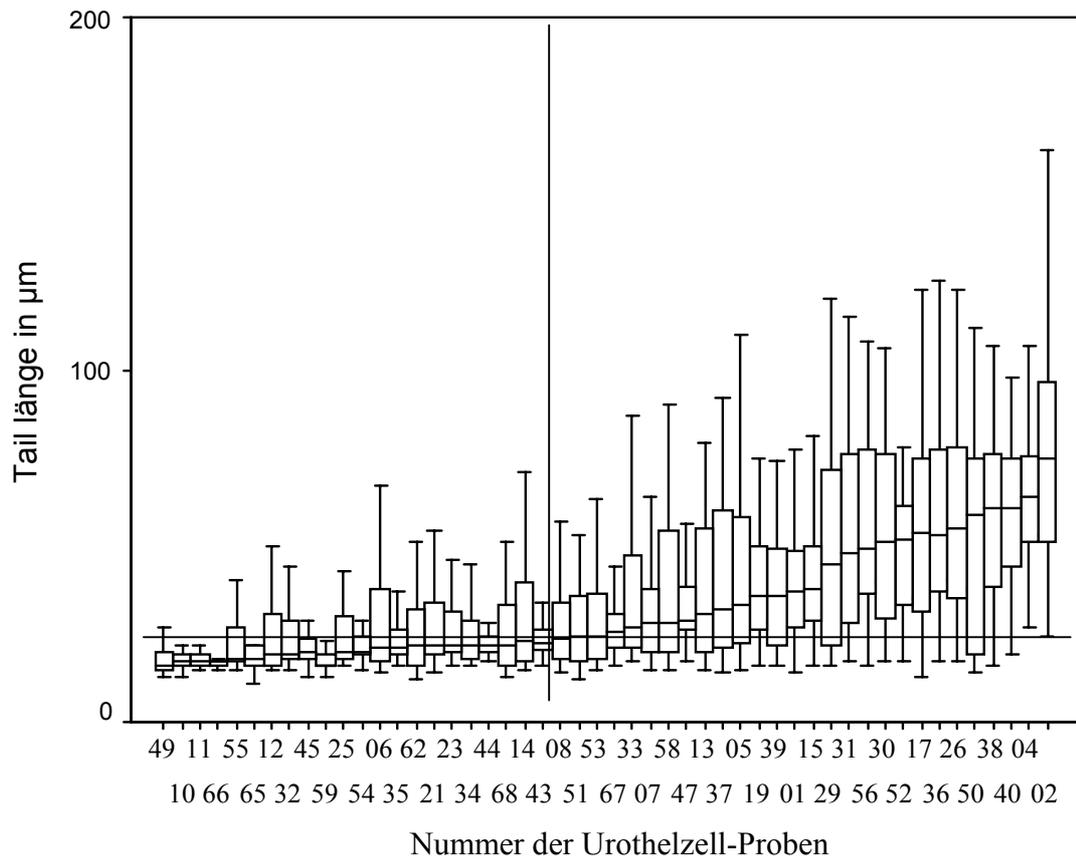
Für die Prüfung der genotoxischen Wirkung von OTA auf humane Urothelzellen des Harnleiters wurde der Comet Assay eingesetzt. Die Zellen wurden für 3 h mit 100 μM OTA inkubiert (**Abbildung 4-48**). Als Negativkontrolle dienten nur mit Kulturmedium inkubierte Zellen (**Abbildung 4-49**) und für die Positivkontrolle wurde 100 μM Kaliumdichromat (KDI) (**Abbildung 4-50**) eingesetzt. Als Parameter für das Ausmaß der DNA-Schäden wurden die Tail Längen bestimmt und 100 Zellkerne pro Konzentration ausgewertet. Die ermittelten Daten sind in Form von Box-Plots dargestellt.

Die mit OTA behandelten Proben wurden in zwei Schadensklassen eingeteilt: a) Proben humaner Urothelzellen, die nach OTA-Inkubation DNA-Schäden aufwiesen und b) Proben, die keine DNA-Schäden zeigen. Um als geschädigte Probe eingestuft zu werden mussten folgenden Kriterien erfüllt werden: Der Median der Tail Längen muss über dem Mittelwert der Mediane der Mediumkontrolle plus Standardabweichung liegen und zugleich musste die Differenz des Medians im Vergleich zur Mediumkontrolle $\geq 5 \mu\text{m}$ sein.

4.2.1.1. OTA Inkubation

Bei der Ausprägung von DNA-Schäden in humanen Urothelzellkulturen zeigten sich große interindividuelle Unterschiede (**Abbildung 4-48**). Es wurden 23 Proben als „ungeschädigt“ und 27 Proben als „geschädigt“ eingestuft.

Abb. 4-48: Boxplots der mit OTA inkubierten Urothelzellen (nach dem Median sortiert).



4.2.1.2. Medium- und Positivkontrolle

Der Mittelwert der Mediane der Mediumkontrolle (MK) betrug $20 \pm 3 \mu\text{m}$. Dabei wiesen drei Zellkulturen, die nach OTA-Inkubation stark erhöhte Tail Längen aufwiesen, z.T. bereits leicht erhöhte Tail Längen in der Mediumkontrolle auf (**Abbildung 4-49**). In der Positivkontrolle (PK), die aus Mangel an Zellen nicht für alle Proben durchgeführt werden konnte, zeigten sich große Schwankungen in der Ausprägung der Tail Längen (**Abbildung 4-50**). Der Median der Tail Längen lag aber in allen Fällen um ein Vielfaches über dem Median der MK.

Abb. 4-49: Boxplots der MK in gleicher Reihenfolge aufgetragen wie bei den OTA-inkubierten Proben.

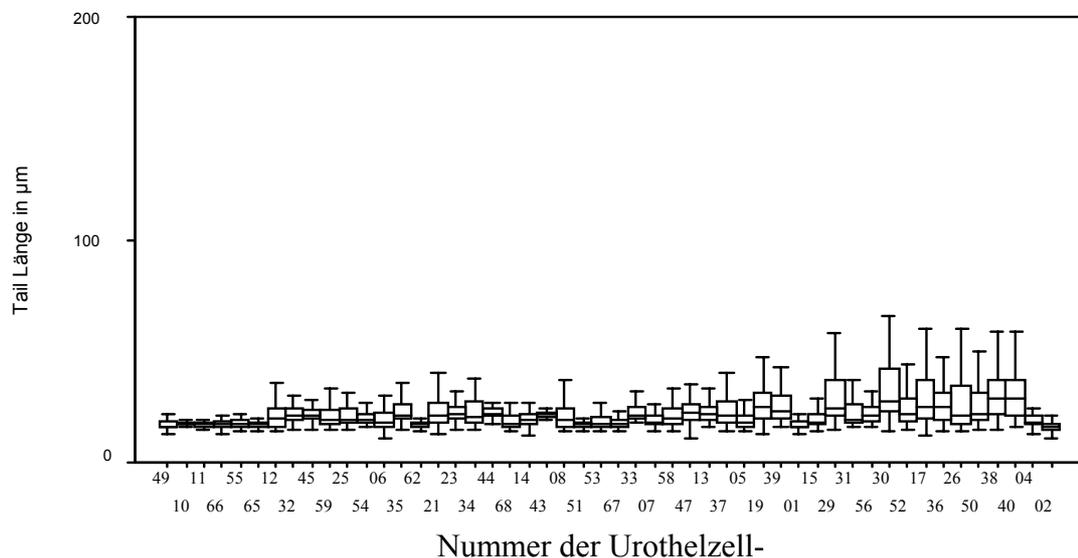
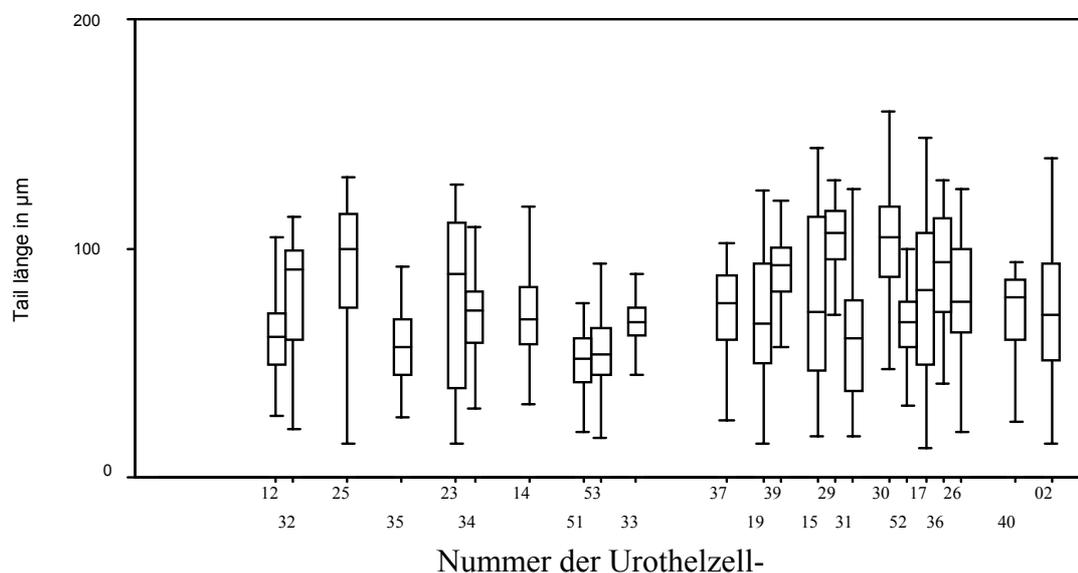


Abb. 4-50: Boxplots der PK in gleicher Reihenfolge aufgetragen wie bei den OTA-inkubierten Proben.



4.2.2. CYP1A2, GSTT1, GSTM1, GSTP1 und NAT2 Genotypisierung

Für die Bestimmung des GST T1, GST M1, GST P1 und NAT2-Genotyps standen 50 Proben, für die CYP 1A2 48 Proben zur Verfügung. Dabei stammten 58% der Proben von männlichen Spendern und 42% von weiblichen Spendern. Die Verteilung der Genotypen ist in **Tabelle 4-5** dargestellt. Der Anteil der Genotypen für CYP 1A2, GSTT1, GSTM1 und GSTP1 war im Vergleich zwischen Männern und Frauen in etwa gleich verteilt. Bei der NAT2 war ein erhöhter Anteil „langsamer Acetylierer“ bei männlichen Spendern im Vergleich zu weiblichen Spendern zu beobachten.

Tab. 4-5 : Verteilung der Genotypen

Genotyp	männliche Spender	weibliche Spender	Summe
CYP 1A2			
homozygoter Wildtyp w/w	7% (2)	-	4% (2)
heterozygoter Wildtyp w/m	38% (11)	42% (8)	40% (19)
homozygot mutiert m/m	55% (16)	58% (11)	56% (27)
GST T1			
positiv	76% (22)	71% (15)	74% (37)
negativ	24% (7)	29% (6)	26% (13)
GST M1			
positiv	52% (15)	57% (12)	54% (27)
negativ	48% (14)	43% (9)	46% (23)
GST P1			
homozygoter Wildtyp w/w	38% (11)	48% (10)	42% (21)
heterozygoter Wildtyp w/m	62% (18)	43% (9)	54% (27)
homozygot mutiert m/m	-	10% (2)	4% (2)
NAT2			
2 Allele „schneller Acetylierer“	7% (2)	-	4% (2)
1 Allele „schneller Acetylierer“ 1 Allele „langsamer Acetylierer“	24% (7)	57% (12)	38% (19)
2 Allele „langsamer Acetylierer“	69% (20)	43% (9)	58% (29)

4.2.3. Verteilung der Genotypen

Um einen Einfluss des Genotyps auf die Empfindlichkeit der Urothelszellen gegenüber OTA zu überprüfen, wurden die Verteilung der Genotypen in den als „ungeschädigt“ und „geschädigt“ definierten Untergruppen miteinander verglichen (**Tabelle 4-6**). Die Geschlechterverteilung entsprach in beiden Untergruppen der des Gesamtkollektives.

Für Cytochrom P450 1A2 zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Positive GST T1 Genotypen waren in der „geschädigten“ Gruppe zahlreicher als in der „ungeschädigten“ Gruppe. Der Anteil an GST M1 positiven Genotypen war ebenso wie der GST P1 homozygote Wildtyp in der Gruppe der als „geschädigt“ eingestuft Proben geringer. Am deutlichsten zeigten sich Unterschiede bei der NAT2. Hier war der Anteil „langsamer Acetylierer“ in der „geschädigten“ Gruppe mit 75% deutlich höher als in der „ungeschädigten“ Gruppe mit 36%.

Tab. 4-6: Verteilung der Genotypen in der „ungeschädigten“ und „geschädigten“ Gruppe

Genotyp	„ungeschädigt“(23)	„geschädigt“ (27)
CYP 1A2		
homozygoter Wildtyp w/w	5% (1)	4% (1)
heterozygoter Wildtyp w/m	38% (8)	41% (11)
homozygot mutiert m/m	57% (12)	55% (15)
GST T1		
positiv	64% (14)	82% (23)
negativ	36% (8)	18% (5)
GST M1		
positiv	64% (14)	46% (13)
negativ	36% (8)	54% (15)
GST P1		
homozygoter Wildtyp w/w	55% (12)	32% (9)
heterozygoter Wildtyp w/m	41% (9)	64% (18)
homozygot mutiert m/m	5% (1)	4% (1)
NAT2		
2 Allele „schneller Acetylierer“	9% (2)	0% (-)
1 Allele „schneller Acetylierer“	55% (12)	25% (7)
1 Allele „langsamer Acetylierer“		
2 Allele „langsamer Acetylierer“	36% (8)	75% (21)

5. Diskussion

5.1. Zytotoxizität von OTA

Der eingesetzte Neutralrot-Assay erfasst die zytotoxische Wirkung von Substanzen anhand der Messung der Aufnahme und Speicherung des Farbstoffs Neutralrot in die Lysosomen. Treten Effekte auf, die eine Beeinträchtigung der Zellvitalität zur Folge haben, kann der Farbstoff nicht mehr effizient gespeichert werden. Die zytotoxische Wirkung der eingesetzten Testsubstanz ist dann anhand des reduzierten Neutralrotgehaltes in der Zelle detektierbar. Eine Reduktion der Neutralrotaufnahme bis zu 10 % im Vergleich zur Kontrolle wird dabei als nicht-zytotoxisch toleriert (INVITOX 1992). Parallel zur Neutralrotaufnahme wird der Proteingehalt der Zellen bestimmt und als weiterer Endpunkt für die Zytotoxizität benutzt.

