

**Aus dem Institut für Arbeitsphysiologie
an der Universität Dortmund**

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt

**Das Mykotoxin Ochratoxin A:
Untersuchungen zu
in vitro Genotoxizität und Metabolismus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Ernährungswissenschaft
der Justus-Liebig-Universität Giessen

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Stephanie Stock
aus
Solingen

Giessen 2004

Vorsitzender: Prof. Dr. B. Schnieder

1. Gutachter: Prof. Dr. K. Becker-Brandenburg

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. G.H. Degen

Prüfer: Prof. Dr. M. Neuhäuser-Berthold

Prüfer: Prof. Dr. K. Ziegler

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Dezember 2004

Meiner Familie und A. Karschewsky gewidmet

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Dr. Gisela H. Degen, unter deren Anleitung diese Arbeit entstand, für die Überlassung des Themas sowie ihre ständige Diskussionsbereitschaft und vielfältigen Anregungen bei der Durchführung des praktischen Teils und der Niederschrift der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann M. Bolt, Direktor des Institutes für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund, danke ich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit in der Abteilung Toxikologie und Arbeitsmedizin des Institutes durchzuführen.

Mein Dank gilt ebenso Frau Prof. Dr. Katja Becker-Brandenburg für die Übernahme des Erstgutachtens.

Frau Maria Gerber danke ich für die Herstellung der Mikrosomenpräparationen und die Durchführung der Mikrokernteste sowie die technische Unterstützung.

Frau Jutta Hülsemann schulde ich Dank für die technische Unterstützung bei den HPLC Analysen und Frau Dr. Hana Tinel, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, für die Hilfe bei den intrazellulären pH-Wert Messungen.

Schließlich bedanke ich mich bei allen Kolleginnen und Kollegen für die vielfältigen Anregungen und das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima.

Inhaltsverzeichnis	I
--------------------	---

Abkürzungsverzeichnis	VI
-----------------------	----

1 Einleitung

1.1	Mykotoxine in Nahrungsmitteln	1
1.2	Ochratoxin A (OTA) und seine Derivate	2
1.2.1	Physiko-chemische Eigenschaften von OTA und seinen Derivaten	4
1.2.2	Vorkommen von OTA	4
1.2.3	Toxische Wirkungen von OTA	6
1.3	Stand der Kenntnis zu Pharmakokinetik und Genotoxizität von Ochratoxin A	10
1.4	Prostaglandin H Synthase als Enzym des Fremdstoffwechsels	16
1.5	Ziele der Arbeit	19

2 Material

2.1	Ausgangsmaterial zur Präparation von Prostaglandin H Synthase und OSV-Zellkulturen	21
2.2	Enzyme	21
2.3	Chemikalien	21
2.4	radioaktiv markierte Substanzen	22
2.5	Zellkulturbedarf	23
2.6	sonstige Materialien	23
2.7	Geräte	24

3 Methoden

3.1	Kultivierung von Schafsamenblasenzellen (ovine seminal vesicle cells, OSV-Zellen)	26
3.1.1	Medium und Puffer für die Zellkultur	26

	Seite	
3.1.2	Anlegen einer Primärkultur aus Schafsamenblasen	27
3.1.3	Subkultivierung von OSV-Zellen	28
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	30
3.1.5	Kryopräservation	30
3.2	Zytotoxizitätstest	31
3.3	<i>In vitro</i> -Mikronukleus-Test	32
3.4	Messung des intrazellulären pH-Wertes	37
3.5	Untersuchungen zum Metabolismus von OTA in OSV-Zellen	41
3.6	Untersuchungen zur Proteinbindung von ³ H-OTA und ¹⁴ C-Indo- metazin (INDO)	43
3.6.1	Bestimmung von freiem und proteingebundenem ³ H-OTA und ¹⁴ C-INDO mittels Ultrafiltration	44
3.6.2	Proteinbestimmung	46
3.7	Synthese von Ochratoxin alpha (OT alpha)	46
3.7.1	Enzymatische Hydrolyse von Ochratoxin A	46
3.7.2	Aufreinigung von OT alpha	47
3.8	Untersuchungen zur Metabolisierung durch Peroxidasen	48
3.8.1	Umsetzung von OTA mit Prostaglandin H Synthase (PHS)	48
3.8.1.1	Präparation von Schafsamenblasen-Mikrosomen (RSVM)	48
3.8.1.2	Inkubationsansatz	49
3.8.1.3	Aufarbeitung und Analyse nicht radioaktiver Ansätze	51
3.8.1.4	Aufarbeitung und Analyse radioaktiver Ansätze	51
3.8.2	Umsetzung von OTA mit Meerrettichperoxidase (HRP)	53
3.8.2.1	Inkubationsansatz	53
3.8.2.2	Aufarbeitung und Analyse radioaktiver Ansätze	53
3.8.3	Umsetzung von <i>trans</i> -Diethylstilbestrol (E-DES) mit PHS und HRP	54
3.9	Analytik	55
3.9.1	UV/VIS Spektroskopie zur Quantifizierung von OTA und Derivaten	55
3.9.2	Chromatographie	56
3.9.2.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	56
3.9.2.2	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	57
3.9.3	Autoradiographie	60

	Seite	
3.9.4	Flüssigszintillationszählung	61
3.10	Beseitigung von OTA-Kontaminationen	61
3.11	Statistische Auswertung	62
4 Ergebnisse		
4.1	Verstoffwechselung von OTA in OSV-Zellen	64
4.2	Umsetzung von OTA durch mikrosomale PHS und HRP	70
4.2.1	PHS-katalysierter Metabolismus von OTA	70
4.2.1.1	Radioaktivitätsverteilung	71
4.2.1.2	HPLC-Analyse der Überstände	73
4.2.1.3	Radioaktivitätsprofil der Überstände	80
4.2.1.4	Analyse der Überstände mittels DC und Autoradiographie	80
4.2.1.5	Umsetzung von <i>trans</i> -Diethylstilbestrol durch die verwendete PHS-Präparation	81
4.2.2	HRP-katalysierter Metabolismus von OTA	82
4.2.2.1	HPLC-Wiederfindung von OTA	83
4.2.2.2	Fluoreszenzprofil der Ansätze	84
4.2.2.3	Radioaktivitätsprofil der Ansätze	85
4.2.2.4	Analyse der Ansätze mittels DC und Autoradiographie	87
4.2.2.5	Umsetzung von <i>trans</i> -Diethylstilbestrol durch HRP	87
4.3	Genotoxizität von OTA und seinen Derivaten für OSV Zellen	89
4.3.1	Untersuchungen zur Genotoxizität von OTB und OT alpha	89
4.3.1.1	Induktion von Mikrokernen durch OTB und Einfluß von Indometazin	89
4.3.1.2	Induktion von Mikrokernen durch OT alpha und Einfluß von Indometazin	92
4.3.2	Untersuchungen zur Toxizität von OTA auf OSV-Zellen und zum Einfluß von Indometazin in serumfreier Kultur	94
4.3.2.1	Zytotoxizität von OTA und Indometazin für OSV-Zellen in serumfreier Kultur	95
4.3.2.2	Induktion von Mikrokernen durch OTA in serumfreier Zellkultur	97

	Seite	
4.3.2.3	Einfluß von Indometazin auf die Induktion von Mikrokernen durch OTA bei serumfreier Zellkultur	98
4.4	Einfluß von OTA und Indometazin auf den intrazellulären pH-Wert von OSV-Zellen	101
4.5	Bindung von OTA und Indometazin an Proteine des OSV-Zellkulturmediums	106
4.5.1	Proteingehalt im Zellkulturmedium	106
4.5.2	Bindung von OTA an Proteine des Zellkulturmediums	106
4.5.3	Verdrängung von OTA durch Indometazin aus der Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums	108
4.5.3.1	Verdrängung bei hoher Serumkonzentration im Zellkulturmedium	108
4.5.3.2	Verdrängung bei niedriger Serumkonzentration im Zellkulturmedium	109
4.5.4	Bindung von Indometazin an Proteine des Zellkulturmediums	110
4.5.5	Verdrängung von Indometazin durch OTA aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums	112
4.5.5.1	Verdrängung bei hoher Serumkonzentration im Zellkulturmedium	112
4.5.5.2	Verdrängung bei niedriger Serumkonzentration im Zellkulturmedium	113

5 Diskussion

5.1	Genotoxische Wirkungen von OTA – und Indizien für eine Rolle des Metabolismus?	115
5.2	Aufgabenstellung dieser Arbeit vor dem Hintergrund kontroverser Vorstellungen zum Wirkmechanismus von OTA	121
5.3	Wird OTA von Peroxidasen (PHS, HRP) oder in OSV-Zellen (im Sinne einer Bioaktivierung oder Detoxifizierung) metabolisiert?	122
5.4	Bewirken OTA und Indometazin (allein oder in Kombination) eine meßbare Verschiebung des pH-Wertes in OSV-Zellen?	126
5.5	Konkurrieren OTA und INDO um Bindung an Serumproteine?	128
5.6	Genotoxizität von OTA und OTA-Analoga bei unterschiedlichen Serumgehalten in Zellkultur – und Modulation durch Indometazin	131
5.7	Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick	134

	Seite
6 Zusammenfassung	138
7 Literaturverzeichnis	140
8 Anhang	157

Abkürzungsverzeichnis

ε	molarer Extinktionskoeffizient
λ_{\max}	Absorptionsmaximum
μg	Mikrogramm
4-OH-OTA	Hydroxyochratoxin (hydroxyliert an Position 4)
Abb.	Abbildung
ARA	Arachidonsäure
ATA	alimentäre toxische Aleukie
ATP	Adenosin-Triphosphat
BCECF	Biscarboxyethylcarboxyfluoreszein
BCECF-AM	Biscarboxyethylcarboxyfluoreszein-Acetoxymethylester
BEN	Balkan Endemische Nephropathie
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BNC	binucleated cell (binukleäre Zelle)
Bq	Bequerel
BSA	bovines Serum-Albumin
Ci	Curie
COX	Cyclooxygenase
CYP P450	Cytochrom P 450
d	Tag
Da	Dalton
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DES	Diethylstilbestrol
DIES	Dienestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid (-säure)
dpm	desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
E-DES	<i>trans</i> -Diethylstilbestrol
EtOH	Ethanol
FCS	foetales Kälberserum
g	gravitations

h	Stunde
HETE	Hydroeicosatetraensäure
HNE	4-Hydroxynonenal
HPETE	Hydroperoxy-eicosatetraensäure
HPLC	High performance liquid chromatography (Hochleistungs-Flüssigchromatographie)
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase Assay
HRP	Horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC50	Inhibitory Concentration 50 (Konzentration, bei der eine 50 %-ige Hemmung des Zellwachstums beobachtet wird)
INDO	Indometazin
IU	international Units (internationale Einheiten)
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LSC	liquid scintillation counting (Flüssigszintillations-Zählung)
M	molar
MDCK	Madin Darby canine kidney cells (Hundenierenzellen)
ml	Milliliter
MN	Mikronukleus (Mikrokern)
mRNA	Messenger- Ribonucleic acid (-säure)
MDA	Malondialdehyd
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
n	Anzahl der Proben
N	Normalität
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSAID	Non steroidal anti-inflammatory derivative (Nichtsteroidales Antiphlogistikum)
OSV	ovine seminal vesicle (Schafsamenblase)
OT alpha	Ochratoxin alpha
OTA	Ochratoxin A
OTB	Ochratoxin B

OTC	Ochratoxin C
PBS	phosphate buffered saline (NaCl-haltiger Phosphatpuffer)
PBS-CMS	PBS calcium magnesium free (PBS Puffer ohne Kalzium und Magnesium)
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PG	Prostaglandin
Phe	Phenylalanin
PHS	Prostaglandin H Synthase
PTWI	provisional tolerable weekly intake (vorläufig tolerierbare wöchentliche Aufnahme)
PUBEC	porcine urinary bladder epithelial cells (Epithelzellen der Schweineharnblase)
RNA	Ribonucleicacid (-säure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RSVM	ram seminal vesicle microsomes (Schafsamenblasen-Mikrosomen)
RT	Raumtemperatur
Rt	Retentionszeit
S9-Mix	9000 x g Überstand des Rattenleberhomogenates
SCE	sister chromatid exchange (Schwester Chromatid Austausch)
sec	seconds (Sekunden)
SHE-cells	syrian hamster embryo cells (Embryonalzellen des syrischen Hamsters)
Tab.	Tabelle
tRNA	transfer-ribonucleic acid (-säure)
Tx	Thromboxan
UDS	unscheduled DNA synthesis (unplanmäßige DNA-Synthese)
UV	Ultraviolett
V79	Hamsterfibroblasten
Z,Z-DIES	Dienestrol
Z-DES	<i>cis</i> -Diethylstilbestrol

1 Einleitung

1.1 Mykotoxine in Nahrungsmitteln

In der Nahrung können sich verschiedene Schadstoffe befinden. Beispielsweise führen Rückstände aus der Anwendung von Tierarzneimitteln oder Umweltchemikalien zu einer Belastung von Nahrungs- bzw. Futtermitteln (Ernährungsbericht, 1996). Diese Kontaminationen anthropogenen Ursprungs sind durch geeignete Maßnahmen (Einhalten von Wartezeiten bei Tierarzneimitteln, Verzicht bzw. limitierter Einsatz z. B. von Pflanzenschutzmitteln) prinzipiell vermeidbar. Eine weitaus komplexere Problematik stellen Belastungen von Lebens- und Futtermitteln mit natürlichen Toxinen dar (Bauer und Gareis, 1987; Lindner, 1990)

Solche natürlichen Toxine stellen beispielsweise Mykotoxine dar. Sie werden als Sekundärmetabolite, also Produkte des Sekundärstoffwechsels, der ubiquitär vorkommenden Schimmelpilze gebildet (Betina, 1984). Der Begriff „Mykotoxine“ faßt dabei abgrenzend diejenigen Sekundärmetaboliten mit toxischer Wirkung für Mensch und Tier zusammen (Fink-Gremmels, 1994).

Mykotoxine zeichnen sich durch relativ geringes Molekulargewicht sowie ihre häufig spezifische Synthese durch bestimmte Schimmelpilzgattungen aus (Moss, 1987); Intoxikationen durch Mykotoxine werden als „Mykotoxikosen“ bezeichnet. Es sind heute etwa 300 Mykotoxine bekannt, von denen ca. 20 in signifikanten Mengen und Häufigkeiten in Lebensmitteln gefunden werden (Steyn, 1995). Zu diesen zählen Aflatoxine, Ochratoxine, Trichothecene, Fusarium-Mykotoxine, Fumonisine und Patulin (Ueno, 1985; Pohland und Wood, 1987). Zu den allgemein besonders belasteten Lebensmitteln gehören neben verschiedenen Nußarten auch Getreide bzw. Getreideprodukte, Fruchtprodukte und tierische Nahrungsmittel wie Milch, Eiprodukte oder Käse (Kiermeier, 1985).

Mykotoxine können bei Mensch und Tier verschiedene adverse Effekte hervorrufen. Einige dieser Mykotoxine zeichnen sich vorwiegend durch akute Toxizität aus (z. B. die Trichothecene). Andere wiederum können Krebs und andere chronische Krankheiten hervorrufen (Weber, 1983; Schlatter, 1988; Chu, 1991). Ames *et al.* (1987) charakterisieren Mykotoxine als die „signifikanteste kanzerogene Verunreinigung von Lebensmitteln in Entwicklungsländern“.

Insbesondere die Aflatoxine sind von großer Bedeutung: Sie werden u. a. für die hohe Inzidenz des primären Leberkrebses in Afrika und Asien verantwortlich gemacht (Bilgrami und Sinha, 1992; Eaton und Gallagher, 1994). Die Entdeckung dieser potenten Hepatokanzerogene intensiviert die Suche nach weiteren möglicherweise kanzerogenen Mykotoxinen in der Nahrung sowie deren Bedeutung in der Ätiologie menschlicher und tierischer Erkrankungen (Steyn, 1984).

Das Mykotoxin Sterigmatocystin wird ebenso wie das chemisch verwandte Aflatoxin B₁ von verschiedenen *Aspergillus*-Arten gebildet. Es fanden sich bald deutliche Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung des Sterigmatocystins; das kanzerogene Potential für die Hepatotoxine Patulin und Penicillinsäure ist dagegen noch ungeklärt (Chu, 1991; Dirheimer, 1998).

Von *Fusarium*-Spezies produzierte Trichothecene, vor allem das sogenannte T-2 Toxin, werden u.a. für das Auftreten der Alimentären Toxischen Aleukie (ATA) verantwortlich gemacht, einer Erkrankung mit schweren gastrointestinalen Symptomen sowie Leukopenie (Steyn, 1993; Pohland und Wood, 1987; Steyn, 1995). Schwache genotoxische Effekte konnten in *in vitro*-Untersuchungen für T-2 Toxin gezeigt werden (Chu, 1991). Ergebnisse für andere Trichothecene wie Vomitoxin, Nivalenol oder Fusarenon X sind bislang widersprüchlich und bedürfen weiterer Abklärung (Dirheimer, 1998).

Die Fumonisine B₁ und B₂, von *Fusarium moniliforme* produzierte Mykotoxine, gelten als Krebs-promovierende Agentien, zeigten in einigen Studien jedoch auch tumor-initierende Wirkung. Fusarin C zeigt *in vitro* nach metabolischer Aktivierung Mutagenität im Ames-Test (Chu, 1991).

Das Nephrotoxin Ochratoxin A wird als Kanzerogen angesehen (WHO, 2001). Über Auftreten, Toxizität, Metabolismus, Kinetik und Genotoxizität liegen inzwischen viele Daten vor. Der Mechanismus der kanzerogenen Wirkung von OTA ist allerdings noch nicht aufgeklärt, insbesondere ist die Frage, ob OTA direkt oder indirekt genotoxisch wirkt, offen.

1.2 Ochratoxin A (OTA) und seine Derivate

Ochratoxine sind eine Gruppe strukturverwandter Mykotoxine, die von Spezies der Pilzgattungen *Penicillium* und *Aspergillus* produziert werden. Die zuerst entdeckte

Verbindung wurde aus einer Kultur von *Aspergillus ochraceus* isoliert, daher wurde sie Ochratoxin A (OTA) genannt (van der Merwe *et al.*, 1965).

Abbildung 1 zeigt die chemische Struktur von Ochratoxin A (*N*-[[[(3*R*)-5-Chloro-8-Hydroxy-3-Methyl-1-Oxo-7-Isochromanyl]carbonyl]-3-Phenyl-L-Alanin).

Es handelt sich hierbei um ein Dihydroisokumarin-Derivat, das über seine 7-Carboxylgruppe mittels einer α -Amidbindung an die Aminosäure L-Phenylalanin gebunden ist.

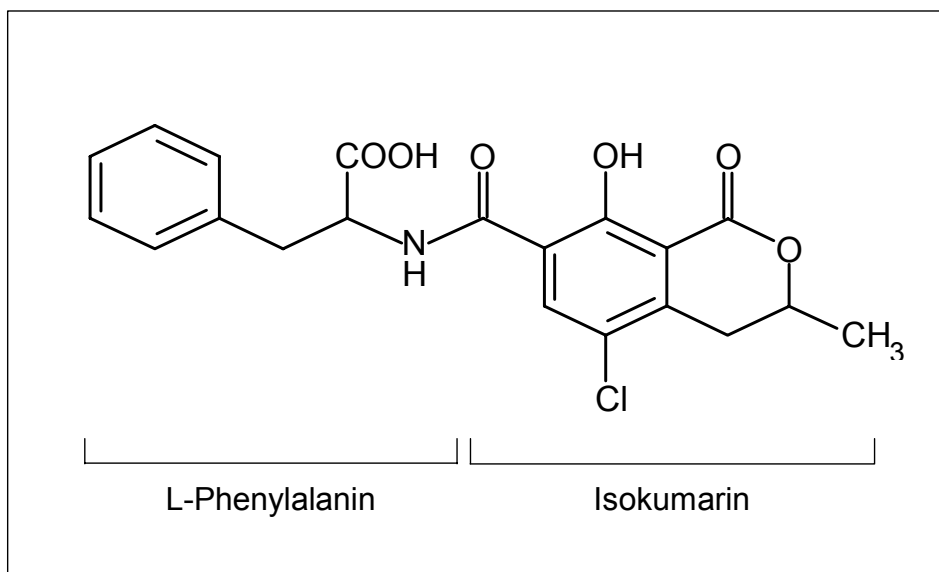


Abb. 1: Strukturformel von Ochratoxin A (OTA)

Weitere Arbeiten führten zu der Entdeckung von Ochratoxin B (OTB) und Ochratoxin C (OTC), dem dechlorinierten Derivat bzw. Ethylester-Derivat von OTA (van der Merwe *et al.*, 1965). OTA und seltener OTB sind die einzigen Ochratoxine, die als Kontaminationen in Lebens- und Futtermitteln vorkommen (WHO, 1990).

In gemäßigten Klimazonen der Erde gilt *Penicillium verrucosum* (früher bezeichnet als *Penicillium viridicatum*) als OTA-Hauptproduzent, in warmen und tropischen Klimaten dagegen verschiedene *Aspergillus*-Spezies (Pitt, 1987; Abarca *et al.*, 1994; Moss, 1996; Varga *et al.*, 1996).

1.2.1 Physiko-chemische Eigenschaften von OTA und seinen Derivaten

OTA besitzt ein Molekulargewicht von 403,8 Da. Die phenolische Hydroxylgruppe im Dihydroisokumarinring sowie die Carboxylgruppe des Phenylalanin sind für das schwach saure Verhalten des OTA verantwortlich. Das Toxin besitzt zwei Dissoziationskonstanten: $pK_1 = 6,75$; $pK_2 = 10,25$ (Godin *et al.*, 1997).

Reines OTA ist eine farblose kristalline Substanz mit einem Schmelzbereich von 168-173 °C. Das Mykotoxin ist in polaren organischen Lösungsmitteln (Chloroform, Ethanol, Methanol, Dimethylsulfoxid) oder in wäßriger Bicarbonatlösung leicht löslich, in Wasser dagegen schlecht löslich (DFG, 1990).

In Lösung kann OTA verlustlos über lange Zeit dunkel und kühl gelagert werden, bei Exposition gegen fluoreszierendes Licht erfolgt jedoch nach kurzer Zeit Photolyse (Krogh, 1987). In neutralen Lösungen ist das Toxin hitzestabil, es wird aber in alkalischen Lösungen unter Hitzeeinfluß hydrolysiert (Trivedi *et al.*, 1992). Eine vollständige Degradation von OTA wird mit einem Überschuß an Natrium-Hypochlorid-Lösung erzielt (Castegnaro, 1991).

Saure sowie enzymatische Hydrolyse (durch Carboxypeptidase A) führen zur Spaltung des OTA in Ochratoxin alpha (OT alpha), dem Isokumarin-Anteil des Toxins, und Phenylalanin (van der Merwe *et al.*, 1965; Pitout, 1969 a,b).

OTA emittiert bei UV-Bestrahlung in saurer bzw. alkalischer Lösung intensive grüne bzw. blaue Fluoreszenz. Das UV-Absorptionsspektrum von OTA variiert mit dem pH-Wert und der Polarität des Lösungsmittels (Chu, 1974; Pitout, 1969b; Harwig *et al.*, 1983)

Der molare Extinktionskoeffizient (ϵ) ist von der Konzentration der Lösung abhängig und variiert zwischen $1,9 \times 10^{-6}$ und $4,8 \times 10^{-4}$ M (Nesheim, 1969).

1.2.2 Vorkommen von OTA

Obwohl OTA prinzipiell weltweit und in allen Lebens- und Genußmitteln vorkommen kann, wird es doch am häufigsten in den gemäßigten Klimaten der Mais-, Gerste- und Weizenanbaugebiete der nördlichen Hemisphäre nachgewiesen (Kuiper-Goodman und Scott, 1989; WHO, 1990; IARC, 1993).

In Deutschland wurden in Gerste bis zu 206 µg OTA pro kg Getreide gefunden, in Weizen bis zu 12,5 µg pro kg. Aus kontaminiertem Getreide kann OTA in daraus gebrautes Bier übergehen, und kann dort in Anteilen von bis zu 1 ng / ml nachgewiesen werden (Scott, 1996).

Ferner kann das Mykotoxin bei Fütterung von kontaminiertem Getreide an Schlachttiere in daraus hergestellte Lebensmittel übergehen, und zwar in durchaus signifikanten Mengen. So sind in einer deutschen Studie in Schweinewurstchen bis zu 3,4 µg, in Schweinenieren auch bis zu 10 µg OTA / kg festgestellt worden (Scheuer und Leistner, 1986)

Eine andere OTA-Quelle ist Kaffee, da der Röstungsprozeß den Gehalt an OTA in kontaminierten Kaffeebohnen nicht zu reduzieren vermag. Beim Brühen können signifikante Mengen an Mykotoxin in den Kaffeeextrakt übergehen und Kaffee somit bei regelmäßigem Konsum einen Beitrag zur menschlichen Exposition gegen das Mykotoxin leisten (Studer-Rohr *et al.*, 1995; Scott, 1996).

In der Literatur finden sich auch Angaben über positive Nachweise von OTA in Kuhmilch (Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993) sowie in der Muttermilch stillender Frauen (Micco *et al.*, 1991; Jonsyn *et al.*, 1995).

Als Folge einer Ernährung mit Mykotoxin-belasteten Lebensmitteln ist OTA im Blut von Bewohnern verschiedener europäischer Länder gemessen worden (Hald, 1991). Die höchsten Konzentrationen wurden bei Einwohnern der Balkanländer festgestellt: Hier wurden Werte von bis zu 100 ng / ml Blut ermittelt (Fuchs *et al.*, 1991; Petkova-Bocharova und Castegnaro, 1991). In anderen Ländern lagen die Werte deutlich niedriger und korrelierten mit einer geringeren Mykotoxin-Belastung der verzehrten Lebensmittel (Petkova-Bocharova und Castegnaro, 1991).

Das BgVV (Bundesinstitut für Verbraucherschutz und Veterinärmedizin) gibt die tägliche alimentäre Aufnahme von OTA für den Verbraucher in Deutschland unter Zugrundelegung des üblichen Lebensmittelkonsums und der üblichen Verzehrsmengen mit etwa 0,9 ng / kg KG an. Die Aufteilung auf die Hauptzufuhrquellen sei wie folgt:

- 0,5 ng / kg KG und Tag durch Getreide und Getreideprodukte,
 - 0,2 ng / kg KG und Tag durch Kaffee und weitere
 - 0,2 ng / kg KG und Tag durch den Verzehr von Bier
- (BgVV, 1997, Pressemitteilung 15).

Von Frank (1991) sowie Wolff *et al.* (2000) wird die durchschnittliche tägliche Aufnahme von OTA mit der Nahrung in Deutschland ebenfalls mit etwa 1 ng / kg Körpergewicht (KG) angegeben. Dazu können weitere 2 ng / kg KG von Personen aufgenommen werden, die sich zum großen Teil von Getreideprodukten ernähren (Frank, 1991). Dies bedeutet eine durchschnittliche wöchentliche alimentäre Aufnahme an OTA von ca. 20 ng / kg KG für deutsche Konsumenten. Die WHO (2001) gibt die durchschnittliche wöchentliche Aufnahme von OTA im europäischen Rahmen mit etwa 45 ng / kg KG an, basierend auf den Konsumdaten der GEMS-Datenbank. Getreide und Wein tragen hierzu 25 bzw. 10 ng / kg KG bei, Traubensaft und Kaffee nur je 2 – 3 ng / kg KG. Basierend auf diesen sowie den vorliegenden Daten bzgl. adverser Effekte des OTA bestätigte die WHO 2001 den vormals festgesetzten PTWI (provisional tolerable weekly intake) von 100 ng / kg KG pro Woche.

Seit dem 5. April 2002 existieren allgemeine europäische gesetzliche Regulationen für OTA-Höchstmengen in Lebensmitteln, allerdings nur für Getreide (rohe Getreidekörner: 5 µg / kg; Getreideerzeugnisse: 3 µg / kg) und getrocknete Weintrauben (10 µg / kg). Eine Höchstmengenregelung für Kaffee, Wein, Bier, Kakao und Gewürze wird angestrebt (Verordnung 472/2002 der Europäischen Gemeinschaft vom 12. März 2002). In der laufenden Diskussion um die Anpassung solcher Grenzwerte schlagen einige Arbeitsgruppen erheblich niedrigere Werte vor als zur Zeit in der Verordnung festgesetzt (Petzinger und Ziegler, 2000).

1.2.3 Toxische Wirkungen von OTA

Folgende adverse Wirkungen von OTA auf den Organismus wurden beschrieben:

a) *Nephrotoxizität*

OTA wirkt in allen bislang getesteten Spezies (außer in Wiederkäuern) als potentes Nephrotoxin (Pohland *et al.*, 1992). Basierend auf verschiedenen Feldstudien wird es als auslösender Faktor der sogenannten Schweine-Nephropathie angesehen (Krogh, 1987). Diese Erkrankung bei Schweinen geht mit einer Degeneration der proximalen

Nieren-Tubuli sowie einer Atrophie des tubulären Epithels, interstitieller Fibrose in der Nierenrinde und hyalinisierten Glomeruli einher (Pohland *et al.*, 1992).

OTA steht im Verdacht, die Ursache der sogenannten „Balkan Endemischen Nephritis“ (BEN) beim Menschen zu sein. Ein solcher Zusammenhang liegt unter anderem nahe, da OTA bei Mensch und Tier sehr ähnliche morphologische und funktionale Schädigungen hervorruft. Ferner wurden besonders hohe OTA-Belastungen in Nahrungsmitteln und bei Menschen aus Regionen gemessen, in denen BEN auftritt (IARC, 1993). Als möglicher Erklärungsansatz für das endemische Auftreten der BEN in Ländern des Balkan wird daher eine hohe OTA-Belastung der Lebensmittel diskutiert, obwohl auch andere ätiologische Faktoren nicht ausgeschlossen werden (Tatu *et al.*, 1998). Die Mechanismen, welche der Nephrotoxizität des OTA zugrunde liegen, sind bislang nicht restlos aufgeklärt (Godin *et al.*, 1997). OTA wird wahrscheinlich über das organische Anionen Transport System in die proximalen Tubuluszellen der Niere aufgenommen und dort angereichert (Friis *et al.*, 1988; Gekle *et al.*, 1998; 2000).

b) *Kanzerogenität*

Im Jahre 1971 wurde erstmals über Nierentumoren nach oraler Gabe von OTA an Ratten berichtet (zitiert in Pohland *et al.*, 1992). Die Entwicklung von renalen bzw. hepatischen Tumoren nach oraler Gabe an Ratten und Mäuse wurden von Kanisawa und Suzuki (1978) und Bendele *et al.* (1985) beschrieben. Die kanzerogene Wirkung wurde durch eine Studie des National Toxicology Program bestätigt (zitiert in IARC 1993).

Bis heute gibt es keine definitiven Beweise dafür, daß OTA auch beim Menschen kanzerogen wirkt. In einer Reihe von epidemiologischen Studien an Personen in BEN Endemiegebieten wurde allerdings eine erhöhte Inzidenz von Tumoren in Niere und Harntrakt (Nierenbecken, Ureter, Harnblase) gegenüber Personen aus nicht-BEN Endemiegebieten beobachtet (Sostaric und Vukelic, 1991; IARC, 1993).

Weiterhin zeigte sich, daß Nahrungsmittel in Endemiegebieten sehr viel häufiger und höhergradiger mit OTA kontaminiert sind als in Nicht-Endemiegebieten (Petkova-Bocharova *et al.*, 1991). Auch konnte gezeigt werden, daß im Blut von in Endemiegebieten lebenden Menschen, die zum Teil an BEN bzw. Tumoren der ableitenden Harnwege erkrankt waren, sowohl die Anzahl der Proben als auch der Gehalt an

OTA signifikant höher waren als in der Vergleichspopulation aus einem Nicht-Endemiegebiet (Petkova-Bocharova *et al.*, 1988).

Aufgrund dieser und weiterer Ergebnisse stuft 1993 die International Agency for Research on Cancer (IARC) das Mykotoxin OTA in die Gruppe 2B, also als „possibly carcinogenic to humans“ ein (IARC, 1993).

c) *Teratogenität*

Experimentell konnte gezeigt werden, daß OTA die Plazentabariere zu überwinden und in foetalem Gewebe zu akkumulieren vermag (Ballinger *et al.*, 1986).

In den Nachkommen von mit OTA behandelten Ratten konnte ein breites Spektrum von Effekten (wie Exencephalie, Anomalien der Augen, sonstige Fehlbildungen) beobachtet werden (Pohland *et al.*, 1992; Kuiper-Goodman und Scott, 1989).

Über teratogene Effekte beim Menschen liegen keine Studien vor.

d) *Immunotoxizität*

Luster *et al.* (1987) berichteten erstmals, daß OTA die Aktivität der natürlichen Killerzellen zu reduzieren vermag. Diese Wirkung soll auf einer spezifischen Hemmung der endogenen Interferon-Produktion basieren.

Lea *et al.* (1989) beobachteten eine potente suppressive Wirkung von OTA auf den Spiegel an humanen B- und T-Zell-Lymphozyten. In Mäusen sind funktionelle Veränderungen der Knochenmarkszellen und Makrophagen beobachtet worden (Boormann *et al.*, 1984). Müller *et al.* (1999) zeigten, daß OTA bei Läufer Schweinen auch in Dosen unterhalb der Toxizitätsgrenze zu Immunmodulationen führte. Im wesentlichen wurden eine Erhöhung der Leukozyten- und Neutrophilenzahl sowie apoptotische Phagozyten im Blut beobachtet. Die Anzahl der Lymphozyten im Blut war dagegen gegenüber der Kontrolle erniedrigt.