Nach 24-stündiger OTA-Inkubation konnte in allen verwendeten Zelltypen eine konzentrationsabhängige Reduktion der Neutralrotaufnahme und eine damit gekoppelte Abnahme der Proteinkonzentration beobachtet werden. Die Reduktion dieser Werte beruht auf der Summe aus apoptotischen und/oder nekrotischen Zelluntergang. OTA ist in der Lage *in vitro* sowohl nach längerer Inkubation (7 Tage) mit niedrigen OTA-Konzentrationen (nM) (SCHWERDT *et al.* 1999, GEKLE *et al.* 2000), als auch nach 24-stündiger Inkubation mit hohen Konzentrationen (~50 µM) (SEEGERS *et al.* 1994) Apoptose auszulösen. Ebenso konnte Apoptose *in vivo* bei Mäusen (ATROSHI *et al.* 2000) und bei Ratten (MAAROUFI *et al.* 1999) festgestellt werden. Bei Inkubation mit OTA-Konzentrationen > 10 µM konnten auch nekrotische Veränderungen auf Grund einer Hemmung der Proteinbiosynthese beobachtet werden (CREPPY *et al.* 1996, DIETRICH *et al.* 2001).

Primäre Zellkulturen aus der Harnblase des Schweins reagierten sehr viel empfindlicher auf die Exposition mit OTA als die verwendeten permanenten Zelllinien. In dieser Studie wurden folgende IC₅₀-Werte ermittelt: PUBEC 0,2 µM, 5637-Zellen 10 µM, IHKE-Zellen 18 µM und MDCK-Zellen 50 µM. Diese Reihenfolge stimmt mit Ergebnissen von O'BRIEN *et al.* (2001) überein, bei denen primäre Nierenzellen vom Schwein im Neutralrot-Assay ebenfalls sensitiver auf OTA reagierten, als Zelllinien. Auch zeigten primäre humane Zellkulturen aus der Niere eine höhere Empfindlichkeit gegenüber OTA, als Zelllinien aus der Niere (DIETRICH *et al.* 2001, O'BRIEN *et al.* 2001), was auf eine höhere Empfindlichkeit von Primärzellen gegenüber einer OTA-Exposition hindeutet.

Ein direkter Vergleich der hier erhobenen absoluten IC_{50} -Werte mit Werten aus anderen Untersuchungen zur Zytotoxizität von OTA ist schwierig. Schon leichte Veränderungen der Methoden, wie z.B. Kulturbedingungen der Zellen, die Wahl des Testverfahrens, die Inkubationszeit oder die Verwendung von Serum im Inkubationsmedium, können zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Toxizität mit anderen IC_{50} -Werten führen (BONDY UND ARMSTRONG 1998).

In dieser Studie variierten die IC_{50} -Werte bei einer Inkubationszeit von 24 h in den verschiedenen Zelltypen sehr stark (0,2 μ M bis 50 μ M). Ähnliche Schwankungen treten auch beim Vergleich von Ergebnissen aus anderen zytotoxischen Studien auf. So wurde unter vergleichbaren Versuchsbedingungen für LLC-PK1-Zellen ein IC_{50} -Wert von 75 μ M und für NHBE-Zellen ein IC_{50} -Wert von 3 μ M ermittelt.

Die Resultate aus dem Neutralrot-Assay und der Aufnahme von [3 H]-OTA deuten auf einen Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber OTA und ihrem Vermögen OTA aufzunehmen hin. Die hier ermittelte Reihenfolge der IC_{50} -Werte entspricht der Reihenfolge der Aufnahmekapazität der verwendeten Zelltypen für OTA. PUBEC waren unter neutralen pH-Bedingungen in der Lage am schnellsten OTA zu akkumulieren und wiesen den niedrigsten IC_{50} -Wert auf. Vergleichbare Ergebnisse lieferten auch primäre Nierenzellen vom Menschen und vom Schwein. Diese Zellen waren am sensitivsten gegenüber OTA und akkumulierten übereinstimmend mehr OTA (O'BRIEN *et al.* 2001).

5637-Zellen, die aus dem Urothel stammen, wiesen allerdings einen 50-fach höheren IC_{50} -Wert auf, obwohl ähnlich viel OTA unter neutralen pH-Bedingungen aufgenommen wurde wie in PUBEC. Eine Erklärung könnte die Herkunft der Zellen liefern. Es liegt nahe, dass primäre Zellen wie PUBEC in der Lage sind eher eine Apoptose einzuleiten als 5637-Zellen, die aus einem humanen Blasenepithel-Karzinom stammen (FOGH 1978). Für 5637-Zellen ist auch ein nekrotischer Zelluntergang denkbar, der auf eine Hemmung der Proteinbiosynthese zurückzuführen ist, der beim Einsatz hoher OTA-Konzentrationen beobachtet wurde (CREPPY *et al.* 1996, DIETRICH *et al.* 2001). Eine vergleichbare Beobachtung wurde von O'BRIEN *et al.* (2001) mit der Fibroblasten Zelllinie NRK49F gemacht. So zeigten sich erste zytotoxische Effekte erst bei einer 1000-fach höheren OTA-Konzentration verglichen mit einer primären Zellkultur, die etwa gleich viel OTA aufgenommen hatten. Dieses Resultat wird von den Autoren auf spezifische Eigenschaften der Zelle oder auf ein Defizit beim Auslösen von Apoptose zurückgeführt.

Die IC_{50} -Werte von MDCK- und IHKE-Zellen (MDCK $IC_{50} = 50 \mu\text{M}$; IHKE $IC_{50} = 18 \mu\text{M}$) spiegeln ebenfalls die Fähigkeit dieser Zellen wieder, OTA unter neutralen pH-Bedingungen aufzunehmen. Dass OTA in IHKE-Zellen stärker zytotoxisch wirkt, als in MDCK-Zellen, konnte auch bei der Induktion von Apoptose in diesen Zelllinien gezeigt werden. In IHKE-Zellen reichte eine OTA-Konzentration von 5 nM zur Induktion von Apoptose aus, während in MDCK-Zellen 500 nM benötigt wurden (SCHWERDT *et al.* 1999a). Die Inkubationszeit betrug in diesem Versuch allerdings 7 Tage. Es kann demnach nicht gefolgert werden, dass nach einer 24-stündigen Inkubation mit höheren OTA-Konzentrationen der Untergang von MDCK- und IHKE-Zellen auch auf Apoptoseereignissen beruht. Denkbar ist ebenso die Induktion nekrotischer Effekte, da auch eine Induktion von Nekrose für OTA-Konzentrationen in diesem Bereich beschrieben wurden (SEEGERS *et al.* 1994, CREPPY *et al.* 1996).

Ein weiterer Grund für den hohen IC_{50} -Wert der MDCK-Zellen könnte darin liegen, dass MDCK-Kulturen aus mindestens zwei verschiedenen Zelltypen bestehen (VALENTICH 1981). Es konnten zwei Subtypen isoliert werden, die sich in Morphologie und Funktion (GEKLE *et al.* 1994), sowie in der Aufnahme von OTA und der Sensitivität gegenüber OTA (SCHWERDT *et al.* 1996, 1997) unterscheiden. Dabei konnte der MDCK-C11 Subtyp mehr OTA akkumulieren als der MDCK-C7 Subtyp, es war jedoch nur im C11 Subtyp Apoptose induzierbar (GEKLE *et al.* 2000). Der hohe IC_{50} -Wert der MDCK-Zellen resultiert zum einen daraus, dass ein Teil der Zellen schlechter oder gar nicht apoptotisch wird. Zum anderen verringern diese Zellen die OTA-Konzentration im Medium durch ihre stärkere OTA-Aufnahme.

Einen weiteren Hinweis auf den Zusammenhang zwischen OTA-Aufnahme und adverser Effekte durch OTA konnte z.B. in Ratten gefunden werden. Männliche Tiere, die eine erhöhte Inzidenz für renale Tumoren und Blasentumoren zeigten (CASTEGNARO *et al.* 1998, RASONYI *et al.* 1999), exprimierten den oatp1 Transporter stärker als Weibchen, so dass weibliche Ratten eine höhere Clearance der Niere für OTA besitzen (KATO *et al.* 2002). Eine oatp1 vermittelte OTA-Resorption könnte zu der beobachteten erhöhten Tumorzinzidenz in männlichen Ratten führen. Unterstützt wird dieser Zusammenhang von der Beobachtung, dass OTA nicht geschlechtsspezifisch an Steroidrezeptoren (HEUSSNER *et al.* 2002) oder $\alpha_2\text{u}$ -globulin (RASONYI *et al.* 1999) gebunden wird und so zu unterschiedlichen renalen OTA-Konzentrationen führt.

Die Zugabe von S9-Mix als externes Metabolisierungssystem hatte in keinem in dieser Studie verwendeten Zelltyp einen Einfluss auf die OTA-Konzentration, bei der erste zytotoxische Effekte zu beobachten waren.

Die Zugabe von S9-Mix bedeutet zunächst einmal eine Erhöhung der Proteinkonzentration im Inkubationsmedium. OTA ist in der Lage stark an Plasmaproteine zu binden (HAGELBERG *et al.* 1989). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass OTA weit schwächer an zelluläre Proteine bindet als an Plasmaproteine (SCHWERDT *et al.* 1996). Die Konzentration an freiem OTA scheint demnach durch S9-Mix nicht stark herabgesetzt.

Jedoch wirkte sich S9-Mix unterschiedlich auf die IC₅₀-Werte der verschiedenen Zelltypen aus. In PUBEC und 5637-Zellen wird der IC₅₀-Wert nicht verändert, in MDCK-Zellen wird der IC₅₀-Wert von 50 µM OTA auf 30 µM OTA erniedrigt und in IHKE-Zellen wird der IC₅₀-Wert von 18 µM OTA auf 30 µM OTA erhöht. Ähnlich kontroverse Ergebnisse konnten bei transfizierten Zellen beobachtet werden, die CYP exprimieren. LEWIS *et al.* (1999) fanden eine erhöhte Zytotoxizität wenn CYP 1A2 oder CYP 2E1 in den Zellen exprimiert wurden. Im Gegensatz dazu fanden DE GROENE *et al.* (1996a) eine Verringerung der Zytotoxizität, wenn transfizierte Zellen diese Enzyme exprimierten.

Diese Ergebnisse und der Umstand, dass PUBEC am empfindlichsten auf eine OTA-Exposition reagieren, obwohl eine CYP-Aktivität in diesen Zellen nach einer Kulturdauer von einem Tag nicht mehr messbar war (GUHE *et al.* 1996), deuten darauf hin, dass S9-Mix das zytotoxische Potential von OTA nicht erhöht. Diese Beobachtung wird noch dadurch gestärkt, dass die Induktion von CYP die renale Toxizität von OTA herabsetzt (OMAR *et al.* 1996), sowie dass typische toxische Effekte durch OTA auch in anderen Zellsystemen beobachtet wurden, die nur eine geringe oder keine CYP-Aktivität aufwiesen (SEEGERS *et al.* 1994, HOEHLER *et al.* 1996, XIAO *et al.* 1996).

Bei längeren Inkubationszeiten variierten die IC₅₀-Werte verschiedener Studien weniger und liegen nach 48 h in einem Bereich von 1 µM bis 10 µM (HONG *et al.* 2000, DIETRICH *et al.* 2001, O'BRIEN *et al.* 2001,) bzw. nach 72 h in einem Bereich von 1 µM bis 5 µM (KITABATAKE *et al.* 1993, XIAO *et al.* 1996). In diesen Untersuchungen wurden Zelllinien verschiedener Spezies und unterschiedlicher Gewebe eingesetzt, die vermutlich eine unterschiedliche metabolische Kapazität besitzen. Ein Metabolismus von OTA scheint demnach unwahrscheinlich, da dann eher auch sehr unterschiedliche IC₅₀-Werte, nach einer langen Inkubation, erwartet werden konnten. Diese Beobachtung

konnte von STETINA UND VOTAVA (1985) für Aflatoxin B₁ gemacht werden. Die IC₅₀-Werte für Aflatoxin B₁ unterschieden sich in zwei verschiedenen Zellkulturen um den Faktor 100 und es konnten nur in der empfindlicheren Zelllinie DNA-Schäden nachgewiesen werden. Die Autoren führten diese Unterschiede auf eine unterschiedliche metabolische Kapazität der Zelllinien zurück. Im Gegensatz dazu zeigte OTA hier in beiden Zelllinien vergleichbare Effekte. Der OTA-Toxizität scheint ein allgemeiner Mechanismus zu Grunde zu liegen, der bei einer bestimmten intrazellulären OTA-Konzentration ausgelöst wird. Bei langen Inkubationszeiten haben auch Zelltypen, die OTA nur langsam aufnehmen können, die Gelegenheit OTA-Konzentrationen zu akkumulieren, bei denen zytotoxische Effekte ausgelöst werden. Die Zytotoxizität vom OTA wäre demnach bei langen Inkubationszeiten größtenteils von der Aufnahme abhängig.

Dennoch zeigen die Beispiele mit MDCK-C11- und NRK-49F-Zellen, dass die OTA-Zytotoxizität nicht allein von der OTA-Aufnahme abhängt. In PUBEC konnten auch bei einer OTA-Konzentrationen von 50 µM nicht alle Zellen abgetötet werden, obwohl bereits bei einer Konzentration von 1 µM 80 % der Zellen abgestorben waren. Analog konnte auch in den anderen verwendeten Zelllinien nicht das Absterben aller Zellen erreicht werden. Höhere OTA-Konzentrationen und längere Expositionszeiten führten ebenso nicht zu einer weiteren Reduktion der Zellzahl (DREGER *et al.* 2000). Ähnlich wie in MDCK-Zellen lässt sich vermuten, dass in anderen Zelltypen Subpopulationen vorhanden sind, die resistent gegen OTA sind. Die Selektion einer solchen Subpopulation konnte in Epithelzellen der Prostata nach Cadmiumexposition beobachtet werden (ACHANZAR *et al.* 2000).

5.2. Genotoxizität von OTA

Mit Hilfe des alkalischen Comet Assay wurden genotoxische Effekte von OTA untersucht. Dieser Test ist in der Lage, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, reparaturinduzierte Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen der DNA nachzuweisen (COLLINS *et al.* 1997). Der hier unter alkalischen Bedingungen durchgeführte Comet Assay kann jedoch nicht die Art des DNA-Schadens anzeigen. Um die Beteiligung von DNA-Reparatur an der Kompensierung der DNA-Schäden zu untersuchen, wurden in einer Variante des Comet Assay die DNA-Reparatur-Hemmstoffe Cytosine β-D-

Arabino-Furanosid (araC) und Hydroxyurea (HU) eingesetzt. AraC ist ein Nukleosidanalogon, das in der Zelle zu araCTP phosphoryliert wird und somit mit dCTP um die Nucleotid-Bindungsstelle der DNA α -Polymerase konkurriert (COZZARELLI 1977). AraC kann aber auch in DNA-Stränge eingebaut werden und so zu Strangabbrüchen führen (MAJOR *et al.* 1982). HU hemmt die Ribonucleotid-Reduktase und unterbindet damit die DNA-Synthese, indem es den Deoxynukleotid-Pool verringert (MAYNE 1984). DNA-Schäden können aus der DNA herausgeschnitten werden, eine Resynthese dieser Stellen ist jedoch gehemmt. Dies hat eine Akkumulation der DNA-Einzelstrangbrüche zur Folge, die durch die vorhergegangene DNA-Reparatur entstanden sind.

Neben der einfachen Handhabung und schnellen Durchführung sowie der geringen Kosten, liegt ein großer Vorteil des Comet Assay darin, dass zu seiner Durchführung nur eine geringe Zellzahl benötigt wird.

Für die Auswertung dieses Tests stehen verschiedene Parameter zur Verfügung. Neben der Tail Länge wird von vielen Autoren auch das Tail Moment als Parameter verwendet. Das Tail Moment ist das Produkt aus der Tail Länge und des DNA-Gehaltes im Tail. Der Vorteil des Tail Moment liegt darin, dass nicht nur die Größe der DNA-Fragmente, die die Länge des Tail bestimmen, sondern auch die DNA-Menge mit in die Berechnung eingehen. Ein Nachteil ist, dass das Tail Moment von unterschiedlicher Analyse-Software nicht einheitlich berechnet wird. Daher wurde hier die Tail Länge bestimmt und zur Analyse benutzt.

Bezüglich einer statistischen Auswertung gibt es im Rahmen einer „Guideline“ (TICE *et al.* 2000) Vorschläge für den Comet Assay, jedoch bislang noch keine Einigung auf ein bestimmtes Verfahren. Da es sich um nicht-parametrische Daten handelt, die also nicht normalverteilt sind, wird ein paarweiser Vergleich der Dosisgruppen gegen die Kontrolle empfohlen. Der Test ist einseitig, wenn nur die Zunahme oder nur die Abnahme der Tail Länge getestet werden soll. Aus diesen Gründen wurde für die statistische Berechnung der Mann-Whitney-U-Test gewählt.

In allen verwendeten Zelltypen konnten DNA-Schäden nach OTA-Inkubation mit dem Comet Assay nachgewiesen werden. Da nach 3-stündiger Inkubation keine Effekte im Neutralrot-Assay auftraten, beruhen die im Comet Assay detektierten DNA-Schäden nicht auf zytotoxischen Effekten. Das genotoxische Potential von OTA konnte auch in einer Reihe anderer *in vivo* und *in vitro* Studien gezeigt werden (CREPPY *et al.* 1985,

KANE *et al.* 1986, PFOHL-LESZKOWICZ *et al.* 1991, DEGEN *et al.* 1997, DÖRRENHAUS UND FÖLLMANN 1997, OBRECHT-PFLUMIO *et al.* 1999, EHRLICH *et al.* 2002).

Die Ursache für die DNA-Schäden ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Ergebnisse aus der Gruppe von Pfohl-Leszkwowicz sprechen für die Bildung von DNA-Addukten (GROSSE *et al.* 1995, EL ADLOUNI *et al.* 2000, OBRECHT-PFLUMIO UND DIRHEIMER 2000, ARLT *et al.* 2001). Diese DNA-Addukte konnten allerdings nur nachgewiesen werden, wenn mit OTA-Konzentrationen im hohen mikro- bis millimolaren Bereich und für mindestens für 24 h inkubiert wurde. Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen in denen keine OTA-Addukte gefunden wurden (RASONYI 1995, GAUTIER *et al.* 2001, ZEPNIK *et al.* 2001, GROSSE-STEINMEYER *et al.* 2002). Diese Autoren bezweifeln daher, dass reaktive OTA-Intermediate entstehen und kovalent an DNA binden.

Eine weitere Möglichkeit für die durch OTA vermittelten genotoxischen Effekte könnte die Induktion von oxidativen Stress sein. Zum einen wurde die Bildung von reaktiven Radikalen postuliert (MALAVEILLE *et al.* 1994, HASINOFF *et al.* 1990), zum anderen konnte oxidativer Stress (GAUTIER *et al.* 2001, MEKI UND HUSSEIN 2001) und Lipidperoxidation (OMAR *et al.* 1990, BAUDRIMONT *et al.* 1997) nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten oxidierte Basen im Comet Assay von JANZOWSKI *et al.* (2002) und SCHAAF *et al.* (2002) detektiert werden.

Die im Comet Assay erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven der verwendeten Zelllinien waren vergleichbar mit den Dosis-Wirkungs-Kurven im Neutralrot Assay. Erste DNA-Schäden sind in MDCK-Zellen schon bei einer Konzentration von 100 nM OTA zu erkennen. In IHKE- und 5637-Zellen führt eine OTA-Konzentration von 1 µM zu detektierbaren DNA-Schäden im Comet Assay. Die Dosis-Wirkungs-Kurve in PUBEC unterschied sich deutlich von denen der Zelllinien. DNA-Schäden waren erst ab einer Konzentration von 100 µM OTA zu erkennen und PUBEC wiesen das geringste Maximum der Tail Länge unter den verwendeten Zelltypen auf.

Der Befund, dass DNA-Schäden in MDCK- und IHKE-Zellen nach 3-stündiger Inkubation ausgeprägter waren als in PUBEC und 5637-Zellen, steht nicht in Einklang mit der gemessenen aufgenommenen OTA-Menge und den Ergebnissen aus dem Neutralrot-Assay. Dies macht deutlich, dass bei einer kurzzeitigen Exposition mit hohen OTA-Konzentrationen andere Mechanismen als die OTA-Aufnahme einen größeren Einfluss auf die Ausbildung von DNA-Schäden haben.

Eine wichtige Rolle spielt die DNA-Reparatur, da zum einen DNA-Schäden beseitigt werden und andererseits bei der DNA-Reparatur Einzelstrangbrüche entstehen können, die im Comet Assay detektierbar werden. So könnten oxidierte Basen, die nicht direkt erkannt werden können, erst durch die aus der DNA-Reparatur resultierenden Einzelstrangbrüche sichtbar werden. Durch die Hemmung der DNA-Resynthese mit araC/HU, die zu einer Akkumulation von Einzelstrangbrüchen führt, konnte gezeigt werden, dass alle verwendeten Zelltypen in der Lage waren einen Teil der DNA-Schäden zu reparieren. Die Induktion von DNA-Reparatur nach OTA-Exposition konnte in PUBEC (DÖRRENHAUS UND FÖLLMANN 1997, DÖRRENHAUS *et al.* 2000), in IHKE-Zellen (SCHWERT *et al.* 1999b), sowie in *E. coli* (MALAVEILLE *et al.* 1994) gezeigt werden. Die Erhöhung der Tail Längen nach der Zugabe von araC/HU ist jedoch kein Indiz für das Vorhandensein oxidierter Basen, da z.B. in V79-Zellen oxidierte Basen erst nach Zugabe eines Reparaturenzyms im Comet Assay detektierbar wurden (JANZOWSKI *et al.* 2002).

Bei der Untersuchung der DNA-Reparatur in 5637-Zellen fällt auf, dass der Unterschied in der Ausprägung von DNA-Schäden im Vergleich der Bedingungen mit und ohne araC/HU deutlich geringer waren als in den anderen Zelltypen. Da in MDCK- und IHKE-Zellen DNA-Schäden bereits durch araC/HU induziert werden und bei IHKE-Zellen zytotoxische Effekte von araC/HU mit dem Neutralrot Assay nachgewiesen wurden, kann ein Teil der Erhöhung der Tail Längen auf Effekte von araC/HU selbst zurückgeführt werden. In PUBEC, die diese Effekte nicht zeigten, liegt die Erhöhung der Tail Längen demnach in einer effektiveren DNA-Reparatur begründet, die nach Zugabe von araC/HU gehemmt war.

Zusätzlich waren 5637-Zellen nicht in der Lage alle DNA-Schäden zu reparieren, wenn sie anschließend mit schadstofffreiem Medium weiter kultiviert wurden. Der Anteil stark geschädigter Zellkerne blieb konstant, während der Anteil weniger stark geschädigter Zellkerne abnahm und dafür der Anteil ungeschädigter Zellkerne zunahm. Daraus lässt sich schließen, dass entweder eine Subpopulation vorlag, bei der keine DNA-Reparatur durchgeführt wurde, oder die DNA war so stark geschädigt, dass keine DNA-Reparatur möglich war. Gegen eine Subpopulation, wie sie für MDCK-Zellen angenommen wird spricht, dass die Einzelwerte der Tail Länge in 5637-Zellen deutlich weniger streuten als in MDCK-Zellen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ab einem gewissen Grad des DNA-Schadens der Zelluntergang eingeleitet wird. Besonders deutlich wird dies in IHKE-Zellen, die nach 2-stündiger Inkubation mit 100 µM OTA

und araC/HU alle entstandenen DNA-Schäden reparieren konnten, jedoch nicht in der Lage waren DNA-Schäden nach 4-stündiger Inkubation mit OTA zu reparieren. Im Gegensatz dazu konnten von PUBEC und MDCK-Zellen alle DNA-Schäden nach solch einer 4-stündiger Inkubation mit OTA repariert werden.

Wurden die Zellen unter sauren pH-Bedingungen kurzzeitig mit 100 μ M OTA inkubiert, ist eine Verstärkung des DNA-Schadens in MDCK- und 5637-Zellen zu beobachten. Auch konnten in PUBEC unter sauren pH-Bedingungen früher DNA-Schäden detektiert werden, als unter neutralen Kulturbedingungen. Ein Einfluss der aufgenommenen OTA-Menge auf die Genotoxizität von OTA zeigte sich also auch bei kurzen Inkubationszeiten.

Die Zugabe von S9-Mix führt zu ähnlich kontroversen Ergebnissen wie im Neutralrot Assay. In PUBEC und MDCK-Zellen steigen die Tail Längen signifikant an. Die Effekte traten aber nicht bei geringeren OTA-Konzentrationen auf, als in Abwesenheit von S9-Mix. In 5637-Zellen war kein Einfluss zu erkennen und in IHKE-Zellen waren die Effekte mit S9-Mix geringer. Da S9-Mix die Tail Längen nicht stark beeinflusst und auch nicht dazu führte, dass DNA-Schäden bei geringeren OTA-Konzentrationen auftraten als in Anwesenheit von S9-Mix, scheint keine metabolische Aktivierung von OTA durch S9-Mix nötig zu sein, um DNA-Schäden zu verursachen. Gegen eine metabolische Aktivierung spricht auch, dass die Verläufe der Dosis-Wirkungs-Kurven der Zelllinien sehr ähnlich verlaufen und nach 3-stündiger Inkubation mit 100 μ M OTA vergleichbare Tail Längen in den drei Zelltypen auftreten. Die geringeren Werte bei PUBEC können hier auf eine effektivere DNA-Reparatur zurückgeführt werden.

5.3. Aufnahme von OTA

Toxische Effekte, die durch OTA verursacht werden, beruhen nicht zuletzt auf der ungewöhnlich langen Halbwertszeit von OTA im Organismus. Durch die starke Bindung an Plasmaproteine wie Albumin (CHU 1971), wird eine effektive glomeruläre Filtration von OTA in der Niere unterbunden. Der Hauptausscheidungsweg von OTA ist die Sekretion durch proximale Tubuluszellen ins Tubuluslumen (GEKLE UND SILBERNAGEL 1994, STEIN *et al.* 1984). Neben der starken Plasmabindung kann eine zusätzliche Resorption von OTA auf der apikalen Seite im Nephron die Halbwertszeit

von OTA erhöhen (GEKLE *et al.* 1993, ZINGERLE *et al.* 1997, SCHWERDT *et al.* 1997, 1998).

Zur Untersuchung der Aufnahme von radioaktiv markiertem OTA in Harnblasenepithel- und Nierenzellen wurden zwei unterschiedliche pH-Bedingungen gewählt. Die OTA-Aufnahme wurde unter neutralen pH-Bedingungen, wie sie im Kulturmedium herrschen, und unter sauren pH-Bedingungen, wie sie in Niere (SABATINI UND KURTZMAN 1989) und Blase (YOUNG UND KADLUBAR 1982) nicht unüblich sind, untersucht.

Unter neutralen Bedingungen konnten die Urothelzellen PUBEC und 5637 etwa doppelt so viel OTA aufnehmen wie die Nierenzellen MDCK- und IHKE.

Unter sauren Bedingungen war eine sehr viel stärkere Aufnahme von OTA durch PUBEC, MDCK- und IHKE-Zellen zu beobachten. Dies spricht dafür, dass OTA apikal von Proton-Dipeptid Kotransportern (PEPT1 oder PEPT2) aufgenommen wird (SCHWERT *et al.* 1998), die eine zunehmende Transportrate mit abnehmenden pH-wert zeigen (BOLL *et al.* 1996) und ein Aktivitätsmaximum zwischen pH 6,5 und pH 5 haben (TAMAI *et al.* 1995).

Die erhöhte OTA-Aufnahme in PUBEC unter sauren pH-Bedingungen kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass der Proton-Dipeptid Kotransporter auch im Epithel der Harnblase exprimiert wird.

Eine weitere denkbare Möglichkeit für die vermehrte Aufnahme von OTA unter sauren Bedingungen wäre eine erleichterte Diffusion von OTA. Da OTA im sauren pH hauptsächlich undissoziiert vorliegt und in dieser Form gut membranpermeabel ist. In der Zelle, in der ein neutraler pH vorliegt, könnte ein Proton vom OTA-Molekül abdissoziieren und das Toxin wäre im geladenen Zustand in der Zelle gefangen. Für den Gastrointestinaltrakt wird die Aufnahme von OTA hauptsächlich auf Diffusion zurückgeführt (KUMAGAI UND AIBARA 1982). Dagegen spricht allerdings, dass die aufgenommene OTA-Menge in 5637-Zellen unter neutralen und sauren pH-Bedingungen etwa gleich groß war. Zudem war keine Zunahme der OTA-Konzentration über die Zeit in diesen Zellen messbar. Würde die steigende OTA-Aufnahme in PUBEC nur aus der Diffusion resultieren, müsste auch in 5637-Zellen der gleiche Effekt wie in den anderen Zellen zu beobachten sein.

Der Umstand, dass 5637-Zellen bei neutralen und sauren pH-Bedingungen etwa gleich viel OTA aufnahmen, lässt sich nicht allein mit einem Proton-Dipeptid Kotransporter vermittelten Transport erklären. Eine weitere wichtige Rolle für den Transport von

OTA spielen multispezifische *oatp*-Transporter, deren Expression in der Leber (KONTAXI *et al.* 1996) und Niere (JACQUEMIN *et al.* 1994) nachgewiesen werden konnte. In MDCK-Zellen konnte die OTA-Aufnahme durch die Zugabe von Methotrexat, einem Substrat des *oatp* (ECKHARDT *et al.* 1999), um bis zu 80 % reduziert werden (SCHWERT *et al.* 1998). Im Comet Assay war bei allen eingesetzten Zelltypen eine signifikante Abnahme der Tail Längen zu beobachten, wenn Methotrexat zusammen mit OTA zum Inkubationsmedium hinzugegeben wurde. Bei PUBEC und 5637-Zellen führte eine Methotrexat-Konzentration von 10 μ M zu einer Reduktion der DNA-Schäden um etwa 50 %. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass der *oatp*-Transporter auch im Urothel exprimiert wird. In MDCK-Zellen konnte die Ausprägung von DNA-Schäden durch die Zugabe von 10 μ M Methotrexat um 64 % und bei einer Methotrexat-Konzentration von 100 μ M um 89 % gesenkt werden. In IHKE-Zellen führte die Zugabe von 10 μ M Methotrexat bereits zu einer vollständigen Reduktion der DNA-Schäden.