Es werden bisher folgende zelluläre Wirkungen des OTA diskutiert, die den oben beschriebenen toxischen Wirkungen zugrunde liegen sollen, und zwar:

- 1) eine Inhibition der Protein-, RNA- und DNA-Synthese sowie Einfluß auf verschiedene Enzymsysteme,
- 2) eine Erhöhung der Lipidperoxidation und
- 3) eine Wirkung auf die Mitochondrien bzw. die mitochondriale ATP-Produktion.

Ad 1): Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* wird eine Hemmung der Proteinbiosynthese durch OTA beobachtet. Wegen des im Mykotoxin enthaltenen Phenylalanin-Anteils kommt es zu einer Konkurrenz mit der Aminosäure Phenylalanin bei der durch die Phenylalanyl-tRNA^{Phe}-Synthetase katalysierten Aminoacylierung der tRNA^{Phe}. Dadurch kommt es zu einem Stop der Peptid-Elongation. Die inhibitorische Wirkung des OTA ist bei Gabe eines Überschusses an Phenylalanin reversibel.

Bei fortgesetzter Exposition gegen OTA erfolgt nach der Hemmung der Proteinbiosynthese später ebenfalls eine Hemmung der RNA-Synthese, schließlich eine Hemmung der DNA-Synthese (Creppy *et al.*, 1983; 1984).

Neben diesem Effekt auf die Phenylalanyl-tRNA^{Phe}-Synthetase gibt es offenbar weitere Einflüsse des OTA auf Schlüsselenzyme des Stoffwechsels: OTA hemmt in isolierten Rattenhepatozyten sowie *in vivo* die Hydroxylierung von Phenylalanin zu Tyrosin durch das Enzym Phenylalanin-Hydroxylase. Hierdurch können Effekte hervorgerufen werden, die dem Erscheinungsbild der Phenylketonurie ähneln (Creppy *et al.*, 1984; 1990).

Weiterhin vermag OTA die Aktivität der cytosolischen Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) in Rattenleber zu hemmen (Meisner *et al.*, 1983; Meisner und Krogh, 1986). Die Autoren postulieren hierfür eine Degradation der PEPCK mRNA durch das Mykotoxin. Von anderen Autoren wird jedoch diskutiert, daß die Hemmung der Enzymaktivität eine Folge der verminderten Proteinbiosynthese sein könnte, da mRNAs mit hohem Umsatz unter diesen Bedingungen nicht mehr von den Ribosomen geschützt werden (Dirheimer und Creppy, 1991). Die Konsequenz dieser Enzymhemmung ist eine verminderte renale Glukoneogenese (Meisner *et al.*, 1983).

Ad 2): Bei Untersuchungen an isolierten proximalen Nierentubuli (Aleo *et al.*, 1990) sowie an Leber- und Nierenmikrosomen von Ratten ist eine erhöhte Lipid-Peroxidation durch OTA gezeigt worden (Rahimtula *et al.*, 1988).

Diese wird offenbar durch Komplexierung des Mykotoxins mit im Testsystem enthaltenem Eisen III (Fe^{3+}) hervorgerufen und führt in Gegenwart des NADPH-Cytochrom P 450-Reduktase Systems zur Produktion eines toxischen Hydroxyl-Radikals. Dieses Radikal wird von einigen Autoren zum Teil für die weiter oben beschriebenen adversen Effekte des OTA verantwortlich gemacht (Baudrimont *et al.*, 1997; Hasinoff *et al.*, 1990; Omar *et al.*, 1990; 1991).

Ad 3): Eine *in vitro* Studie an Rattenlebermitochondrien zeigte, daß die Aufnahme von OTA in die Mitochondrien ein Energie-verbrauchender Prozeß ist, der die Depletion des intramitochondrialen ATPs zur Folge hat. Zusätzlich hemmt OTA offenbar den intramitochondrialen Phosphat-Transport, welches zu einem allgemeinen Verfall der Mitochondrien führt (Meisner, 1976). Resultate aus anderen *in vitro* Studien ergaben überdies, daß OTA kompetitiv die Carrierproteine der inneren Mitochondrienmembran hemmen kann (Meisner und Chan, 1974; Wei *et al.*, 1985).

Die oben beschriebenen zellulären Effekte des OTA werden einzeln bzw. in Kombination als zugrundeliegende Mechanismen der adversen Wirkungen des OTA diskutiert (Marquart und Frohlich, 1992; Xiao *et al.*, 1996).

1.3 Stand der Kenntnis zu Pharmakokinetik und Genotoxizität von Ochratoxin A

Pharmakokinetik

Die Resorption von OTA beginnt bei den meisten Tierspezies bereits im Magen (Roth *et al.*, 1988). Anhaltspunkte für eine effiziente Resorption aus dem proximalen Jejunum liegen ebenfalls vor (Kumagai und Aibara, 1982). Nach Kumagai (1988) soll die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt passiv in der nichtionisierten Form erfolgen. Wiederkäuer spalten OTA nach alimentärer Aufnahme effizient durch Hydrolyse in OT alpha und Phenylalanin (Hult *et al.*, 1976).

In vivo und *in vitro* bindet OTA an Serumproteine des Plasmas, allerdings mit relativ geringer Affinität im Bereich von etwa 10^{-4} bis 10^{-6} M (Chu, 1971). In humanem Plasma bindet OTA wesentlich spezifischer ($2,3 \times 10^{-10}$ M, Stojkovic *et al.*, 1984) an bislang unidentifizierte Makromoleküle der Größe 20.000 Da. Eine Sättigung dieser Bindung ist bereits im Dosisbereich von 10 – 20 ng OTA / ml Serum erreicht (Hult und Fuchs, 1986). *In vitro* wurde ermittelt, daß bei einer Gesamtkonzentration von 10^{-9} – 10^{-6} M der Anteil an ungebundenem OTA in humanem Plasma bei nur 0,02 % liegt (Hagelberg und Hult, 1989).

In einer kürzlich publizierten Arbeit berichten die Autoren über einen humanen Selbstversuch, in dessen Verlauf nach Ingestion von 395 ng Tritium-markiertem OTA eine Plasma-Halbwertszeit von 35,55 Tagen ermittelt wurde (Studer-Rohr *et al.*, 2000). Dies ist etwa achtmal so lang wie die für Ratten kalkulierte Plasma-Halbwertszeit mit ca. 103 Stunden (Li *et al.*, 1997).

Biliäre Exkretion und glomeruläre Filtration sind die Hauptwege der Ausscheidung von OTA; ein Beitrag der tubulären Sekretion wird ebenfalls diskutiert (Stein *et al.*, 1985). Der Anteil der jeweiligen Exkretionsroute variiert dabei zwischen den einzelnen Spezies (Hagelberg und Hult, 1989). OTA unterliegt einem enterohepatischen Kreislauf (Fuchs *et al.*, 1988b; Roth *et al.*, 1988).

Primäre Zielgewebe in allen bislang untersuchten Spezies sind unter anderem Niere, Hoden und Samenblase (Kane *et al.*, 1986; Galtier, 1979; Fuchs *et al.*, 1988a; Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1992).

Metabolismus

In Studien mit Mäusen, Ratten und Kaninchen sind verschiedene Metabolite erkannt und identifiziert worden. Es sind dies hydroxylierte Metabolite wie 4-OH-OTA (Størmer und Pedersen, 1980;) und 10-OH OTA (Størmer *et al.*, 1983). Diese hydroxylierten Metabolite werden *in vivo* und *in vitro* durch verschiedene Cytochrom P450 Isoenzyme gebildet (Størmer und Pedersen, 1980). 4-OH-OTA kann dabei in den zwei isomeren Formen (4R)- bzw. (4S)-OH-OTA vorkommen (Størmer *et al.*, 1981). Je nach Spezies variieren die Anteile der Isomere: In Ansätzen mit Lebermikrosomen aus humanem und Rattengewebe überwiegt der Anteil an (4R)-OH-OTA, während in Schweinegewebe hauptsächlich das (4S)-Isomer gebildet wird (Størmer *et al.*, 1981).

10-OH-OTA wurde bislang nur in Ansätzen mit Lebermikrosomen des Kaninchens nachgewiesen.

Neben diesen hydroxylierten Metaboliten wird auch Ochratoxin alpha (OT alpha), der Dihydroisokumarin-Anteil des OTA, durch enzymatische Aktivität *in vivo* gebildet (Roth *et al.*, 1988). Die Bildung von OT alpha erfolgt durch Spaltung der Peptidbindung des OTA mittels der Enzyme Carboxypeptidase oder Chymotrypsin in Darm (Pitout, 1969b) und Pankreas (Suzuki *et al.*, 1977). Die Hydrolyse von OTA wird als Detoxifizierungsreaktion angesehen, da OT alpha in verschiedenen Tests (Zytotoxizität, Genotoxizität) weniger toxisch als OTA bzw. nicht wirksam ist.

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht über die bekannten Metabolisierungswege des OTA.

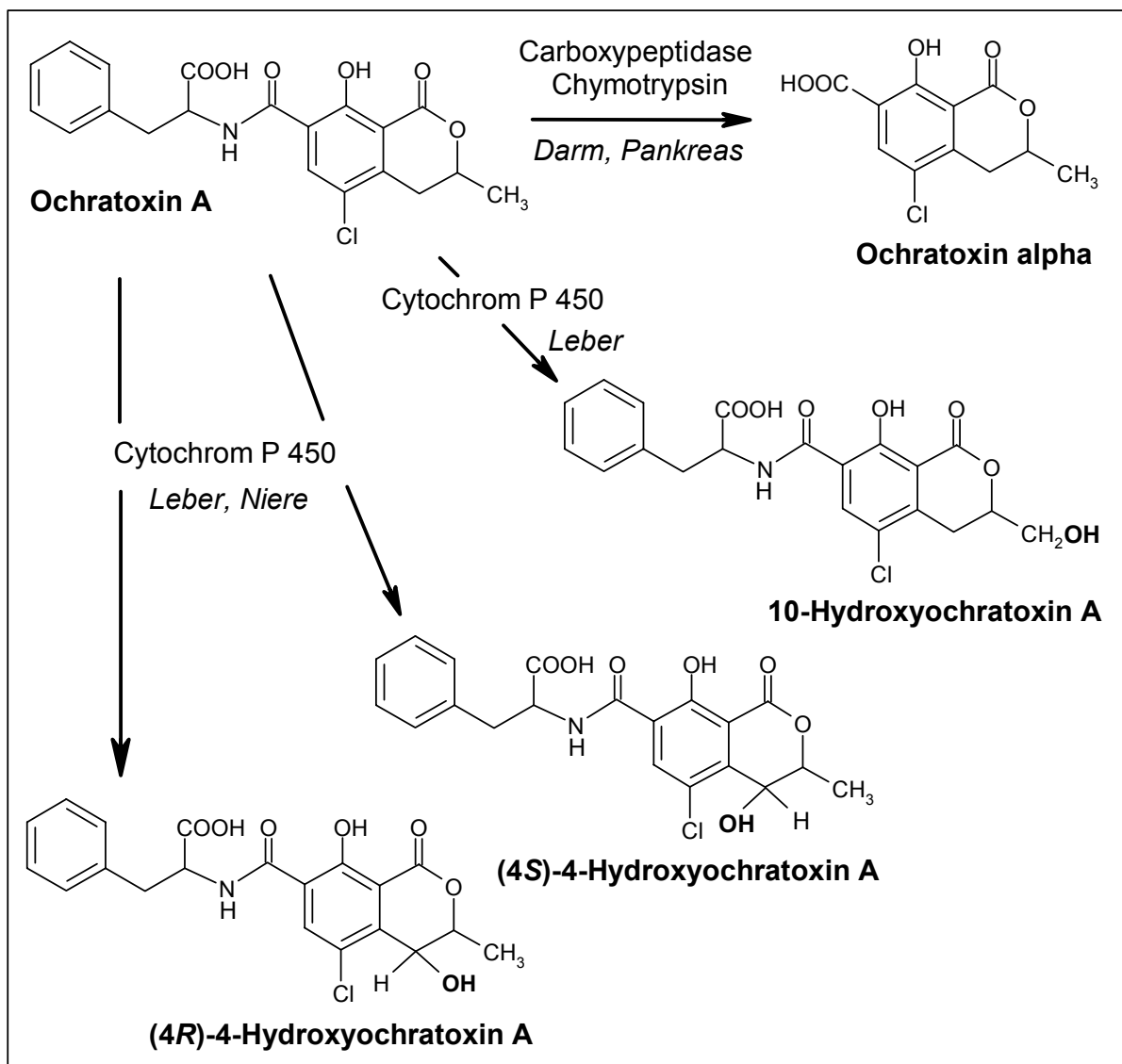


Abb. 2: Metabolisierung des Mykotoxins Ochtratoxin A *in vivo*

Sowohl (4R)-OH OTA als auch (10)-OH-OTA können *in vitro* durch das Enzym Alkoholdehydrogenase zu 4-Oxo-OTA bzw. 10-Oxo-OTA weiter metabolisiert werden (Syvertsen und Størmer, 1983). *In vivo* sind diese Metabolite nicht gefunden worden. In der Literatur wird berichtet, daß wahrscheinlich mehrere Isoformen des Cytochrom P450 an der Metabolisierung des OTA beteiligt sind. Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung der IA-, der IIB- und der IIIA-Familien (Omar *et al.*, 1996). Zepnik *et al.* (2001) zeigten auch, daß CYP P450 IA1, IIIA4 und IIC9 die Bildung von (4R)- und (4S)-OH-OTA aus Ochratoxin A katalysieren. Der Umfang der Metabolisierung von OTA durch die genannten Enzyme war jedoch sehr gering. Es wird daher eher als unwahrscheinlich angesehen, daß diese Metabolisierungswege eine wichtige Rolle für die Toxizität von OTA spielen. Einige Autoren postulieren aber eine Beteiligung der Bio-transformation an adversen, insbesondere den genotoxischen Effekten des OTA (Malaveille *et al.* 1994; De Groene *et al.*, 1996a,b; Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996; Castegnaro *et al.*, 1998; Gillman *et al.*, 1999).

Genotoxizität

Die überwiegende Zahl der Mutagenitätsteste mit *Salmonella typhimurium* (mit / ohne metabolischer Aktivierung durch S9-Mix) beschreibt OTA als nicht mutagen (Kuczuk *et al.*, 1978; Würigler *et al.*, 1991). Bei Einsatz von Zellkulturmedium, das durch Inkubation von Rattenhepatozyten mit OTA gewonnen wurde, zeigte sich in einigen *Salmonella*-Teststämmen zwar erhöhte Mutagenität (Hennig *et al.*, 1991), doch bislang konnte dieser Befund nicht bestätigt werden (Föllmann und Lucas, 2003).

Vor kurzem sind positive Befunde in *Salmonella typhimurium* Mutagenitätstesten unter Verwendung von Maus-Nierenmikrosomen berichtet worden (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1999).

In Säugerzellen zeigten sich genotoxische Effekte zunächst als schwach oder widersprüchlich. So untersuchte Bendele (1985) die OTA Genotoxizität in einer Reihe von *in vitro* und *in vivo* Testsystemen. Es wurden damals weder Anzeichen einer "Unscheduled DNA Synthesis" (UDS) in Primärkulturen von Rattenhepatozyten noch Anhaltspunkte für das Auftreten von Sister chromatid-exchanges (SCE) in Zellen des Chinesischen Hamsters gefunden.

Später ist jedoch durch Föllmann *et al.* (1995) gezeigt worden, daß OTA in Epithelzellen der Schweineharnblase SCE induziert. Ebenso wurde UDS in Primärzellen des humanen Urothels nachgewiesen (Dörrenhaus *et al.*, 2000).

Creppy *et al.* (1985) beschreiben das Auftreten von DNA Einzelstrangbrüchen in OTA-behandelten Milzzellen von Mäusen. Dieses *in vitro* Ergebnis wurde in einem *in vivo* Versuch bestätigt (Kane, 1986).

Die Frage, ob eine metabolische Umsetzung des Mykotoxins diese und weitere genotoxische Effekte bedingt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert:

Von der Arbeitsgruppe um Pfohl-Leszkowicz wurde mittels ^{32}P -Postlabelling Analyse gezeigt, daß die Gabe von OTA in Versuchstieren dosis- und zeitabhängig die Bildung von DNA-Addukten induziert (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991; 1993 a,b,c,e). Eine Reihe von Addukten wurden in verschiedenen Spezies (Mäusen und Ratten) und in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen (Niere, Leber, Milz), auch in der Harnblase von Mäusen (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996). Die in den einzelnen Organen gefundenen Muster waren nicht identisch und offenbar wurden Addukte in unterschiedlicher Geschwindigkeit repariert, welches die Autoren als Indiz für einen organspezifischen Metabolismus nahmen. Die Art dieser Addukte ist bislang aber unbekannt. Es gibt zwar Hinweise auf Guanin-Addukte (Obrecht-Pflumio und Dirheimer, 2000), andere Gruppen konnten allerdings auch mit sehr empfindlichen Methoden keine OTA-Bindung an DNA-Basen nachweisen (Gautier *et al.*, 2001a; Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002).

De Groene *et al.* (1996a,b) untersuchten die Mutagenität von OTA in NIH/3T3 Mauszelllinien, die mit verschiedenen CYP P450 Gene transfiziert wurden und einen Shuttle-Vector mit dem lacZ'-Gen als Reporter gen für Mutationen enthielten: Sie fanden hauptsächlich große DNA Deletionen und bringen diesen OTA-Effekt mit einer Bio-transformation des Mykotoxins durch die Cytochrom P450 Isoenzyme in Verbindung.

Degen *et al.* (1997) konnten zeigen, daß OTA in Zellkulturen von Schafsamenblasen (ovine seminal vesicle cells, OSV-Zellen) dosisabhängig Mikrokerne induziert. In diesen Zellen wird das Enzym Prostaglandin H Synthase (PHS) in hohem Maße exprimiert (Degen, 1993a,b). Zusatz des PHS-Inhibitors Indometazin (INDO) zum Versuchsansatz ergab einen interessanten Befund, nämlich eine höhere Mikrokernrate, also eine Verstärkung des OTA-Effektes. Die Ergebnisse der Untersuchung sind in der folgenden Grafik zusammengefaßt:

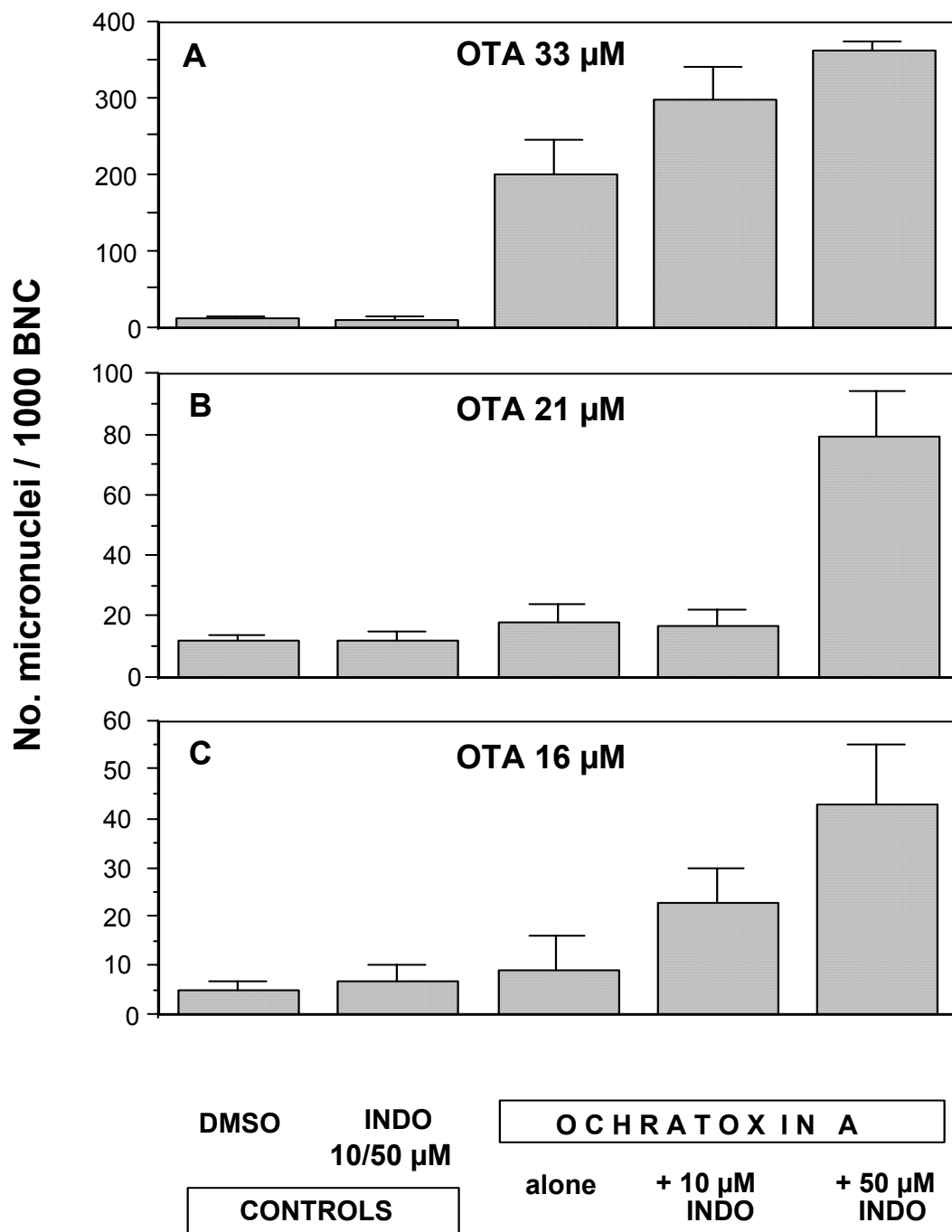


Abb. 3: Dosisabhängige Mikrokerninduktion durch OTA und Einfluß von Indometazin (INDO) in Schafsamenblasen-Zellen (ovine seminal vesicle cells, OSV-Zellen), nach Degen *et al.* (1997)

Die Auslösung genotoxischer Effekte durch OTA ist also unbestritten, aber die Frage nach den zugrundeliegenden Mechanismen, insbesondere die Rolle des Metabolismus von OTA, ist noch nicht geklärt. Während einige Wissenschaftler z. B. eine PHS-

katalysierte Umsetzung von OTA im Sinne einer Bioaktivierung vermuten (vgl. Abschnitt 1.5) sprechen die Befunde von Degen *et al.* (1997) eher für eine Umsetzung im Sinne einer Entgiftung.

1.4 Prostaglandin H Synthase als Enzym des Fremdstoffwechsels

Viele Chemikalien, darunter auch verschiedene Mutagene bzw. Kanzerogene, sind selbst nicht (geno-)toxisch, sondern rufen genotoxische Wirkungen erst nach metabolischer Aktivierung (Bioaktivierung, Toxifizierung) zu reaktiven Intermediaten hervor. In der Leber werden diese Reaktionen hauptsächlich durch Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen katalysiert (Guengerich, 1991). In extrahepatischen Geweben mit sehr geringer Monooxygenase-Aktivität wird alternativ eine Beteiligung von Peroxidasen an der Bioaktivierung von Fremdstoffen diskutiert (Eling *et al.*, 1990; Degen *et al.*, 2002). Eine solche Peroxidase ist die Prostaglandin H Synthase (PHS, E.C. 1.14.99.1). Die PHS ist ein Schlüsselenzym in der Synthese biologisch aktiver Prostanoiden wie Prostaglandine (PGE_2), Thromboxane (TxA_2) und Prostacycline (PGI_2). Als autokrin bzw. parakrin wirkende Mediatoren sind Prostanoiden an einer Vielzahl physiologischer (Reproduktion, Bluthomöostase, Salz- und Wasserhaushalt, Plättchenaggregation) und pathophysiologischer (Fieber, Schmerz, Infektion) Prozesse beteiligt (Smith und Marnett, 1991; Hershman, 1996).

PHS-Aktivität findet sich in nahezu allen Säugergeweben (Eling *et al.*, 1990); besonders hohe Expression findet man im Nierenmark (Davis *et al.*, 1981), Blasenepithel, Reproduktionstrakt (Christ und van Dorp, 1972) und in Gefäßendothelien (Smith *et al.*, 1983). Das Enzym befindet sich als integrales Membranprotein des endoplasmatischen Reticulums bzw. der Kernmembran (Rollins und Smith, 1980) in der Mikrosomen-Fraktion entsprechender Gewebehomogenate. Da die Samenblase von Schafböcken und Rindern besonders hohe PHS-Aktivität aufweist, gilt dieses Organ als bevorzugte Quelle für die Präparation des Enzyms (Marnett und Maddipati, 1991).

Die zuerst aus Schaf-Samenblasen gewonnene PHS ist ein glykosyliertes Homodimer aus zwei je ca. 70 kDa großen Untereinheiten (van der Oudera *et al.*, 1977). PHS besitzt Häm (Eisen-Protoporphyrin Fe^{3+} -PP IX) als prosthetische Gruppe;

beobachtet wurde die Bindung von 0,5 bis 1 Hämgruppe je Untereinheit (Ruf *et al.*, 1984; Kulmacz und Lands, 1984). Inzwischen wurde die Aminosäure-Sequenz der PHS verschiedener Spezies (Mensch, Schaf, Ratte, Maus) aufgeklärt. Die Primärstruktur des Enzyms von Schaf und Maus ist zu 88 % homolog, zwischen Schaf und Mensch bestehen Übereinstimmungen von sogar 91 % (Smith und Marnett, 1991).

Mittlerweile sind zwei Isoformen der PHS bekannt, PHS-1 und PHS-2, die in der Literatur auch COX-1 bzw. COX-2 genannt werden. Beide Isoformen sind strukturell sehr ähnlich und katalysieren die gleichen Reaktionen (Fletcher *et al.*, 1992), ihre Expression ist aber unterschiedlich reguliert (Degen *et al.*, 2002).

Die PHS besitzt zwei Enzymaktivitäten: Eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidase-Aktivität (Kulmacz und Lands, 1984). In der durch die Cyclooxygenase katalysierten Reaktion kommt es zum Einbau von zwei Mol Sauerstoff in ein Mol Arachidonsäure (ARA). Es entsteht das Endoperoxidhydroperoxid PGG₂. Die Peroxidasereaktion reduziert dieses Intermediärprodukt zum Alkohol, dem Endoperoxidhydroxid PGH₂.

Während der durch die Peroxidase katalysierten Reaktion kommt es zur Oxidation eines Kosubstrates. Die Fremdstoffe, die als Kosubstrate der PHS umgesetzt werden (man spricht auch von „Kooxidation“), sind z. B. aromatische und heterozyklische Amine (Rice *et al.*, 1985; Wolz *et al.*, 1995), polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (Eling *et al.*, 1990), und Diethylstilbestrol (Degen *et al.*, 1982) [in Abbildung 4 am Beispiel von „X“ gezeigt].

Für Diethylstilbestrol (Degen *et al.*, 1986) sowie für das heterozyklische Amin 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-*f*]chinolin (IQ; Wolz, 1995) konnte gezeigt werden, daß während der Reaktion gebildete reaktive Intermediate kovalent an Proteine binden.

In vitro unterliegt die PHS einer raschen Autoinaktivierung, die durch Zusatz kleiner Mengen an reduzierendem Kosubstrat verhindert werden kann (Markey *et al.*, 1987). Ein endogenes Kosubstrat ist bislang unbekannt.

Abbildung 4 zeigt eine Übersicht über diese PHS-katalysierte Reaktion.

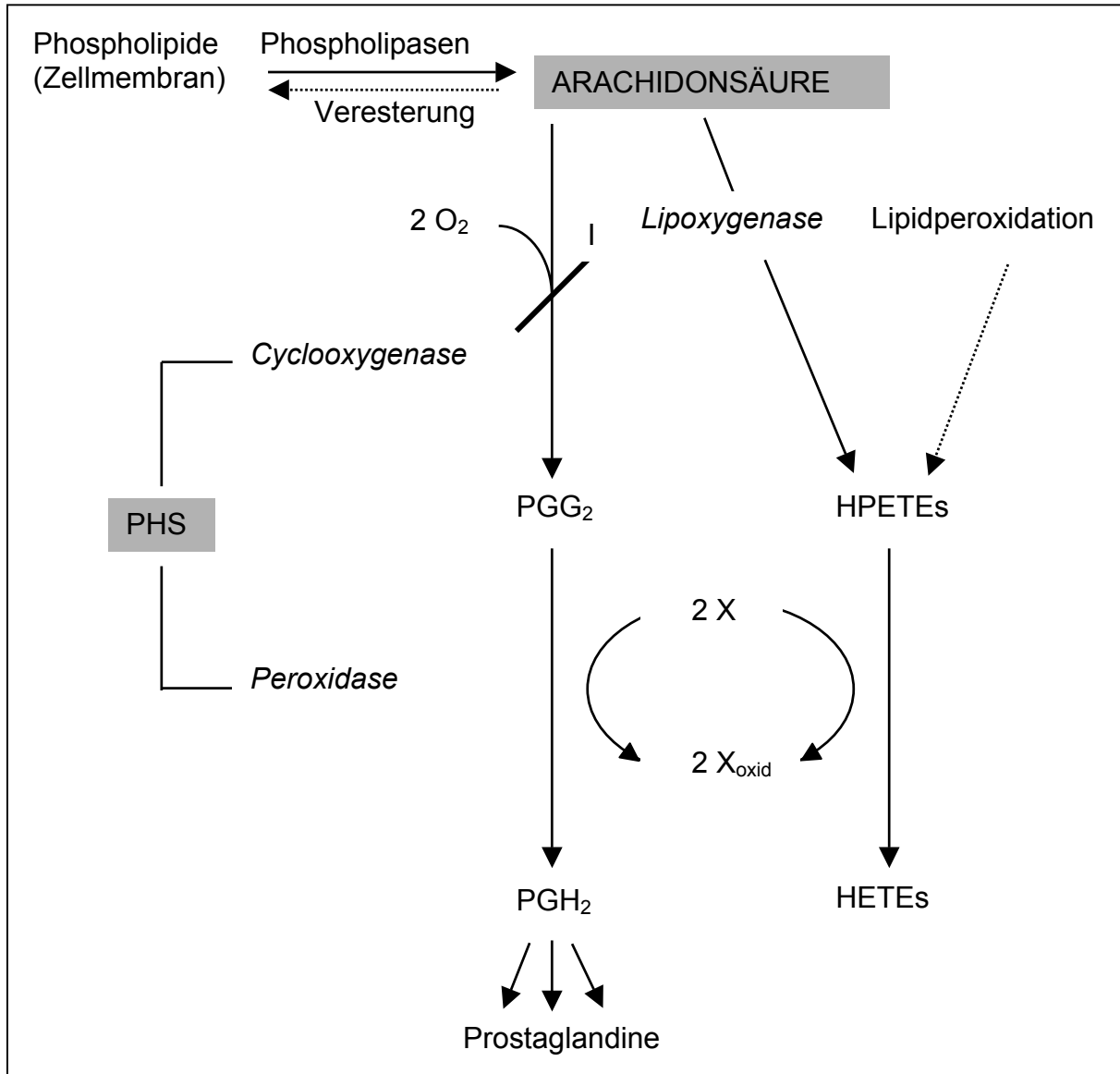


Abb. 4: PHS-katalysierte Kooxidation von Fremdstoffen. I = Hemmung durch Indometazin; X = reduzierendes Kosubstrat; PGG₂ = Endoperoxidhydroperoxid; PGH₂ = Endoperoxidhydroxid (Alkohol); HPETEs = Hydroperoxyeicosatetraensäure; HETEs = Hydroeicosatetraensäure.

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs), wie Indometazin (INDO) oder Acetylsalicylsäure (Aspirin) vermögen die Cyclooxygenase-Aktivität der PHS (und infolge dessen auch die Kooxidation von Fremdstoffen) effizient zu hemmen (Smith und Marnett, 1991). Die Wirkung des Indometazins beruht dabei (wie bei den meisten NSAIDs) auf einer Konkurrenz der Substanz mit ARA um die Bindung an das aktive Zentrum des Enzyms, während Acetylsalicylsäure die Cyclooxygenaseaktivität durch Acetylierung des Serinrestes im katalytischen Zentrum des Enzyms irreversibel hemmt (DeWitt et

al., 1990). In beiden Fällen bleibt jedoch die Peroxidase-Aktivität des Enzyms erhalten. Ein experimenteller Zusatz von INDO oder Aspirin muß die PHS-katalysierte Fremdstoffmetabolisierung nicht unbedingt vollständig hemmen, wenn durch Lipoxygenase-Aktivität oder nicht-enzymatische Lipidperoxidation gebildete Lipidperoxide (Hydroperoxy-eicosatetraensäure, HPETEs) vorliegen und an Stelle von PGG₂ für die Kooxidation von Xenobiotika genutzt werden (Degen *et al.*, 2002).

1.5 Ziele der Arbeit

Wie in den Abschnitten 1.2 und 1.3 dargestellt, muß Ochratoxin A als Krebsrisikofaktor für den Menschen angesehen werden. Die Ausprägung gesundheitsschädigender Wirkungen hängt primär von der Exposition ab. Zur Begrenzung der Exposition werden daher gesetzliche Regelungen für OTA-Höchstmengen in Lebensmitteln angestrebt, die das Risiko für den Verbraucher minimieren.