Im Gegensatz zu PUBEC und 5637-Zellen (Urothelzellen) wurden in MDCK- und IHKE-Zellen (Nierenzellen) keine DNA-Schäden durch Methotrexat selbst induziert. Dies deutet darauf hin, dass von MDCK- und IHKE-Zellen weniger Methotrexat aufgenommen wird, so dass sich eine genotoxische Wirkung von Methotrexat nicht ausprägt (VINSON UND HALES 2002).

Die geringere Aufnahme von OTA und Methotrexat unter neutralen pH-Bedingungen, sowie die bereits beschriebene Korrelation von *oatp*-Expression und OTA-Aufnahme in transfizierten Oozyten (KONTAXI *et al.* 1996), spricht für eine geringere Expression von *oatp*-Transportern in MDCK- und IHKE-Zellen als in PUBEC und 5637-Zellen.

In 5637-Zellen war nach 15-minütiger Inkubation kein weiterer Anstieg der OTA-Konzentration in den Zellen zu erkennen. 5637-Zellen zeigten im Neutralrot-Assay eine leichte Abnahme der Neutralrotaufnahme und der Proteinwerte. Zudem konnten DNA-Schäden im Comet Assay unter neutralen und sauren Inkubationsbedingungen nachgewiesen werden. Allerdings waren diese Effekte nicht so stark ausgeprägt, dass sie die alleinige Ursache für eine Stagnation der OTA-Aufnahme nach 15 min Inkubation sein könnten. Es wurde bereits gezeigt, dass in MDCK-Zellen der größte Teil an akkumuliertem OTA in Zellorganellen, wie Mitochondrien gebunden ist (MEISNER 1976, SCHWERDT *et al.* 1996). Eine Anreicherung in den Mitochondrien könnte die Bereitstellung von Energie beeinflussen, die für eine aktive Aufnahme von

OTA benötigt wird (SCHWERDT *et al.* 1996) und so die Aufnahme von OTA unterbinden.

In IHKE-Zellen ging die OTA-Aufnahme unter sauren pH-Bedingungen nach 15 min zurück, da saurer HEPES-Ringer-Puffer toxisch auf IHKE-Zellen wirkte. Eine erhöhte Diffusion von OTA aus der Zelle kann hier ausgeschlossen werden, da die OTA-Konzentration des Mediums höher war als in der Zellen. Das geschädigte Zellen weniger OTA aufnehmen können als vitale, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass OTA zum Teil aktiv aufgenommen wird.

Wie groß der Einfluss einer Diffusion auf die Aufnahme von OTA ist, konnte hier nicht bestimmt werden. Es wird vermutet, dass 50 % der OTA-Aufnahme in MDCK-Zellen über PEPT- und *oatp*-Transporter erfolgt, die verbleibenden 50 % werden über Diffusion und einen, noch ungeklärten, pH-abhängigen Mechanismus aufgenommen (SCHWERDT *et al.* 1998). Das „multidrug-resistance protein 2“ (MRP2), das ebenfalls auf der apikalen Membran von Nierenzellen lokalisiert ist und ein Transporter für anionische Medikamente und Substanzen darstellt (LEIER *et al.* 2000), könnte für den Transport von OTA eine Rolle spielen. Für einen 2-Doxorubicin resistenten 5637-Subtyp konnte eine erhöhte MRP-Expression nachgewiesen werden, was zu einem verstärktem Efflux dieser Substanz führte (KIM *et al.* 1997). Dies könnte bedeuten, dass 5637-Zellen in der Lage sind OTA auszuschleusen und sich so ein Fließgleichgewicht einstellen kann.

Der Einfluss eines Na-abhängigen Anionentransportes konnte von SCHWERDT *et al.* (1998) und KONTAXI *et al.* (1996) ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse zur Aufnahme von radioaktiv markiertem OTA und der Co-Inkubation mit Methotrexat deuten darauf hin, dass die Aufnahme von OTA in Nierenzellen vorwiegend durch Proton-Dipeptid Kotransporter vermittelt wird, während die OTA-Aufnahme in Urothelzellen, unter neutralen Bedingungen, hauptsächlich durch *oatp* Transporter vermittelt wird.

5.4. Bioaktivierung von OTA

Im Gegensatz zu den verwendeten Zelllinien und den PUBEC zeigten primäre Epithelzellkulturen aus humanen Harnleitern nach 3-stündiger Inkubation mit 100 μ M

OTA große interindividuelle Unterschiede in der Ausprägung von DNA-Schäden. Eine mögliche Ursache für die großen Schwankungen in der Reaktion auf eine OTA-Exposition könnten im Enzym polymorphismus der Spender und somit in einer unterschiedlichen Enzymausstattung der kultivierten Urothelzellen begründet sein.

Eine Reihe von Untersuchungen (siehe 5.3.) belegen eindeutig, dass OTA ein genotoxisches Potential aufweist und erbgutverändernde Wirkung zeigt. Kontrovers diskutiert wird hingegen die Bedeutung einer metabolischen Bioaktivierung von OTA. Aufgrund der großen interindividuellen Unterschiede der humanen Urothel-Zellkulturen in der Ausprägung von DNA-Schäden, wurde in diesem Zusammenhang untersucht, ob Enzym polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme einen Einfluss auf die Ausprägung der DNA-Schäden haben könnten.

5.4.1. Cytochrom P450 1A2

Eine Reihe von Studien deuten auf eine Beteiligung von CYP Enzymen an der Bioaktivierung von OTA hin. So führte OTA-Behandlung bei NIH/3T3 Zellen zu einer erhöhten Mutationsrate, die mit den CYP-Isoenzymen CYP1A1, CYP1A2, CYP2C10 und CYP3A4 transfiziert waren (DE GROENE *et al.* 1996a). Diese Mutationsrate war primär auf große Deletionen zurückzuführen (DE GROENE *et al.* 1996b).

In bronchialen Epithelzellen, die mit dem CYP-Isoenzymen CYP1A2 oder CYP2D6 transfiziert waren, konnten erhöhte DNA-Addukt-Spiegel nachgewiesen werden (GROSSE *et al.* 1997).

Dementsprechend berichteten PFOHL-LESZKOWICZ *et al.* (1998) über Untersuchungen mit chronische OTA exponierten Ratten, dass eine erhöhte CYP1A2-, CYP2C11- und CYP3A-Expression bei Tieren gefunden wurde, die erhöhte DNA-Adduktspiegel aufwiesen.

Ebenso zeigte OTA in NHBE-Zellen, die CYP1A2 exprimierten, die größte toxische Wirkung (LEWIS *et al.* 1999) und erhöhte DNA-Addukt-Level konnten festgestellt werden, wenn in Zellen die Expression von CYP2C9 induziert wurde (EL ADLOUNI *et al.* 2000).

Im Gegensatz dazu konnte in dieser Studie kein Einfluss des CYP1A2-Genotyps auf die Ausprägung der DNA-Schäden gefunden werden. Weitere Hinweise darauf, dass eine CYP450 vermittelte OTA-Oxidation nicht obligatorisch für eine OTA-Toxizität ist, liefern auch andere Studien. So konnte beobachtet werden, dass bei der Induktion von CYP450-Enzymen, wie 1A1 und 1A2, die renale OTA-Toxizität abnahm (OMAR *et al.* 1996). Darüber hinaus konnten typische toxische OTA-Effekte auch in Zell-Systemen

mit geringer oder ohne CYP-Aktivität beobachtet werden (SEEGERS *et al.* 1994, MALAVEILLE *et al.* 1994, HOEHLER *et al.* 1996, XIAO *et al.* 1996). In jüngeren Studien, die sich intensiv mit einem möglichen OTA-Metabolismus beschäftigt haben, konnten ebenfalls keine Hinweise auf einen Einfluss von CYP1A2 gefunden werden (GAUTIER *et al.* 2001, ZEPNIK *et al.* 2001).

Auch konnte ein aus OTA gebildetes Hydrochinon, das ein möglicher elektrophiler Metabolit sein könnte, nur in einem *in vitro* Modell-System gefunden werden (GILLMAN *et al.* 1999), wobei unklar ist, ob dieses *in vitro*-System tatsächlich zelluläre metabolische Prozesse modelliert. *In vivo* oder in Zellkultur konnte das beschriebene Hydrochinon bisher nicht beschrieben werden, obwohl ein Chinon an Nukleophile, z.B. Protein oder Glutathion bindet und somit nachweisbar sein sollte.

5.4.2. Glutathion-S-Transferase

Eine Beteiligung von GSTs und GSH am Metabolismus und Bioaktivierung von OTA ist ebenfalls unklar. Malaveille *et al.* (1994) berichten, dass in einem modifizierten SOS-Chromo-Test in *E. coli* gefundene genotoxische Effekte von OTA durch Zusatz eines Antioxidans komplett zu unterdrücken waren. Es wurde ein OTA-Radikal postuliert, das die genotoxischen Effekte auslöst und das mit Hilfe von GSTs mit GSH konjugiert werden kann.

Dementsprechend konnten De Groen *et al.* (1995) eine geringere Mutationsrate finden, wenn mit dem GSH-Depletor Buthionin Sulfoximide co-inkubiert wurden. Aus diesem Befund schlossen die Autoren auf ein reaktives Glutathion-Konjugat.

Von EL ADLOUNI *et al.* (2000) konnte gezeigt werden, dass der DNA-Addukt Spiegel nach OTA Inkubation abnahm, wenn GSTs gehemmt wurden.

Im Gegensatz dazu konnten in Studien von GAUTIER *et al.* (2001) und ZEPNIK *et al.* (2001) keine Hinweise auf eine Biotransformation von OTA durch GSTs gefunden werden.

In der hier durchgeführten Studie deutet sich ein möglicher Zusammenhang zwischen dem GST-Genotyp und der Ausprägung der DNA-Schäden an. Dieser Befund muss allerdings nicht zwingend auf einen GST-Metabolismus hindeuten, da das von einigen Autoren postulierte OTA-Glutathion-Konjugat (Malaveille *et al.* 1994, De Groen *et al.* 1995, SCHAAF *et al.* 2002) bisher weder *in vitro* noch *in vivo* nachgewiesen werden konnte. Wie in 5.3. beschrieben könnten genotoxische Effekte von OTA auf die Induktion von oxidativen Stress zurückzuführen sein. Für GSTM1 und GSTT1 konnte

eine enzymatische Aktivität gegenüber Phospholipid-Peroxiden nachgewiesen werden (HURST *et al.* 1998). Dies ließe den Schluss zu, dass GSTs die DNA vor einer Oxidation durch Lipid-Peroxide schützen, die endogen bei oxidativen Stress entstehen (SWEENEY *et al.* 2000).

5.4.3. N-Acetyltransferase 2

Der Einfluss der NAT2 wurde im Zusammenhang mit einem OTA-Metabolismus bisher noch nicht untersucht. OTA stellt im Grunde kein Substrat für die NAT2 dar. Dennoch scheint in dieser Studie der Acetylierer-Status einen Einfluss auf das Ausmaß des DNA-Schadens zu haben. Dies wäre nach einer GSH-Konjugation im Laufe des Mercaptursäure-Weges denkbar. Da die NAT2 im Urothel nur schwach exprimiert wird (KLOTH *et al.* 1994), könnte sich hier der Phänotyp des langsamen Acetylierers besonders stark bemerkbar machen. Ein verstärkter Abbau der GSH-Konjugate durch die β -Lyase könnte so vermehrt zu reaktiven Thiolen führen. In der bereits erwähnten Studie von MALAVEILLE *et al.* (1994) konnte durch Hemmung der β -Lyase die zytotoxische Wirkung von OTA herabgesetzt werden, jedoch nicht die genotoxische Wirkung. Aus dieser Beobachtung schlossen die Autoren auf die Bildung eines zytotoxischen Thiol-enthaltenden OTA-Derivates.

Neben den bereits diskutierten Enzymen wurde auch der Einfluss der Prostaglandin-H-Synthase (PHS) postuliert (PFOHL-LESZKOWICZ *et al.* 1993, OBRECHT-PFLUMIO *et al.* 1996). Gegen eine PHS-abhängige Bioaktivierung sprechen aber *in vitro* Befunde mit OSV-Zellen, die PHS in hohem Maße exprimieren (FREYBERGER *et al.* 1987, FOTH *et al.* 1992), in denen Indometazin die Genotoxizität von OTA verstärkte (DEGEN *et al.* 1997).

5.5. Fazit und Ausblick

Die in dieser Studie erzielten Ergebnisse sprechen eher gegen eine Bioaktivierung von OTA. Dabei stehen die Befunde, dass S9-Mix keinen bedeutenden Einfluss auf die Zytotoxizität und Genotoxizität von OTA hat, im Einklang mit ähnlichen Befunden anderer Studien. Ehrlich *et al.* (2002) konnten zeigen, dass OTA Mikrokerne in HepG2-Zellen induziert, wohingegen ein Ames-Test mit OTA und HepG2-Enzym-Homogenat

negativ war. Auch andere Autoren kamen im Ames-Test mit und ohne Zusatz verschiedener externer Enzymsysteme zu negativen Befunden (Kuczuk *et al.* 1978, Bartsch *et al.* 1980, Zepnik *et al.* 2001). Positive Befunde im Ames-Test konnten hingegen nur von HENNING *et al.* (1991) bei Verwendung eines mit OTA-präinkubierten Hepatozyten-Überstandes und von OBRECHT-PFLUMIO *et al.* (1999) mit Nierenmikrosomen als externes Metabolisierungs-System, gemacht werden. In vergleichbaren Versuchen konnten diese Ergebnisse aber nicht bestätigt werden (FÖLLMANN UND LUCAS 2003).

Ebenso konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass der CYP1A2 Genotyp keinen Einfluss auf die Ausprägung von DNA-Schäden im Comet-Assay hatte.

Der Genotyp der GSTs M1, T1 und P1 scheint hingegen das Ausmaß der Genotoxizität *in vitro* zu beeinflussen. Dieser Einfluss muss allerdings kein Hinweis auf eine Bioaktivierung von OTA sein, da GSTs auch eine protektive Wirkung gegen oxidativen Stress besitzen (SWEENEY *et al.* 2000).

Ebenso scheint der Acetylierer-Status einen Einfluss auf das Ausmaß des DNA-Schadens zu haben. Jedoch wäre in diesem Zusammenhang die Bildung eines OTA-Glutathion-Konjugates notwendig, das aber bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus muss aber auch beachtet werden, dass für die Genotypisierung nur eine geringe Anzahl an Proben untersucht wurden, so dass keine statistisch abgesicherten Ergebnisse erzielt werden konnten.

Neuere Befunde können mit einer Induktion von oxidativen Stress durch OTA assoziiert werden. OTA-Behandlung führte in Ratten zum Anstieg biologischer Marker für oxidativen Stress (GAUTIER *et al.* 2001b, MEKI UND HUSSEIN 2001) und es konnten oxidierte Basen im Comet Assay detektiert werden (JANZOWSKI *et al.* 2002, SCHAAF *et al.* 2002). Man weiß auch, dass OTA *in vitro* intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen beeinflusst (DOPP *et al.* 1999), mitochondriale Dysfunktion auslöst (Aleo *et al.* 1991) und Lipidoxidation fördern kann (OMAR *et al.* 1990, BAUDRIMONT *et al.* 1997). Sowohl ROS als auch Lipidperoxidationsprodukte können zu DNA-Schäden führen (MARNETT 2000).

Ein weiter Hinweis darauf, dass OTA oxidativen Stress auslöst, ist die Abnahme an GSH in Zellen, die mit OTA inkubiert wurden (GROSSE-STEINMEYER *et al.* 2002, Schaaf *et al.* 2002). Diese Befunde könnten auf eine schützende Wirkung von GSH beruhen.

GAUTIER *et al.* (2001b) konnten *in vivo* im Gegensatz zu *in vitro*-Ergebnissen keine Lipidoxidation oder oxidierte Basen nach OTA-Exposition finden. Jedoch wies eine erhöhte Expression des Häm-Oxygenase-1-Proteins und ein erniedrigter α -Tocopherol-Spiegel, beides frühe Marker für oxidativen Stress, auf die Entstehung von ROS hin. Die Autoren erklären die Diskrepanz zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Befunden unter anderem mit einer protektiven Wirkung von GSH *in vivo*. Ein besserer Schutz vor oxidativem Stress in PUBEC gegenüber den Zelllinien könnte auch eine Erklärung für die geringe Ausbildung von DNA-Schäden im Comet Assay sein. Des Weiteren schlossen die Autoren aus Identifikation früher Marker für oxidativen Stress, dass OTA auf einem direkten Weg oxidativen Stress induziert und dieser nicht auf unspezifische Mechanismen einer OTA-induzierten Zytotoxizität beruht.

Schließlich ließen sich auch DNA-Addukte auf die Entstehung von oxidativen Stress zurückführen. *In vivo* konnte eine ungewöhnlich hohe Anzahl an DNA-Addukten nach OTA Exposition gefunden werden (CASTEGNARO *et al.* 1998 PFOHL-LESZKOWICZ *et al.* 1998). Ähnliche Beobachtungen konnten bei Nagern gemacht werden, die mit Eisen(III)nitrilotriacetat exponiert wurden, einem Kanzerogen, das über oxidativem Stress wirkt, (RANDERATH *et al.* 1995). Ebenso führte *in vitro* der Zusatz von Aspirin (OBRECHT-PFLUMIO *et al.* 1996), Katalase, Superoxiddismutase, α -Tocopherol und den Vitaminen A, C und E (GROSSE *et al.* 1997) zu einer Reduktion von DNA-Addukt-Leveln, die auch aus Lipidperoxidationsprodukte entstanden sein könnten (MARNETT 2000).

Als eine Möglichkeit zur besseren Identifizierung von OTA-induzierten zellulären Läsionen würde sich in der Zukunft eine Analyse der Veränderung von Expressionsmustern anbieten. Auf diese Weise könnten Veränderungen in der Zelle aufgezeigt und zelluläre Angriffspunkte bestimmt werden. Auch böten sich dann bessere Möglichkeiten zelluläre Modulationen und Dosis-Wirkungsbeziehungen im Niedrig-Dosis-Bereich zu untersuchen.

Eine Aufklärung des Wirkungsmechanismus von OTA ist dabei nicht allein von akademischem Interesse, sondern im Hinblick auf die Identifizierung eines möglichen Schwellenwertes auch bewertungsrelevant.

6. Zusammenfassung

Das Mykotoxin Ochratoxin A (OTA), ein sekundäres Stoffwechselprodukt verschiedener Schimmelpilze der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium*, ist eine häufig auftretende Kontaminante von Nahrungsmitteln und Tierfutter. Beim Menschen gelangt mit der Nahrung aufgenommenes OTA über die Magen- und Darmschleimhaut ins Blut, wo es zu 99% an Plasmaproteine bindet. Die Ausscheidung erfolgt in der Niere über tubuläre Sekretion, die durch multispezifische organische Anionentransporter (OAT) vermittelt wird. Dabei kann OTA in allen Nephron-Segmenten wieder resorbiert werden, was zu einer Akkumulation im Nierengewebe führt.

Im Vordergrund der toxischen Wirkung von OTA steht seine Nephrotoxizität. OTA steht im Verdacht für die endemische Balkan-Nephropathie (BEN) aber auch für ein erhöhtes Risiko von Harntrakttumoren verantwortlich zu sein. Neben nephrotoxischen Effekten hat OTA kanzerogene, genotoxische, teratogene und immunotoxische Wirkungen. Auf zellulärer und molekularer Ebene konnten DNA-Schäden, Hemmung der Proteinbiosynthese, Hemmung der Atmung in Mitochondrien, Lipidoxidation und die Induktion von Apoptose nachgewiesen werden.

Die Vielzahl an Effekten und eine hohe Halbwertszeit des Toxins im Serum unterstreichen die Bedeutung von OTA für die menschliche Gesundheit.

Der mögliche Mechanismus, der für die Toxizität von OTA verantwortlich ist, konnte bisher nicht eindeutig aufgeklärt werden. Es steht zur Diskussion, dass entweder das OTA-Molekül selbst über Sekundärprozesse für die adversen Effekte verantwortlich ist, oder dass reaktive OTA-Metaboliten vorausgesetzt werden müssen, die durch einen oxidativen Metabolismus gebildet werden.

Um das zytotoxische und genotoxische Potential von OTA eingehend zu charakterisieren, wurden permanente Zelllinien aus der Niere (IHKE, MDCK) und der Harnblase (5637), sowie primäre Epithelzellen aus der Harnblase (PUBEC) im Neutralrot-Test und Comet Assay, mit und ohne externes Metabolisierungs-System (S9-Mix), eingesetzt. Dabei wurde der Einfluss der DNA-Reparatur untersucht und die Bedeutung der OTA-Aufnahme hinterfragt.

Im Neutralrot-Test konnte gezeigt werden, dass das zytotoxische Potential von OTA in den primären PUBEC stärker war als in den verwendeten Zelllinien. Dem gegenüber wurden in MDCK-, IHKE- und 5637-Zellen mehr DNA-Schäden nachgewiesen, was auf eine effektivere DNA-Reparatur in PUBEC zurückgeführt werden konnte.

Ein Einfluss von S9-Mix und damit eine mögliche Metabolisierung von OTA auf die Zytotoxizität oder Genotoxizität von OTA konnte nicht beobachtet werden.

Mit Hilfe von radioaktiv-markiertem OTA konnte gezeigt werden, dass neben Epithelzellen der Niere auch Epithelzellen der Blase in der Lage waren OTA zu akkumulieren. Unter neutralen und sauren pH-Bedingungen, sowie der Co-Inkubation mit Methotrexat im Comet Assay, konnte eine Beteiligung des Protonen-Dipeptid-Kotransporters und des oatp-Transporters an der Aufnahme von OTA nachgewiesen werden.

Im Hinblick auf eine potentielle Bioaktivierung von OTA wurde bestimmt, ob Polymorphismen der Fremdstoff-metabolisierenden Enzyme Cytochrom P450 1A2 (CYP1A2), Glutathion-S-Transferase (GST) M1, T1, P1 und N-Acetyltransferase 2 (NAT2) einen Einfluss auf die Ausprägung von DNA-Schäden haben. Es zeigte sich, dass Epithelzellkulturen aus humanen Harnleitern große interindividuelle Unterschiede in der Ausprägung von DNA-Schäden aufwiesen.

Ein CYP1A2-Polymorphismus des Gewebespenders hatte keinen Einfluss auf die Genotoxizität, während Polymorphismen der GSTs und der NAT2 die Ausprägung der DNA-Schäden durch OTA modulierten.

Die Ergebnisse dieser Studie deuten darauf hin, dass für die Ausprägung adverser Effekte eine Bioaktivierung von OTA nicht obligatorisch ist. Die Verwendung eines externen enzymatischen Metabolisierungssystems (S9-Mix) hatte weder Auswirkungen auf die Zytotoxizität noch auf die Genotoxizität von OTA.

Auch die verschiedenen CYP1A2-Genotypen zeigten keinen Einfluss auf die Ausprägung von DNA-Schäden durch OTA. Der Genotyp der GSTs scheint hingegen das Ausmaß der Genotoxizität zu beeinflussen. Dieser Einfluss muss allerdings nicht gezwungenermaßen als Hinweis auf eine Bioaktivierung von OTA gewertet werden, da durch GSTs eine Protektion gegen den durch OTA-induzierten oxidativen Stress ermöglicht wird. Auch der Acetylierer-Status hatte einen Einfluss auf das Ausmaß des DNA-Schadens. In diesem Zusammenhang wäre die Bildung eines OTA-Glutathion-Konjugates notwendig, das bisher allerdings noch nicht nachgewiesen wurde.

Diese Resultate deuten darauf hin, dass OTA nicht notwendigerweise metabolisiert werden muss, um adverse Effekte zu induzieren, sondern eher über sekundäre Mechanismen wie z.B. eine Induktion von oxidativen Stress oder Lipidperoxidation wirkt.

7. Literaturverzeichnis

Achanzar W E, Achanzar K B, Lewis J G, Webber M M, Waalkes M P (2000)
Cadmium induces c-myc, p53, and c-jun expression in normal human prostate epithelial cells as a prelude to apoptosis.
Toxicol Appl Pharmacol. 164(3):291-300

Adler I D, Ashby J, Wurgler F E (1989)
Screening for possible human carcinogens and mutagens: a symposium report.
Mutat Res. 213(1):27-39

Aleo M D, Wyatt R D, Schnellmann R G (1991)
Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules.
Toxicol Appl Pharmacol. 107:73-80

Appelgren L E, Arora R G (1983)
Distribution of ¹⁴C-labelled ochratoxin A in pregnant mice.
Food Chem. Toxicol. 21:563-568

Arlt V M, Pfohl-Leszkowicz A, Cosyns J, Schmeiser H H (2001)
Analyses of DNA adducts formed by ochratoxin A and aristolochic acid in patients with Chinese herbs nephropathy.
Mutat Res. 494(1-2):143-150

Ashby J, Tennant R W (1988)
Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP.
Mutat Res. 204(1):17-115

Ashby J, Tennant R W, Zeiger E, Stasiewicz S (1989)
Classification according to chemical structure, mutagenicity to Salmonella and level of carcinogenicity of a further 42 chemicals tested for carcinogenicity by the U.S. National Toxicology Program.
Mutat Res. 223(2):73-103

Atroshi F, Biese I, Saloniemi H, Ali-Vehmas T, Saari S, Rizzo A, Veijalainen P (2000)
Significance of apoptosis and its relationship to antioxidants after ochratoxin A administration in mice.
J Pharm Pharm Sci. 3(3):281-291

Autrup H, Grafstrom R C, Christensen B, Kieler J (1981)
Metabolism of chemical carcinogens by cultured human and rat bladder epithelial cells.
Carcinogenesis. 2(8):763-768

Bach P H, Gregg N J, Delacruz L (1991)
Relevance of a rat model of papillary necrosis and upper urothelial carcinoma in understanding the role of ochratoxin A in Balkan endemic nephropathy and its associated carcinoma.
Food Chem Toxicol. 30(3):205-211

- Bartsch H**, Malaveille C, Camus A M, Martel-Planche G, Brun G, Hautefeuille A, Sabadie N, Barbin A, Kuroki T, Drevon C, Piccoli C, Montesano R (1980)
Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 Chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems.
Mutat Res. 76(1):1-50
- Bartsch H**, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K (2000)
Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9(1):3-28
- Baudrimont I**, Murn M, Betbeder A M, Guilcher J, Creppy E E (1995)
Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats.
Toxicology. 95(1-3):147-154
- Baudrimont I**, Ahouandjivo R, Creppy E E (1997)
Prevention of lipid peroxidation induced by ochratoxin A in Vero cells in culture by several agents.
Chem Biol Interact. 104(1):29-40
- Bauer J**, Gareis M (1987)
Ochratoxin A in the food chain
Zentralbl Veterinarmed [B]. 134(8):613-627
- Bell D A**, Taylor J A, Paulson D F, Robertson C N, Mohler J L, Lucier G W (1993)
Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer.
J Natl Cancer Inst. 85(14):1159-1164
- Blum M**, Demierre A, Grant D M, Heim M, Meyer U A (1991)
Molecular mechanism of slow acetylation of drugs and carcinogens in humans.
Proc Natl Acad Sci U S A. 88(12):5237-5241
- Board P G**, Webb G C, Coggan M (1989)
Isolation of a cDNA clone and localization of the human glutathione S-transferase 3 genes to chromosome bands 11q13 and 12q13-14.
Ann Hum Genet. 53 (Pt 3):205-213
- Bönicke R**, Reif W (1953)
Enzymatische Inaktivierung von Isonicotinsaurehydrazid im menschlichen und tierischen Organismus.
Arch Exp Pathol Pharmacol. 220:321-333
- Boll M**, Herget M, Wagener M, Weber W M, Markovich D, Biber J, Clauss W, Murer H, Daniel H (1996)
Expression cloning and functional characterization of the kidney cortex high-affinity proton-coupled peptide transporter.
Proc Natl Acad Sci U S A. 93(1):284-289

- Bondy G S**, Armstrong C L (1998)
Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines.
Cell Biol Toxicol. 14(5):323-32
- Boyland E**, Chasseaud L F (1969)
The role of glutathione and glutathione S-transferases in mercapturic acid biosynthesis.
Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 32:173-219
- Bradford M M** (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem. 72:248-254
- Brockmoller J**, Kerb R, Drakoulis N, Staffeldt B, Roots I (1994)
Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study.
Cancer Res. 54(15):4103-4111
- Buechmann N B**, Hald B (1985)
Analysis, occurrence and control of ochratoxin A residues in Danish pig kidney.
Foods Addit Contam. 2, 193-199
- Butler M A**, Lang N P, Young J F, Caporaso N E, Vineis P, Hayes R B, Teitel C H, Massengill J P, Lawsen M F, Kadlubar F F (1992)
Determination of CYP1A2 and NAT2 phenotypes in human populations by analysis of caffeine urinary metabolites.
Pharmacogenetics. 2(3):116-127
- Cascorbi I**, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I (1995)
Arylamine N-acetyltransferase (NAT2) mutations and their allelic linkage in unrelated Caucasian individuals: correlation with phenotypic activity.
Am J Hum Genet. 57(3):581-592
- Cascorbi I**, Drakoulis N, Brockmoller J, Maurer A, Sperling K, Roots I (2000)
Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction.
Pharmacogenetics. 10(3):271-274
- Castegnaro M**, Mohr U, Pfohl-Leskowicz A, Esteve J, Steinmann J, Tillmann T (1998)
Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction.
Int J Cancer. 1998 Jul 3;77(1):70-75
- Ceovic S**, Hrabar A, Radonic M (1985)
An etiological approach to Balkan endemic nephropathy based on the investigation of two genetically different populations.
Nephron. 40(2):175-179