Eine toxikologische Risiko-Abschätzung wird aber neben Daten zur *Exposition* des Menschen und zur *Dosis-Wirkungs-Beziehung* (im Tierversuch) auch als weiteren wichtigen Aspekt den *Wirkungsmechanismus* heranziehen.

In diesem Zusammenhang interessiert die Frage, ob OTA selbst oder ein Metabolit für die genotoxischen Effekte (DNA-Schädigung und / oder numerische Chromosomenaberrationen) verantwortlich ist. Beispielsweise könnten Unterschiede im Metabolismus von OTA zu spezies-, stamm- und geschlechtsspezifischen Unterschieden in der Ausprägung kanzerogener Wirkungen beitragen. Ferner böten sich Ansatzpunkte zur Modulation, zum Beispiel im Sinne einer verstärkten Detoxifizierung von OTA bzw. einer Hemmung von Bioaktivierungsreaktionen.

Allerdings war zu Beginn dieser Dissertation die Diskussion und die Datenlage zur Rolle des Metabolismus für die Toxizität von OTA alles andere als klar und zwar sowohl in Hinblick auf Cytochrom P450- als auch eine PHS-katalysierte Umsetzung. So sahen die Gruppen um Dirheimer und Pfohl-Leszkowicz Anhaltspunkte für die Bildung reaktiver Intermediate (z. B. Dirheimer, 1998; Grosse *et al.*, 1995a,b; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993d) und vertraten die Position, Bioaktivierung von OTA sei entscheidend für dessen genotoxische Effekte. Andere, darunter die Gruppen am Dortmunder Institut für Arbeitsphysiologie (IfADo) um Degen und Föllmann vertraten eine eher skeptische Position. Zum einen ließen sich Befunde von Hennig *et al.* (1991)

nicht reproduzieren (Föllmann und Lucas, 2003), des weiteren waren die in Abbildung 3 dargestellten Befunde im Mikronukleus-Assay nicht damit vereinbar.

Ausgehend von der Publikation von Degen *et al.* (1997) wurden die folgenden alternativen Hypothesen zur Erklärung der dort beobachteten genotoxischen Effekte des Mykotoxins und möglicher Interaktionen zwischen OTA und Indometazin aufgestellt:

- 1) Wird das Mykotoxin OTA durch die in den OSV Zellen exprimierte Peroxidase PHS metabolisiert? Und bedeutet diese Metabolisierung möglicherweise eine Detoxifizierung des OTA? Ist also OTA selbst genotoxisch und wird es durch PHS in den Zellen detoxifiziert, hätte somit also eine Hemmung dieses Metabolismus durch Indometazin zur Folge, so daß mehr OTA selbst wirken kann?
- 2) Bewirkt der Indometazin-Zusatz eine pH-Wert-Verschiebung in den OSV Zellen, infolge derer es zu einer erhöhten Aufnahme bzw. Retention der schwachen Säure OTA in die / den Zellen und damit zu einer verstärkten genotoxischen Wirkung kommt?
- 3) Erfolgt zwischen beiden Substanzen eine Competition um die Bindung an Serumproteine, und vermag Indometazin das OTA aus dieser Bindung zu drängen, was zur Folge hätte, daß mehr ungebundenes OTA vorliegt, welches in dieser Form vermehrt in die Zellen eindringen und genotoxisch wirken kann?

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, diese Fragen mit geeigneten Methoden zu untersuchen und dann die Befunde im Kontext vorliegender und neuer Studien zum Wirkungsmechanismus von OTA zu diskutieren.

2 Material

2.1 Ausgangsmaterial zur Präparation von Prostaglandin H Synthase und OSV-Zellkulturen

Von frisch geschlachteten Schafböcken wurden im örtlichen Schlachthof Samenblasen entnommen, welche unter Eiskühlung in PBS-CMF-Puffer möglichst rasch für die weitere Präparation ins Labor transportiert wurden (vgl. 3.1.1 und 3.1.2).

2.2 Enzyme

Carboxypeptidase A, 51 units / mg, Typ 2 (aus Rinderpankreas), E.C. 3.4.17.1	Sigma (Deisenhofen)
Meerrettichperoxidase (HRP), 190 units / mg Typ 2 (aus Meerrettich), E.C. 1.11.1.7	Sigma (Deisenhofen)

2.3 Chemikalien

Ameisensäure (98 - 100 %)	Merck (Darmstadt)
Arachidonsäure (ARA)	Pasel & Lorei (Frankfurt)
Bio-Rad Protein-Assay Kit I (incl. bovine γ -globulin Standard)	Bio-Rad (München)
Chloroform (Roti [®] Solv)	Roth (Karlsruhe)
Diethylether	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
E-Diethylstilbestrol (E-DES)	Sigma (Deisenhofen)
Eisessig	Merck (Darmstadt)
Ethanol absolut	Merck (Darmstadt)
Ethylacetat	Merck (Darmstadt)
Ethylendiamintetraessigsäuredinatriumsalz (EDTA)	Sigma (Deisenhofen)
Indometazin (INDO)	Sigma (Deisenhofen)

Isoton [®] II	Coulter Electronics (Krefeld)
Methanol (Roti [®] Solv)	Roth (Karlsruhe)
gradient grade	Merck (Darmstadt)
Natronlauge	Sigma (Deisenhofen)
Ochratoxin A (OTA)	Sigma (Deisenhofen)
	Promochem (Wesel)
Ochratoxin alpha (OT alpha)	biochemische Synthese (siehe 3.7)
Ochratoxin B (OTB)	Promochem (Wesel)
Rotiszint R 2200	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Toluol	Sigma (Deisenhofen)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Wasserstoffperoxid, 30 %	Aldrich (Steinheim)
Z,Z-Dienestrol (Z,Z-DIES)	Sigma (Deisenhofen)
Z-Diethylstilbestrol (Z-DES)	Sigma (Deisenhofen)

Weitere Chemikalien und Puffersalze wurden in *p.a.* Qualität von folgenden Firmen bezogen: Aldrich (Steinheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen).

Zur Herstellung von Pufferlösungen sowie zur Verdünnung von Stammlösungen wurde *Aqua bidest* verwendet, sofern nichts anderes angegeben ist.

2.4 radioaktiv markierte Substanzen

[2- ¹⁴ C]-Indometazin (¹⁴ C-INDO, in Ethanol)	DuPont (Bad Homburg)
Radioakt. Konz. 3,7 MBq / ml (0,1 mCi / ml)	
Spezif. Aktivität 0,83 GBq / ml (22,3 mCi / mmol)	

[³H(G)]-Ochratoxin A (³H-OTA, in Ethanol)
 Radioakt. Konz. 9,25 MBq / ml (0,25 mCi / ml)
 Spezif. Aktivität 144,3 GBq / ml (3,9 Ci / mmol)

Moravek Biochemicals
 (Brea California, USA)

2.5 Zellkulturbedarf

96-well-Platten

Greiner (Nürtingen)

Collagen R, steril, Lösung 2 mg/ml

in 0,1 % Essigsäure

Serva (Heidelberg)

D-[+]-Glucose (Zellkultur-getestet)

Sigma (Deisenhofen)

Deckgläschen, Ø 18 mm

Assistent

Dispase-Lösung (Grad II)

Boehringer (Mannheim)

Foetales Kälberserum (FCS)

Life Technologies (Karlsruhe)

IBR-Medium, Sonderanfertigung

(modification formula 78-5006)

Life Technologies (Karlsruhe)

Kenacidblau

Serva (Heidelberg)

Kulturflaschen

Greiner (Nürtingen)

Objektträger (8-Loch)

ICN Biomedicals (Meckenheim)

Penicillin/Streptomycin (Penstrep), Fertiglösung

Penicillin: 10000 IU/ml

Streptomycin: 10000 µg/ml

Life Technologies (Karlsruhe)

Petrischalen

Greiner (Nürtingen)

Trypsin-Lösung 2,5 % (10 x Konzentrat)

Life Technologies (Karlsruhe)

2.6 sonstige Materialien

Autoradiographiekassette Kodak (24 x 30 cm)

Hartenstein (Würzburg)

DC-Platten: Kieselgel 60 F₂₅₄ (0,2 mm)

Merck (Darmstadt)

PSC Kieselgel 60 (0,5 mm)

Merck (Darmstadt)

DC-Platten Halterung Vario-KS-Techno

Camag (Schweiz)

Entwicklerkonzentrat

Hartenstein (Würzburg)

Fixierkonzentrat

Hartenstein (Würzburg)

Pipetten (0,5 - 10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl, 1000 - 5000 µl)	Abimed (Langenfeld), Eppendorf (Hamburg), Labsystems (Helsinki, Finnland) Zinsser (Frankfurt)
Radioaktivitätsstandards (³ H, gelöscht)	
Röntgenfilm Kodak X-OMAT AR (20,3 x 24,4 cm)	Hartenstein (Würzburg)
Sterilfilter ZAP CAP 0,45 und 0,2 µm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Szintillationsfläschchen (5 bzw. 22 ml)	Zinsser (Frankfurt)
Vivaspin 4 ml-Konzentrator (MW 10.000)	Sipan (Lier, Belgien)

2.7 Geräte

Autoklav Modell Webeco	Webecke & Co. (Bad Schwartau)
Begasungsbrutschrank Modell IG 150	Jouan (München)
Coulter Counter Modell Industrial D	Coulter Electronics (Krefeld)
Dioden-Array Spektrophotometer Modell 8452A	Hewlett Packard (Böblingen)
Fraktionssammler HeliRac TM LKB 2212	LKB (Freiburg)
Inverses Mikroskop Modell IM 35	Zeiss (Oberkochen)
Magnetrührer Modell MR 2000	Heidolph
Mikroplatten-Schüttler Modell MTS 2	Ika Labortechnik (Staufen)
Mikrotiterplatten-Lesegerät SLT 340 ATC	SLT Labinstruments (Crailsheim)
Milli-Q Water System	Millipore (Eschborn)
Oxygraph Modell Gilson 5 / 6 H	Abimed (Langenfeld)
pH-Elektrode Modell InLab 422	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
pH-Meter Modell CG 825	Schott (Hofheim)
Rotationsverdampfer Modelle Büchi RE 111 und Büchi RE 120	Büchi (Flawil, Schweiz)
Rotator	Ismatec
Schüttelwasserbad GFL 1083	GFL Labortechnik (Burgwedel)

Scintillationszähler Modell Tri-Carb 2200 CA	Canberra Packard (Frankfurt)
Sterilbank Modell HBB 2472	Heraeus (Hanau)
Ultraturrax	Ika-Labortechnik (Staufen)
UV-Lampe	Camag (Schweiz)
Vaporisator Reacti-Vap Modell 18780	Pierce Chemical Company (Rockford, Illinois, USA)
Vortex	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)
Waagen:	
Modelle AE 240 und PB 602	Mettler Toledo (Greifensee, Schweiz)
Zentrifugen:	
Eppendorf Typ 5415	Eppendorf (Hamburg)
Kühlzentrifuge J2-21 (Rotor JA-20)	Beckmann (München)
Kühlzentrifuge Minifuge 2	Heraeus (München)
Megafuge 1.0R	Heraeus (München)
Ultrazentrifuge TGA-50 (Rotor TI-50.2)	Kontron (Eching)

3 Methoden

3.1 Kultivierung von Schafsamenblasen-Zellen (ovine seminal vesicle cells, OSV-Zellen)

3.1.1 Medium und Puffer für die Zellkultur

Alle Salz- bzw. Pufferlösungen für die Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen angesetzt. Sofern nichts anderes angegeben ist, wurden die Ausgangsstoffe bzw. die fertigen Lösungen in einem Autoklaven dampfsterilisiert und bei 4 °C bis zum Gebrauch gelagert. Für die Zellkultur wurden sie nach Erwärmung auf 37 °C eingesetzt.

IBR-Medium (Modification formula 78-5006)

Für die Kultivierung von OSV-Zellen (ovine seminal vesicle cells) wurde IBR-Medium verwendet, eine Sonderanfertigung, das in seiner Zusammensetzung dem DMEM-Medium (Dulbecco's Minimal Essential Medium) der Firma Life Technologies vergleichbar ist. Die genaue Formulierung ist bei Foth (1992) beschrieben.

Das Pulvermedium wurde in sterilem Wasser gelöst, mit Penicillin/Streptomycin-Fertiglösung zu 50 ml auf 10 l Medium versetzt und anschließend sterilfiltriert.

Vor Gebrauch wurde es aliquotiert und durch folgende Zusätze komplettiert:

- 35 %-ige Glucoselösung

175 g Glucose in 500 ml Endvolumen A. bidest lösen, dem Medium 1 %-ig (v/v) zusetzen (5 ml Glucoselösung/500 ml), Endkonzentration: 1,75 g Glucose/500 ml Medium

- 7,5 %-ige NaHCO₃-Lösung

37,5 g NaHCO₃ in 500 ml Endvolumen A. bidest lösen, dem Medium 3 %-ig (v/v) zusetzen (15 ml NaHCO₃/500 ml), Endkonzentration: 1,125 g NaHCO₃/500 ml Medium

Vor Zugabe von FCS (fetal calf serum, foetales Kälberserum) wurde das Medium mit CO₂ bis zum Indikatorumschlag von rot-violett nach gelb-orange begast.

Anschließend wurde FCS je nach Fragestellung 2,5; 10 bzw. 15 %-ig (v/v) zugesetzt.

In dieser Zusammensetzung ist das Medium etwa 3 Monate lang gekühlt haltbar und kann für die Zellkultur direkt eingesetzt werden.

● Lösungen

Pufferlösungen

	<i>PBS-CMF</i>		<i>PBS</i>	
NaCl:	140 mM	(8,2 g/l)	140 mM	(8,2 g/l)
KCl:	2,7 mM	(0,2 g/l)	2,7 mM	(0,2 g/l)
Na ₂ HPO ₄ :	3,2 mM	(0,57 g/l)	3,2 mM	(0,57 g/l)
KH ₂ PO ₄ :	1,5 mM	(0,2 g/l)	1,5 mM	(0,2 g/l)
MgCl ₂ :	—	—	0,5 mM	(0,1 g/l)
CaCl ₂ :	—	—	1,2 mM	(0,13 g/l)
	Sterilfiltrieren		Autoklavieren	

Trypsin-Lösung (0,25 %)

Trypsin-Lösung 2,5 %	100 ml
EDTA	200 mg
PBS-CMF	900 ml

Lösung wird nach Sterilfiltration bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert

3.1.2 Anlegen einer Primärkultur aus Schafsamenblasen

Primärkulturen aus Schafsamenblasen wurden nach der Methode von Freyberger *et al.* (1987) mit Modifikationen nach Foth (1992) gewonnen.

Frisch entnommene Samenblasen von Schafböcken wurden vom örtlichen Schlachthof in PBS-CMF-Puffer (mit Penicillin 100 IU/ml und Streptomycin 100 µg/ml) unter Eiskühlung möglichst schnell ins Labor verbracht. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank.

Die Organe wurden von Fettgewebe und Drüsenepithel befreit und der innere Drüsenbereich mit einer Schere grob zerkleinert. Nach Aufnahme der Gewebeteile in PBS-CMF und nachfolgender Homogenisierung mittels Ultraturrax wurden dem Homogenat zum enzymatischen Verdau der interzellulären Verbindungen 10 ml Dispaselösung (Grad II) zugesetzt. Nach 10 min Rühren bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgenommen und für 5 min bei Raumtemperatur mit 920 x g zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das Zellpellet wurde in 10 ml IBR-Medium mit 15 % FCS resuspendiert, darin in eine 75 cm² Kulturflasche überführt und bei 37 °C und 12 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Medium-Wechsel durchgeführt, wobei nicht angeheftete Zellen entfernt wurden. Nach ca. 1 Woche war der Zellrasen konfluent und die Zellen konnten subkultiviert werden.

Primärkulturen von OSV-Zellen enthalten Fibroblasten und epitheliale Zellen. Das Wachstum der Fibroblasten wurde jedoch durch die Verwendung von unbeschichteten Kulturgefäßen sowie Medium mit 15 % FCS gefördert. Während in OSV-Zellkulturen anfangs (und bis Passage 8) etwa 8 % der Zellen epithelialen Ursprungs sind, verringert sich dieser Anteil in Kulturen, die nach Kryopräservierung wieder in Kultur genommen werden, auf 1 - 2 % (Foth, 1992).

Alle Untersuchungen wurden mit Zellisolaten der gleichen Präparation (Nummer 18) durchgeführt. Bei Angaben zum entsprechenden Isolat steht die Nummer der Präparation (18) vor, die Passagezahl der Zellkultur (z. B. 10) hinter dem Schrägstrich (also 18/10). Die Numerierung der Präparationen erfolgte chronologisch.

3.1.3 Subkultivierung von OSV-Zellen

Nach Erreichen der Konfluenz des Zellrasens wurden die OSV-Zellen zur weiteren Vermehrung umgesetzt. Hierzu wurde zunächst das Kulturmedium abpipettiert und verbleibende Mediumreste mit PBS-CMF abgespült. Die Zellen wurden anschließend mit 0,25 %-iger Trypsin-Lösung bei 37 °C für ca. 20 sec inkubiert, die Trypsin-Lösung abgegossen und die Zellen durch Klopfen vom Kulturgefäß abgelöst. Nach Ablösung der Zellen vom Gefäßboden wurde der Vorgang gestoppt, indem das Trypsin durch Zugabe von Medium mit 10 % FCS inaktiviert wurde. Entsprechend ihrer weiteren Verwendung wurden die Zellen dann gezählt bzw. in neue Kulturgefäße umgesetzt.

Während der Wachstumsphase wurde das Kulturmedium (mit 10 % FCS) alle 2 - 3 Tage gewechselt.

Abbildung 5 zeigt mit Giemsa-Lösung gefärbte, unbehandelte OSV-Zellkulturen der Passage 18/13, die auf 60 mm Petriplatten (Greiner, Nürtingen) in 4 ml IBR-Medium gezogen wurden: **A**: 200.000 Zellen, **B**: 700.000 Zellen je Petrischale. Nach dem Abnehmen des Mediums wurden die Zellen vorsichtig zunächst bei Raumtemperatur (RT, 21°C) mit je 3 ml Methanol für 10 Minuten, und dann 3 mal mit je 3 ml A. bidest gespült. Die Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) wurde mit A. bidest 1:10 verdünnt, anschließend wurden die Zellen mit je 3 ml der so verdünnten Färbelösung angefärbt und später 3 mal mit A. bidest abgespült. Die Aufnahmen wurden mit einem Kodak Gold Film 200 ISO mit Hilfe des inversen Lichtmikroskops (Zeiss, Oberkochen) bei 20-facher Objektivvergrößerung gemacht.

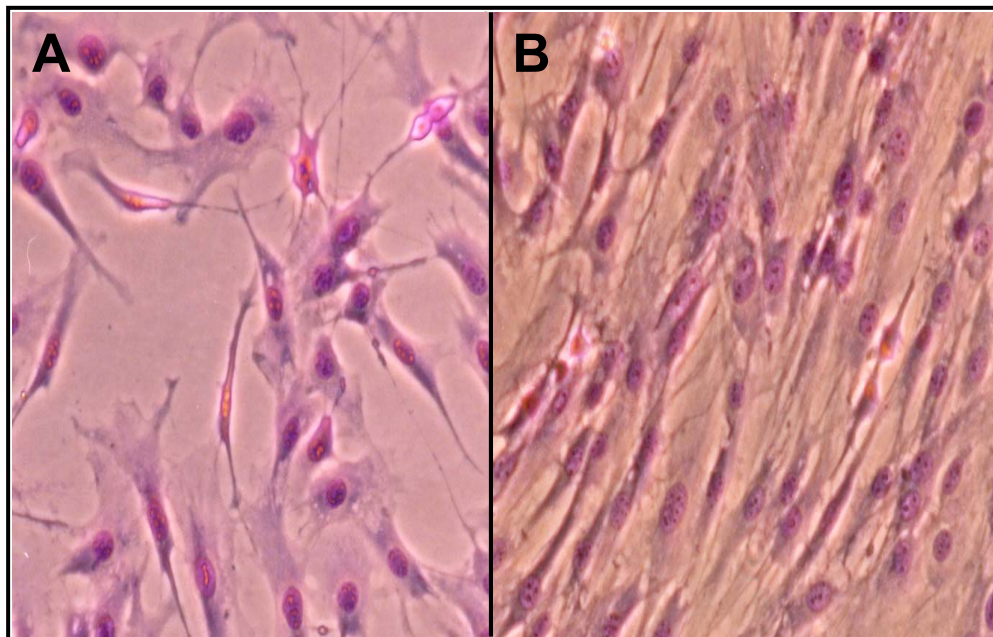


Abb. 5: Lichtmikroskopische Aufnahme von mit Giemsa angefärbten, unbehandelten OSV-Zellkulturen (18/13), **A**: 200.000 Zellen pro Petrischale, **B**: 700.000 Zellen je Petrischale

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie unter 3.1.3 beschrieben abtrypsinisiert und in 10 ml IBR-Medium resuspendiert. Nach Verdünnung eines 0,5 ml-Aliquotes der Zellen mit 9,5 ml Isoton[®] II wurde die Zellzahl mittels eines Coulter Counters bestimmt.

3.1.5 Kryopräservierung

Die OSV-Zellen können über längere Zeit ohne sichtbare Veränderungen der Morphologie bzw. Vitalitätsverluste kryopräserviert werden (Degen, 1993a). Der Vorteil einer solchen Lagerungsmöglichkeit besteht vor allem darin, daß über längere Zeiträume mit Zellmaterial des gleichen Ursprungs gearbeitet werden kann.

Die Kryopräservierung ist ausführlich bei Foth (1992) beschrieben. Dazu wurden die Zellen wie unter 3.1.3 beschrieben abtrypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Je 1×10^6 Zellen wurden in insgesamt 1,8 ml IBR-Medium (supplementiert mit 15 % FCS und 5 % DMSO) in Polypropylen (PP)-Kryogefäße (Greiner, Nürtingen) aliquotiert. Die Zellen wurden zunächst für 24 h bei -20°C , anschließend für weitere 24 h bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei etwa -160°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung kryopräservierter Zellen wurden zwei dieser PP-Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad schnell aufgetaut und die Zellen nach Aufnahme in 10 ml IBR-Medium (10 % FCS) bei Raumtemperatur (21°C) für 5 min bei $920 \times g$ zentrifugiert (Megafuge 1.0 R, Heraeus). Das nun von DMSO weitgehend befreite Zellpellet wurde in 10 ml Zellkulturmedium (10 % FCS) resuspendiert und in einer 25 cm^2 Kulturflasche ausgesät. Ein Mediumwechsel erfolgte am nächsten Tag.

Alle im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Zellen durchgeführt, die nach Kryopräservierung rekultiviert worden waren. Die Zellen wurden bei 37°C und 12 % CO_2 im Brutschrank gehalten.

3.2 Zytotoxizitätstest

Die Zytotoxizität von OTA in OSV-Zellen wurde anhand der Bestimmung des zellulären Proteingehaltes mittels des Kenacidblau-Assays nach Knox *et al.* (1986) in 96-well Mikrotiterplatten gemäß dem InVitTox-Protokoll Nr. 3 (1990) geprüft. Dieser Test nutzt die Tatsache, daß eine zytotoxische Substanz (unabhängig vom Mechanismus der Schädigung) die Zellvermehrung beeinträchtigt bzw. zum Absterben von Zellen führt und so die Zellzahl erniedrigt. Bei der Messung wird das weitgehend konstante Verhältnis zwischen Zellzahl, Proteingehalt der Zellen und Proteinfärbung mit Coomassie-Blau genutzt (InVitTox-Protokoll Nr. 3, 1990).

Die Bestimmung erfolgte photometrisch nach Inkubation der Zellen mit OTA und Vergleich mit Lösungsmittel-behandelten Kontrollen.

15×10^3 Zellen wurden in 200 µl IBR-Medium (10 % FCS) pro well (Mulde) ausgesät und wuchsen für 21 h bei 37 °C und 12 % CO₂ an („Anwuchsphase“). Dieses Medium wurde gegen frisches Medium (0 % FCS) ausgetauscht, welches die Testsubstanzen OTA (in 0,1 M NaHCO₃, pH 7,4) und/oder INDO (in 0,1 M NaHCO₃ pH 7,4/DMSO 90/10 (v/v)) bzw. Lösemittel in den gewünschten Konzentrationen enthielt (Endkonzentration an NaHCO₃ bzw. NaHCO₃/DMSO im Medium in allen wells: 1 % (v/v)). Wurden Doppelinkubationen mit Indometazin und OTA durchgeführt, wurden beide Substanzen gleichzeitig zugesetzt.

Die Platten wurden mit den Testsubstanzen für 21 h bei 37 °C und 12 % CO₂ inkubiert („Behandlungsphase“) und nach Absaugen des Mediums dreimal mit PBS gewaschen. Zur Zellfixierung wurden pro well 200 µl Fixierlösung aufgegeben und die Platten 20 min lang auf einem Mikroplatten-Schüttler geschüttelt. Anschließend wurde diese Lösung abgegossen und die Platten erneut mindestens zweimal mit PBS gewaschen, bevor pro well 200 µl der frisch angesetzten Färbelösung zugesetzt und für weitere 30 min geschüttelt wurde. Nach Entfernen der Färbelösung wurden die Platten zweimal für je 5 min mit Waschlösung gewaschen und die Lösung dekantiert. Schließlich wurde in jedes well 200 µl Desorberlösung gegeben und erneut 20 min lang geschüttelt. Die Absorption wurde im Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 570 nm gegen einen Referenzfilter von 405 nm gemessen.

Die Bestimmung der Plattenhintergrund-Absorption erfolgte in wells, in welche keine Zellen ausgepflanzt wurden. Nach der wie oben beschriebenen „Anwuchsphase“

(ohne Zellen) mit 10 % FCS im Medium wurden in jedes dieser wells 200 µl Nährmedium ohne FCS gegeben, die wells dann wie oben beschrieben weiterbehandelt. Die so gemessene Absorption wurde als Blindwert von den Absorptionen aller anderen wells abgezogen.

● Lösungen

NaHCO₃ 0,1 M, pH 7,4

840 mg NaHCO₃ in 100 ml A. bidest lösen, mit 1 N HCl auf pH 7,4 einstellen

Fixierlösung

50 % (250 ml) Ethanol und
1 % (5 ml) Eisessig lösen in
49 % (245 ml) A. bidest (v/v/v)

Waschlösung

10 % (50 ml) Ethanol und
5 % (25 ml) Eisessig lösen in
85 % (425 ml) A. bidest (v/v/v)

Desorberlösung

1 M K-Acetat (49,1 g) in 70 % Ethanol lösen (350 ml Ethanol/150 ml A. bidest, v/v)

Kenacid-Blau Färbelösung

Stammlösung: 0,2 g Coomassie-Blau in 315 ml A. bidest und 125 ml Ethanol lösen

Gebrauchslösung: pro zu färbende Platte je 22 ml Stammlösung 3 ml Eisessig zusetzen

3.3 *In vitro* Mikronukleus-Test

Theoretische Grundlagen und Prinzip der Methode

Der *in vitro* Mikronukleus-Test ist ein Genotoxizitätstest an proliferierenden eukaryoten Zellen und dient der Erkennung Substanz-induzierter struktureller und numerischer Chromosomenaberrationen (Romagna, 1993). Diese manifestieren sich, infolge einer Fehlverteilung des genetischen Materials bei der nachfolgenden

Zellteilung, in der anschließenden Interphase als sogenannte Mikrokerne (Heddle und Salamone, 1981). Mikrokerne können, je nach Art der Schädigung des Erbgutes, azentrische Chromosomenfragmente (Wirkung klastogener Substanzen) bzw. ganze Chromosomen (Wirkung aneugener Substanzen wie Spindelgifte) enthalten (Adler, 1984). Sie sind wie der Zellkern von einer Kernmembran umgeben, besitzen aber nur einen Bruchteil von dessen Größe. Die quantitative Erfassung mikrokernhaltiger Zellen wird als indirekter Meßparameter zur Untersuchung einer zytogenetisch wirksamen Substanz herangezogen (Romagna, 1993).

Der Test beruht auf einer Fluoreszenzfärbung des genetischen Materials sowohl im Zellkern als auch in den Mikrokerneln, nachdem proliferierende (OSV-) Zellen der Testsubstanz ausgesetzt wurden. Die Verwendung des interkalierenden Farbstoffes Acridin-Orange (Heddle *et al.*, 1981) resultiert in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung bei Vorschaltung entsprechender Filter in einer intensiven Gelbfärbung der DNA, während das Zytoplasma schwach orange gefärbt ist.

Eine Erhöhung der Empfindlichkeit dieses Testsystems wird mit der Zytokinese-Blockierungsmethode mit Cytochalasin B erreicht (Fenech und Morley, 1985). Cytochalasin B verhindert nach erfolgter Karyokinese, also Kernteilung, die Teilung des Zytoplasmas. Die resultierenden Zellen weisen daher zwei Zellkerne auf und werden als „binukleäre Zellen“ bezeichnet. Damit sind sie eindeutig als teilungsaktive, vitale Zellen erkennbar.

Behandlung der Zellen

Die Durchführung des Testes sowie der Färbung sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.

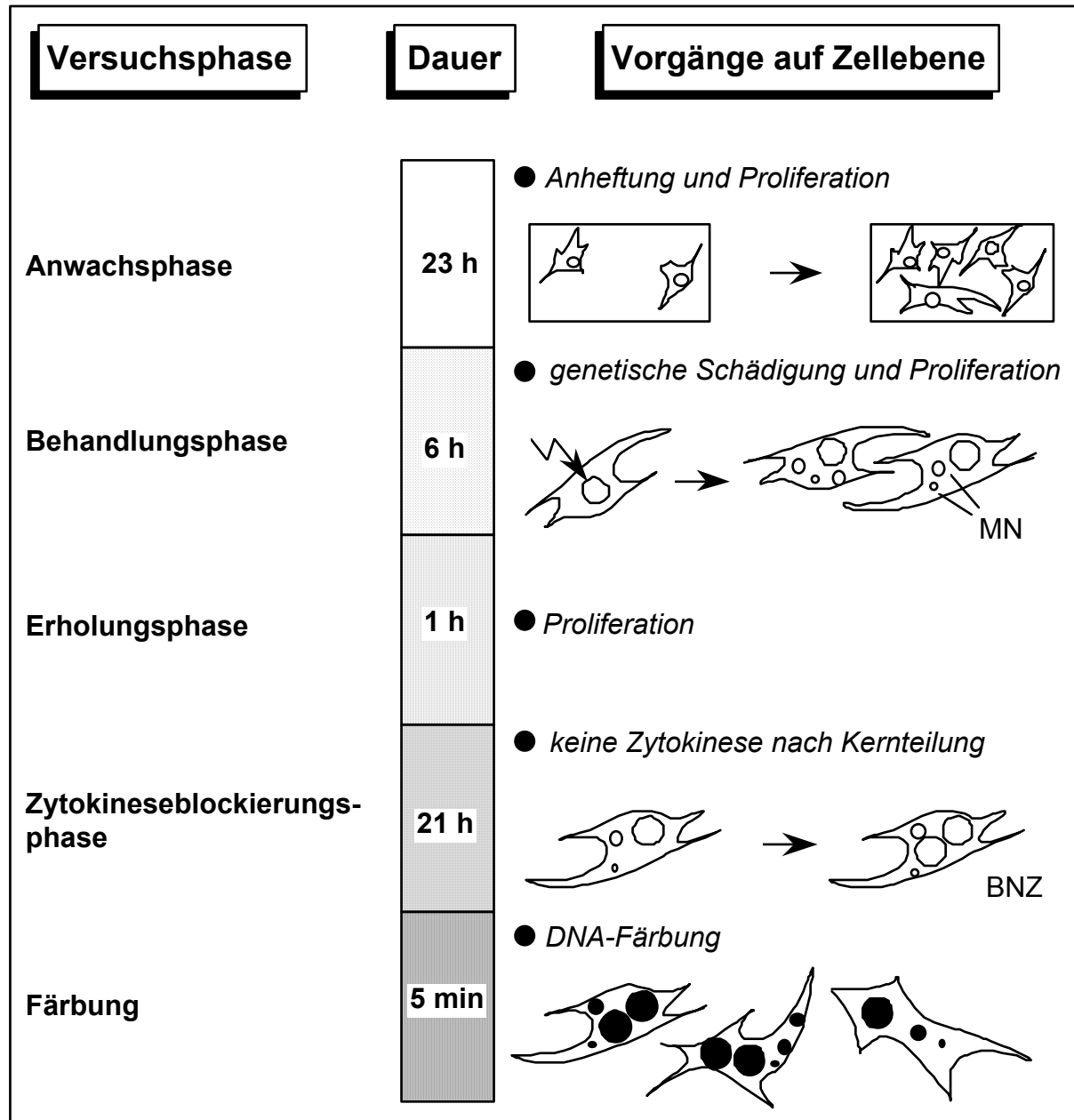


Abb. 6: Schematische Übersicht des *in vitro*-Mikronukleus-Testes. Dargestellt sind neben den Versuchsphasen und deren Dauer die entsprechenden Vorgänge auf zellulärer Ebene. MN: Mikronuklei; BNZ: binukleäre Zelle

Nach Kryopräservation rekultivierte OSV-Zellen der Präparation 18 wurden in Vorbereitung auf den *in vitro*-Mikrokerntest zur Vermeidung einer Mykoplasmeninfektion mit BM-Cyclin (in A. bidest, Boehringer, Ingelheim) behandelt (Pleuromutilin-Derivat BM Cyclin 1: Endkonzentration 40 ng/ml Medium für 3 d;

Tetracyclin-Derivat BM-Cyclin 2: 10 ng/ml Medium für 4 d). Die Zellen wurden in IBR-Medium (10 % FCS), wie in 3.1.3 beschrieben bis zur Passage 7-9 kultiviert.