- Cereijido M**, Ehrenfeld J, Meza I, Martinez-Palomo A (1980)
Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells.
J Membr Biol. 52(2):147-159
- Chelkowski J**, Golinski P, Godlewska B, Radomyska, W (1989)
Reduktion of ochratoxin contamination in cereals by technological processing.
Przegląd Zbozowo-Młynarski 24(6), 6-7
- Chernozemsky I N** (1991)
Balkan endemic nephropathy and the associated tumours of the urinary system: a summary of epidemiological features in Bulgaria.
IARC Sci Publ. (115):3-4
- Chu F S** (1971)
Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin.
Archs Biochem Biophys. 147, 359-366
- Collins A R**, Dobson V L, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R (1997)
The comet assay: what can it really tell us?
Mutat Res. 375(2):183-193
- Cozzarelli N R** (1977)
The mechanism of action of inhibitors of DNA synthesis.
Annu Rev Biochem. 46:641-668
- Creppy E E**, Baudrimont I, Belmadani A, Betbeder A M (1996)
Aspartame as a preventive agent of chronic toxic effects of ochratoxin A in experimental animals.
Food Addit Contam. 1996;13 Suppl:51-122
- Creppy E E**, Kane A, Dirheimer G, Lafarge-Frayssinet C, Mousset S, Frayssinet C (1985)
Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single-strand break evaluation in spleen, liver and kidney.
Toxicol Lett. 28(1):29-35
- Creppy E E**, Rosenthaler R, Dirheimer G (1984)
Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine.
Food Chem Toxicol. 22(11):883-886
- Creppy E E**, Stormer FC, Rosenthaler R, Dirheimer G (1983)
Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxyochratoxin A and ochratoxin alpha, on immune response in mice.
Infect Immun. 39(3):1015-1018
- Dahlmann A**, Dantzler W H, Silbernagl S, Gekle M (1998)
Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms.
J Pharmacol Exp Ther. 286(1):157-162

- Degen G H**, Gerber M M, Obrecht-Pflumio S, Dirheimer (1997)
Induction of mikronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures.
Arch. Toxicol. 71(6):365-371
- De Groene E M**, Hassing I G, Blom M J, Seinen W, Fink-Gremmels J, Horbach G J (1996a)
Development of human cytochrome P450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A.
Cancer Res. 56(2):299-304
- De Groene E M**, Jahn A, Horbach G J, Fink-Gremmels J (1996b)
Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A.
Environ Toxicol Pharmacol. 1:21-26
- Dekant W**, Vamvakas S, Anders M W (1989)
Bioactivation of nephrotoxic haloalkenes by glutathione conjugation: formation of toxic and mutagenic intermediates by cysteine conjugate beta-lyase.
Drug Metab Rev. 20(1):43-83
- Deutsche Forschungsgemeinschaft** (Hrsg.) (1990)
Ochratoxin A – Vorkommen und toxikologische Bewertung. (Mitteilung XII der Senatskommission zur Prüfung von Lebensmittelzusatz- und Inhaltsstoffen)
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- Di Paolo N**, Guarnieri A, Garosi G, Sacchi G, Mangiarotti A M, Di Paolo M (1994)
Inhaled mycotoxins lead to acute renal failure.
Nephrol Dial Transplant. 9 Suppl 4:116-120
- Dirheimer G**, Creppy EE (1991)
Mechanism of action of ochratoxin A.
IARC Sci Publ. (115):171-186
- Dietrich D R**, O'Brien E, Stack M E, Heussner A H (2001)
Species- and sex-specific renal cytotoxicity of ochratoxin A and B in vitro.
Exp Toxicol Pathol. 53(2-3):215-225
- Dreger S**, O'Brien E, Stack M, Dietrich D (2000)
Antiproliferative effects and cell-cycle specific effects of ochratoxin A in LL-CPK1, NRK-52E and porcine primary proximal kidney cells.
Toxicologist 54: 170-173
- Dörenhaus A**, Flieger A, Golka K, Schulze H, Albrecht M, Degen G H, Föllmann W (2000)
Induction of unscheduled DNA synthesis in primary human urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A.
Toxicol Sci. 53(2):271-277
- Dörrenhaus A**, Föllmann W (1997)
Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells.
Arch Toxicol. 71(11):709-713

- Dopp E**, Muller J, Hahnel C, Schiffmann D (1999)
Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A.
Food Chem Toxicol. 37(7):713-721
- Eckhardt U**, Schroeder A, Stieger B, Hochli M, Landmann L, Tynes R, Meier P J, Hagenbuch B (1999)
Polyspecific substrate uptake by the hepatic organic anion transporter Oatp1 in stably transfected CHO cells.
Am J Physiol. 276(4 Pt 1):G1037-1042
- Ehrlich V**, Darroudi F, Uhl M, Steinkellner H, Gann M, Majer B J, Eisenbauer M, Knasmüller S (2002)
Genotoxic effects of ochratoxin A in human-derived hepatoma (HepG2) cells.
Food Chem Toxicol. 40(8):1085-1090
- El Adlouni C**, Pinelli E, Azemar B, Zaoui D, Beaune P, Pfohl-Leszkowicz (2000)
Phenobarbital increases DNA adduct and metabolites formed by ochratoxin A: role of CYP 2C9 and microsomal glutathione-S-transferase.
Environ Mol Mutagen. 35(2):123-131
- El-Kady I A**, El-Maraghy S S, Eman Mostafa M. (1995)
Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt.
Folia Microbiol (Praha). 40(3):297-300
- Elling F** (1979)
Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: alterations in enzyme activity in tubular cells.
Acta Pathol Microbiol Scand [A]. 87A(4):237-243
- Elling F**, Möller T (1973)
Mycotoxic nephropathy in pigs.
Bull World Health Organ. 49(4):411-418
- Evans D A** (1989)
N-acetyltransferase.
Pharmacol Ther. 42(2):157-234
- Fjellstedt T A**, Allen R H, Duncan B K, Jakoby W B (1973)
Enzymatic conjugation of epoxides with glutathione.
J Biol Chem. 248(10):3702-3707
- Föllmann W**, Lucas S (2003)
Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system.
Arch. Toxicol. 77(5): 298-308

Fogh J (1978)

Cultivation, characterization, and identification of human tumor cells with emphasis on kidney, testis, and bladder tumors.

Natl Cancer Inst Monogr. (49):5-9

Freyberger A, Schnitzler R, Schiffmann D, Degen G H (1987)

Prostaglandin-H-synthase competent cells derived from ram seminal vesicles: a tool for studying cooxidation of xenobiotics.

Mol Toxicol. 1(4):503-512

Galtier P, Charpenteau J L, Alvinerie M, Labouche C (1979)

The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration.

Drug Metab Dispos. 7(6):429-434

Garcia-Saez I, Parraga A, Phillips M F, Mantle T J, Coll M (1994)

Molecular structure at 1.8 Å of mouse liver class pi glutathione S-transferase complexed with S-(p-nitrobenzyl)glutathione and other inhibitors.

J Mol Biol. 237(3):298-314

Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P (1985)

Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK).

Am J Physiol. 248(4 Pt 2):F536-544

Gautier J, Richoz J, Welti DH, Markovic J, Gremaud E, Guengerich FP, Turesky RJ (2001)

Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes.

Chem Res Toxicol. 14(1):34-45

Gedek B (1980)

Kompodium der medizinischen Mykologie.

Parey Verlag, Berlin, Hamburg

Gekle M, Oberleithner H, Silbernagl S (1993)

Ochratoxin A impairs "postproximal" nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby canine kidney cells in vitro.

Pflugers Arch. 425(5-6):401-408

Gekle M, Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Wilflingseder D, Pollack V, Dander M, Schramek H (2000)

Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations.

J Pharmacol Exp Ther. 293(3):837-844

Gekle M, Wunsch S, Oberleithner H, Silbernagl S (1994)

Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties.

Pflugers Arch. 428(2):157-162

Gekle M, Silbernagl S (1994)

The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo: toxodynamic and toxokinetic aspects.

Ren Physiol Biochem. 17(1):40-49

Gekle M, Silbernagl S (1996)

Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach.

Kidney Blood Press Res. 9(5):225-235

Gillman I G, Clark T N, Manderville R A (1999)

Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage.

Chem Res Toxicol. 12(11):1066-1076

Godin M, Fillastre J P, Simon P, Francois A, Roy F L, Morin J P (1997)

Is ochratoxin a nephrotoxic in human beings?

Adv Nephrol Necker Hosp. 26:181-206

Golinski P, Hult K, Grabarkiewicz-Szczesna J, Chelkowski J, Kneblewski P, Szebiotko K (1984)

Mycotoxic porcine nephropathy and spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in kidneys and blood of Polish swine.

Appl Environ Microbiol. 47(6):1210-1212

Golka K, Prior V, Blaszkewicz M, Bolt H M (2002)

The enhanced bladder cancer susceptibility of NAT2 slow acetylators towards aromatic amines: a review considering ethnic differences.

Toxicol Lett. 128(1-3):229-241

Grosse Y, Baudrimont I, Castegnaro M, Betbeder A M, Creppy E E, Dirheimer G, Pfohl-Leskowicz A (1995)

Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells.

Chem Biol Interact. 95(1-2):175-187

Grosse Y, Monje M C, Macé K, Pfeifer A, Pfohl-Leskowicz (1997)

Use of bronchial epithelial cells expressing human cytochrom P450 for study on metabolism and genotoxicity of ochratoxin A.

In Vitro Toxicol. 10(1):93-102

Gross-Steinmeyer K, Weymann J, Hege H G, Metzler M (2002)

Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin a in cultured rat and human primary hepatocytes.

J Agric Food Chem. 50(4):938-945

Guengerich F P (1993)

The 1992 Bernard B. Brodie Award Lecture. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals.

Drug Metab Dispos. 21(1):1-6

- Guhe C**, Degen G H, Schuhmacher U S, Kiefer F, Föllmann W (1996)
Drug metabolizing enzyme activities in porcine urinary bladder epithelial cell cultures (PUBEC).
Arch Toxicol. 70(10):599-606
- Guhe C**, Föllmann W (1994)
Growth and characterization of porcine urinary bladder epithelial cells in vitro.
Am J Physiol. 266(2 Pt 2):298-308
- Habig W H**, Pabst M J, Jakoby W B (1974)
Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation.
J Biol Chem. 249(22):7130-7139
- Hagelberg S**, Hult K, Fuchs R (1989)
Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties.
J Appl Toxicol. 9(2):91-96
- Hallier E**, Deutschmann S, Reichel C, Bolt H M, Peter H (1990)
A comparative investigation of the metabolism of methyl bromide and methyl iodide in human erythrocytes.
Int Arch Occup Environ Health. 62(3):221-225
- Hamilton P B**, Huff W E, Harris J R, Wyatt R D (1982)
Natural occurrences of ochratoxicosis in poultry.
Poult Sci. 61(9):1832-1841
- Hammons GJ**, Milton D, Stepps K, Guengerich FP, Tukey RH, Kadlubar FF.
Metabolism of carcinogenic heterocyclic and aromatic amines by recombinant human cytochrome P450 enzymes.
Carcinogenesis. 1997 Apr;18(4):851-854
- Harries L W**, Stubbins M J, Forman D, Howard G C, Wolf C R (1997)
Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer.
Carcinogenesis. 18(4):641-644
- Hasinoff B B**, Rahimtula A D, Omar R F (1990)
NADPH-cytochrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron(III)-ochratoxin A complex.
Biochim Biophys Acta. 1036(1):78-81
- Hayes J D**, Pulford D J (1995)
The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.
Crit Rev Biochem Mol Biol. 30(6):445-600

- Henning A**, Fink-Gremmels J & Leistner L (1991)
Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation.
In: Castegnaro M, Plestina R, Dirheimer G, Chernozemsky I N & Bartsch H, eds, *Mykotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Trakt Tumours* (IARC Scientific Publications No. 115), Lyon: IARC Press, pp. 255-260
- Heussner A H**, O'Brien E, Dietrich D R (2002)
Species- and sex-specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins in vitro.
Exp Toxicol Pathol. 54(2):151-159
- Hickman D**, Palamanda J R, Unadkat J D, Sim E (1995)
Enzyme kinetic properties of human recombinant arylamine N-acetyltransferase 2 allotypic variants expressed in *Escherichia coli*.
Biochem Pharmacol. 50(5):697-703
- Hirsch J R**, Meyer M, Magert H J, Forssmann W G, Mollerup S, Herter P, Weber G, Cermak R, Ankorina-Stark I, Schlatter E, Kruhoffer M (1999)
cGMP-dependent and -independent inhibition of a K⁺ conductance by natriuretic peptides: molecular and functional studies in human proximal tubule cells.
J Am Soc Nephrol. 10(3):472-480
- Hirvonen A** (1999)
Polymorphic NATs and cancer predisposition.
IARC Sci Publ. (148):251-270
- Horai Y**, Ishizaki T (1988)
N-acetylation polymorphism of dapsone in a Japanese population.
Br J Clin Pharmacol. 25(4):487-494
- Hoehler D**, Marquardt R R, McIntosh A R, Xiao H (1996)
Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*).
J Biol Chem. 271(44):27388-27394
- Hong J T**, Park K L, Han S Y, Park K S, Kim H S, Oh S D, Lee R D, Jang S J (2000)
Effects of ochratoxin A on cytotoxicity and cell differentiation in cultured rat embryonic cells.
J Toxicol Environ Health A. 61(7):609-621
- Hurst R**, Bao Y, Jemth P, Mannervik B, Williamson G (1998)
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase activity of human glutathione transferases.
Biochem J. 332 (Pt 1):97-100
- IARC** (1993)
Ochratoxin A. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risks to humans: Some naturally occurring substances. Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.
International Agency for Research on Cancer, Geneva Vol. 56. pp. 26-32

- Ilett K F**, Kadlubar F F, Minchin R F (1999)
1998 International Meeting on the Arylamine N-Acetyltransferases: synopsis of the workshop on nomenclature, biochemistry, molecular biology, interspecies comparisons, and role in human disease risk.
Drug Metab Dispos. 27(9):957-959
- INVITOX** (1992)
The frame neutral red release assay
Invitox protocol. 54, INVITOX, Nottingham, England
- Jacquemin E**, Hagenbuch B, Stieger B, Wolkoff A W, Meier P J (1994)
Expression cloning of a rat liver Na(+)-independent organic anion transporter.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91(1):133-137
- Jakoby W B** (1978)
The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins.
Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 46:383-414
- Janzkowski C**, Kamp H G, Schlatter J, Eisenbrand G (2002)
The mycotoxin ochratoxin A induces oxidative damage in mammalian cells.
Proceedings of the American Association for Cancer Research 43:867
- Jelinek C F**, Pohland A E, Wood G E (1989)
Worldwide Occurrence of Mykotoxins in Foods and Feeds – An Update.
J. A. O. A. C. 72:223-230
- Jessen H**, Roigaard H, Riahi-Esfahani S, Jacobsen C (1994)
A comparative study on the uptake of alpha-aminoisobutyric acid by normal and immortalized human embryonic kidney cells from proximal tubule.
Biochim Biophys Acta. 1190(2):279-288
- Jung K Y**, Takeda M, Kim D K, Tojo A, Narikawa S, Yoo B S, Hosoyamada M, Cha S H, Sekine T, Endou H (2001)
Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters.
Life Sci. 69(18):2123-2135
- Kalow W**, Tang B K (1991)
Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities.
Clin Pharmacol Ther. 50(5 Pt 1):508-519
- Kane A**, Creppy E E, Roth A, Rösenthaller R, Dirkheimer G (1976)
Distribution of the (3)-label from low doses of radioactive Ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strang breaks caused in liver and kidneys.
Arch Toxicol. 58, 219-224
- Kasel U**, Wichmann, G, Bleck M (1999)
Ochratoxin A in Hausstaub.
Umweltmed. Forsch. Prax. 4, 301-303

- Kato Y**, Kuge K, Kusuhara H, Meier P J, Sugiyama Y (2002)
Gender difference in the urinary excretion of organic anions in rats.
J Pharmacol Exp Ther. 302(2):483-489
- Kempkes M**, Golka K, Reich S, Reckwitz T, Bolt H M (1996)
Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null genotypes as potential risk factors for urothelial cancer of the bladder.
Arch Toxicol. 71(1-2):123-126
- Kilbane A J**, Petroff T, Weber W W (1991)
Kinetics of acetyl CoA: arylamine N-acetyltransferase from rapid and slow acetylators human liver.
Drug Metab Dispos. 19(2):503-507
- Kim W J**, Kakehi Y, Yoshida O (1997)
Multifactorial involvement of multidrug resistance-associated [correction of resistance] protein, DNA topoisomerase II and glutathione/glutathione-S-transferase in nonP-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human bladder cancer cells.
Int J Urol. 4(6):583-590
- Kitabatake N**, Doi E, Trivedi A B (1993)
Toxicity evaluation of the mycotoxins, citrinin and ochratoxin A, using several animal cell lines.
Comp Biochem Physiol C. 105(3):429-433
- Kloth M T**, Gee R L, Messing E M, Swaminathan S (1994)
Expression of N-acetyltransferase (NAT) in cultured human uroepithelial cells.
Carcinogenesis. 15(12):2781-2787
- Ko Y**, Koch B, Harth V, Sachinidis A, Thier R, Vetter H, Bolt H M, Brüning T (2000)
Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction.
Pharmacogenetics. (3):271-274
- Kontaxi M**, Eckhardt B, Hagenbuch B, Stieger B, Meier P J, Petzinger E (1996)
Uptake of the mycotoxin ochratoxin A in liver cells occurs via the cloned organic anion transporting polypeptid.
J Pharmacol Exp Ther. 279(3):1507-1513
- Krogh P**, Hald B, Pedersen E J (1973)
Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy.
Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol. 1973 81(6):689-695
- Krogh P**, Hald B, Plestina R, Ceovic S (1977)
Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs.
Acta Pathol Microbiol Scand [B]. 85(3):238-240

- Kuczuk M H**, Benson P M, Heath H, Hayes A W (1978)
Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*.
Mutat Res. 53(1):11-20
- Kuiper-Goodman T** (1996)
Risk assessment of ochratoxin A: an update.
Food Addit Contam. 13 Suppl:53-57
- Kuiper-Goodman T**, Scott P M (1989)
Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A.
Biomed Environ Sci. 2(3):179-248
- Kumagai S**, Aibara K (1982)
Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat.
Toxicol Appl Pharmacol. 64(1):94-102
- Kuramochi G**, Gekle M, Silbernagl S (1997a)
Derangement of pH homeostasis in the renal papilla: ochratoxin A increases pH in vasa recta blood.
Nephron. 1997;76(4):472-476
- Kuramochi G**, Gekle M, Silbernagl S (1997b)
Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta.
Pflugers Arch. 434(4):392-397
- Le Tutour B**, Tantaoui-Hlaraki A, Ihlal, L (1983)
Simultaneous detection of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in olive oil.
J Am Oil Chem. Soc. 60, 835-837
- Leier I**, Hummel-Eisenbeiss J, Cui Y, Keppler D (2000)
ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2.
Kidney Int. 57(4):1636-1642
- Leonhardt H** (1984)
Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen.
7. überarbeitete Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Lewis C W**, Smith J E, Anderson J G, Freshney R I (1999)
Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression using the MTT bioassay.
Mycopathologia. 148(2):97-102
- Li A P**, Reith M K, Rasmussen A, Gorski J C, Hall S D, Xu L, Kaminski D L, Cheng L K (1997)
Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure-activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin.
Chem Biol Interact. 107(1-2):17-30

Lin J H, Lu A Y (1998)

Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications.
Clin Pharmacokinet. 35(5):361-390

Maaroufi K, Zakhama A, Baudrimont I, Achour A, Abid S, Ellouz F, Dhouib S,
Creppy E E, Bacha H (1999)

Karyomegaly of tubular cells as early stage marker of the nephrotoxicity induced by
ochratoxin A in rats.
Hum Exp Toxicol. 18(6):410-415

Mace K, Bowman E D, Vautravers P, Shields P G, Harris C C, Pfeifer A M (1998)
Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial
mucosa and peripheral lung tissues.

Eur J Cancer. 34(6):914-920

MacLeod S, Sinha R, Kadlubar F F, Lang N P (1997)

Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 influence the in vivo function of CYP1A2.
Mutat Res. 376(1-2):135-142

Major P P, Egan E M, Herrick D J, Kufe D W (1982)

Effect of ARA-C incorporation on deoxyribonucleic acid synthesis in cells.
Biochem Pharmacol. 31(18):2937-2940

Malaveille C, Brun G, Bartsch H (1994)

Structure-activity studies in E. coli strains on ochratoxin A (OTA) and its analogues
implicate a genotoxic free radical and a cytotoxic thiol derivative as reactive
metabolites.

Mutat Res. 307(1):141-147

Mannervik B, Alin P, Guthenberg C, Jansson H, Tahir M K, Warholm M, Jornvall H
(1985)

Identification of three classes of cytosolic glutathione transferase common to several
mammalian species: correlation between structural data and enzymatic properties.

Proc Natl Acad Sci U S A. 82(21):7202-7206

Mannervik B, Danielson U H (1988)

Glutathione transferases - structure and catalytic activity.

CRC Crit Rev Biochem. 23(3):283-337

Markovic B (1985)

Balkan nephropathy and transitional cell carcinoma. Pathogenetic problems and the
early phase of cancerogenesis

J Urol (Paris). 91(4):215-220

Marnett L J (2000)

Oxyradicals and DNA damage.

Carcinogenesis. 21(3):361-370

Mayne L V (1984)

Inhibitors of DNA synthesis (aphidicolin and araC/HU) prevent the recovery of RNA synthesis after UV-irradiation.

Mutat Res. 131(5-6):187-191

Meisner H (1976)

Energy-dependent uptake of ochratoxin A by mitochondria.

Arch Biochem Biophys. 173(1):132-140

Meisner H, Chan S (1974)

Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems.

Biochemistry. 13(14):2795-2800

Meki A R, Hussein A A (2001)

Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney.

Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 130(3):305-313

Melick W F, Naryka J J, Kelly R E (1971)

Bladder cancer due to exposure to para-aminobiphenyl: a 17-year followup.

J Urol. 106(2):220-226

Merwe K J van der, Steyn P S, Fourie L (1965)

The constitution of ochratoxin A, B and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh., Mycotoxins Part II.

J Chem Soc. 7083-7088

Meyer D J, Coles B, Pemble S E, Gilmore K S, Fraser G M, Ketterer B (1991)

Theta, a new class of glutathione transferases purified from rat and man.

Biochem J. 274 (Pt 2):409-414

Meyer D J, Thomas M (1995)

Characterization of rat spleen prostaglandin H D-isomerase as a sigma-class GSH transferase.

Biochem J. 311 (Pt 3):739-742

Micco C, Grossi M, Miraglia M, Brera C (1989)

A study of the contamination by ochratoxin A of green and roasted coffee beans.

Food Addit. Contam. 6, 333-339

Nelson D R, Koymans L, Kamataki T, Stegeman J J, Feyereisen R, Waxman D J, Waterman M R, Gotoh O, Coon M J, Estabrook R W, Gunsalus I C, Nebert D W (1996)
P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature.

Pharmacogenetics. 6(1):1-42

Nicolov I G, Chernozemsky I N, Petkova-Bocharova T, Stoyanov I S, Stoichev I I (1978)

Epidemiologic characteristics of urinary system tumors and Balkan nephropathy in an endemic region of Bulgaria.

Eur J Cancer. 14(11):1237-1242

- Obrecht-Pflumio S**, Grosse Y, Pfohl-Leszkowicz A, Dirheimer G (1996)
Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney.
Arch Toxicol. 70(3-4):244-248
- Obrecht-Pflumio S**, Chassat T, Dirheimer G, Marzin D (1999)
Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes.
Mutat Res. 446(1):95-102
- Obrecht-Pflumio S**, Dirheimer G (2001)
Horseradish peroxidase mediates DNA and deoxyguanosine 3'-monophosphate adduct formation in the presence of ochratoxin A.
Arch Toxicol. 75(10):583-590
- O'Brien E**, Heussner A H, Dietrich D R (2001)
Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B.
Toxicol Sci. 63(2):256-264
- Olive C**, Board P (1994)
Glutathione S-conjugate transport by cultured human cells.
Biochim Biophys Acta. 1224(2):264-268
- Omar R F**, Hasinoff BB, Mejilla F, Rahimtula AD (1990)
Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation.
Biochem Pharmacol. 40(6):1183-1191
- Omar R F**, Gelbion H V, Rahimtula A D (1996)
Effect of cytochrome P450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A
Biochem Pharmacol. 51(3):207-216
- Payen J**, Girad T, Gaillardin M, Lafont P (1983)
About contamination of beers by mycotoxins.
Microbiol Alim Nutr. 1, 143-146
- Paxton J W** (1984)
Pharmacogenetic polymorphism of drug metabolism.
N Z Med J. 97(762):567-569
- Pemble S**, Schroeder K R, Spencer S R, Meyer D J, Hallier E, Bolt H M, Ketterer B, Taylor J B (1994)
Human glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism.
Biochem J. 300 (Pt 1):271-276
- Peter H**, Deutschmann S, Reichel C, Hallier E (1989)
Metabolism of methyl chloride by human erythrocytes.
Arch Toxicol. 63(5):351-355

- Pfohl-Leszkowicz A**, Chakor K, Creppy EE, Dirheimer G (1991)
DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A.
IARC Sci Publ. (115):245-253
- Pfohl-Leszkowicz A**, Grosse Y, Kane A, Creppy EE, Dirheimer G (1993)
Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A.
Mutat Res. 289(2):265-273
- Pfohl-Leszkowicz A**, Pinelli E, Bartsch H, Mohr U, Castegnaro M (1998)
Sex- and stain-specific expression of cytochrom P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats.
Molecular Carcinogenesis 23:76-85
- Pflüger K H**, Probeck H D, Adler G, Stach-Machado D, Kapmeyer H, Havemann K (1986)
Karyotype and ultrastructure of a colony stimulating factor (CSF) producing cell line (5637) originated from a carcinoma of the human urinary bladder.
Blut. 53(2):89-100
- Quentmeier H**, Zaborski M, Drexler H G (1997)
The human bladder carcinoma cell line 5637 constitutively secretes functional cytokines.
Leuk Res. 21(4):343-350
- Randerath K**, Randerath E, Smith C V, Chang J (1995)
Intensification and depletion of specific bulky renal DNA adducts (I-compounds) following exosure of male F344 rats to the renal carcinogen ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA).
Mutat Res. 341:265-279
- Rasonyi T** (1995)
Mechanistic investigations in ochratoxin A-induced nephrotoxicity and their relevance for the sex-specific renal tumor induction in rats.
Thesis, ETH, University of Zürich Diss. ETH No. 11343
- Rasonyi T**, Schlatter J, Dietrich D R (1999)
The role of alpha2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats.
Toxicol Lett. 104(1-2):83-92
- Rebbeck T R** (1997)
Molecular epidemiology of the human glutathione S-transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 6(9):733-743
- Rendic S**, Di Carlo F J (1997)
Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors.
Drug Metab Rev. 29(1-2):413-580

- Reznikoff C A**, Johnson M D, Norback D H, Bryan G T (1983)
Growth and characterization of normal human urothelium in vitro.
In Vitro. 19(4):326-343
- Richardson J C**, Scalera V, Simmons N L (1981)
Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments.
Biochim Biophys Acta. 673(1):26-36
- Roberts B J** (1997)
Evidence of proteasome-mediated cytochrome P-450 degradation.
J Biol Chem. 272(15):9771-9778
- Rosner H**, Bresch H, Cholmakow-Bodechtel C, Engel G, Gareis M, Majerus P, Wolff J, Peiker G, Rohrmann B (1998)
Ochratoxin-A-Gehalt in Serumproben der deutschen Bevölkerung.
Infektionsepidemiologische Forschung II/98: 11-12
- Roth A**, Chakor K, Creppy E E, Kane A, Rosenthaler R, Dirheimer G (1988)
Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice.
Toxicology. 48(3):293-308
- Ruck A**, Jakobson E, Bjorkman S, Paulie S (1994)
Adaptation of human bladder carcinoma cell lines to serum-free growth. Evidence for autocrine growth stimulation.
Anticancer Res. 14(1A):55-60
- Sabatini S**, Kurtzman N A (1989)
Vanadate stimulates the N-ethylmaleimide-sensitive adenosine triphosphatase in rat nephron.
J Pharmacol Exp Ther. 250(2):529-533
- Sachse C**, Brockmoller J, Bauer S, Roots I (1999)
Functional significance of a C-->A polymorphism in intron 1 of the cytochrome P450 CYP1A2 gene tested with caffeine.
Br J Clin Pharmacol. 47(4):445-449
- Schaaf G J**, Nijmeijer S M, Maas R F, Roestenberg P, de Groene E M, Fink-Gremmels J (2002)
The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells.
Biochim Biophys Acta. 1588(2):149-158
- Schmider J**, Brockmoller J, Arold G, Bauer S, Roots I (1999)
Simultaneous assessment of CYP3A4 and CYP1A2 activity in vivo with alprazolam and caffeine.
Pharmacogenetics. 9(6):725-734
- Scheuer R**, Leistner L (1985)
Occurrence of ochratoxin A in pork and pork products. Proc. of the European Meeting of Meat Res Workers. No. 32, Vol.1, 4:2, 191

Schmidt H L (1989)

Zur Häufigkeitsverteilung der Keimzahlen beim Futtergetreide sowie zur mikrobiellen Befallsituation beim Hafer.

Landwirtsch Forsch. 42, 20-28

Schuh M, Schweighardt H (1981)

Ochratoxin A: ein nephrotoxisch wirkendes Mykotoxin.

Übers Tierernährung 9, 33-70

Schweighardt H, Leibetseder J (1981)

Nachweis von Mycotoxinen mittels HPLC.

Wiener Tierärztl Wochenschr. 68, 302-305

Schwerdt G, Bauer K, Gekle M, Silbernagl S (1996)

Accumulation of ochratoxin A in rat kidney in vivo and in cultivated renal epithelial cells in vitro.