Danach wurden sie abgeerntet und die Zellzahl bestimmt (vgl. 3.1.3 bzw. 3.1.4).

$3,5 \times 10^5$ Zellen wurden auf sterile 8-well Objektträger (ICN Biomedicals, Meckenheim) in Quadripermschalen (Heraeus, Hanau) in je 5 ml IBR-Medium (10 % FCS) pro Kammer ausgesät. Die Zellen wurden für 23 h im Brutschrank gehalten („Anwuchsphase“) und nach Mediumwechsel für 6 h bei 37 °C und 12 % CO₂ mit den Testsubstanzen behandelt („Behandlungsphase“).

Die Testsubstanzen OTB und OT alpha wurden in den gewünschten Konzentrationen in DMSO gelöst, für die entsprechenden Testansätze wurde IBR-Medium mit 10 % FCS verwendet. Bei Doppelinkubationen mit INDO (in DMSO) wurden beide Substanzen gleichzeitig zugesetzt (Endkonzentration DMSO: max. 0,5 %, v/v). Für den Mikrokerntest mit OTA bei 0 % FCS im IBR-Medium wurde OTA in 0,1 M NaHCO₃, pH 7,4 gelöst, INDO dagegen in Ethanol (Endkonzentration NaHCO₃: 0,25 % v/v; Endkonzentration Ethanol: 0,1 %, v/v). Als Kontrollen dienten jeweils die Lösungsmittel bzw. INDO in entsprechenden Konzentrationen. Nach der „Behandlungsphase“ wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen konnten sich in frischem Medium (10 % FCS) ohne Testsubstanzen für 1 h erholen („Erholungsphase“).

Anschließend wurde dem Nährmedium Cytochalasin B (in DMSO; Sigma, Deisenhofen) in einer Endkonzentration von 3 µg/ml zugesetzt und die Zellen weitere 21 h in Medium mit 10 % FCS inkubiert („Zytokineseblockierungs-Phase“).

Nach dieser Zeit wurde das Medium abgenommen, die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und bei RT (21°C) für 2 min in Methanol vorfixiert.

Anschließend wurden die Zellen für mindestens 1 h bei - 20°C in 96 %-igem Methanol auf den Objektträgern fixiert. In diesem Zustand sind sie bei 4°C für längere Zeit lagerfähig.

Pro Dosisgruppe wurden n = 4 Objektträger in dieser Weise behandelt.

Färbung der Präparate

Vor der Färbung der Präparate wurden die Zellen bei RT (21°C) für mindestens 20 min in Soerensen-Puffer (pH 8,0) rehydriert.

Anschließend wurden sie mit Acridin-Orange Gebrauchslösung (in Soerensen-Puffer pH 6,8, Serva, Heidelberg) bei RT (21°C) für 5 min gefärbt. Die Objektträger wurden zweimal für je 5 min mit Soerensen-Puffer pH 6,8 gewaschen und schließlich in angefeuchtetem Zustand mit Deckgläsern abgedeckt.

Auswertung

Die Auswertung der Objektträger erfolgte unter Eindeckung in Soerensen-Puffer pH 6,8 mit einem Leitz Fluoreszenzmikroskop (Modell DMBR, Leica, Wetzlar) mit Phasenkontrast (Okularvergrößerung: 10; Objektivvergrößerung: 40, Neofluar; Osram HBO 50 W Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe; Anregungsfilter: BP 450-490 nm; Sperrfilter LP 520; alles Leica, Wetzlar).

Es wurden die gängigen Kriterien zur Auswertung von Mikrokerntesten befolgt (Eastmond und Tucker, 1989), d.h. je Objektträger wurden 1000 binukleäre Zellen ausgezählt, wobei jeder Mikrokern als Ereignis gewertet wurde, sofern er vom Zellkern klar abgegrenzt und deutlich kleiner als dieser war. Außerdem wurden nur solche Zellen ausgewertet, die keine Anzeichen von Karyorrhesis aufwiesen.

Für jede Behandlungsgruppe wurden zusätzlich die Anteile binukleärer Zellen bestimmt, indem pro 300 Zellen/Objektträger die Anzahl der Zellen mit zwei Kernen gezählt wurde.

● Lösungen

Soerensen-Puffer (33 mM Na_2HPO_4 / 33 mM KH_2PO_4 , pH 6,8 bzw. 8,0

(1) Herstellung einer 66 mM Na_2HPO_4 -Lösung: 4,68 g in 500 ml A. bidest lösen

(2) Herstellung einer 66 mM KH_2PO_4 -Lösung: 4,49 g in 500 ml A. bidest lösen

Lösung (1) mit Lösung (2) auf pH 8,0 bzw. 6,8 einstellen

Acridin-Orange Färbelösung

Stammlösung (0,1 %-ig): 100 mg Acridin-Orange in 100 ml A. bidest lösen

Gebrauchslösung: Stammlösung 1:15 mit Soerensen-Puffer pH 6,8 verdünnen (4,5 ml Stammlösung + 67,5 ml Puffer)

3.4 Messung des intrazellulären pH-Wertes

Theoretische Grundlagen und Prinzip der Methode

Die Messung des intrazellulären bzw. zytoplasmatischen pH-Wertes erfolgte mittels an konfokale Laser Scanning-Mikroskopie gekoppelte Ratio-Fluorimetrie (Bright *et al.*, 1987) unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF [2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5 (und 6)-carboxyfluorescein] (Wehner *et al.*, 1993; Slayman und Moussatos, 1994; Weill *et al.*, 1994).

Dieses Fluorescein-Derivat wird als neutraler, lipophiler Acetoxymethyl-Ester (BCECF-AM) von den Zellen aufgenommen und durch zelluläre Esterasen hydrolysiert, wodurch BCECF freigesetzt wird.

Mit einem pK_a -Wert von 6,98 besitzt dieses bei physiologischem pH-Wert 4-5 negative Ladungen und wird in dieser Form in den Zellen retiniert (Haugland und Larison, 1992). Abbildung 7 zeigt die Strukturformeln der beiden Derivate.

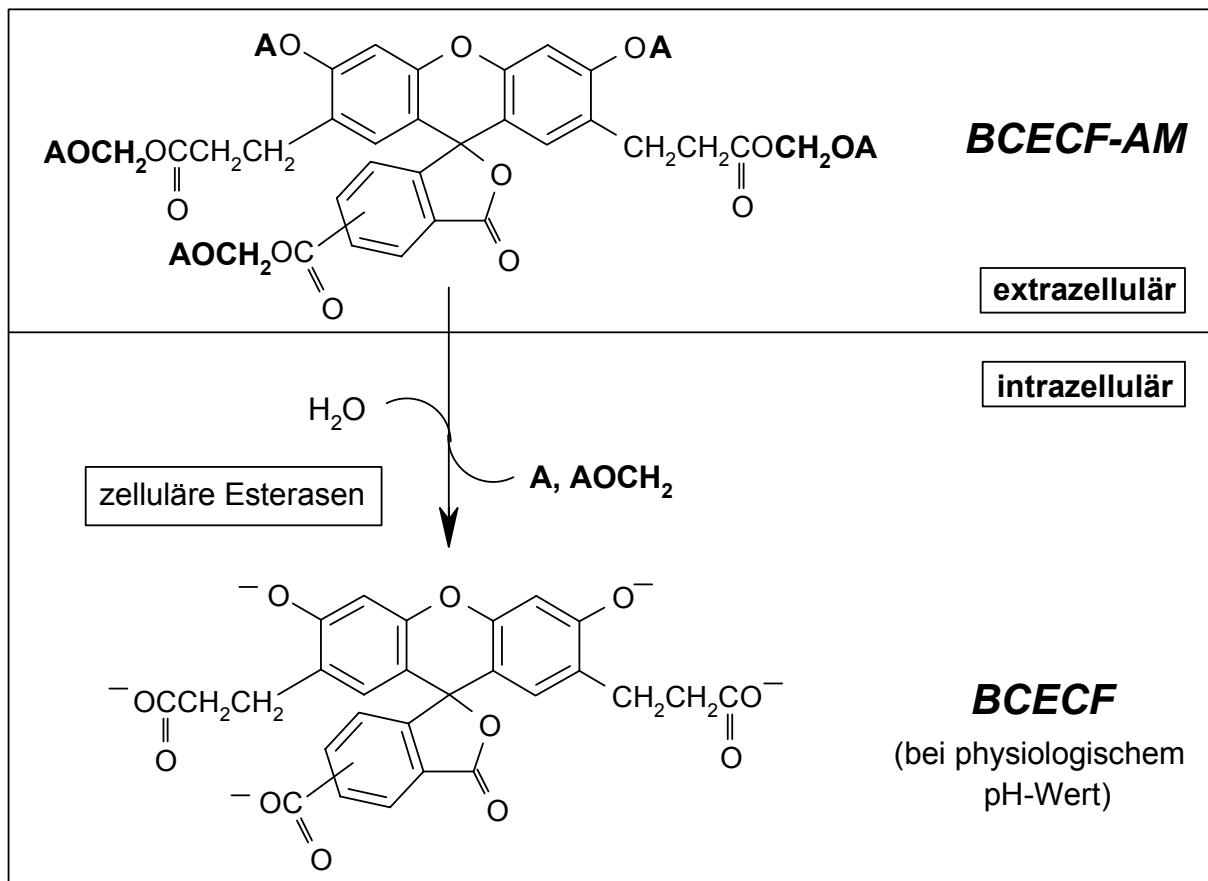


Abb. 7: Strukturformeln von BCECF-Acetoxy-methylester (BCECF-AM) und unverestertem BCECF. **A:** Acetylrest, **AOCH₂:** Acetoxy-methylrest. Modifiziert nach Slayman und Moussatos, 1994.

Der in den mikroskopisch beobachteten Zellen retinierte Farbstoff wird von zwei Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlängen (λ_1 und λ_2) angeregt, wobei λ_1 nahe des Absorptionsmaximums (505 nm) und λ_2 nahe des isobestischen Punktes (439 nm) von BCECF gewählt wird (Haugland und Larison, 1992). Die dadurch vom Farbstoff emittierten Fluoreszenzintensitäten sind durch Anregung mit λ_1 pH-Wert-abhängig bzw. mit λ_2 pH-Wert-unabhängig. Das Verhältnis dieser beiden Emissionsintensitäten wird kontinuierlich über ein computergesteuertes bildgebendes Verfahren gemessen und gespeichert. Bei Versuchsende ermöglicht ein Zusatz des K⁺-Ionophors Nigericin zu den gefärbten Zellen eine intrazelluläre Kalibrierung mit Eichlösungen verschiedener pH-Werte und hohem K⁺-Gehalt (Thomas *et al*, 1979). Aufgrund der hier ermittelten Emissionsintensitäten können der vormalige

intrazelluläre pH-Wert einzelner Zellen ebenso wie mögliche Veränderungen über die Zeit automatisch bestimmt werden.

Kultivierung der OSV-Zellkulturen

Nach Kryopräservation rekultivierte OSV-Zellen der Präparation 18 wurden in IBR-Medium (10 % FCS) bei 37 °C und 12 % CO₂ bis zur Passage 8-10 in Kulturgefäßen kultiviert. 24 h vor Messung des pH-Wertes wurden sie abtrypsiniert und je 400.000 Zellen in 2 ml IBR-Medium (10 % FCS) auf runde sterile Deckgläschen (Ø 18 mm, Assistent) ausgepflanzt, die mit einem Tropfen Collagen R (Serva) am Boden kleiner Petrischalen (35 x 10 mm, Greiner) befestigt wurden. Dadurch wurde gewährleistet, daß die Zellen nur an einer Seite der Deckgläschen anhaften, eine Voraussetzung für die spätere mikroskopische Auswertung der Präparate.

Beladen der Zellen

Bei Versuchsbeginn wurden die bepflanzten Deckgläschen mit einer Pipette vorsichtig von der unterliegenden Petrischale abgenommen und in frische Petrischalen mit je 1 ml IBR-Medium (10 % FCS) verbracht, das durch Begasung mit Carbogen auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt worden war. Im Dunkeln gelagertes BCECF-AM (Molecular Probes, Eugene, USA) in DMSO wurde dem Präparat in einer Endkonzentration von 10 µM (Endkonzentration DMSO: 0,3 %, v/v) zugesetzt und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ für 30 min in dieser Färbelösung inkubiert.

Versuchsdurchführung

Unmittelbar im Anschluß an die 30-minütige Färbung wurde das entsprechende Zellpräparat in BCECF-freiem IBR-Medium (10 % FCS) gründlich gewaschen und umgedreht in eine 0,1 ml-Perfusionskammer eingespannt.

Die Fluoreszenzemission wurde durch Bestrahlung der Zellen mit einem Argon-Ionen Laser (Ion Laser Technology, Salt Lake City, USA) bei 488 nm bzw. einem Helium-Cadmium Laser (Modell 4310 N, Liconix, Santa Clara, USA) bei 442 nm angeregt.

Die einzelnen Zellen wurden unter einem mit der konvokalen Laserscan-Einheit (MRC-600, BioRad, Hemel, Hampstead, England) gekoppelten Standard-Mikroskop (Diaphot, Nikon, Düsseldorf) mit einem 6,3 x Neofluar Objektiv (Zeiss, Oberkochen) beobachtet; Bilder der jeweils emittierten Fluoreszenz wurden alle 60 sec aufgenommen und die Daten von einem Mikrocomputer (RM Nimbus AX/2, Oxford, England; Meßprogramm COMOS, BioRad, Hemel, Hampstead, England) digitalisiert und ausgewertet.

Während der 30-minütigen Messung wurden die Zellen kontinuierlich mit auf 37 °C erwärmtem und mit Carbogen begastem IBR-Medium (10 % FCS) mit 2,5 ml/min überströmt, in welchem die Testsubstanzen gelöst waren.

Eingesetzt wurden die Testsubstanzen OTA 20 bzw. 30 µM sowie Indometazin in 50 µM Konzentration jeweils einzeln sowie in Kombination. Die Substanzen wurden in DMSO gelöst, der Anteil an DMSO betrug in allen Versuchsansätzen 0,2 %, v/v.

Unmittelbar vor und nach der Messung wurden die Zellen für einige Minuten mit erwärmtem Zellkulturmedium mit 10 % FCS ohne Testsubstanzen überströmt (Vorlauf- bzw. Nachlaufphase).

Eichung der Messungen

Im Anschluß an die Nachlaufphase erfolgte die Eichung. Dazu wurde den Zellen das K⁺-Ionophor Nigericin (Endkonzentration 10 µM) in Kombination mit Eichlösungen verschiedener pH-Werte (pH 6.4; 7.2; 7.8) und hohem K⁺-Gehalt (140 mM) in 10 mM HEPES-Puffer zugesetzt.

Die Emissionsintensitäten wurden nach so erzielter Equilibrierung von extra- und intrazellulärem pH-Wert wie oben beschrieben bestimmt und der vormalige intrazelluläre pH-Wert anschließend computergesteuert berechnet und automatisch in Microsoft Excel Tabellen übertragen.

Die oben beschriebenen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit und am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund durchgeführt.

3.5 Untersuchungen zum Metabolismus von OTA in OSV-Zellen

Behandlung der Zellen

Zur Untersuchung einer möglichen Metabolisierung von OTA durch OSV-Zellen wurden Zellen der Präparation 18/10 herangezogen. Je 1,3 Mio. Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium mit 10 % FCS in Petrischalen über Nacht angezogen. Das Medium wurde abgenommen und gegen 7 ml frisches Medium mit 10 % FCS ausgetauscht, welches die Testsubstanzen (in DMSO) in folgenden Konzentrationen enthielt: OTA 15 μM bzw. OTA 15 μM und Indometazin 50 μM ; die Konzentration von DMSO betrug in allen Ansätzen 0,22 % (v/v).

Zur Beurteilung einer möglichen Veränderung bzw. Zersetzung während der Aufarbeitung wurde OTA (15 μM) in Medium ohne Zellen inkubiert, sowie Zellen in Medium (zur Beurteilung möglicher, nicht von OTA, von sondern von normalem Zellmetabolismus herrührender HPLC-Peaks) und OT alpha (105 nM) zur Beurteilung der Extraktionseffizienz (bzgl. des Entstehens möglicher untoxischer Metabolite) eingesetzt.

Je Behandlungsgruppe wurden 2 Petrischalen angesetzt, die Ansätze wurden für 6 bzw. 24 h bei 37°C inkubiert. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Behandlungsgruppen.

Gruppe:	Zellen:	Behandlung mit:	Behandlungsdauer:
1	18/10	OTA 15 μM	6 h
2	18/10	OTA 15 μM	24 h
3	18/10	OTA 15 μM /INDO 50 μM	6 h
4	18/10	OTA 15 μM /INDO 50 μM	24 h
Kontrollen:			
5	--	OTA 15 μM	6
6	18/10	--	24 h
7	--	OT alpha 105 nM	24 h

Tab. 1: Überblick über die einzelnen Behandlungsgruppen zur Untersuchung der Metabolisierung von OTA durch OSV-Zellen

Extraktion und Analytik

Die Aufarbeitung der Ansätze erfolgte leicht modifiziert nach Rosner (1997, pers. Kommunikation) bzw. Hult *et al.* (1982) und Beker und Radic (1991).

Nach Beendigung der Inkubation wurden je Ansatz 5 ml Zellkulturmedium abgenommen. Zur Lösung einer Bindung des OTA an Proteine des Zellkulturmediums wurden 25 ml eines Gemisches von 0,1 M MgCl₂ / 0,05 M HCl zugegeben. Die Suspension wurde mit 15 ml Chloroform versetzt und für 30 min bei 35 U / min und RT (21°C) am Rotator durchmischt. Anschließend wurde das Gemisch unter Kühlung (10°C) bei 1600 x g für 20 min zentrifugiert (Heraeus-Zentrifuge) und die Chloroformphase entnommen. Im Anschluß daran erfolgte eine zweite Chloroformextraktion unter den oben beschriebenen Bedingungen. Die Chloroformphasen wurden vereinigt und bei 40°C am Rotationsverdampfer eingengt. Der Rückstand wurde in 1 ml mobile Phase aufgenommen und im Ultraschallbad gelöst. Nach der anschließenden 30-minütigen Zentrifugation (14.000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge) bei RT (21°C) wurde der Überstand abgenommen und bis zur Analyse mittels HPLC in Bördelgefäßen mit Septumdeckel verschlossen bei 4°C aufbewahrt.

Die Analyse der so gewonnenen Extrakte wurde wie in 3.9.2.2. beschrieben mittels HPLC durchgeführt.

Abbildung 8 zeigt die Wiederfindung von OTA in % der eingesetzten Konzentration (15 µM = 100 %) nach erfolgter Extraktion.

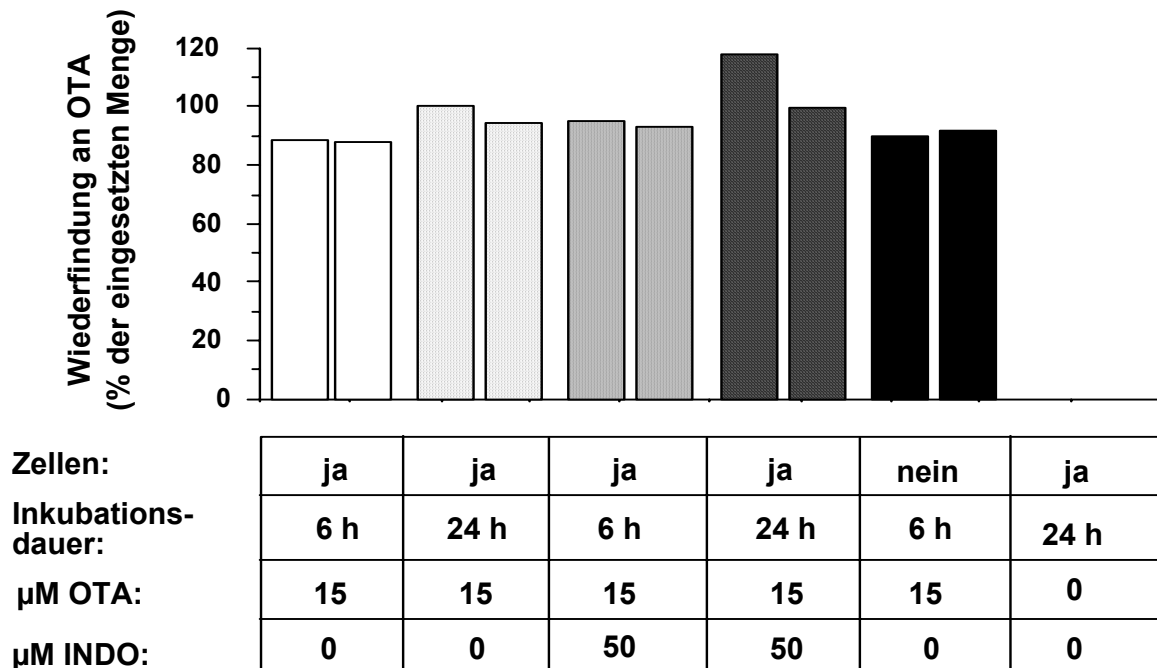


Abb. 8: Wiederfindung an OTA in % der eingesetzten Konzentration (15 µM) nach Inkubation mit OSV-Zellen und Chloroformextraktion. Dargestellt sind n = 2 Ansätze je Behandlungsgruppe sowie die jeweiligen Inkubationsbedingungen.

3.6 Untersuchungen zur Proteinbindung von ³H-OTA und ¹⁴C-Indometazin (INDO)

Aus der Literatur ist bekannt, daß sowohl OTA (Chu, 1971; Hagelberg und Hult, 1989; Galtier 1991) als auch Indometazin (Hucker *et al.*, 1966; Hvidberg *et al.*, 1972; Ekman *et al.*, 1980) an Plasmaproteine binden können. Mit den im folgenden beschriebenen Versuchsansätzen sollte untersucht werden, inwieweit OTA bzw. INDO an Proteine des Zellkulturmediums (je nach Fragestellung enthielt ja das Medium 2,5 bzw. 10 % FCS) binden. Proteingebundenes OTA bzw. INDO werden vermutlich nicht in die Zellen aufgenommen und werden daher nicht wirksam.

Außerdem sollte überprüft werden, inwieweit ein INDO-Zusatz eine Verdrängung des OTA aus dieser Bindung bewirkt bzw. ob möglicherweise *vice versa* OTA das INDO aus einer solchen Bindung zu drängen vermag.

Im ersteren Fall würde OTA dann in höherem Maße in der ungebundenen, freien Form vorliegen, daher besser in die Zellen aufgenommen werden und dort

genotoxisch wirken können. Ziel war somit die Bestimmung des Anteils an physiologisch aktiver, ungebundener Substanz.

In der Literatur beschriebene Verfahren dazu umfassen beispielsweise Equilibriums-Dialyse (Chu, 1971), Ultrazentrifugation oder Gel-Filtration (Kurz *et al.*, 1977). Daneben wird zunehmend auch die Methode der Ultrafiltration angewandt, der in der Literatur gleiche Genauigkeit bei der Bestimmung des nicht proteingebundenen Anteils bestätigt wird wie der Gleichgewichts-Dialyse (Sophianopoulos *et al.*, 1978).

Für die Versuche wurden radioaktiv markiertes OTA (^3H -OTA) sowie INDO (^{14}C -INDO) eingesetzt. Ein von der Firma Sipan entwickeltes System (Vivaspin 4 ml Konzentrator) erlaubt per Ultrafiltration in einer Zentrifuge die Trennung von proteingebundener, auf speziellen Filtern zurückgehaltener Substanz von der ins Ultrafiltrat abzentrifugierten ungebundenen Substanz. Die Anteile an ungebundener Substanz im Ultrafiltrat sind mittels LSC (vgl. 3.9.4) quantifizierbar. Die Versuche wurden in (zellfreiem) Kulturmedium durchgeführt.

3.6.1 Bestimmung von freiem und proteingebundenem ^3H -OTA und ^{14}C -INDO mittels Ultrafiltration

Die Trennung von freier und proteingebundener Substanz erfolgte mittels Ultrafiltration. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches System verwendet: Die Vivaspin 4 ml Konzentratoren der Firma Sipan können ein Volumen von maximal 4 ml aufnehmen und sind mit einer Biomax-Polysulphon-Trennmembran der Porengröße 10.000 Da ausgestattet.

Für die Bindungs- bzw. Kompetitionsstudien mit radioaktiv markiertem OTA wurden 4,5 ml zellfreies, steriles Kulturmedium mit 2,5 bzw. 10 % FCS-Gehalt (vgl. 3.1.1) mit ^3H -OTA (in Ethanol, spezif. Aktivität: 3,9 Ci / mmol) zu 1,01 μCi (500.000 dpm/ml) versetzt und nicht radioaktiv markiertes OTA (in Ethanol) in verschiedenen Konzentrationen (30, 20, 10, 5 μM) zugegeben. Bei Kompetitionsstudien wurde gleichzeitig mit OTA auch nicht markiertes Indometazin (in DMSO) in 50 μM Endkonzentration zugegeben. Der Anteil an Ethanol / DMSO betrug in allen Ansätzen 0,1 % / 0,2 % (v/v).

Für die Bindungs- bzw. Kompetitionsstudien mit radioaktiv markiertem Indometazin wurden analog ebenfalls 4,5 ml zellfreies, steriles Kulturmedium (FCS-Gehalt 2,5 bzw. 10 %) mit ^{14}C -INDO (in Ethanol, spezif. Aktivität: 22,3 mCi/mmol) zu 0,2 μCi (100.000 dpm/ml) versetzt und nicht radioaktiv markiertes INDO (in Ethanol) in verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50 μM) zugegeben. Bei Kompetitionsstudien wurde gleichzeitig mit INDO nicht markiertes OTA (in Ethanol) in 5 bzw. 30 μM Konzentration zugegeben. Der Anteil an Ethanol betrug in allen Ansätzen 0,245 % (v/v).

Diese Gemische wurden bei 37°C im Wasserbad zur Gleichgewichtseinstellung für 3 h inkubiert. Anschließend wurden je 4 ml des jeweiligen Reaktionsgemisches entnommen und in Vivaspin 4 ml Konzentratoren (Sipan) pipettiert. Die Konzentratoren wurden in 15 ml-Falcon-Röhrchen gesteckt und bei RT (21°C) in einer Zentrifuge (Minifuge 2, Heraeus) mit Schwingrotor (Typ 3350, Heraeus) für 5 min bei 3.860 x g zentrifugiert. Nach dieser Zeit ergaben sich ca. 1,5 ml Ultrafiltrat. Hiervon wurden je 1 ml in Scintillationsgefäße verbracht, mit jeweils 2 ml Scintillationscocktail versetzt und über Nacht kühl und dunkel aufbewahrt. Am folgenden Tag erfolgte eine Quantifizierung der Radioaktivität im Ultrafiltrat mittels Flüssigszintillationszählung (vgl. 3.9.4).

Die Umrechnung der erhaltenen Radioaktivität in μmol erfolgte aufgrund der unterschiedlichen spezifischen Aktivitäten der jeweils eingesetzten Stammlösungen (Mischung markierte / unmarkierte Substanz). Der Anteil an ungebundener Substanz (Ultrafiltrat) konnte so direkt ermittelt werden, der Anteil an gebundener Substanz ergab sich aus der Subtraktion des freien Anteils von der eingesetzten Gesamtmenge.

Da die unspezifische Filterbindung sowohl für ^3H -OTA als auch für ^{14}C -INDO mit 0,1 ‰ als extrem niedrig ermittelt wurde, konnte darauf verzichtet werden, die erhaltenen Werte um diesen Anteil zu korrigieren.

3.6.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes im Zellkulturmedium sowie in Schafsamenblasen-Mikrosomen (vgl. 3.8.1.1) erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung von bovinem Serumalbumin als Standard. Der Test wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Bio-Rad, München) durchgeführt. Das Testprinzip beruht darauf, daß sich nach Proteinbindung das Absorptionsmaximum des Farbstoffes Coomassie-Blau von 465 nach 595 nm verschiebt. Zellkulturmedium mit 2,5 % FCS sowie Schafsamenblasen-Mikrosomensuspension wurden zur Proteinbestimmung unverdünnt eingesetzt, Medium mit 10 % FCS wurde zuvor 1:5 mit A. bidest verdünnt.

Je 20 µl dieser Testlösungen wurden mit 980 µl einer 1:5 Verdünnung des sauren Farbstoffkonzentrates vermischt und nach 5 Minuten bei RT (21°C) die Absorption bei 595 nm gemessen. Unter den gleichen Bedingungen wurde eine Eichkurve mit bovinem Serumalbumin erstellt, anhand derer der Proteingehalt der Proben ermittelt wurde.

3.7 **Synthese von Ochratoxin alpha (OT alpha)**

3.7.1 Enzymatische Hydrolyse von Ochratoxin A

Die enzymatische Hydrolyse von Ochratoxin A zum Isokumarin-Derivat Ochratoxin alpha (OT alpha) wurde in Anlehnung an Pitout (1969 a, b) durchgeführt. Hierbei wird mittels der Protease Carboxypeptidase A (E.C. 3.4.17.1) der Phenylalanin-Anteil des Mykotoxins hydrolytisch abgespalten. Aufgrund der beschriebenen Empfindlichkeit des in Puffer gelösten Mykotoxins für UV-Licht (Pitout, 1969 a) wurde weitgehend unter Tageslichtausschluß gearbeitet.

10 mg Ochratoxin A wurden in 110 ml Puffer (0,1 M NaCl / 0,02 M TRIS, pH 7,5) gelöst (entspricht 225 µM).

Nach Zusatz von Carboxypeptidase A (308 Units, entspricht 6,048 mg oder 54,98 µg/ml) wurde das Reaktionsgemisch in einem Wasserbad bei 25 °C unter Schütteln für 48 Stunden inkubiert.

Zum Nachweis der Umsetzung zu OT alpha wurden nach verschiedenen langen Inkubationszeiten (0; 2,5; 24; 48 h) Aliquots von je 350 µl entnommen. Je 50 µl davon wurden für eine spätere HPLC-Analyse mit eisgekühltem reinem Ethanol ad 80 Vol.% versetzt, zur Proteinfällung über Nacht bei -20°C gehalten und anschließend bei 16 000 x g zentrifugiert (Eppendorf-Zentrifuge). Der Überstand wurde einer HPLC-Analyse unterzogen (siehe 3.9.2.2.).

Weitere 50 µl wurden unverdünnt auf eine analytische DC-Platte aufgetragen und entwickelt (siehe 3.9.2.1).

Zweimal je 100 µl der Inkubationsansätze wurden 1:10 mit 96 %-igem Ethanol verdünnt und das Absorptionsspektrum im Dioden-Array Spektrophotometer bestimmt (siehe 3.9.1).

- **Puffer:** 0,1 M NaCl / 0,02 M Tris, pH 7,5

Herstellung einer 0,2 M NaCl-Lösung: 5,84 g NaCl in 500 ml A. bidest lösen

Herstellung einer 0,04 M TRIS-Lösung: 2,42 g TRIS in 500 ml A. bidest lösen

beide Lösungen zusammengeben, mit 1 N HCl auf pH 7,5 einstellen

3.7.2 Aufreinigung von OT alpha

Nach beendiger Inkubation wurde das Reaktionsgemisch mit 1 N HCL auf einen pH-Wert von 2,0 angesäuert und dreimal mit dem doppelten Volumen Chloroform extrahiert. Die das OT alpha enthaltenden Chloroformphasen wurden vereinigt und bei RT (21°C) im Vakuum zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde in 6 ml Chloroform aufgenommen, jeweils 2 ml davon wurden strichförmig auf eine präparative DC-Platte aufgegeben (PSC-Kieselgel 60) und entwickelt (siehe 3.9.2.1). Die unter UV-Licht (366 nm) blau fluoreszierenden Banden (OT alpha) der einzelnen Platten wurden abgekratzt und vereinigt. Das Kieselgel wurde mit 200 ml Methanol über einer G4-Fritte eluiert, das Eluat bei RT (21°C) im Vakuum abgedampft. Der verbleibende Niederschlag wurde mit HCl-gesättigtem Chloroform solange eluiert, bis im Niederschlag unter UV-Bestrahlung (366 nm) keine Fluoreszenz mehr nachweisbar war. Das Eluat mit dem OT alpha wurde bei RT (21°C) im Vakuum bis

zur Trockne eingedampft, der Rückstand in 10 ml Chloroform aufgenommen und der unlösliche Rest bei 1000 x g (Heraeus Zentrifuge) abzentrifugiert, mehrmals mit Chloroform gewaschen und die vereinigten Chloroformphasen wiederum bei RT (21°C) im Vakuum eingeengt. Der Rückstand wurde mit 1 ml Ethanol versetzt und im Wasserbad bei 60°C vollständig gelöst. Die Lösung wurde über Nacht bei - 20°C gehalten. Die abgesetzten weißen Kristalle wurden in Chloroform gelöst, welches bei RT (21°C) unter N₂ bis zur Trockne eingeengt wurde. OT alpha wurde in dieser Pulverform unter Argon aufbewahrt und bei Bedarf in Lösemittel gelöst.

Die Bestimmung der Reinheit des so gewonnenen OT-alpha erfolgte mittels HPLC (siehe 3.9.2.2.), die Quantifizierung gelöster Aliquots spektrophotometrisch wie in 3.9.1 beschrieben.

Die Ausbeute an OT alpha betrug zwischen 40 und 60 %. Ein typisches HPLC-Profil ist in Abbildung 10 gezeigt.

3.8 Untersuchungen zur Metabolisierung durch Peroxidasen

3.8.1 Umsetzung von OTA mit Prostaglandin H Synthase (PHS)

Für Studien zur Umsetzung von OTA durch die Peroxidase PHS wurden als Enzymquelle Schafsamenblasen-Mikrosomen (ram seminal vesicle microsomes, RSVM) eingesetzt, denn sie weisen eine besonders hohe enzymatische Aktivität auf (Wild und Degen, 1987).

3.8.1.1 *Präparation von Schafsamenblasen-Mikrosomen (RSVM)*

Samenblasen wurden im örtlichen Schlachthof von frisch geschlachteten Schafböcken entnommen und in PBS-CMF-Puffer auf Eis gelegt. Anschließend wurden sie von Fett und Bindegewebe befreit und vakuumverpackt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden sie bei - 70°C gelagert.

Schafsamenblasen-Mikrosomen (RSVM) wurden, wie bei Wild und Degen (1987) beschrieben, gewonnen. Für die Präparation wurden die gefrorenen Organe zerkleinert und das Geschabsel in das dreifache Volumen Puffer (TRIS / HCl 0,1 M, pH 7,5; Saccharose 0,25 M) aufgenommen. Nach Aufschluß im Ultraturrax (Stufe 6, 10 min) wurde das Homogenat für 15 min bei 4°C mit 12000 x g zentrifugiert (Rotor JA 20, Kühlzentrifuge J2-21, Beckmann). Das Pellet wurde verworfen und der postmitochondriale Überstand für 60 min bei 4°C mit 100000 x g zentrifugiert (Rotor TI 50/2, Ultrazentrifuge TGA-50, Kontron). Der das Cytosol enthaltende Überstand wurde verworfen und das mikrosomale Pellet in einem Volumen Puffer (s.o.) resuspendiert. Nach Aliquotierung wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

Der Proteingehalt der RSVM wurde nach Bradford (1976) mit dem BIO-RAD-Protein-Assay gegen bovines Serumalbumin als Standard bestimmt (vgl. 3.6.2).

Zur Bestimmung der Cyclooxygenase-Aktivität der Mikrosomenpräparationen wurde der Arachidonsäure-abhängige Sauerstoffverbrauch mittels einer Clark-Elektrode im Gilson-Oxygraph gemessen (Degen *et al.* 1986; Clark 1993). Die Aktivität wurde aufgrund der initialen Sauerstoffverbrauchsraten [$\text{nmol O}_2 / \text{min} / \text{mg Protein} = \text{„units“}$] berechnet.

- **Puffer: 0,1 M Tris/HCl, pH 7,5/0,25 M Saccharose**

12,11 g TRIS in 1 l A. bidest lösen, mit 1 N HCl auf pH 7,5 einstellen

Zugabe von 8,55 g Saccharose/100 ml Puffer, Endkonzentration: 0,25 M

3.8.1.2 Inkubationsansatz

Die Inkubationen wurden in 2,0 ml Gesamtvolumen durchgeführt (Kaliumphosphat-Puffer 0,05 M, pH 7,5). Wenn nichts anderes angegeben ist, enthielten die Ansätze OTA in 50 μM Konzentration; in radioaktiven Ansätzen wurde ferner jeweils 1 $\mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -OTA (spez. Aktivität: 3,9 Ci / mmol) zugesetzt.

Nach Angaben der Herstellerfirma befinden sich ca. 85 % der Tritiummarkierung im Isokumarinanteil und ca. 15 % im Phenylalanin-Teil des OTA-Moleküls. Mikrosomale

PHS wurde den Ansätzen zu je 1,0 mg zugesetzt, Arachidonsäure (gelöst in Ethanol) in einer Endkonzentration von 100 μM . Die Inkubation und nachfolgende Aufarbeitung sowie Analyse der Ansätze mit radioaktiv markiertem OTA sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

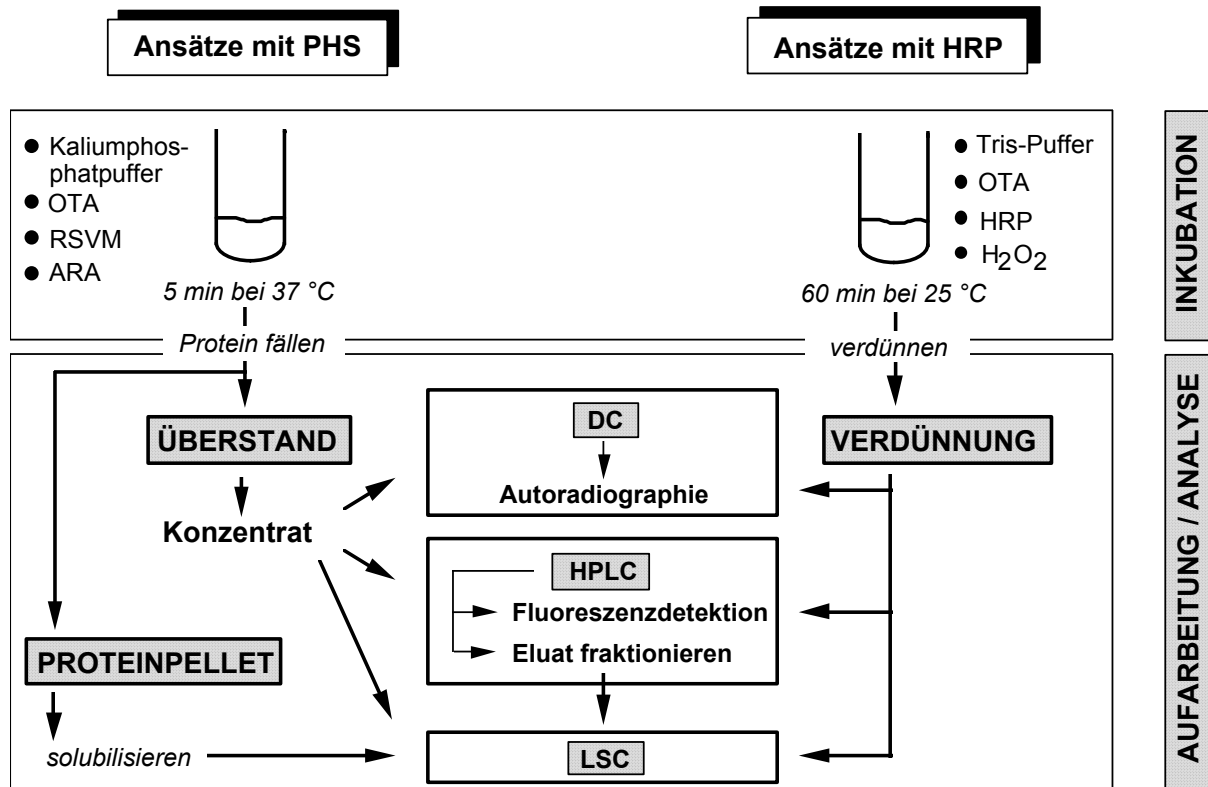


Abb. 9: Schema der Inkubation, Aufarbeitung und Analyse der Inkubationsansätze von ^3H -OTA mit PHS bzw. HRP

Im Anschluß an eine etwa dreiminütige Präinkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μM Arachidonsäure (ARA) gestartet. Die Ansätze wurden anschließend für 5 Minuten bei 37 °C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert. Gestoppt wurden die OTA-Inkubationen durch Zugabe von 8 ml eisgekühltem Ethanol.

Parallel dazu wurden verschiedene Kontrollansätze inkubiert. Diese enthielten neben dem Lösungsmittel und OTA entweder hitzeinaktiviertes Enzym (10 min / 100 °C) oder wurden ohne Zusatz von ARA bzw. ohne Enzym inkubiert.

Zur Hemmung der Cyclooxygenase-Aktivität der PHS wurde manchen Inkubationsansätzen 70 µM Indometazin zugesetzt.

Zur Kontrolle der Inkubationsbedingungen wurden auch Ansätze mit dem nicht radioaktiv markierten synthetischen Östrogen *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) inkubiert, das ein bekanntes Substrat der PHS ist (Degen *et al.*, 1983). Die Inkubationsbedingungen, Aufarbeitung und Analyse dieser Proben sind unter 3.8.3 bzw. 3.9.2.2 beschrieben.

● **Puffer: 0,05 M Kaliumphosphat, pH 7,5**

(1) Herstellung einer 0,1 M K_2HPO_4 -Lösung: 8,7 g in 500 ml A. bidest lösen

(2) Herstellung einer 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung: 6,8 g in 500 ml A. bidest lösen

Lösung (1) mit Lösung (2) auf pH 7,5 einstellen

3.8.1.3 *Aufarbeitung und Analyse nicht radioaktiver Ansätze*

Zur Fällung des mikrosomalen Proteins wurden die Inkubationsansätze mit dem vierfachen Volumen (8 ml) an eisgekühltem Ethanol versetzt und über Nacht kühl gelagert (18 h/-20 °C). Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 4 °C, 1700 x g, Megafuge 1.0 R) und die Überstände abgenommen, während das Pellet verworfen wurde. Diese Überstände wurden mit mobiler Phase, wie sie für die HPLC-Analyse von OTA verwendet wurde, verdünnt und mittels HPLC analysiert (vgl. 3.9.2.2). Die Gehalte an OTA bzw. an bekannten Metaboliten / Derivaten wurden mittels jeweils aktuell hergestellter Eichkurven ermittelt.

3.8.1.4 *Aufarbeitung und Analyse radioaktiver Ansätze*

Nach wie unter 3.8.1.2 durchgeführter Inkubation wurde das mikrosomale Protein wie unter 3.8.1.3 beschrieben ausgefällt und Proteinpellet und Überstand getrennt weiterverarbeitet.

Aufarbeitung der Proteinpellets

Jedes Pellet wurde einmal mit 1 ml Ethanol gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 1700 x g, Megafuge 1.0 R) mit dem restlichen Überstand des jeweiligen Ansatzes vereinigt.

Anschließend wurden die Pellets mit je 1 ml 1 N NaOH versetzt und im Wasserbad bei 50 °C unter Schütteln 2 h lang solubilisiert. Aliquots von je 950 µl wurden mit 2 ml Scintillator versetzt und der Flüssigszintillationszählung unterworfen (vgl. 3.9.4).

Aufarbeitung der Überstände

Die ethanolischen Überstände wurden nach Verdünnung mit mobiler Phase, die zur HPLC-Trennung eingesetzt wurde (pH 2,5, vgl. 3.9.2.2), zunächst einer direkten Analyse durch HPLC unterworfen und zur Bestimmung des OTA-Gehaltes an mit entsprechenden Eichkurven verglichen. Zur Aufkonzentrierung wurden die Überstände anschließend im Dunkeln bei 50 °C im Wasserbad für ca. 2 h unter N₂ bis zur Trockne eingedampft und anschließend in 4 ml mobile Phase aufgenommen, in Bördelgefäße mit Septendeckeln pipettiert und luftdicht verschlossen bis zur HPLC-Analyse bei 4 °C gelagert. Diese Konzentrate wurden mittels HPLC und anschließender Fraktionierung des Eluates analysiert (vgl. 3.9.2.2). Die pro Fraktion enthaltene Radioaktivität wurde mittels Flüssigszintillationszählung (vgl. 3.9.4) bestimmt.

Ferner wurde eine Analyse mittels Dünnschichtchromatographie (vgl. 3.9.2.1) durchgeführt und die enthaltene Radioaktivität anschließend durch eine Autoradiographie (vgl. 3.9.3) qualitativ ermittelt.

Zur Bestimmung von Wiederfindung und Verteilung der Radioaktivität wurden entsprechende Aliquots der Überstände bzw. des solubilisierten Proteins entnommen und die enthaltene Radioaktivität mittels LSC bestimmt.

3.8.2 Umsetzung von OTA mit Meerrettichperoxidase (HRP)

Außer der Umsetzung von OTA mit PHS wurde das Toxin auch einer Inkubation mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) unterworfen. Dieses Enzym konnte im Gegensatz zu den PHS-haltigen Schafsamenblasen-Mikrosomen in hochreiner Form eingesetzt werden. Eine mögliche Proteinbindung des Substrates wurde dadurch extrem reduziert, die Aufarbeitung der Ansätze gleichzeitig erleichtert.

3.8.2.1 *Inkubationsansatz*

Inkubation und nachfolgende Aufarbeitung sowie Analyse der Ansätze mit radioaktiv markiertem OTA sind schematisch in Abbildung 9 dargestellt.

In je 2 ml Tris-Puffer (0,01 M, pH 7,2) wurden jeweils 50 μ M OTA und 100 ng (0,019 units) HRP nach Zugabe von 330 μ M H₂O₂ für 60 min bei 25 °C im Wasserbad inkubiert. Radioaktive Ansätze enthielten ebenfalls jeweils 1 μ Ci ³H-OTA (spezif. Aktivität: 3,9 Ci / mmol). Die Inkubation wurde gestoppt, indem die Ansätze auf Eis gelagert wurden und je 2 ml mobile Phase (vgl. 3.9.2.2) zugesetzt wurden.

Parallel wurden Kontrollansätze ohne H₂O₂, ohne Enzym bzw. ohne H₂O₂ und Enzym durchgeführt. Auch hier wurde unter gleichen Bedingungen zu Kontrollzwecken der Umsatz von E-DES mit HRP analysiert (Degen und McLachlan, 1985; vgl. 3.8.3).

3.8.2.2 *Aufarbeitung und Analyse radioaktiver Ansätze*

Zur Inaktivierung des Enzymproteins wurden die Ansätze mit einem Volumen (2 ml) an mobiler Phase (pH 2,5) versetzt und über Nacht kühl gelagert (18 h/-20 °C). Anschließend wurden die Ansätze zentrifugiert (5 min, 4 °C, 1.700 x g, Megafuge 1.0 R) und die Überstände abgenommen, während das Pellet verworfen wurde. Die Überstände wurden in mobiler Phase verdünnt und mittels HPLC-Analyse untersucht (3.9.2.2). Die Gehalte an OTA bzw. an bekannten Metaboliten wurden mittels jeweils aktuell hergestellter Eichkurven ermittelt. Im Anschluß an die Fluoreszenzdetektion wurde das Eluat fraktioniert aufgefangen und die in den Fraktionen enthaltene

Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszählung (vgl. 3.9.4) bestimmt. Weiterhin wurden Aliquots der nach 3.8.2.2 erhaltenen Überstände dünnenschichtchromatographisch untersucht und die Radioaktivitätsverteilung mittels Autoradiographie (vgl. 3.9.3) qualitativ ermittelt.

3.8.3 Umsetzung von *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) mit PHS und HRP

Umsetzung von E-DES mit mikrosomaler PHS

Die Inkubationen mit DES (Endkonzentration 50 μM) wurden, analog wie für OTA unter 3.8.1.2 beschrieben, durchgeführt: In 2,0 ml Kaliumphosphat-Puffer (0,05 M, pH 7,5) wurde nach etwa dreiminütiger Präinkubation bei Raumtemperatur (21°C) die Reaktion durch Zugabe von 100 μM Arachidonsäure (ARA) gestartet. Parallel dazu wurden Kontrollansätze (mit hitzenaktiviertem Enzym, mit Zusatz von 70 μM Indometazin, ohne ARA, ohne Enzym) inkubiert. Die Ansätze wurden jeweils für 5 Minuten bei 37 °C unter Schütteln im Wasserbad inkubiert und die Umsetzung anschließend durch Zugabe von 4 ml des eisgekühlten Extraktionsgemisches Ethylacetat / Diethylether (1:1, v/v) gestoppt. Nach dreimaliger Extraktion wurde das Lösemittel unter Vakuum am Rotationsverdampfer eingeengt und der Rückstand in 200 μl MeOH aufgenommen. Die Analyse der Umsetzung erfolgte mittels HPLC (siehe 3.9.2.2) über entsprechende Eichgeraden für E-DES, Z-DES bzw. Z,Z-DIES.

Umsetzung von E-DES mit HRP

Analog wie für OTA (unter 3.8.2.1) beschrieben, wurde die Inkubation mit DES (50 μM) in 2 ml Tris-Puffer (0,01 M, pH 7,2) unter Zugabe von 330 μM H_2O_2 für 60 min bei 25 °C im Wasserbad durchgeführt (nach Degen und McLachlan, 1985). Kontrollansätze (ohne HRP, ohne H_2O_2) wurden ebenfalls mitgeführt. Nach dreimaliger Extraktion mit je 4 ml eines eisgekühlten Gemisches aus Ethylacetat / Diethylether (1:1, v/v), Einengen des Lösemittels und anschließender Aufnahme des Rückstandes in 200 μl MeOH wurden Aliquots zur Analyse der Umsetzung mittels HPLC unter Verwendung geeigneter Eichgeraden herangezogen.

3.9 Analytik

3.9.1 UV/VIS-Spektroskopie zur Quantifizierung von OTA und Derivaten

Die UV/VIS-Spektroskopie wurde zur Quantifizierung von OTA- bzw OTB- oder OT alpha enthaltenden Lösungen eingesetzt. Dabei wurden die charakteristischen UV-Absorptionen des OTA bzw. seiner Derivate genutzt:

Ochratoxin	UV-Absorptions- maximum (λ_{\max})	molarer Absorptions- koeffizient (ϵ)	Referenz
OTA	333 nm	5550	Nesheim <i>et al.</i> , 1973
OTB	318 nm	6700	Nesheim, 1969
OT alpha	338 nm	5600	van der Merwe <i>et al.</i> , 1965

Tab. 2: UV-Absorptionen von OTA und seinen Derivaten

Mittels eines Dioden-Array Spektrophotometers (Modell 8452A, Hewlett Packard, Böblingen) wurden in 1 cm Quarzküvetten von den Lösungen UV-Spektren aufgenommen und die maximale Absorption zur Berechnung der Konzentration nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz herangezogen:

$$c = \frac{A}{\epsilon \times d} \times V$$

mit c: Konzentration der Lösung

A: Absorption (Extinktion) der Lösung im Maximum

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient der Lösung

d: Schichtdicke der Quarzküvette (1 cm)

V: Verdünnungsfaktor der Lösung in Ethanol

(Cooper, 1981)

Da diese sowohl mit dem pH-Wert als auch mit der Polarität des verwendeten Lösemittels variieren (Pitout, 1969b; Chu, 1974), wurde unter weitgehend standardisierten Bedingungen gearbeitet: Aliquots der verschiedenen Mykotoxin-Stammlösungen wurden in absolutem Ethanol aufgenommen und spektroskopisch quantifiziert.

Typische Spektren von OTA-, OTB- bzw. OT alpha-haltigen Lösungen finden sich im Anhang (Abbildung 43).

3.9.2 Chromatographie

3.9.2.1 *Dünnschichtchromatographie (DC)*

Die Dünnschichtchromatographie wurde als *analytische* DC mit anschließender Autoradiographie (vgl. 3.9.3) zur Untersuchung von Inkubationsansätzen mit radioaktiv markierter Substanz (vgl. 3.8.1.4 und 3.8.2.2) sowie zur Kontrolle der enzymatischen Umsetzung von OTA zu OT-alpha (vgl. 3.7) eingesetzt.

Mittels *präparativer* DC erfolgte die Aufreinigung von OT alpha.

Während für die analytische DC Platten mit Kieselgel F 60₂₅₄ als Adsorbens und 0,2 mm Schichtdicke auf Plastikfolie verwendet wurden, wurden für die präparative DC Glasplatten mit PSC Kieselgel 60 und 0,5 mm Schichtdicke eingesetzt (beide von Merck, Darmstadt).

Die Platten wurden in einer DC-Kammer mit Toluol : Ethylacetat : Ameisensäure 6:3:1 (v/v/v) für ca. 70 min entwickelt und nach Trocknung im UV-Betrachter (Camag) unter langwelligem UV-Licht (366 nm) ausgewertet (Roberts und Patterson, 1975; Størmer und Pedersen, 1980; Hadidane *et al.*, 1992; Abarca *et al.*, 1994).

OTA erschien dabei als grün, OTB und OT alpha als grün-blau bzw. blau fluoreszierender Spot. Die Fluoreszenzintensität von OTA konnte durch Ammoniakdämpfe erhöht werden, gleichzeitig schlug die Fluoreszenzfärbung von grün nach hellblau um (Nesheim, 1982). In Gegenwart von Ammoniak wird OTA als freie Säure in das Ammonium-Salz umgewandelt, wobei das Absorptionsmaximum von 330 nm nach 370 nm verschoben und die Fluoreszenz-Emission bei 460 nm verstärkt wird (Pohland *et al.*, 1992).

Neben den in der Literatur beschriebenen R_f -Werten für OTA bzw. OTB oder OT alpha kann auch dieses Merkmal zur Identifizierung der Substanzen herangezogen werden.

3.9.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC-Trennungen wurden zur Analyse bzw. Fraktionierung von Inkubationsansätzen bzw. zur Analyse der Reinheit von OTA und Syntheseansätzen von OT alpha eingesetzt. Organische Lösungsmittel wurden in HPLC-Qualität benutzt, Wasser wurde über das Milli-Q Water-Purification System aufbereitet. Elutionsmittel wurden durch Ultraschall bzw. durch Einleiten von Helium entgast. Pufferlösungen wurden über 0,45 µm Membranfilter filtriert. Die reversed-phase Trennsäulen (RP 18-Material) wurden zur Analyse mit Vorsäulen aus demselben Material kombiniert.

HPLC-Analytik von OTA und Derivaten

Aus der Vielzahl der in der Literatur beschriebenen HPLC-Analysemethoden für OTA und seine Metabolite bzw. Derivate – und ausgehend von der apparativen Ausstattung- wurde ein geeignetes Verfahren ausgewählt, das es erlaubte, die Substanzen mit ausreichender Sensitivität zu detektieren und voneinander zu separieren:

HPLC-Anlage:

Pumpe Modell LC5A (Shimadzu, Düsseldorf),
Injektor Modell HMP-P (Latek, Eppelheim),
Spektrofluorimeter Modell JY3D (ISA Jobin Yvon, Longjumeau, Frankreich),
Integrator Modell HP 3394 (Hewlett Packard, Böblingen)

RP-18 Säulenmaterial:

Nucleosil 100 (250 x 3 mm), 5 µM (VDS Optilab, Berlin)

Elutionsmittel (mobile Phase):

Methanol : Wasser: Eisessig (65 : 35 : 0,5, v/v/v), pH: 2,5

Flußrate:

1,5 ml / min, isokratisch

Wellenlängen:

$\lambda_{\text{Excitation}}$: 333 nm

$\lambda_{\text{Emission}}$: 467 nm

Abbildung 10 zeigt unter diesen Bedingungen gewonnene typische HPLC-Profile von je 2 ng (50 μ l) OTA und OT alpha (**A**) bzw. 1 ng OTB (**B**) im Einspritzvolumen.

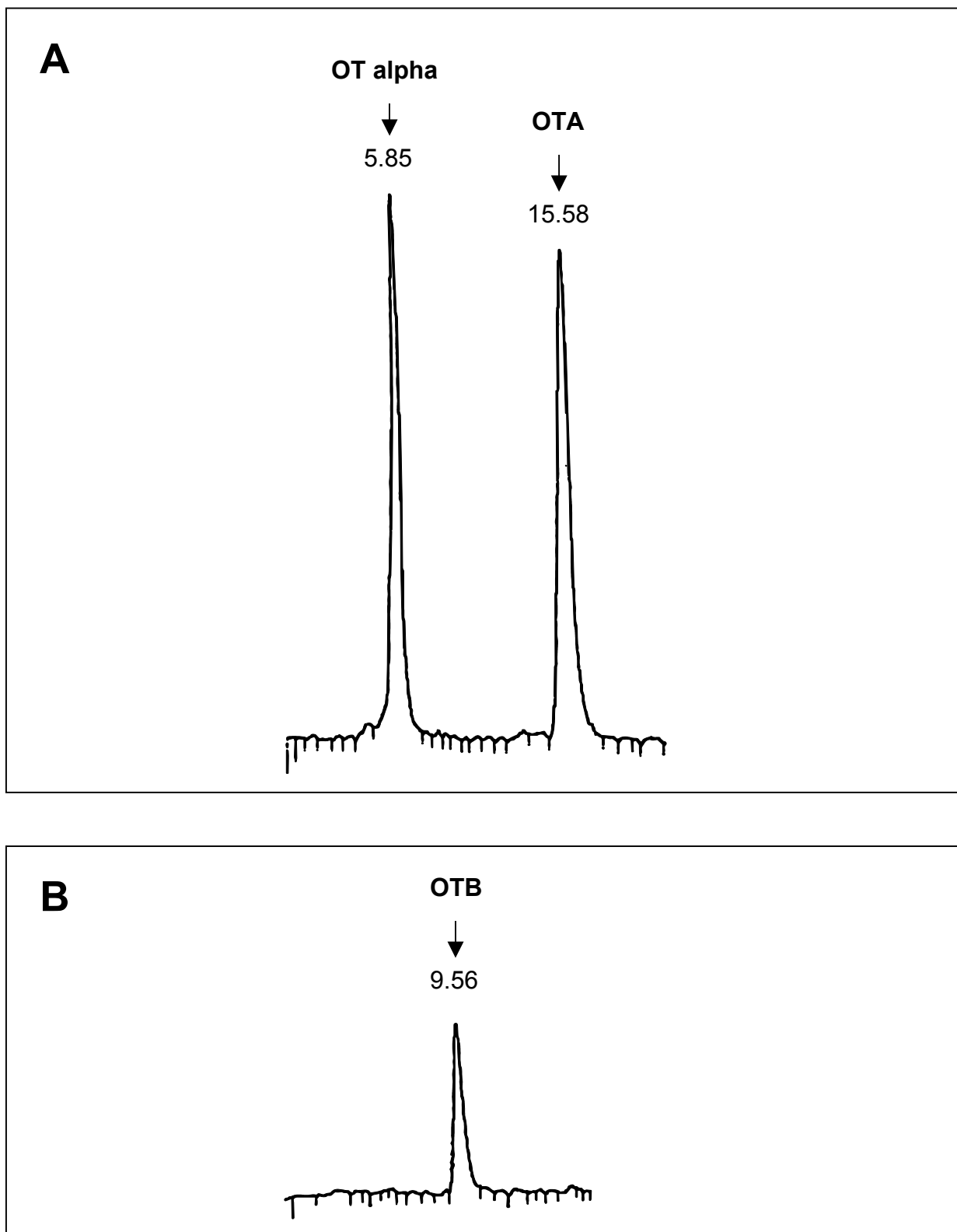


Abb. 10: Typische HPLC-Profile von je 2 ng im Einspritzvolumen (50 μ l) OTA und OT alpha (**A**) bzw. 1 ng OTB (**B**).

Die Nachweisgrenze für OTA wurde mit 140 pg / 50 µl Einspritzvolumen ermittelt, dies entspricht einem Gehalt von 2,8 µg OTA je Liter Lösung.

HPLC-Analytik von Diethylstilbestrol und Analoga

HPLC-Anlage:

2 LC-Pumpen Typ 414 (Kontron, Eching),
Injektor Modell 7125 (Rheodyne)
Mischkammer M 800 (Kontron, Eching),
Spektralphotometer UVIKON 735 LC (Kontron, Eching) bzw.
SPD 10-A (Shimadzu, Düsseldorf),
Programmer Series 200 (Kontron, Eching),
Integrator C R 3-A-Chromatopac (Shimadzu, Düsseldorf)

RP-18 Säulenmaterial:

Zorbax ODS (250 x 4 mm), 5 µM (Bischoff, Leonberg)

Elutionsmittel (mobile Phase):

A: Wasser : Methanol (80 : 20, v/v)
B: Methanol

Gradient:

45 - 100 % B in A für 30 min und 100 % B für 3 min

Flußrate:

1 ml/min

Wellenlänge:

$\lambda_{\text{det.}}$ 254 nm

3.9.3 Autoradiographie

Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung von Radioaktivität enthaltenden Inkubationsansätzen (siehe 3.9.2.1) wurden die Kieselgelplatten unter Lichtausschluß auf einen Röntgenfilm aufgelegt. Nach Einschluß in eine Autoradiographiekassette wurden diese für 10 Wochen bei - 80 °C gelagert. Anschließend erfolgte die Entwicklung des durch Radioaktivität geschwärzten Filmes.

3.9.4 Flüssigszintillationszählung

Definierte Aliquots [³H]- bzw. [¹⁴C]-haltiger Proben wurden nach Versetzen mit Szintillationscocktail (Rotiszint R 2200, Roth, Karlsruhe) über Nacht kühl und dunkel aufbewahrt und im Flüssigszintillationszähler (Tri-Carb 2200 CA, Canberra Packard, Frankfurt) gezählt.

Die Radioaktivität in den Proben wurde mittels externer Standardisierung über Eichkurven mit definiert gequenchten Radioaktivitätsstandards bestimmt und in dpm (desintegrations per minute) angegeben.

3.10 Beseitigung von OTA-Kontaminationen

OTA-Kontaminationen an Geräten, sowie Reste von OTA in fester bzw. gelöster Form wurden nach der Methode von Castegnaro (1991) beseitigt. Das Verfahren nutzt die Empfindlichkeit von OTA und Analoga gegen Oxidation durch Natrium-Hypochlorid (NaOCl) -Lösung.

Kontaminierte Stellen an Geräten wurden mit Ethanol befeuchtet und für 30 min in 224 mM NaOCl-Lösung getaucht bzw. mehrfach mit selbiger abgewischt.

Zur Beseitigung fester Rückstände wurden diese zunächst in Ethanol aufgenommen (je 400 µg OTA bzw. Derivat: 400 µl Ethanol). Anschließend wurden für 30 min je 400 µl Lösung 20 ml 224 mM NaOCl-Lösung dazugegeben und im Ultraschallbad behandelt. Dieses Verfahren wurde auch angewandt für

- wäßrige Lösungen von OTA und Derivate (nach Ansäuern auf pH 2,5 mit konz. HCl),
- Lösungen in flüchtigen Lösemitteln (nach Einengen im Vakuum),
- Lösungen in DMSO (nach Addition des zweifachen Volumens an A. bidest, dreimaliger Extraktion mit dem gleichen Volumen Dichlormethan und Einengung der Extrakte im Vakuum).

OTA-haltige DC-Platten wurden für eine 30-minütige Einwirkzeit mit einer 224 mM NaOCl-Lösung eingesprüht. Zur Überprüfung der Vollständigkeit der OTA-

Degradation wurden die so behandelten DC-Platten unter langwelligem UV-Licht (366 nm) auf fluoreszierende OTA-Spots untersucht.

Die übrigen dekontaminierten Proben wurden stichprobenartig mittels HPLC auf die Vollständigkeit der Degradation untersucht, nachdem nach Ansäuern auf pH 3 mit konz. HCl und Stickstoffbegasung das verbliebene Chlorid aus der Lösung eliminiert wurde.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels des t -Testes auf Gleichheit zweier Mittelwerte. Dieser Test beurteilt, ob sich zwei Kollektive in Bezug auf ein bestimmtes Merkmal (z.B. durchschnittliche Menge an nicht proteingebundenem OTA bei Zusatz unterschiedlicher Mengen Indometazin im Zellkulturmedium) unterscheiden (vgl. 3.6).

Stellen also \bar{X} und \bar{Y} die durchschnittlichen Anteile an freiem Toxin dar, wird die Hypothese H_0 : „ $\bar{X} = \bar{Y}$ “ zum Niveau α verworfen, falls gilt:

$$|T| = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{1}{n(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 + \frac{1}{m(m-1)} \sum_{j=1}^m (y_j - \bar{y})^2}} > t'$$

Hierbei ist t' die t -Approximation des kritischen Wertes nach Cochran und Cox (1957). Die durchschnittlichen Anteile an freiem OTA in den Kollektiven berechnen

sich nach $\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$ bzw. $\bar{y} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m y_j$, wobei x_i und y_j die jeweiligen Ausprägungen

des Merkmals und n bzw. m die jeweiligen Stichprobenumfänge darstellen. Da t' ein approximativer Wert ist, sind die darauf basierenden p -Werte (Niveau, zu dem die Hypothese H_0 verworfen werden kann) ebenfalls Näherungswerte nach Cochran und Cox (1957).