Toxicology. 18;114(3):177-185

Schwerdt G, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S, Gekle M (1999a)

The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells.

Cell Biol Toxicol. 15(6):405-415

Schwerdt G, Freudinger R, Silbernagl S, Gekle M (1999b)

Ochratoxin A-induced changes in the expression of the p53 tumor suppressor protein in cells of the human proximal tubule.

Proceedings 21st Mycotoxin-Workshop, Jena 239-244

Schwerdt G, Gekle M, Freudinger R, Mildenerger S, Silbernagl S (1997)

Apical-to-basolateral transepithelial transport of Ochratoxin A by two subtypes of Madin-Darby canine kidney cells.

Biochim Biophys Acta. 1324(2):191-199

Schwerdt G, Freudinger R, Silbernagl S, Gekle M (1998)

Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A into Madin-Darby canine kidney cells.

Toxicology. 131(2-3):193-202

Seidegard J, Vorachek W R, Pero R W, Pearson W R (1988)

Hereditary differences in the expression of the human glutathione transferase active on trans-stilbene oxide are due to a gene deletion.

Proc Natl Acad Sci U S A. 85(19):7293-7297

Seegers J C, Bohmer L H, Kruger M C, Lottering M L, de Kock M (1994)

A comparative study of ochratoxin A-induced apoptosis in hamster kidney and HeLa cells.

Toxicol Appl Pharmacol. 129(1):1-11

Shelby M D (1988)

The genetic toxicity of human carcinogens and its implications.

Mutat Res. 204(1):3-15

- Singh S V**, Ahmad H, Krishan A (1990)
Expression of glutathione-related enzymes in human bladder cancer cell lines.
Biochem Pharmacol. 39(11):1817-1820
- Singh N P**, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L (1988)
A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.
Exp Cell Res. 175(1):184-191
- Sokol P P**, Ripich G, holohan P D, Ross C R (1988)
Mechanism of ochratoxin A transport in kidney.
J Pharmacol Exp Ther. 246(2):460-465
- Stein A F**, Geerling S, Mollenhauer H H, Kubena L F, Heidelbaugh N D, Phillips T D (1984)
Effects of ochratoxin A in the partially nephrectomized rat.
J Toxicol Environ Health. 14(4):535-550
- Stetina R**, Votava M (1986)
Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B₁ in cell lines CHO and AWRP
Folia biologica (Praha) 32:128-143
- Studer-Rohr J** (1995)
Ochratoxin A in humans: exposure, kinetics and risk assesment.
PhD Thesis. no. 11701. ETH Zürich. Schweiz
- Stojkovic R**, Hult K, Gamulin S, Plestina R (1984)
High affinity binding of ochratoxin A to plasma constitutes.
Biochem. Int. 9, 33-38
- Storen O**, Holm H, Stormer F C (1982)
Metabolism of ochratoxin A by rats.
Appl Environ Microbiol. 44(4):785-789
- Stormer F C**, Hansen C E, Pedersen J I, Hvistendahl G, Aasen A J (1981)
Formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by liver microsomes from various species.
Appl Environ Microbiol. 42(6):1051-1056
- Suzuki S**, Satoh T, Yamazaki M (1977)
The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats.
Jpn J Pharmacol. 27(5):735-744
- Swaminathan S**, Reznikoff C A (1992)
Metabolism and nucleic acid binding of N-hydroxy-4-acetylamino-biphenyl and N-acetoxy-4-acetylamino-biphenyl by cultured human uroepithelial cells.
Cancer Res. 52(12):3286-3294

- Sweeney C**, Farrow D C, Schwartz S M, Eaton D L, Checkoway H, Vaughan T L (2000)
Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms as risk factors for renal cell carcinoma: a case-control study.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 9(4):449-454
- Takeuchi A**, Masuda S, Saito H, Abe T, Inui K (2001)
Multispecific substrate recognition of kidney-specific organic anion transporters OAT-K1 and OAT-K2.
J Pharmacol Exp Ther. 299(1):261-267
- Tamai I**, Tomizawa N, Takeuchi T, Nakayama K, Higashida H, Tsuji A (1995)
Functional expression of transporter for beta-lactam antibiotics and dipeptides in *Xenopus laevis* oocytes injected with messengerRNA from human, rat and rabbit small intestines.
J Pharmacol Exp Ther. 273(1):26-31
- Tanaka H**, Kaneko T (1992)
Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparisons between human granulocyte colony-stimulating factor purified from human bladder carcinoma cell line 5637 culture medium and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor produced in *Escherichia coli*.
J Pharmacol Exp Ther. 262(1):439-444
- Tice R R**, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J C, Sasaki Y F (2000)
Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.
Environ Mol Mutagen. 35(3):206-221
- Tveito G**, Hansteen I L, Dalen H, Haugen A (1989)
Immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel(II).
Cancer Res. 49(7):1829-1835
- Valentich J D** (1981)
Morphological similarities between the dog kidney cell line MDCK and the mammalian cortical collecting tubule.
Ann N Y Acad Sci. 372:384-405
- Vatsis K P**, Weber W W, Bell D A, Dupret J M, Evans D A, Grant D M, Hein D W, Lin H J, Meyer U A (1995)
Nomenclature for N-acetyltransferases.
Pharmacogenetics. 5(1):1-17
- Vermeulen, N P E** (1996)
role of metabolism in chemical toxicity.
in Ioannides, C (Hrsg.) *Cytochromes P450: metabolic and toxicological aspects.*
CRC Press. Boca Raton, USA: 29-54

- Vinson R K**, Hales B F (2002)
Expression and activity of the DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase during organogenesis in the rat conceptus and following methotrexate exposure in vitro.
Biochem Pharmacol. 64(4):711-721
- Weber W W**, Cohen S N (1969)
The mechanism of isoniazid acetylation by human N-acetyltransferase.
Biochim Biophys Acta. 151(1):276-278
- Weber W W**, Hein D W (1985)
N-acetylation pharmacogenetics.
Pharmacol Rev. 37(1):25-79
- Wibel FA**, Dommermuth A, Thier R (1999)
The hereditary transmission of the glutathione transferase hGSTT1-1 conjugator phenotype in a large family.
Pharmacogenetics. 9(2):251-256
- Wolff J**, Richter W I F (1992)
Ochratoxin A in Getreide.
Getreide, Mehl und Brot 46, 355-359
- Wood G M**, Patel S, Entwisle A C, Williams A C, Boenke A, Farnell P J (1997)
Ochratoxin A in wheat: certification of two reference materials.
Food Addit Contam. 14(3):237-48
- Wong L L** (1998)
Cytochrome P450 monooxygenases.
Curr Opin Chem Biol. 2(2):263-268
- Xiao H**, Madhyastha S, Marquardt R R, Li S, Vodela J K, Frohlich A A, Kemppainen B W (1996)
Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships.
Toxicol Appl Pharmacol. 137(2):182-192
- Young J F**, Kadlubar F F (1982)
A pharmacokinetic model to predict exposure of the bladder epithelium to urinary N-hydroxyarylamine carcinogens as a function of urine pH, voiding interval, and resorption.
Drug Metab Dispos. 10(6):641-644
- Zepnik H**, Pahler A, Schauer U, Dekant W (2001)
Ochratoxin A-induced tumor formation: is there a role of reactive ochratoxin A metabolites?
Toxicol Sci. 59(1):59-67

Zimniak P, Nanduri B, Pikula S, Bandorowicz-Pikula J, Singhal S S, Srivastava S K, Awasthi S, Awasthi Y C (1994)
Naturally occurring human glutathione S-transferase GSTP1-1 isoforms with isoleucine and valine in position 104 differ in enzymic properties.
Eur J Biochem. 224(3):893-899

Zingerle M, Silbernagl S, Gekle M (1997)
Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo.
J Pharmacol Exp Ther. 280(1):220-224

8. Anhang

Abb. 8-1: Einverständniserklärung für die Urologische Klinik

Prof. Dr. med. Harald Schulze
Direktor der Urologischen Klinik, Städtische Kliniken, Westfalendamm 403, D-44143 Dortmund
Telefon 0231/4509 - 460, - 470; Telefax 0231/4509 - 467

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient!

Die Behandlung von Erkrankungen der Nieren, der Harnblase und der Vorsteherdrüse (Prostata) ist bereits gut erforscht. Bezüglich der zugrunde liegenden Ursachen dieser Erkrankungen sind jedoch noch viele Fragen offen.

Wir möchten Sie hiermit sehr herzlich bitten, uns Ihr Einverständnis für wissenschaftliche Untersuchungen an dem wegen Ihrer Erkrankung operativ entfernten Organ sowie an einer Blutprobe zu geben. Ziel der von unserer Klinik gemeinsam mit dem Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund durchgeführten Untersuchungen ist es, Ursachen für Erkrankungen von Niere, Harnblase und Vorsteherdrüse (Prostata) zu erkennen.

Ihre Entscheidung für oder gegen die Teilnahme an dieser wissenschaftlichen Untersuchung hat keinerlei Einfluß auf die Behandlung Ihrer Erkrankung. Selbstverständlich bleibt bei diesen Untersuchungen die ärztliche Schweigepflicht bzw. der Datenschutz gewahrt.

Mit freundlichen Grüßen



Prof. Dr. med. Schulze
Direktor der Klinik

Einverständniserklärung

Ich bin mit den zusätzlichen Untersuchungen an Gewebsproben des wegen meiner Erkrankung entfernten Organs sowie an einer Blutprobe

nicht einverstanden einverstanden

Dortmund, den _____

(Unterschrift)

Abb. 8-2: Auswertebogen

	Restriktionsenzym mit Mutationstabelle für NAT 2													
	PCR A						PCR B							
	Msp 1		Fok 1		Dde 1		Kpn 1		Taq 1		Dde 1		BamH 1	
	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu
Fragment- längen (bp)	181 168 93	274 168	337 105	442	221 163 58	189 32 163 58	424 135	559	170 226 21 142	396 21 142	124 90 345	97 27 90 345	515 44	559
Probe	gefundene DNA-Fragmente													

Abb. 8-3: Auswerteschablone

	Restriktionsenzym mit Mutationstabelle für NAT 2													
	PCR A						PCR B							
	Msp 1		Fok 1		Dde 1		Kpn 1		Taq 1		Dde 1		BamH 1	
	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu	wt	mu
Fragment- längen (bp)	181 168 93	274 168	337 105	442	221 163 58	189 32 163 58	424 135	559	170 226 21 142	396 21 142	124 90 345	97 27 90 345	515 44	559
Allel	Fragmentlängen-Kombination													
NAT2*4	X		X		X		X		X		X		X	
NAT2*5A	X		X			O		O	X		X		X	
NAT2*5B	X		X			O		O	X			O	X	
NAT2*5C	X		X			O	X		X			O	X	
NAT2*5D	X		X			O	X		X		X		X	
NAT2*5E	X		X			O	X			O	X		X	
NAT2*6A	X			O	X		X			O	X		X	
NAT2*6B	X		X		X		X			O	X		X	
NAT2*6C	X			O	X		X			O		O	X	
NAT2*7A	X		X		X		X		X		X			O
NAT2*7B	X			O	X		X		X		X			O
NAT2*12A	X		X		X		X		X			O	X	
NAT2*12B	X			O	X		X		X			O	X	
NAT2*12C	X		X		X			O	X			O	X	
NAT2*13	X			O	X		X		X		X		X	
NAT2*14A		O	X		X		X		X		X		X	
NAT2*14B		O		O	X		X		X		X		X	

Abb: 8-4: Humane NAT2 Allele (Stand 06.04.2001)

Allel*	Nukleotidaustaus	Phänotyp
NAT2*4	kein	schnell
NAT2*5A	341 T>C 481 C>T	langsam
NAT2*5B	341 T>C 481 C>T 803 A>G	langsam
NAT2*5C	341 T>C 803 A>G	langsam
NAT2*5D	341 T>C	langsam
NAT2*5E	341 T>C 590 G>A	langsam
NAT2*6A	282 C>T 590 G>A	langsam
NAT2*6B	590 G>A	langsam
NAT2*6C	282 C>T 590 G>A 803 A>G	langsam
NAT2*7A	857 G>A	langsam
NAT2*7B	282 C>T 857 G>A	langsam
NAT2*12A	803 A>G	schnell
NAT2*12B	282 C>T 803 A>G	schnell
NAT2*12C	481 C>T 803 A>G	schnell
NAT2*13	282 C>T	schnell
NAT2*14A	191 G>A	langsam
NAT2*14B	191 G>A 282 C>T	langsam

Quelle: <http://www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html>

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt für die Überlassung des Themas, für die Betreuung der Arbeit und die Förderung meiner weiteren beruflichen Laufbahn.

Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich möchte ich für die Betreuung der Arbeit und die Übernahme des Referates danken.

Herrn Dr. W. Föllmann danke ich ganz besonders für die ständige Begleitung dieser Dissertation und die praktische wie fachliche Unterstützung in dieser Zeit.

Herrn Prof. Dr. H. Schulze von der Urologischen Klinik der Städtischen Kliniken Dortmund möchte ich für die gute Kooperation danken, aufgrund derer es mir möglich war humanes Probenmaterial zu untersuchen.

Frau Prof. Dr. G. H. Degen danke ich für die ständige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Vorschläge und Anregungen im Verlauf dieser Dissertation.

Frau M. Koch, Frau D. Dannappel, Frau B. Kullik, Frau A. Jung, Frau I. Ester und Frau I. Bichbäumer danke ich für die Hilfe bei technischen Fragestellungen und die überaus angenehme Zusammenarbeit.

Herrn G. Zimmermann danke ich für die tatkräftige praktische Unterstützung bei der Überwindung aller technischen Schwierigkeiten.

Nicht zuletzt möchte ich allen Kolleginnen und Kollegen für das gute, kooperative Arbeitsklima danken, welches zum guten Gelingen dieser Dissertation beigetragen hat.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Stefan Lebrun
Wohnort: Londongstr. 47
47506 Neukirchen-Vluyn
Geburtsdatum: 17.10.71
Geburtsort: Moers
Saatangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

1978-1982 Ernst-Moritz-Arndt Grundschule in Neukirchen-Vluyn
1982-1991 Julius-Stursberg-Gymnasium in Neukirchen-Vluyn

Zivildienst

1991-1992 Zivildienst in der Jugendherberge Trier

Hochschulstudium

1992-1993 Maschinenbau an der Universität Duisburg
1993-1999 Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1998-1999 Diplomarbeit bei Prof. Dr. H. Mehlhorn am Lehrstuhl für Zellphysiologie, Morphologie und Parasitologie
Titel der Diplomarbeit: „Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen zu den Beziehungen von Zecken zu ihren Wirbeltierwirten: Analyse der Stichstellen“
seit 11.1999 Promotion am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund bei Prof. Dr. H. Bolt in der Toxikologie, Projekt 11: Grundlagen und Mechanismen kazerogener, mutagener und reproduktionstoxischer Stoffwirkungen, unter der Leitung von Prof. Degen
seit 2000 Fortbildung zum Fachtoxikologen der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Düsseldorf den 20.05.03