Für die Ermittlung der p-Werte und die Durchführung der statistischen Tests wurde das Statistikprogramm SAS[®] für Windows, Version 6.08 eingesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Verstoffwechslung von OTA in OSV-Zellen

Degen *et al.* (1997) hatten gezeigt, daß OTA in Zellen der Schafsamenblase (OSV-Zellen) Mikrokerne induziert (vgl. Abbildung 3). Die OSV-Zellen exprimieren die Peroxidase Prostaglandin H Synthase (PHS) in hohem Ausmaß (Degen, 1993b). Da in der Literatur die Möglichkeit einer Metabolisierung von OTA durch Peroxidasen wie PHS diskutiert wird (Malaveille *et al.*, 1994; Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993d) lag es nahe, mit OSV-Zellen zu untersuchen, inwieweit sie OTA metabolisieren. Dazu wurden Zellkulturen mit OTA bzw. OTA und Indometazin inkubiert. Das Zellkulturmedium wurde nach Chloroformextraktion mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion auf Metabolite untersucht (vgl. 3.5). Zur Kontrolle (Störpeaks bzw. Überlagerungen) wurden auch das Zellkulturmedium allein und die Stammlösungen analysiert. Nachfolgend sind typische HPLC-Profile dargestellt:

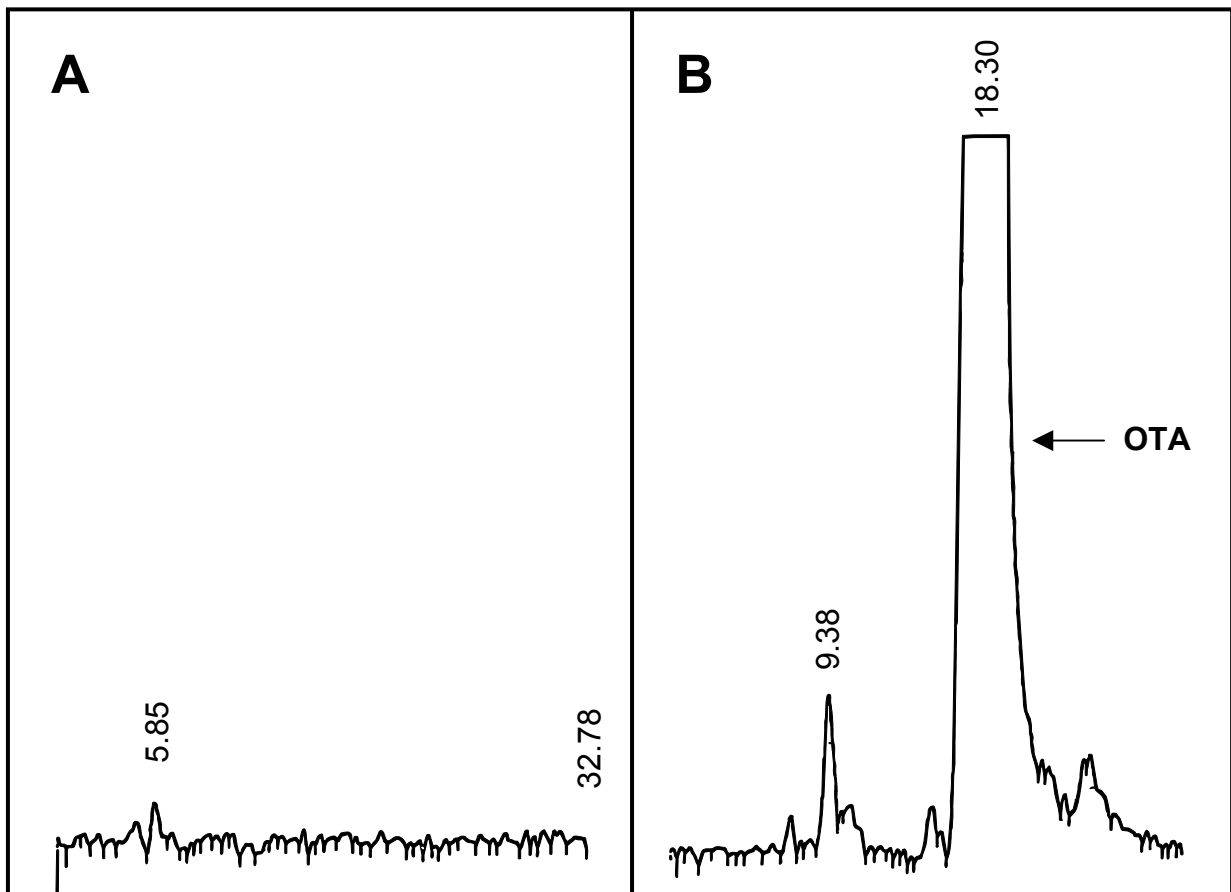
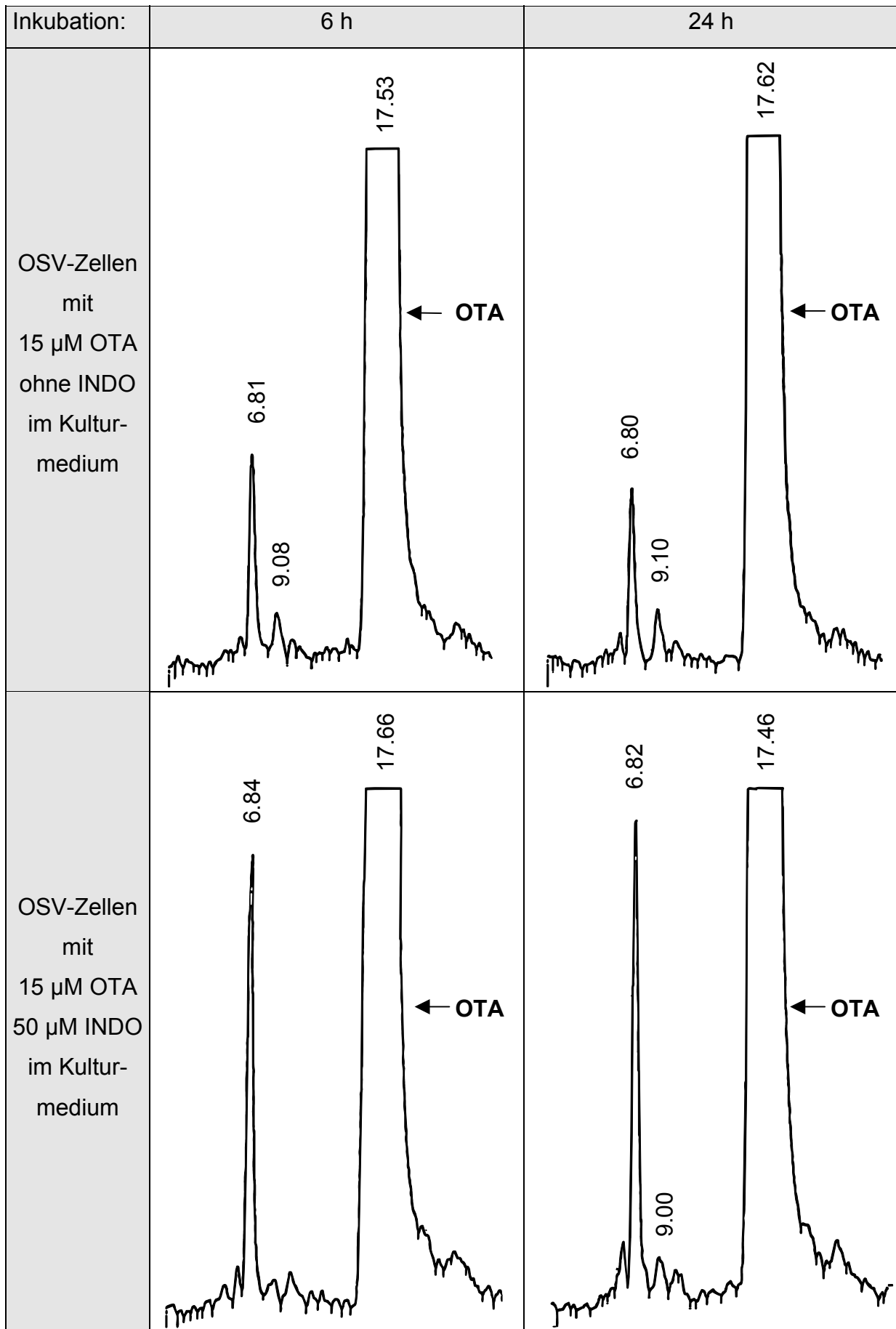


Abb. 11: typische HPLC-Profile von (A): einer Inkubation von Zellen ohne OTA und (B) der für die Inkubation verwendeten OTA-Stammlösung; Chromatogramm mit 1 µg OTA im Einspritzvolumen (50 µl)

Wie Chromatogramm (B) der Abbildung 11 zeigt, wies die verwendete OTA-Stammlösung neben dem OTA-Peak bei einer Retentionszeit (Rt) von 18.30 min einen weiteren Peak bei Rt 9.38 min auf. Dies deutet auf eine sehr geringgradige Kontamination der Stammlösung mit einer polareren Substanz als OTA hin. Spikeversuche zeigten, daß es sich hierbei nicht um das OTA-Derivat OTB handelt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Aus Chromatogramm (A) der Abbildung 11 ist ersichtlich, daß in OTA-freien Inkubationen von Zellen in Kulturmedium mit 10 % FCS keine Störpeaks auftreten, die mit der HPLC Analyse von OTA Metaboliten interferieren.

Nachfolgend finden sich typische Chromatogramme der verschiedenen Inkubationen mit OTA bzw. mit der Kombination von OTA und INDO in Abhängigkeit von den Inkubationsbedingungen (mit/ohne Zellen, Dauer der Inkubation).



Legende umseitig

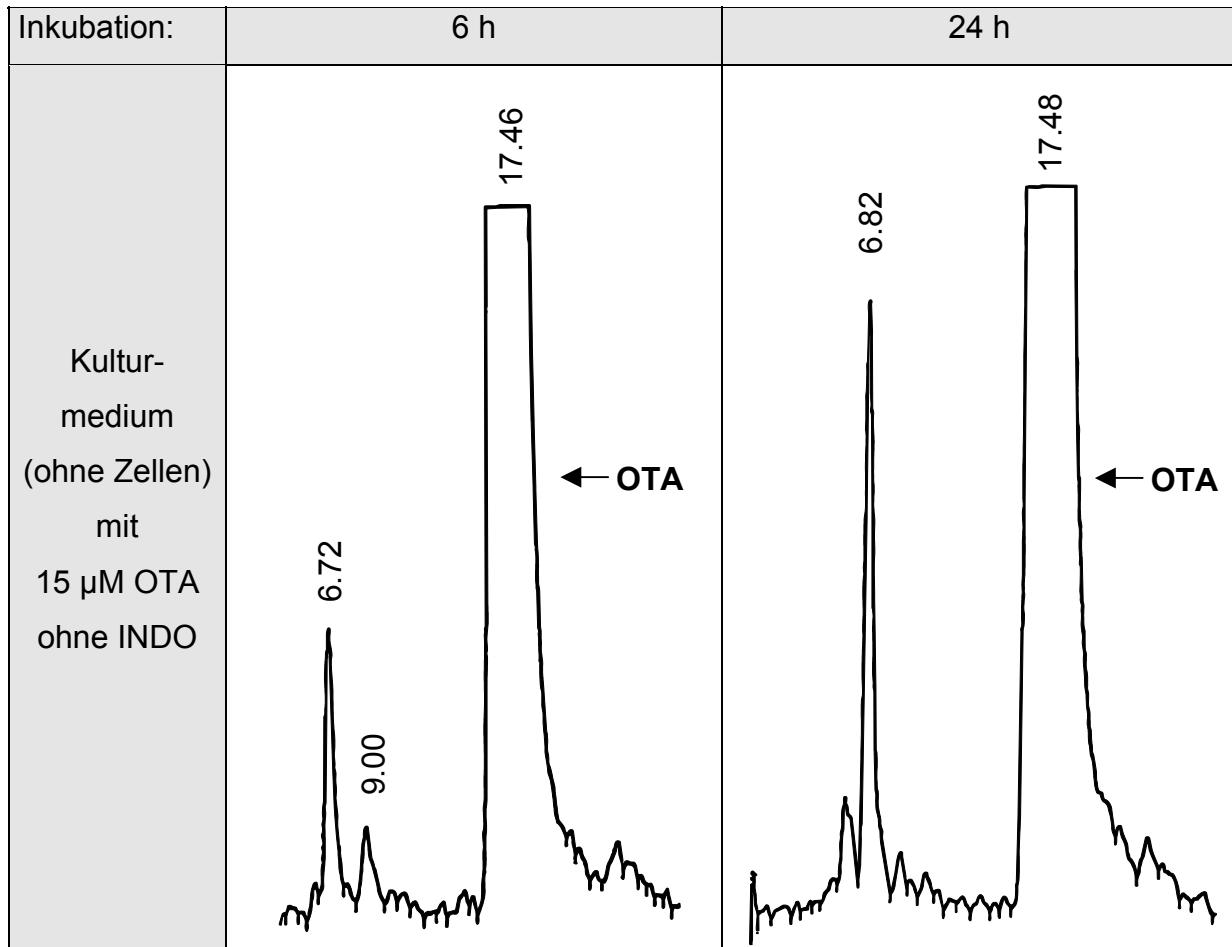


Abb. 12: HPLC-Profile von Extrakten verschiedener Inkubationsansätze mit OSV-Zellen sowie Kontrollen zur nicht-enzymatischen Degradation im Kulturmedium während 6 bzw. 24 h Inkubationszeit. Das Einspritzvolumen (50 μ l) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 μ g OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz)

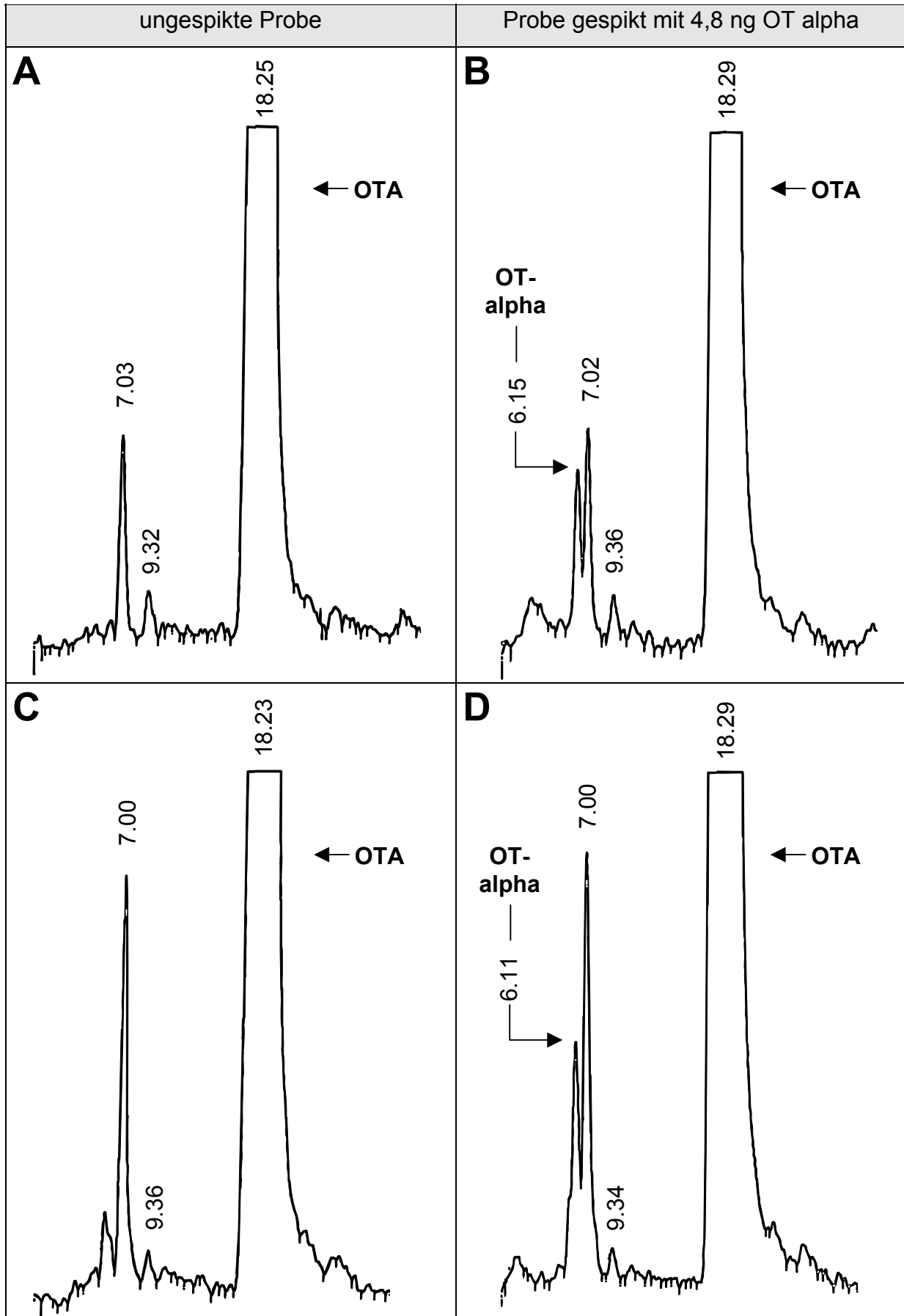
Es zeigt sich, daß der schon in der Stammlösung detektierte Peak (bei Rt 9.38 min) ebenfalls in allen anderen Proben zu finden war, allerdings manchmal mit geringfügig nach vorn verschobener Retentionszeit, doch in recht konstanten Anteilen (unabhängig von der Art der Probe). In einigen Proben wurde der Peak aufgrund der geringen Höhe nicht integriert. Es handelt sich daher bei diesem Peak augenscheinlich nicht um einen durch zelluläre Aktivität entstehenden Metaboliten.

Wie in Abbildung 12 ebenfalls erkennbar, zeigte sich bei einer Rt von ca. 6.80 min in allen Proben ein in der Stammlösung nicht detektierter Peak. Die Höhe dieses Peaks stieg mit der Behandlungsdauer der Proben in allen Ansätzen an.

Dieser Peak fand sich aber auch in Proben, die ohne OSV-Zellen inkubiert wurden. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich hierbei um ein (nicht enzymatisch)

gebildetes Degradierungsprodukt (in kleiner Menge) handelt. Bei diesem Experiment zeigt sich der Nutzen von konsequent mitgeführten Kontrollansätzen. Nur durch die untersuchten Kontrollinkubationen war es möglich, bei dem fraglichen Peak auf ein Degradierungsprodukt zu schließen.

In einem weiteren Experiment wurde geprüft, ob es sich bei dem vermuteten Degradierungsprodukt um OT alpha handelt. Dazu wurde nach der Extraktion des Inkubationsansatzes OT alpha (4,8 ng) zur Analysenprobe dazu gegeben. Abbildung 13 zeigt das Ergebnis.



Legende umseitig

Abb. 13: Chromatogramme von ungespikten (**A, C**) und mit je 4,8 ng OT alpha gespikten (**B, D**) Inkubationsansätzen.
(**A, B**): Inkubationsdauer: 6 h, 15 µM OTA, ohne INDO, mit Zellen
(**C, D**): Inkubationsdauer: 24 h, 15 µM OTA, 50 µM INDO, mit Zellen
Das Einspritzvolumen (50 µl) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 µg OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz)

Da OT alpha etwas früher von der Säule eluiert (Rt 6.15 min bzw. 6.11 min), ist klar erwiesen, daß es sich bei dem fraglichen Peak nicht um OT alpha handeln kann. Die Identität des Peaks wurde nicht weiter aufgeklärt, da es sich offensichtlich nicht um einen (enzymatisch entstandenen) Metaboliten handelt.

4.2 Umsetzung von OTA durch mikrosomale PHS und HRP

4.2.1 PHS-katalysierter Metabolismus von OTA

Bei Inkubation von OTA mit OSV-Zellen, die die Peroxidase PHS exprimieren, wurden also keine Anhaltspunkte für die Entstehung von Metaboliten des Mykotoxins gefunden. Dennoch ist nicht definitiv auszuschließen, daß die PHS das Mykotoxin umsetzen kann, in Zellkulturen jedoch nur sehr geringer Umsatz erfolgt, da der Gehalt an freier Arachidonsäure (vgl. Abbildung 4) in den OSV Zellen u. U. als limitierender Faktor wirkt. Auch könnte die die Zellen umgebende Membran als „Barriere“ wirken und evtl. eine Abgabe von Metaboliten in das analysierte Zellkulturmedium verhindert haben.

Für weitergehende Untersuchungen zur peroxidativen Umsetzung von OTA durch die PHS wurde daher ein zellfreies Untersuchungssystem, d. h. Schafsamenblasen-Mikrosomen (ram seminal vesicle microsomes, RSVM) als Enzymquelle eingesetzt (Degen *et al.*, 1986).

50 µM tritiiertes OTA (³H-OTA) wurden mit mikrosomaler PHS (1 mg Mikrosomen, Aktivität: stimuliert 4800 nmol O₂/min/mg = units) in Form von RSVM inkubiert.

Wenn nichts anderes angegeben ist, wurde das Mykotoxin mit aktivem Enzym in Gegenwart von Arachidonsäure (ARA) inkubiert. Die Inkubation, Aufarbeitung und Analyse der Ansätze erfolgte wie unter 3.8.1.2 - 3.8.1.4 beschrieben.

Zur besseren Übersicht sind in Tabelle 3 die einzelnen Ansätze und ihre Zusammensetzung angegeben.

Komponente	Ansatz				
	Versuch	Kontrollen			
	„Komplett“ (1)	ohne ARA (2)	mit INDO (3)	hitzeinaktivierte Mikrosomen (4)	ohne Mikrosomen (5)
Kaliumphosphat- Puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
³ H-OTA	50 µM 1 µCi	50 µM 1 µCi	50 µM 1 µCi	50 µM 1 µCi	50 µM 1 µCi
RSVM	1 mg	1 mg	1 mg	1 mg	--
ARA	100 µM	--	100 µM	100 µM	100 µM
INDO	--	--	70 µM	--	--

Tab. 3: Zusammensetzung der einzelnen Inkubationsansätze für die Inkubation von ³H OTA mit RSVM (Ansatz (1): Versuchsansatz, Ansätze (2) – (5): Kontrollen)

Es wurde erwartet, daß sich bei einer PHS-katalysierten Kooxidation des OTA im „kompletten“ Versuchsansatz (1) weniger Ausgangssubstanz (OTA) als in den Kontrollen (Ansätze (2) – (5)) analysierbar ist. Im Falle einer Umsetzung des Mykotoxins könnten ein oder mehrere Produkte entstehen, die mit den eingesetzten Analysemethoden (Fluoreszenz- / Radioaktivitätsdetektion) nachweisbar wären. Die Bildung reaktiver, an Protein bindender Intermediate wäre über den Anteil proteingebundener Radioaktivität meßbar. In den Ansätzen (2) – (5) wäre dagegen keine Umsetzung bzw. eine Umsetzung nur in deutlich geringerem Umfange möglich, da darin das Enzym gehemmt (Ansätze (2) – (3)) bzw. inaktiviert ist (Ansatz (4)) oder ganz fehlt (Ansatz (5)).

4.2.1.1 Radioaktivitätsverteilung

Aus der Literatur ist bekannt, daß OTA eine hohe Affinität zu Serumproteinen zeigt (vgl. 1.3). In unserem Fall sollte untersucht werden, ob bei einer PHS-katalysierten

Umsetzung von OTA reaktive Intermediate entstehen, die kovalent an Proteine binden. Daher wurde die Radioaktivitätsverteilung in den einzelnen Inkubationsansätzen zwischen dem nach der Aufarbeitung erhaltenen Überstand und dem Proteinpellet (Mikrosomen) untersucht (vgl. 3.8.1.4). Es wurden entsprechende Aliquots von Überstand und Pellet entnommen und darin OTA bzw. OTA-Produkte mittels Flüssigszintillationszählung (LSC, vgl. 3.9.4) quantifiziert.

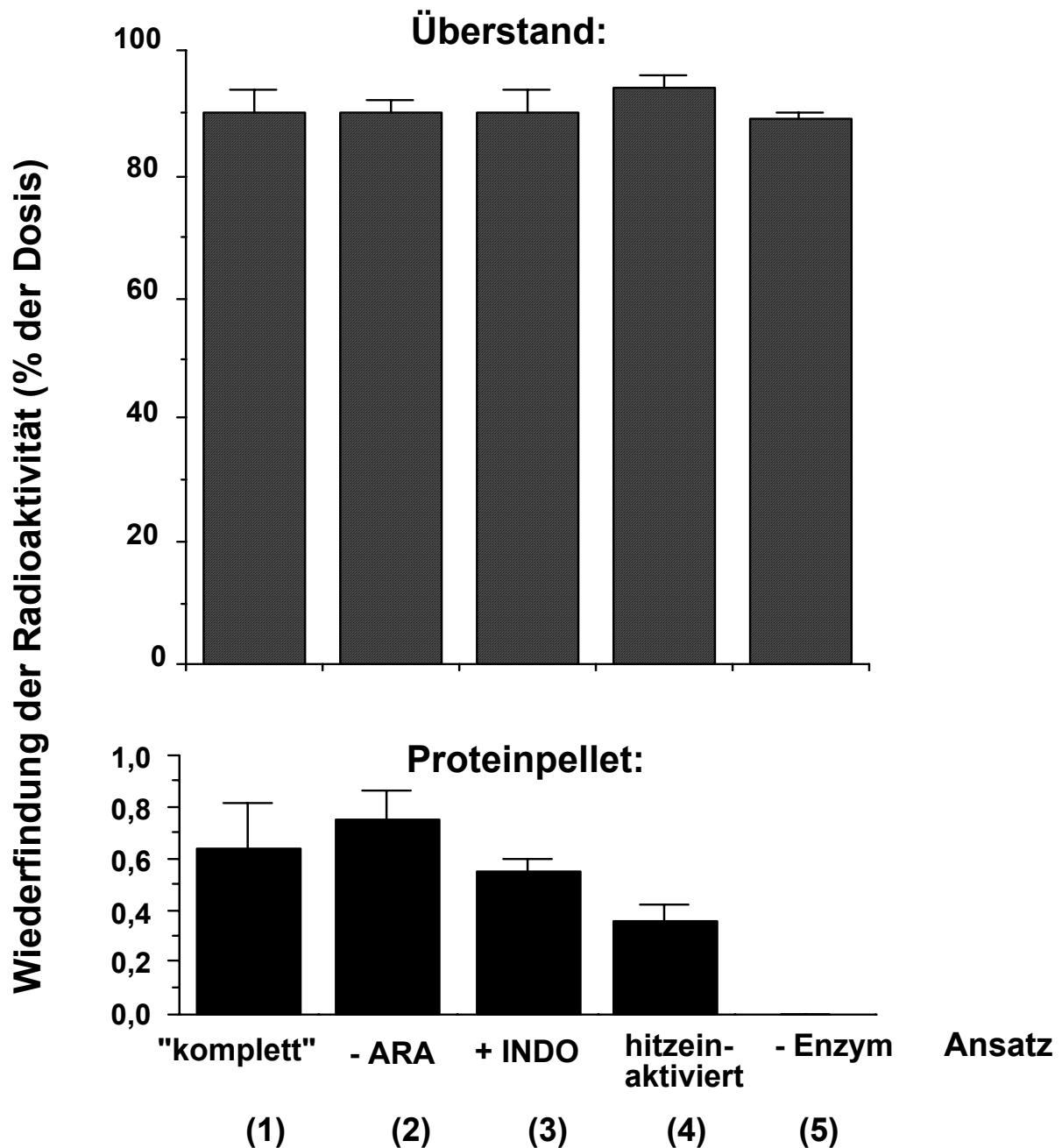


Abb. 14: Radioaktivitätsverteilung und -wiederfindung nach Inkubation (5 min bei 37°C) von ^3H -OTA (50 μM) mit PHS (1 mg, 4.800 Units, Ansatz (1)) bzw. in Kontrollen (Ansätze (2) – (5)). Zusammensetzung der Ansätze siehe Tabelle 3. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von jeweils triplikaten Ansätzen

Die Wiederfindung der eingesetzten Radioaktivität (1 $\mu\text{Ci}/\text{Ansatz}$) lag in allen Ansätzen bei ca. 90 %.

Der Anteil proteinassoziierter Radioaktivität lag in allen Ansätzen deutlich unter 1 % (Abbildung 14). Man findet also keine ausgeprägte Bindung von OTA an das mikrosomale Protein. Ein Vergleich der Ansätze (1) mit (2) bzw. (3) spricht ferner gegen eine signifikante Bindung möglicher in Ansatz (1) enzymatisch entstandener reaktiver Metabolite (denn in diesem Fall müsste die proteingebundene Radioaktivität in Ansatz (1) am höchsten sein).

4.2.1.2 HPLC-Analyse der Überstände

Im ^3H -OTA sind laut Herstellerangaben (Moravek Biochemicals) zu ca. 85 % der Phenylalaninanteil des OTA und zu ca. 15 % der Isokumarinanteil des Moleküls markiert. Bei einer Abspaltung des Aminosäureanteils im Laufe der Inkubation oder Aufarbeitung würden Metabolite, die aus dem Isokumarinanteil resultieren, noch radiochemisch detektiert und auch mittels Fluoreszenzdetektion nachweisbar sein. Daher wurden die Versuchsansätze zum Nachweis fluoreszierender Metabolite mit HPLC und Fluoreszenzdetektion untersucht und durch fraktioniertes Auffangen des HPLC-Eluates auch Radioaktivitätsprofile der Ansätze erstellt. So können auch ^3H -markierte, aber nicht mehr fluoreszierende Metabolite nachgewiesen werden.

Mittels HPLC- Fluoreszenz-Analyse (vgl. 3.9.2.2) wurde die Wiederfindung von OTA ermittelt und innerhalb der einzelnen Ansätze verglichen. Eine geringere Wiederfindung an OTA in kompletten gegenüber Kontrollansätzen wäre ein erster Anhaltspunkt für eine enzymatische Umsetzung und die Entstehung von Metaboliten. Die Proben wurden mit mobiler Phase 1:100 verdünnt und anhand einer Eichkurve quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 15 dargestellt.

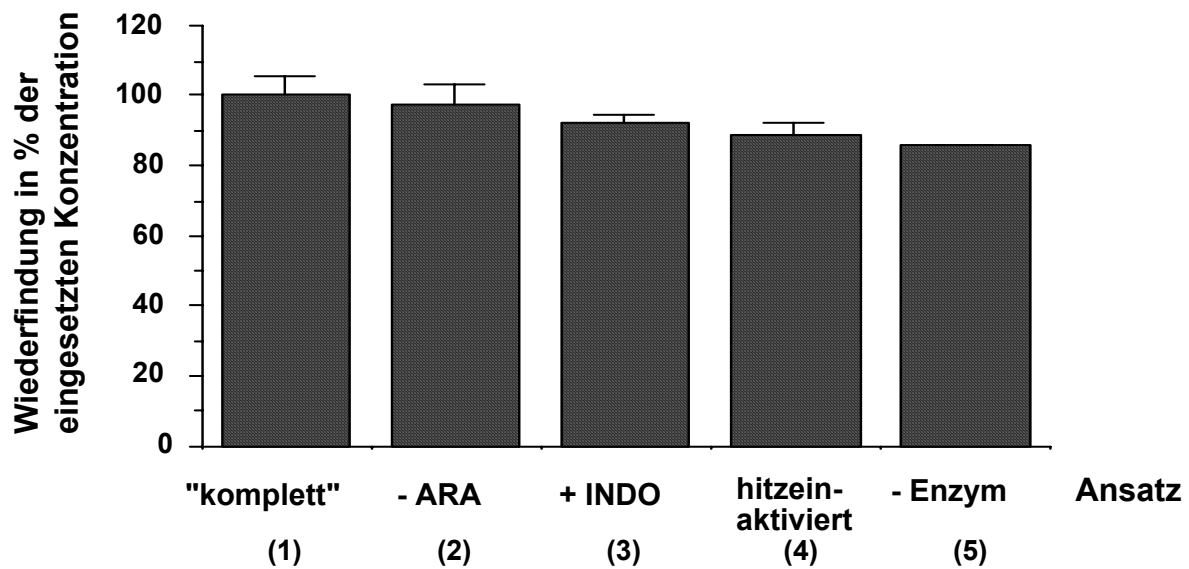


Abb. 15: HPLC-Wiederfindung von OTA in den einzelnen Inkubationsansätzen in % der eingesetzten Konzentration (50 μ M). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von jeweils triplikaten Ansätzen. Zusammensetzung der Ansätze siehe Tabelle 3

In „kompletten“ Ansätzen (1) wurde praktisch die gesamte Menge des eingesetzten OTA (50 μ M) wiedergefunden, mehr als in den Kontrollansätzen ((2) – (5)).

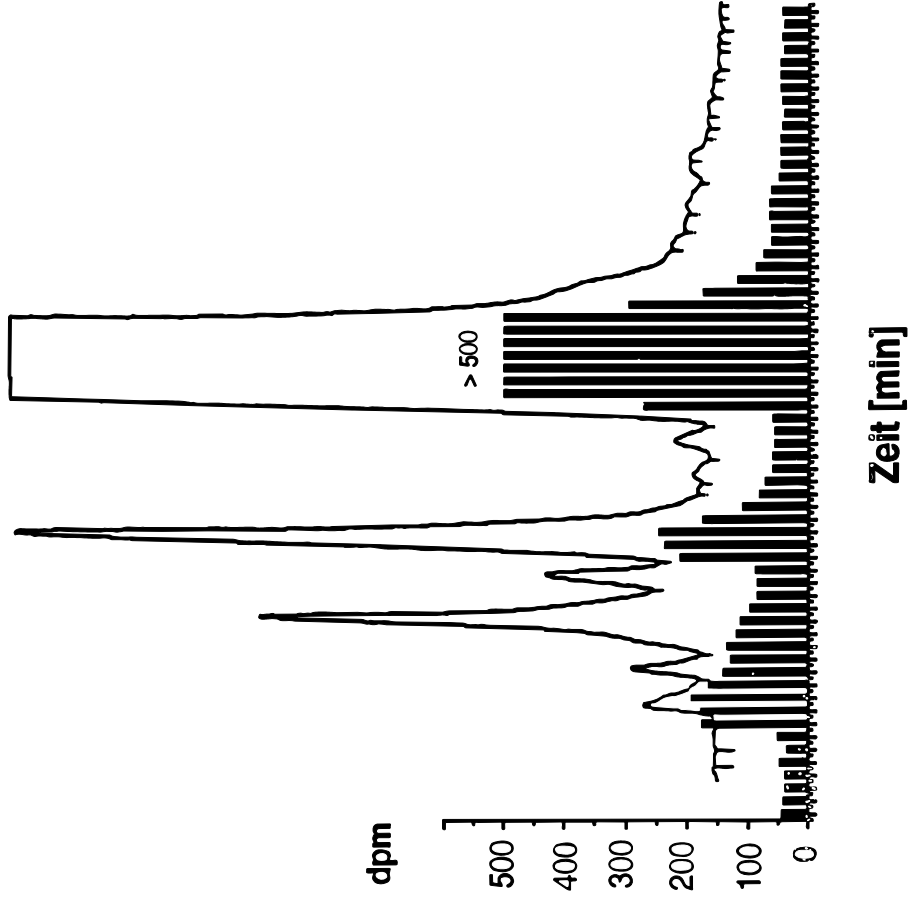
Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß OTA nicht bzw. nur in sehr geringem Umfang verstoffwechselt wird.

Eine weitergehende Untersuchung der Extrakte ergab im HPLC-Fluoreszenz Profil des kompletten Ansatzes (Abbildung 16 A) neben dem OTA-Peak (Rt: 16.40 min) weitere Peaks, die auf im Reaktionsansatz vorhandene fluoreszierende, polarere Komponenten als OTA hindeuteten.

Das entsprechende Profil der Kontrollinkubation ohne Mikrosomen (Abbildung 6 B) zeigt neben dem OTA-Peak (Rt: 16.36 min) ebenfalls zusätzliche Peaks; diese entsprachen zum Teil den bereits im kompletten Ansatz neben OTA detektierten Peaks. Die relativen Anteile an der Gesamtpeakfläche sind in Tabelle 4 angegeben.

A Inkubation von 3H-OTA mit PHS

(OT-alpha) OTB → (5.60)
OTB → 9.63
OTA → 16.40



B Kontroll- Inkubation von 3H-OTA (ohne PHS)

(OT-alpha) OTB → (5.60)
OTB → 9.71
OTA → 16.36

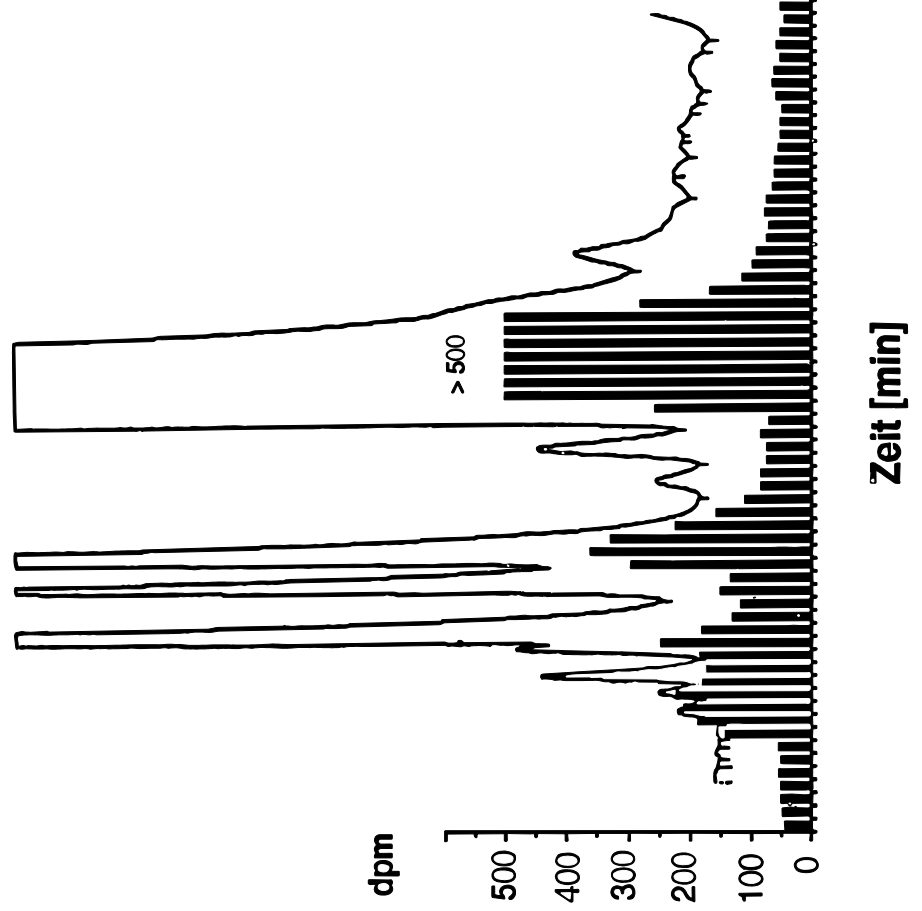


Abb. 16: Darstellung von HPLC-Fluoreszenzprofil und Radioaktivitätsprofil für **(A)** kompletten Inkubationsansatz (50 μM ^3H -OTA, (1 μCi), 1 mg (4.800 Units) PHS und **(B)** Kontrollinkubation ohne Enzym. Inkubation bei 37°C für 5 min. Das Einspritzvolumen (50 μl) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 μg OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz). Dargestellt sind die Ergebnisse eines HPLC-Laufs von je 0 - 30 Minuten, aufgefangen und analysiert wurden jeweils 30-Sekunden-Fractionen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Radioaktivität im mit OTA korrespondierenden Peak nur bis 500 Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute, dpm) angegeben. Die Menge an Radioaktivität in den OTA-Peaks in Abbildung **(A)** und **(B)** war vergleichbar.

Peak Nr.	Ansatz		Eigenschaften
	komplett	Kontrolle (- Enzym)	
1	6.16	6.20	Rt (min)
	0,83	1,88	% Gesamtpeakfläche
2	8.21	8.37	Rt (min)
	0,15	0,89	% Gesamtpeakfläche
3	9.63	9.71	Rt (min)
	1,52	1,60	% Gesamtpeakfläche
4	14.23	14.31	Rt (min)
	0,02	0,23	% Gesamtpeakfläche
5 (OTA)	16.40	16.36	Rt (min)
	97,21	94,68	% Gesamtpeakfläche

Tab. 4: Retentionszeiten und Anteil an der Gesamtpeakfläche einzelner Peaks in einem kompletten und einem Kontrollansatz; Inkubation von 50 μM OTA komplett mit 1 mg (4.800 units) RSVM bei 37 °C für 5 min bzw. ohne Enzym

Im weiteren wurde untersucht, ob die in Abbildung 16 A gezeigten Peaks während der Aufarbeitung entstehen, und zwar möglicherweise während des Abdampfens der Überstände. Dazu wurden Ansätze mit unmarkiertem OTA (ohne Mikrosomen) unter identischen Bedingungen wie im Hauptversuch inkubiert und unterschiedlich lange unter N_2 abgedampft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt: Abbildung 17 A zeigt das Fluoreszenzprofil nach 30 min, Abbildung 17 B nach 2 h Abdampfen unter N_2 . Es zeigte sich, daß die fraglichen Peaks in Abhängigkeit von der Dauer des

Abdampfens zunehmen. Obwohl also ein gängiges und schonendes Verfahren zur Aufarbeitung der Proben verwendet wurde, führte das Abdampfen unter N₂-Strom zu einer Reihe von Störpeaks (d.h. zu nicht durch enzymatische Aktivität entstandenen Produkten).

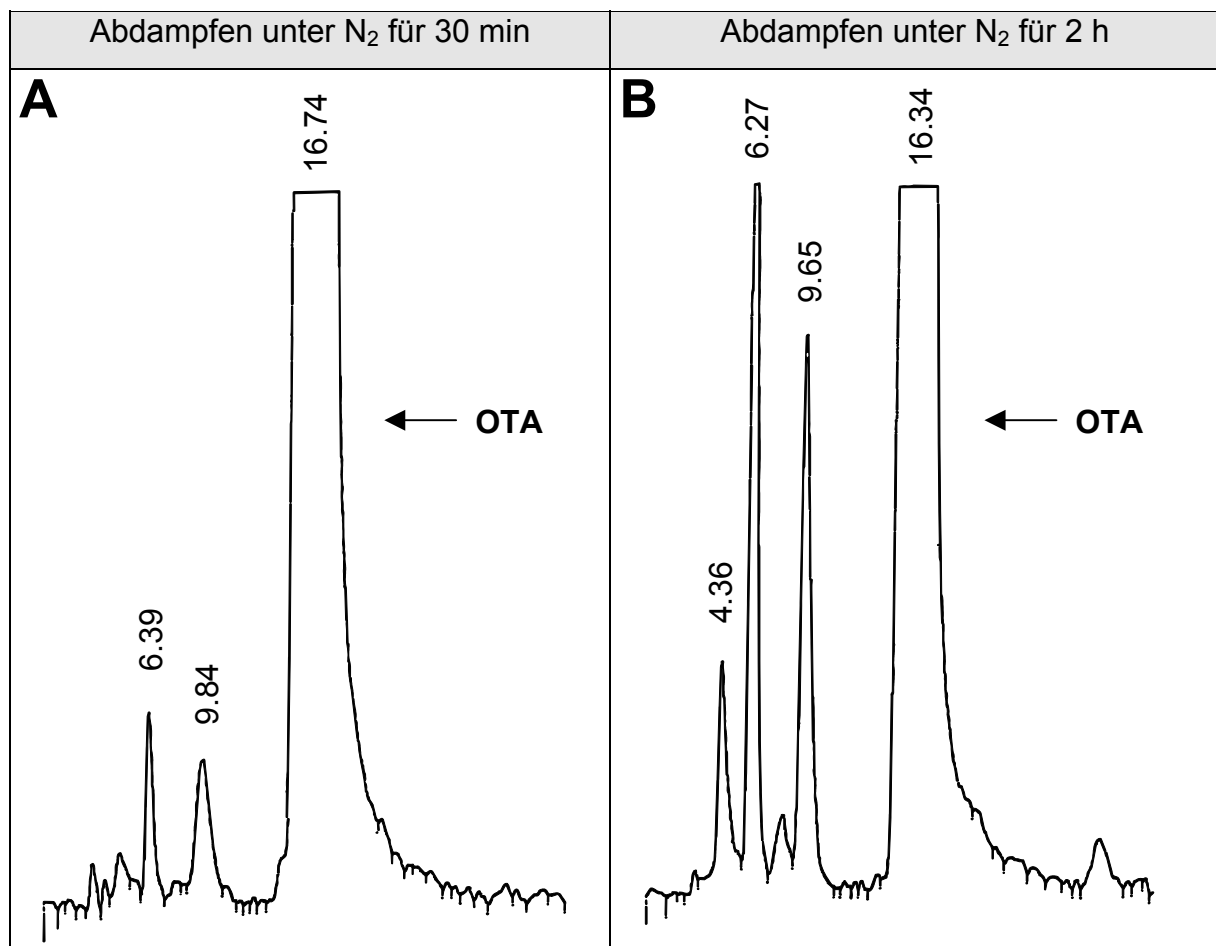
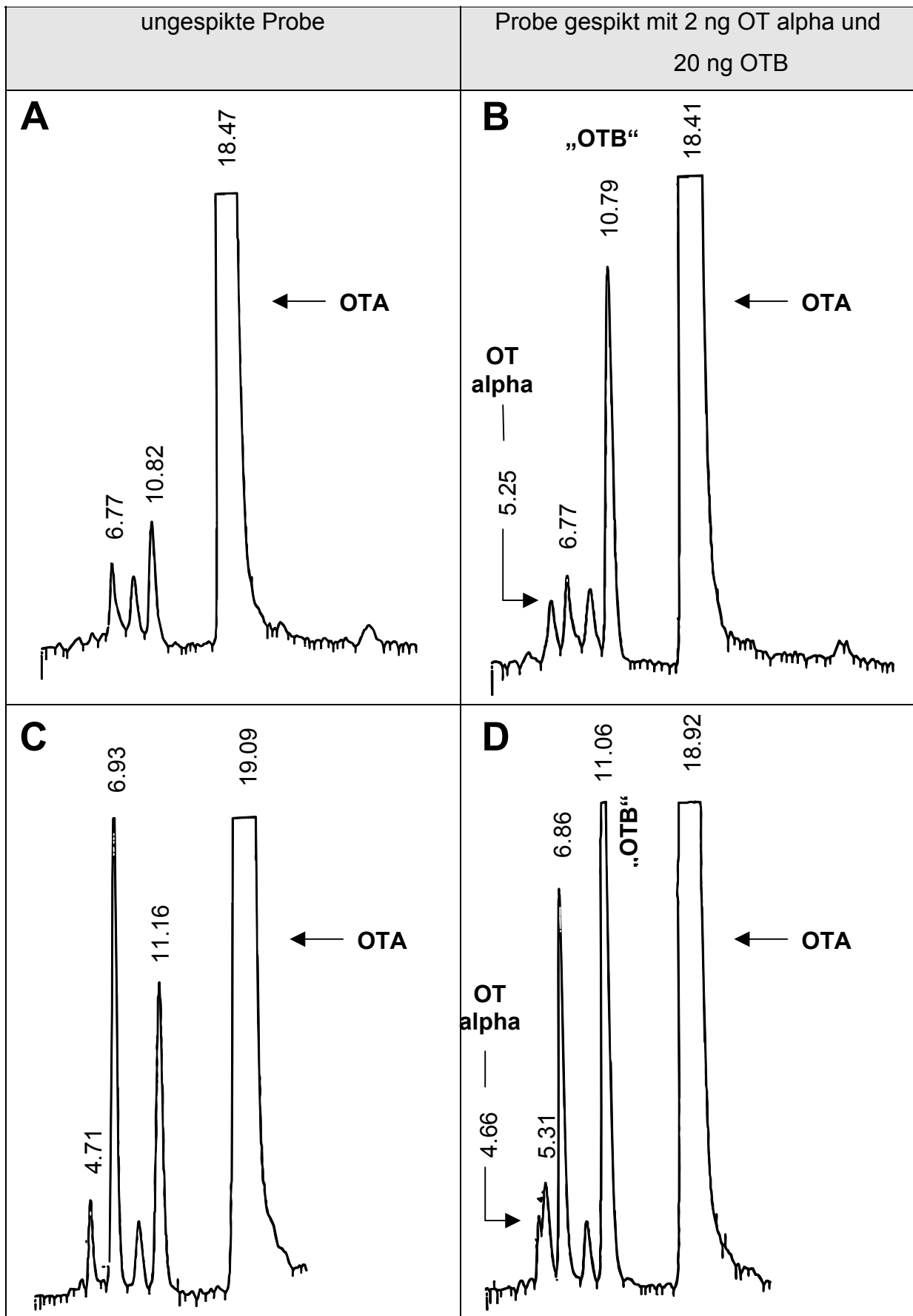


Abb. 17: Chromatogramme von Inkubationsansätzen ohne Mikrosomen nach 30 min (**A**) und 2 h (**B**) Abdampfen unter N₂. Das Einspritzvolumen (50 µl) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 µg OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz)

Inwieweit OTB oder OT alpha mit einem der im Fluoreszenzprofil erhaltenen Störpeaks cochromatographiert, wurde durch Spiken von einigen zufällig ausgewählten Proben untersucht. Abbildung 18 zeigt die entsprechenden Chromatogramme nach HPLC-Analyse.



Legende umseitig

Abb 18: HPLC-Fluoreszenzprofile von einem **(A)** kompletten Inkubationsansatz ungespikt, **(B)** komplettem Inkubationsansatz gespikt mit 2 ng OT alpha und 20 ng OTB im Einspritzvolumen (50 µl), **(C)** Kontrollansatz ohne Enzym ungespikt, **(D)** Kontrollansatz gespikt mit 2 ng OT alpha und 20 ng OTB im Einspritzvolumen (50 µl).

Wie Abbildung 18 zeigt, entstand während der Inkubation/Aufarbeitung der Ansätze kein mit OT alpha cochromatographierendes Produkt. Bei Zusatz von OTB zeigt sich, daß einer der Peaks (Rt ca. 11 min) mit diesem OTA-Derivat cochromatographiert. Die Ausbeute dieses Produktes, im folgenden als "OTB" bezeichnet, wurde mittels einer Eichkurve ermittelt und stellt sich wie folgt in den einzelnen Ansätzen dar:

Ansatz	µg "OTB" / 2 ml Ansatz
komplett	0,21 ± 0,01
- ARA	0,18 ± 0,02
+ INDO	0,33 ± 0,08
hitzeinaktiviertes Enzym	0,46 ± 0,05
- Enzym	0,25 ± 0,05

Tab. 5: Entstehung von "OTB" in den einzelnen Inkubationsansätzen. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von jeweils triplikaten Ansätzen.

Wie Tabelle 5 zeigt, entstand "OTB" in geringen Mengen in allen Inkubationsansätzen, unabhängig von deren Zusammensetzung. Die Tatsache, daß es auch in Ansätzen ohne bzw. mit inaktiviertem Enzym gefunden wurde, spricht dafür, daß das Produkt nicht enzymatisch, sondern während der Aufarbeitung entstand.

Die Tabelle zeigt auch, daß am meisten "OTB" in Ansätzen mit hitzeinaktiviertem Enzym gefunden wurde.

Die Identität des Produktes "OTB" wurde nicht weiter untersucht, da es sich offensichtlich nicht um ein von PHS gebildetes Produkt handelt.

4.2.1.3 Radioaktivitätsprofil der Überstände

Neben den Fluoreszenzprofilen der Inkubationsansätze wurden auch die entsprechenden Radiochromatogramme untersucht, die durch fraktioniertes Auffangen der Eluate (Fraktion: 30 sec) und anschließende Bestimmung der Radioaktivität in den einzelnen Fraktionen mittels LSC (vgl. 3.9.4) erhalten wurden. Dargestellt sind in Abbildung 16 (**A**) ein kompletter Inkubationsansatz und (**B**) ein Kontrollansatz (Inkubation ohne Enzym). Zum direkten Vergleich des Fluoreszenzprofils mit dem Radioaktivitätsprofil wurden beide Abbildungen des entsprechenden Inkubationsansatzes übereinander gelegt. In beiden Ansätzen korrespondierte der jeweilige Fluoreszenzpeak für OTA (Rt 16.40 min bzw. 16.36 min) gut mit dem entsprechenden Radioaktivitätspeak.

In dem mit "OTB" bezeichneten Fluoreszenzpeak konnte ebenfalls etwas Radioaktivität detektiert werden. Es könnte sich bei dem fraglichen Produkt also tatsächlich um OTB gehandelt haben. Eine weitere Absicherung war aufgrund der geringen Mengen aber nicht möglich. Zudem war die Entstehung offenbar nicht durch PHS katalysiert.

4.2.1.4 Analyse der Überstände mittels DC und Autoradiographie

Zur Analyse der Überstände mittels Autoradiographie wurden je Inkubationsansatz 100 µl (entsprechend ca. 55.500 dpm oder maximal 1 µg OTA) mittels einer Hamilton-Spritze auf analytische DC-Platten aufgetragen. Als Kontrolle wurde ein entsprechend verdünntes Aliquot der radioaktiv markierten OTA-Stammlösung (555.000 dpm/100 µl) aufgetragen und die Platten wie in 3.9.2.1 beschrieben entwickelt. Anschließend erfolgte die autoradiographische Darstellung der Spots.

In allen Ansätzen fand sich als Hauptkomponente ein radioaktiver fluoreszierender Fleck mit einem Rf-Wert von ca. 0,614, der mit der als Kontrolle aufgegebenen ³H-OTA-Stammlösung korrespondierte. Weitere Schwärzungen, die auf radioaktiv markierte Produkte einer Umsetzung hindeuten würden, konnten nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die auf Absorptionschromatographie beruhenden

Analysen waren zwar weniger empfindlich, bestätigten aber im Prinzip den Befund der HPLC-Analyse, nämlich keine meßbare Umsetzung von OTA.

4.2.1.5 Umsetzung von *trans*-Diethylstilbestrol durch die verwendete PHS-Präparation

Die nach 4.2.1.1 bis 4.2.1.4 erhaltenen Befunde sprechen nicht für eine Metabolisierung von OTA durch die Peroxidase PHS. Um auszuschließen, daß dies auf einer mangelnden Aktivität der eingesetzten Mikrosomenpräparation beruht, wurde zur Kontrolle das bekannte PHS-Substrat *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) mit der gleichen Charge von RSVM umgesetzt.

Die Inkubation sowie Aufarbeitung und Analyse der Ansätze sind unter 3.8.3 bzw. 3.9.2.2 beschrieben. Das Ergebnis dieser Kontrollinkubation zeigt Abbildung 19. Dargestellt sind die HPLC-Analysen der E-DES-Umsetzung in kompletten Ansätzen sowie in Kontrollansätzen ohne Enzym (Mittelwerte aus n = 2 Ansätzen).

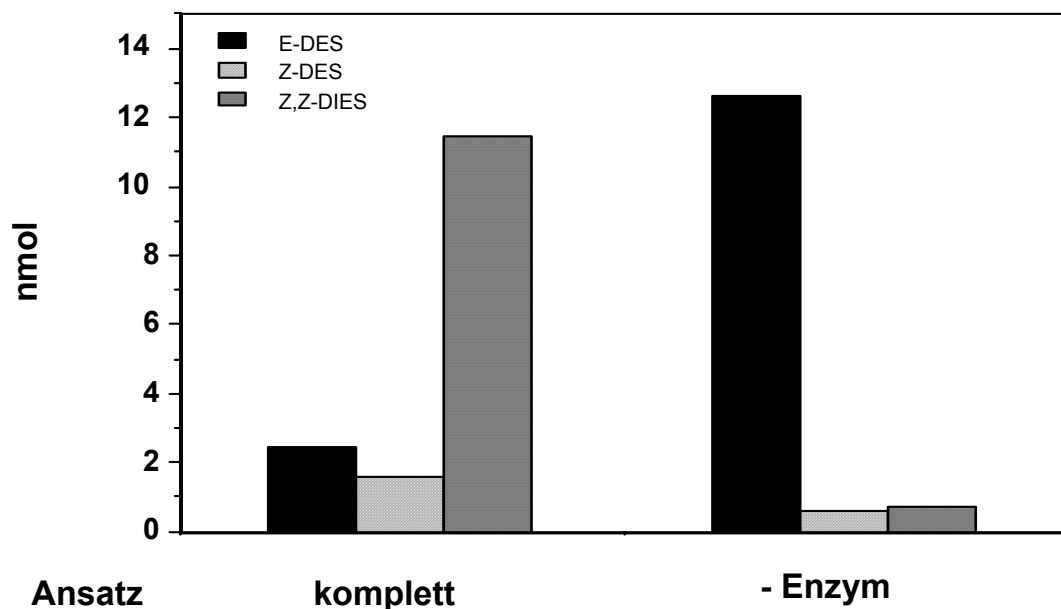


Abb. 19: Umsetzung von *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) durch PHS. Inkubation von E-DES (100 µM) mit 1 mg RSVM (PHS-Aktivität: 4.800 units) für 5 min bei 37°C und ohne Enzym, Mittelwerte aus duplikaten Ansätzen

Das in Abbildung 19 dargestellte Ergebnis zeigt, daß die für Metabolismusstudien mit OTA verwendete PHS-Präparation das synthetische Östrogen *trans*-Diethylstilbestrol

(E-DES) sehr effizient zum oxidativen Metaboliten Z,Z-Dienestrol (Z,Z-DIES) umsetzt. Die verwendeten Mikrosomen waren also enzymatisch sehr aktiv und führten zu einer fast vollständigen Oxidation von E-DES, jedoch keiner messbaren Umsetzung von OTA.

4.2.2 HRP-katalysierter Metabolismus von OTA

Keines der oben beschriebenen Ergebnisse sprach also für eine oxidative Umsetzung von OTA durch die Säuger-Peroxidase PHS.

Nachfolgend wurde eine weitere Peroxidase, die Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) eingesetzt; dieses Enzym ist in hochreiner Form verfügbar und eine Proteinbindung von OTA oder auch von potentiell reaktiven, an Protein bindende Metaboliten konnte daher weitgehend ausgeschlossen werden. Gleichzeitig konnte die Aufarbeitung der Inkubationsansätze weniger aufwendig gestaltet werden (vgl. 3.8.2.2). Das in geringen Mengen im Inkubationsansatz enthaltene HRP-Protein wurde durch Zugabe von mobiler Phase (pH 2,5) inaktiviert, ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Somit war keine weitere Aufarbeitung der Proben (wie Abdampfen) erforderlich; eine Verteilung der Radioaktivität auf Proteinpellet und Überstand entfiel.

Die Zusammensetzung der einzelnen Inkubationsansätze zeigt Tabelle 6 als Übersicht.

Komponente	Ansatz			
	Versuch	Kontrollen		
	„komplett“	ohne H ₂ O ₂	ohne HRP	ohne H ₂ O ₂ / ohne HRP
TRIS-Puffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
³ H-OTA	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
	1 µCi	1 µCi	1 µCi	1 µCi
HRP	100 ng	100 ng	--	--
H ₂ O ₂	338 µM	--	338 µM	--

Tab. 6: Zusammensetzung der einzelnen Inkubationsansätze zur Umsetzung von ³H OTA mit HRP

4.2.2.1 HPLC-Wiederfindung von OTA

Zunächst wurde mittels HPLC-Analyse (vgl. 3.9.2.2) die Menge an OTA ermittelt und innerhalb der einzelnen Ansätze verglichen. Eine geringere Wiederfindung an OTA in kompletten Ansätzen gegenüber Kontrollansätzen wäre, wie bereits für die Untersuchungen mit PHS erläutert, ein erster Anhaltspunkt für eine enzymatische Umsetzung und Entstehung von Metaboliten.

Die Proben wurden mit mobiler Phase 1:100 verdünnt und anhand einer Eichkurve für OTA quantifiziert. Das Ergebnis zeigt die folgende Abbildung.

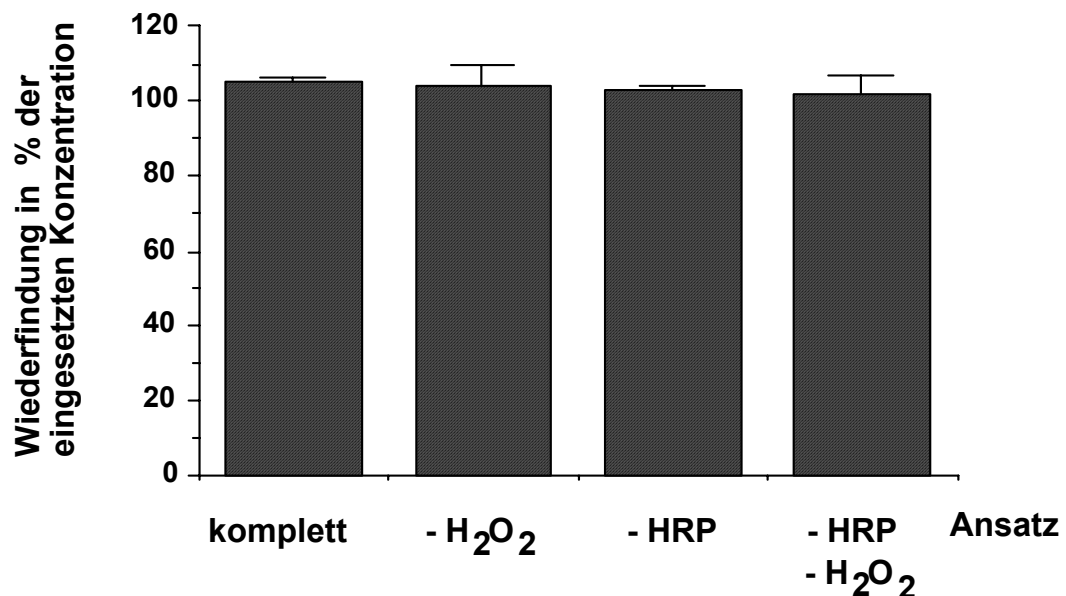


Abb. 20: HPLC-Wiederfindung von OTA in den einzelnen Inkubationsansätzen in % der eingesetzten Konzentration (50 µM). Dargestellt sind Mittelwerte ± SD von triplikativen Ansätzen. Zusammensetzung der Ansätze siehe Tabelle 6

Wie Abbildung 20 zeigt, wurde in allen Ansätzen praktisch die gesamte eingesetzte OTA-Menge bei der HPLC-Analyse wiedergefunden. Dieses Ergebnis spricht dagegen, daß OTA in kompletten Ansätzen in nennenswertem Umfang verstoffwechselt wird.

Im folgenden wurden die Inkubationsansätze noch genauer auf ihre Zusammensetzung (z. B. Metabolite) hin untersucht.

4.2.2.2 Fluoreszenzprofil der Ansätze

Abbildung 21 zeigt repräsentative HPLC-Fluoreszenz-Profile von **(A)** einem kompletten Inkubationsansatz mit HRP und **(B)** einer Kontrollinkubation ohne Enzym.

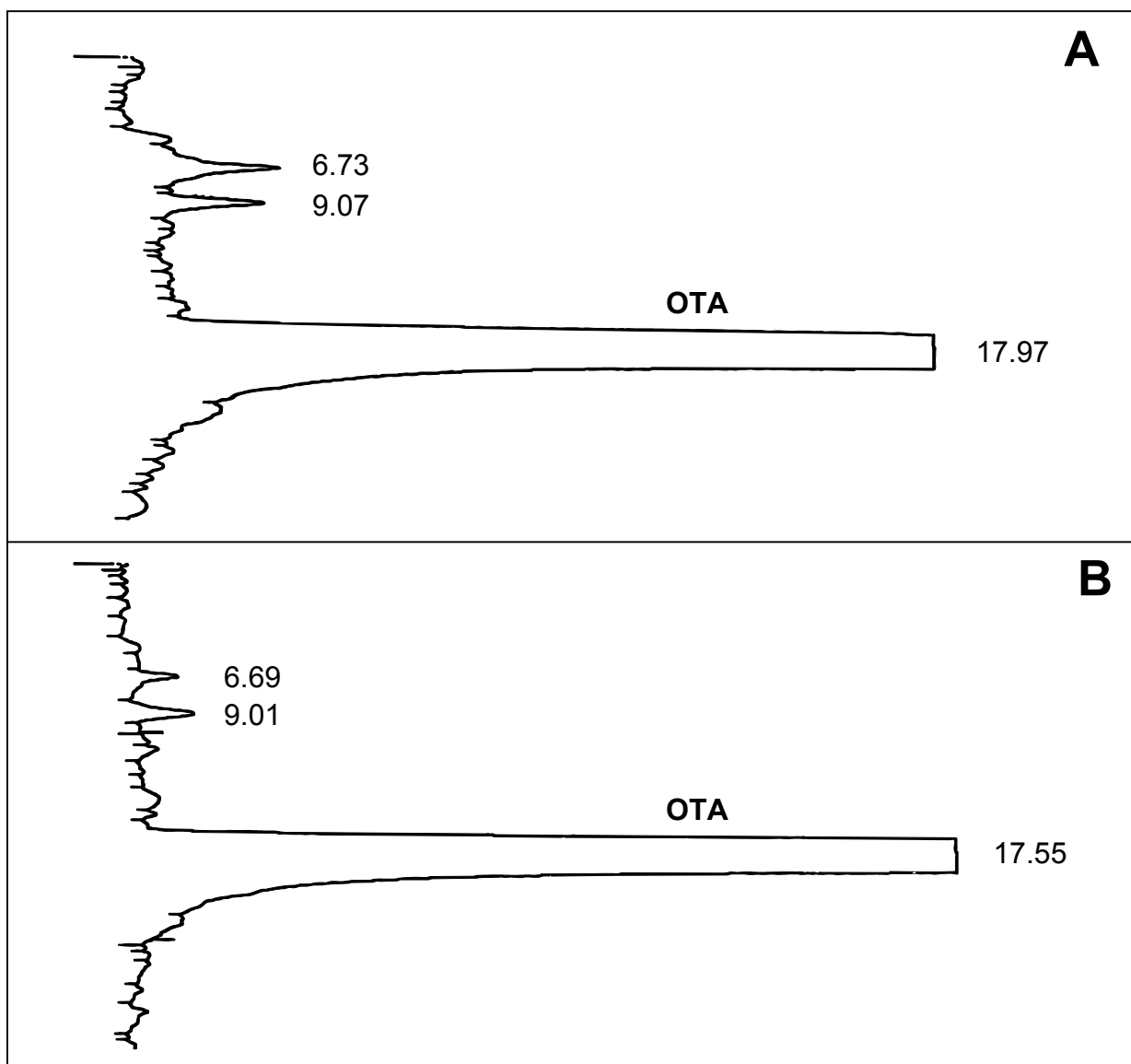


Abb. 21: HPLC-Fluoreszenzprofile von **(A)** einem kompletten Inkubationsansatz (50 μM ^3H -OTA, (1 μCi), 100 ng HRP und **(B)** einer Kontrollinkubation ohne Enzym. Inkubation bei 25°C für 30 min. Das Einspritzvolumen (50 μl) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 μg OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz)

Im HPLC-Profil des kompletten Ansatzes (Abbildung 21 A) fanden sich neben dem OTA-Peak (Rt: 17.97 min) noch 2 weitere Peaks, die auf fluoreszierende, polarere Komponenten als OTA hindeuteten (Rt: 6.73 min bzw. 9.07 min). Diese Peaks machten im Reaktionsansatz einen Bruchteil der Gesamtpeakfläche aus, zusammen weniger als 0,5 %. Diese Peaks fanden sich in vergleichbaren Anteilen ebenfalls im Kontrollansatz ohne Enzym und in allen weiteren Kontrollansätzen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Dieses Ergebnis spricht dagegen, daß aus OTA bei Umsetzung mit der Peroxidase HRP fluoreszenzierende Metaboliten entstehen.

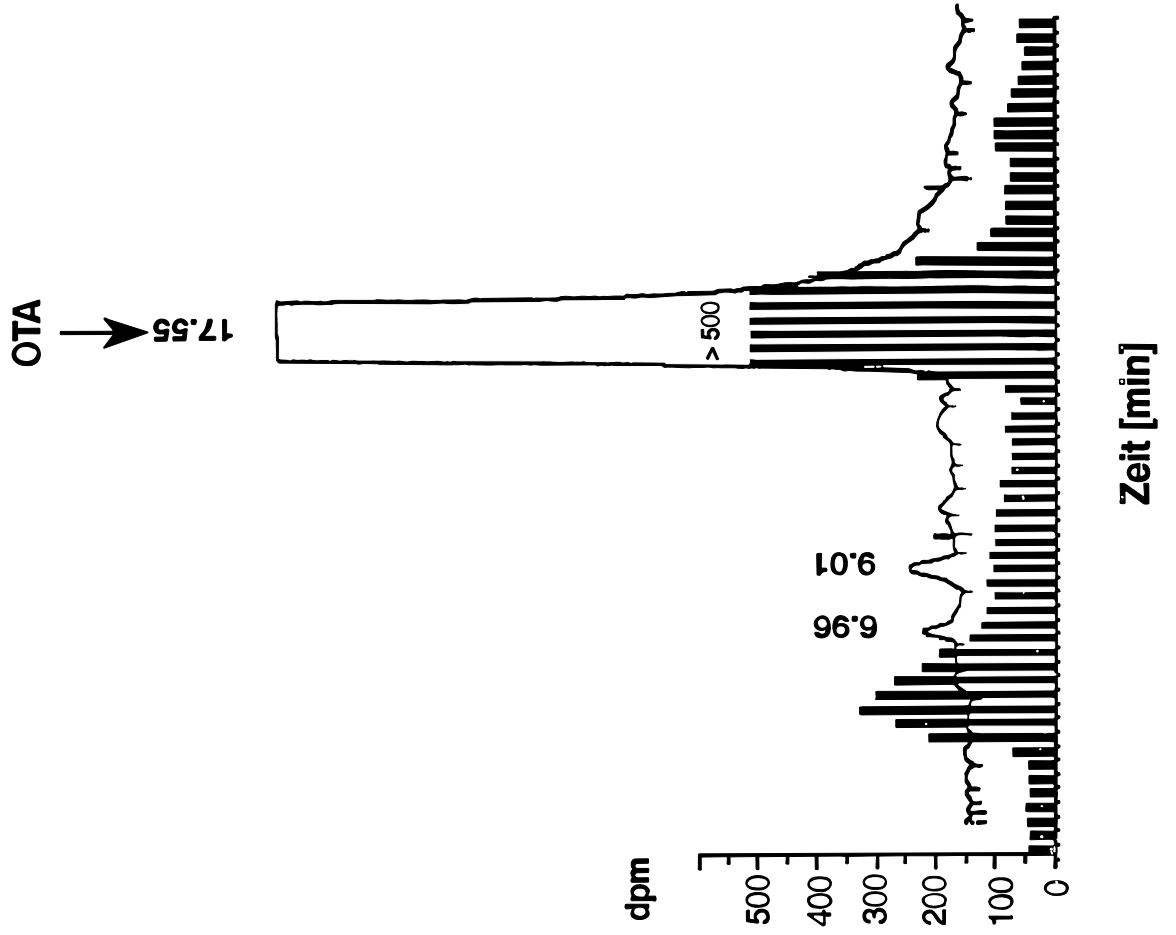
4.2.2.3 *Radioaktivitätsprofil der Ansätze*

Die Ansätze wurden auch mit Hilfe des Radioaktivitätsprofils weiter untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Auch bei dieser Analyse fanden sich keine Hinweise dafür, daß bei Inkubation von OTA mit HRP neue (radioaktive) Metabolite entstehen. Polare, früh eluierende Radioaktivität (ohne Fluoreszenz) ist in gleichem Umfang in der Kontrolle (ohne Enzym) enthalten.

**Kontroll- Inkubation von 3H-OTA
(ohne HRP)**

B



Inkubation von 3H-OTA mit HRP

A

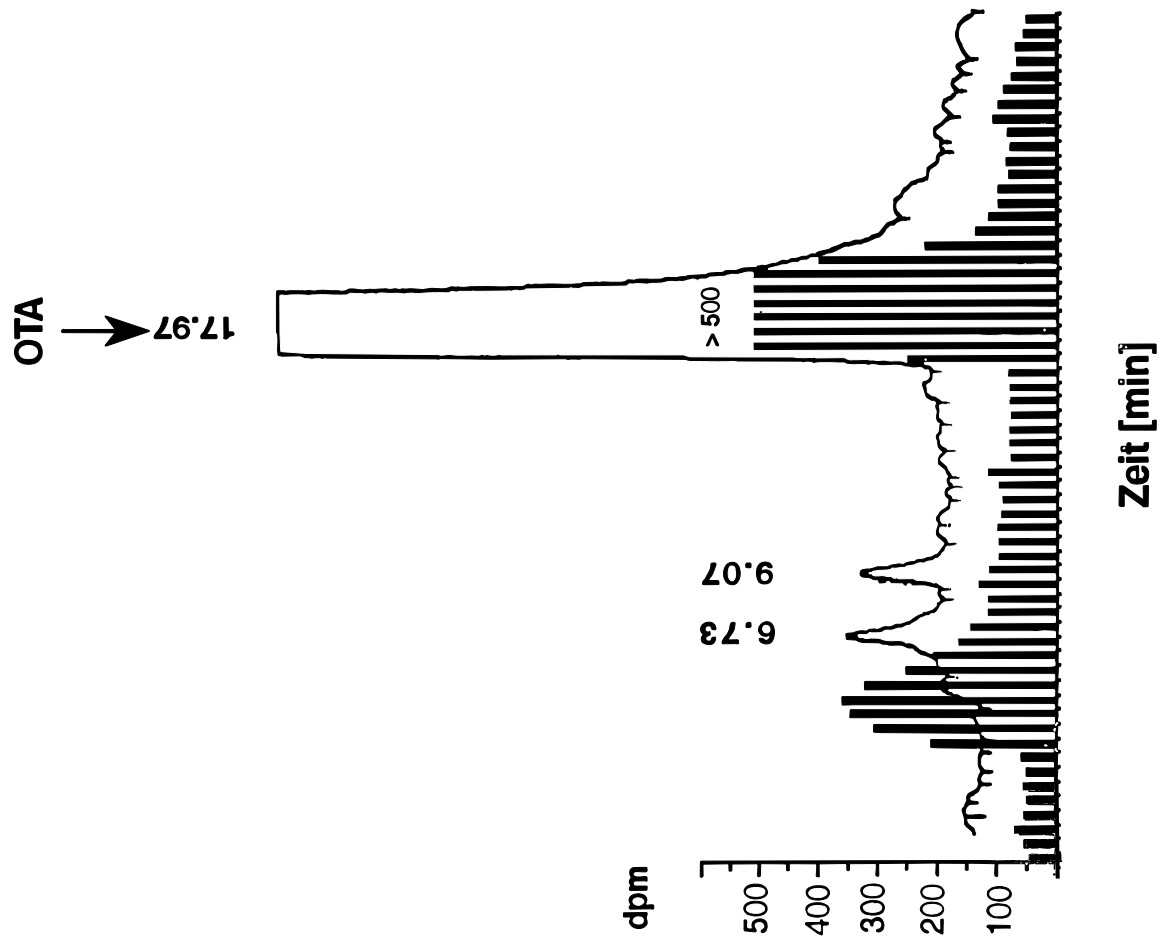


Abb. 22: Darstellung von HPLC-Fluoreszenzprofil und Radioaktivitätsprofil für **(A)** kompletten Inkubationsansatz (50 μM ^3H -OTA, (1 μCi), 100 ng (4.800 Units) HRP und **(B)** Kontrollinkubation ohne Enzym. Inkubation bei 25°C für 30 min. Das Einspritzvolumen (50 μl) enthält (bei 100 % Wiederfindung) 1 μg OTA (gemäß einer Berechnung ausgehend vom Inkubationsansatz). Dargestellt sind die Ergebnisse eines HPLC Laufs von je 0 - 30 Minuten, aufgefangen und analysiert wurden jeweils 30-Sekunden-Fractionen.

Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Radioaktivität im mit OTA korrespondierenden Peak nur bis 500 Zerfälle pro Minute (desintegrations per minute, dpm) angegeben. Die Menge an Radioaktivität in den OTA-Peaks in Abbildung **(A)** und **(B)** war vergleichbar.

4.2.2.4 Analyse der Ansätze mittels DC und Autoradiographie

Die Analyse der Ansätze mittels DC und Autoradiographie wurde wie folgt durchgeführt: Je Inkubationsansatz wurden 100 μl (entsprechend ca. 55.500 dpm oder maximal 1 μg OTA) mittels einer Hamilton-Spritze auf analytische DC-Platten aufgetragen. Als Kontrolle wurde ein entsprechend verdünntes Aliquot der radioaktiv markierten OTA-Stammlösung (555.000 dpm/100 μl) aufgetragen und die Platten wie in 3.9.2.1 beschrieben entwickelt. Anschließend erfolgte die autoradiographische Detektion der Spots.

In allen Ansätzen fand sich wiederum nur unverstoffwechseltes OTA, d. h. Flecke mit einem Rf-Wert von ca. 0,619 wie bei der zur Kontrolle aufgegebenen ^3H -OTA-Stammlösung. Weitere Schwärzungen, die auf radioaktiv markierte Produkte einer Umsetzung hindeuten würden, wurden nicht detektiert (Daten nicht gezeigt).

4.2.2.5 Umsetzung von *trans*-Diethylstilbestrol durch HRP

Zur Kontrolle der enzymatischen Aktivität der verwendeten Meerrettichperoxidase wurde wiederum *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) verwendet, das auch als Substrat der HRP bekannt ist (Degen und McLachlan, 1985; Ross *et al.*, 1985).

Die Inkubation sowie Aufarbeitung und Analyse der Ansätze sind unter 3.8.3 bzw. 3.9.2.2 beschrieben. Das Ergebnis dieser Umsetzung zeigt Abbildung 23. Dargestellt

sind die HPLC Analysen der Umsetzung von E-DES in kompletten Ansätzen und in Kontrollansätzen ohne Enzym (Mittelwerte aus duplikaten Ansätzen).

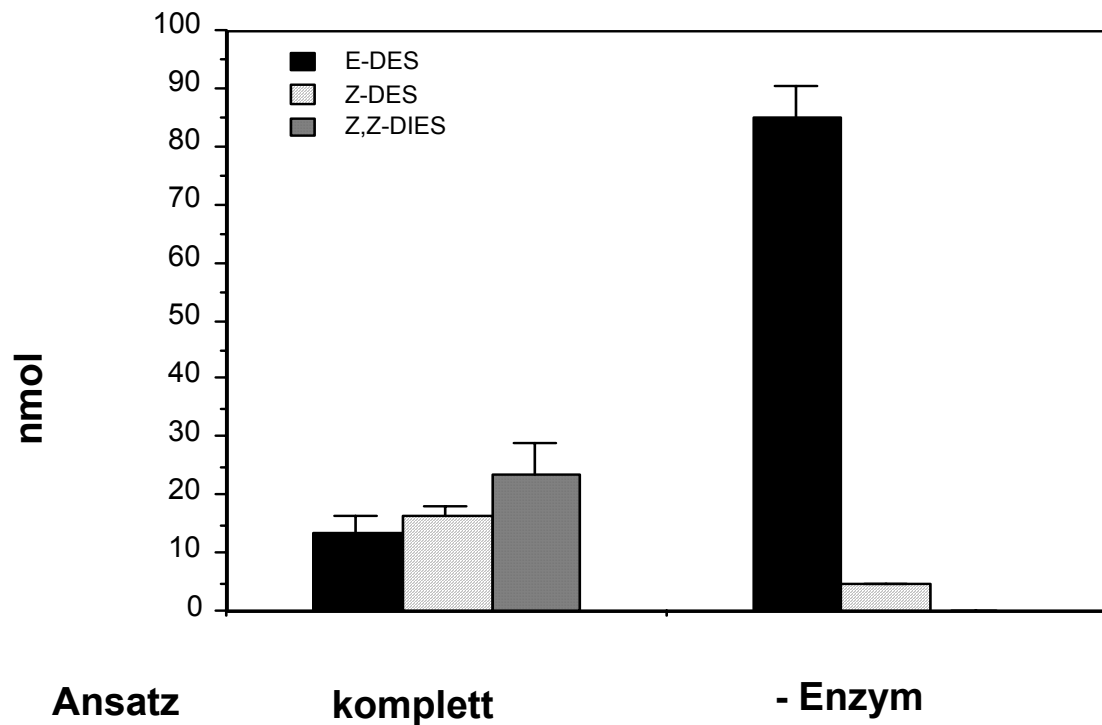


Abb. 23: Umsetzung von *trans*-Diethylstilbestrol (E-DES) durch HRP. Inkubation von E-DES (100 μ M) mit 100 ng PHS für 30 min bei 25°C, Mittelwerte aus duplikaten Ansätzen

Auch hier wird E-DES durch HRP sehr effizient zum oxidativen Metaboliten Z,Z-DIES umgesetzt. Die Inkubationsbedingungen wären daher offensichtlich geeignet gewesen, eine peroxidative Umsetzung von OTA durch HRP zu zeigen.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben somit keine Anhaltspunkte für eine Metabolisierung des Mykotoxins OTA durch die beiden eingesetzten Peroxidasen.

4.3 Genotoxizität von OTA und seinen Derivaten für OSV Zellen

4.3.1 Untersuchungen zur Genotoxizität von OTB und OT alpha

Weder in PHS-kompetenten Zellkulturen noch mit isoliertem Enzym wurden Anhaltspunkte dafür gefunden, daß OTA peroxidativ verstoffwechselt wird. Die Hemmung einer PHS-katalysierten Umsetzung von OTA durch Indometazin erklärt somit nicht die Verstärkung der Genotoxizität von OTA im Mikrokerntest (vgl. Kapitel 1.5 Hypothese # 1). Deshalb galt es, die alternativen Hypothesen zu untersuchen. Zunächst war es von Interesse zu prüfen, ob Indometazin auch Einfluß auf genotoxische Effekte der OTA Derivate OTB und OT alpha hat. Dazu wurde ein Mikrokerntest mit diesen Toxinen unter den gleichen Bedingungen durchgeführt wie zuvor mit OTA (siehe Abbildung 3).

Zur Untersuchung des genotoxischen Potentials der OT-Analoga wurde der *in vitro* Mikronukleus-Test mit OSV-Zellen herangezogen, um strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen detektieren zu können (vgl. 3.3).

In (unbehandelten) OSV-Zellkulturen wurden von Foth (1992) durchschnittliche Mikrokernraten von 1,5 – 3,5 % gefunden. Da mit Zellen höherer Passagezahl aber ein Anstieg der Spontan-Mikrokernrate beobachtet worden war (> 100 Mikrokern/2000 Zellen), wurden hier für den Mikronukleus-Test nur Zellen bis max. Passage 10 (eines batches Nummer 18) verwendet.

4.3.1.1 *Induktion von Mikrokernen durch OTB und Einfluß von Indometazin*

Im folgenden Versuch wurde geprüft, inwieweit OTB in OSV-Zellen Mikrokern induzieren kann. Die Untersuchungen wurden in Zellkulturmedium durchgeführt, das 10 % FCS enthielt; die Befunde können daher mit den Ergebnissen für OTA (Abbildung 3) verglichen werden.

Wie Tabelle 7 zeigt, werden in OSV-Zellen durch OTB Mikrokern induziert, allerdings etwas weniger als in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie zuvor durch OTA (Degen *et al.*, 1997).

Behandlung	Mikrokerne/1000 BNC	BNC (%)
Kontrolle (DMSO, 0,3%)	5 ± 4	54 ± 7
OTB (6 µM)	5 ± 2	49 ± 5
OTB (12 µM)	12 ± 6	48 ± 6
OTB (18 µM)	14 ± 7	45 ± 5
OTB (24 µM)	14 ± 5	43 ± 5

Tab. 7: Konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen durch OTB in OSV-Zellen. % BNC = Anteil binukleärer Zellen in der Kultur

Ab einer Konzentration von 12 µM OTB fand sich eine Verdoppelung der Mikrokernrate gegenüber der Kontrolle; höhere OTB-Konzentrationen führten zu keiner erheblichen Steigerung. Der Anteil der % BNC nahm mit steigenden OTB Konzentrationen kaum ab; es trat also keine massive Toxizität auf.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit der PHS-Inhibitor Indometazin die OTB-induzierte Mikrokernrate beeinflussen würde. Dies wurde durch einen Zusatz von INDO (10 bzw. 50 µM) zu den Versuchsansätzen mit 18 bzw. 24 µM OTB untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt.

Wie die Abbildung zeigt, hatte ein Zusatz von INDO in 10 µM Konzentration keinen Effekt auf die Mikrokerninduktion durch 18 µM OTA, während ein 50 µM INDO-Zusatz eine deutliche Erhöhung der Mikrokerninduktion bewirkte.

INDO (in 10 und 50 µM Konzentration) verstärkte die Mikrokerninduktion durch 24 µM OTB in OSV-Zellen. Der Effekt fiel prinzipiell ähnlich aus wie die Modulation der Genotoxizität von OTA durch INDO unter ähnlichen Bedingungen (30 µM INDO in Kombination mit OTA, vgl. Abbildung 3).

Insgesamt zeigte sich, daß OTB in den eingesetzten Konzentrationen weniger Mikrokerne induzierte als OTA. Auch der modulierende Einfluß des PHS-Inhibitors INDO war weniger ausgeprägt.

Mikrokerne / 1000 binukleäre Zellen

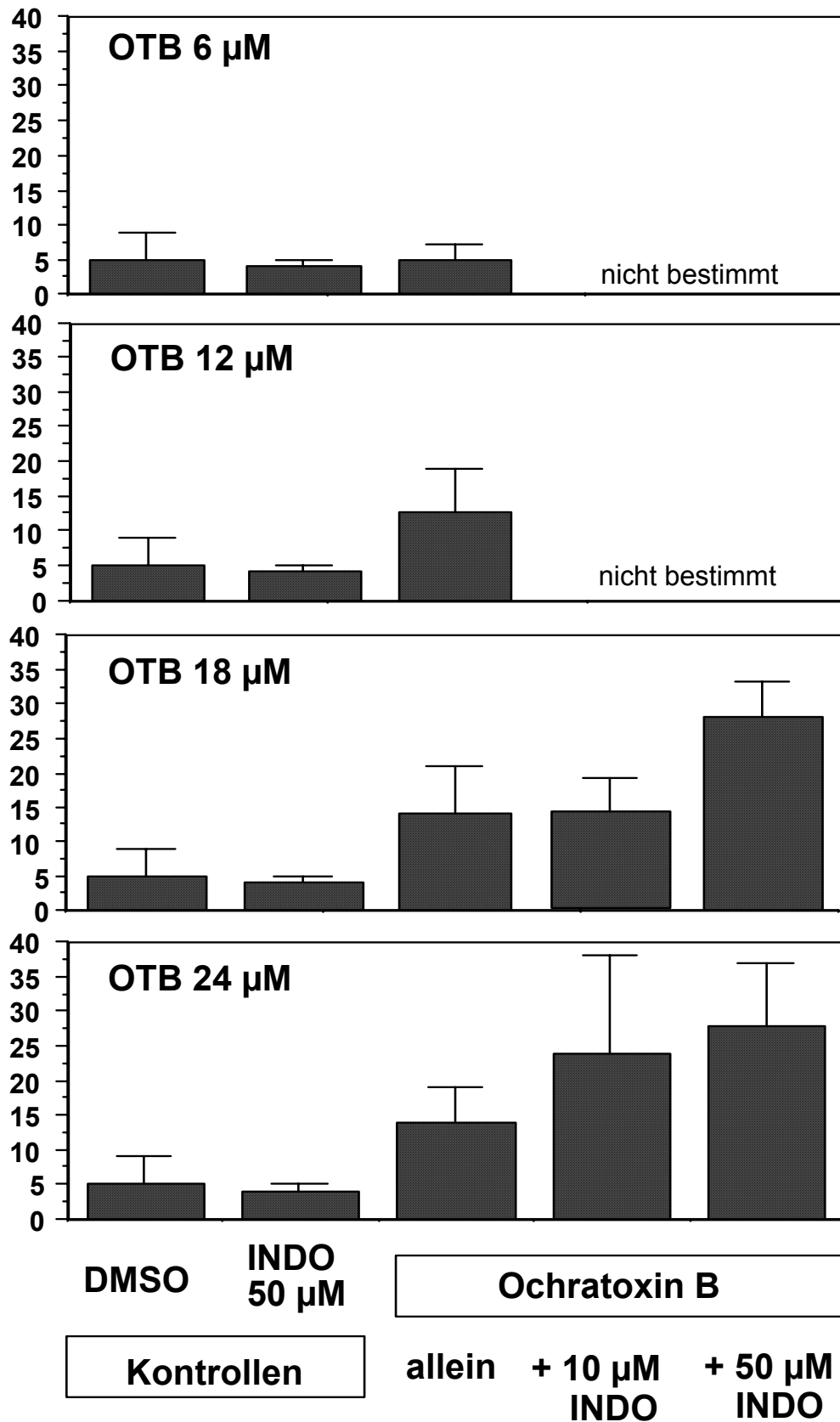


Abb. 24 Konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen durch OTB und Einfluß von Indometazin (10 bzw. 50 µM) auf die Mikrokerninduktion durch 18 bzw. 24 µM OTB.

4.3.1.2 Induktion von Mikrokernen durch OT alpha und Einfluß von Indometazin

Ebenfalls wurde eine mögliche Mikrokerninduktion durch den allgemein als nicht genotoxisch angesehenen Metaboliten OT alpha untersucht. Wie schon zuvor bei OTB, wurden die Zellen auch hier in Medium, welches 10 % FCS enthielt, exponiert.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse:

Behandlung	Mikrokerne/1000 BNC	BNC (%)
Kontrolle (DMSO, 0,55%)	5 ± 2	48 ± 7
OT alpha (60 µM)	2 ± 1	51 ± 6
OT alpha (120 µM)	3 ± 2	51 ± 7
OT alpha (180 µM)	2 ± 1	57 ± 6

Tab. 8: Induktion von Mikrokernen durch OT alpha in OSV-Zellen. % BNC = Anteil binukleärer Zellen in der Kultur

OT alpha, in Konzentrationen zwischen 60 und 180 µM, induzierte keine höhere Mikrokernrate als in der Kontrolle (vgl. Tabelle 8). Demgegenüber waren zehnfach geringere Konzentrationen an OTA und OTB im Mikrokerntest wirksam (vgl. Abbildung 3 und 24). Es wurde auch keine Toxizität von OT alpha beobachtet, die sich als Erniedrigung der Zahl an binukleären Zellen manifestiert hätte.

Ein möglicher Einfluß von Indometazin (50 µM) in Kombination mit OT alpha (Konzentration 120 und 180 µM) auf die Mikrokernbildung wurde ebenfalls untersucht.

Wie in Abbildung 25 dargestellt, induzierte OT alpha weder allein noch in Kombination mit INDO gegenüber der Lösemittelkontrolle eine erhöhte Mikrokernrate.

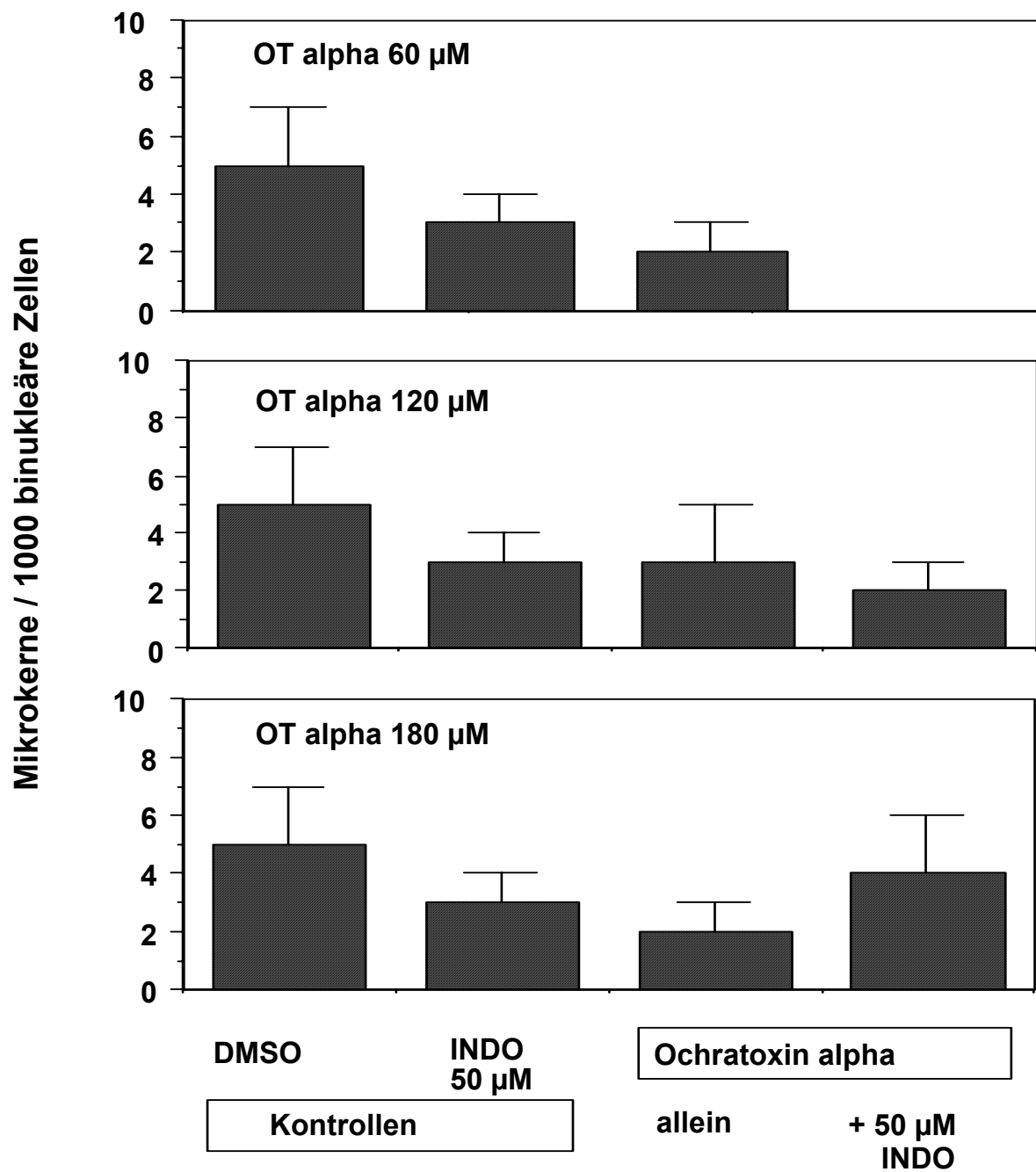


Abb. 25: Induktion von Mikrokernen durch OT alpha und Einfluß von Indometazin (50 µM) auf die Mikrokerninduktion in OSV-Zellen.

4.3.2 Untersuchungen zur Toxizität von OTA auf OSV-Zellen und zum Einfluß von Indometazin in serumfreier Kultur

Wie in der Einleitung dargestellt, bindet OTA recht gut an Serumproteine. Dies erklärt und manifestiert sich beispielsweise durch unterschiedliche Wirkkonzentrationen (Effective Concentration, EC) von OTA im Zytotoxizitätsassay (vgl. 3.2) mit Zellkulturmedium von geringem und hohem Serumgehalt:

OTA- Toxizität in OSV-Zellkulturen bei niedrigem und hohem Serumgehalt im Medium

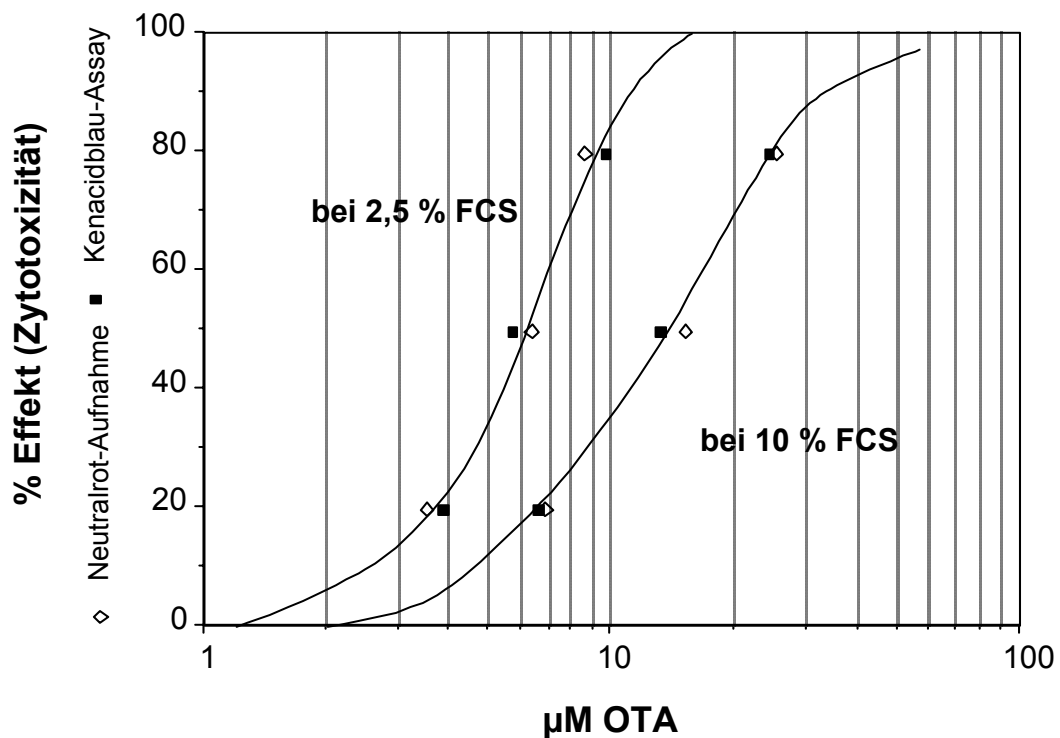


Abb. 26: Zytotoxizität von OTA bei verschiedenen Serumkonzentrationen im Zellkulturmedium (2,5 und 10 % FCS). Dargestellt sind die EC 20, EC 50 und EC 80 Werte für 2 Parameter (◇ Neutralrotaufnahme, ■ Kenacidblau-Assay).

Aus Abbildung 26 wird deutlich, daß der Serumgehalt im Zellkulturmedium einen deutlichen Einfluß auf die Toxizität des Mykotoxins hat. So ist die erforderliche Menge an OTA, die bei OSV-Zellen zu 50 % Zytotoxizität führt, bei 10 % FCS im Serum ca. 2 – 3 mal höher als in Medium mit 2,5 % FCS.

4.3.2.1 Zytotoxizität von OTA und Indometazin für OSV-Zellen in serumfreier Kultur

In Vorbereitung auf Untersuchungen zur Genotoxizität von OTA in Kombination mit INDO an OSV-Zellen in serumfreier Kultur sollte zunächst die Frage geklärt werden, welche OTA-Konzentrationen (auch in Kombination mit INDO) unter diesen Bedingungen toxisch auf die Zellen wirken. Hierbei war zu beachten, daß die Zellen unter serumfreien Bedingungen nicht proliferieren (Foth, 1992). Daher wurden für den Toxizitätstest doppelt so viele Zellen pro well angesetzt wie sonst üblich (vgl. 3.2). Um eine zusätzliche Belastung der Zellen durch organische Lösemittel zu vermeiden, wurden OTA und INDO für diesen Test nicht in DMSO oder EtOH, sondern OTA stattdessen in 0,1 M NaHCO₃ gelöst. INDO ist in reinem NaHCO₃ nicht löslich und wurde daher in 0,1 M NaHCO₃ / DMSO 90/10 (v/v) gelöst. Diese Stammlösungen wurden später auch für den Mikrokerntest verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt.

Bei einer Inkubationszeit von 21 h wurde für OTA allein und für OTA in Kombination mit 10 oder 30 µM INDO eine konzentrationsabhängig zunehmende Zytotoxizität gefunden. Bereits ab 60 nM zeigten sich zytotoxische Effekte: geringere Zellzahl bzw. verringerte Zellproteinmenge verglichen mit lösemittelbehandelten Kontrollen. Bei den höchsten OTA-Konzentrationen (auch in Kombination mit Indometazin) waren deutliche Toxizitätsanzeichen bereits im Lichtmikroskop erkennbar, wobei der größte Teil der Zellen abgelöst war.

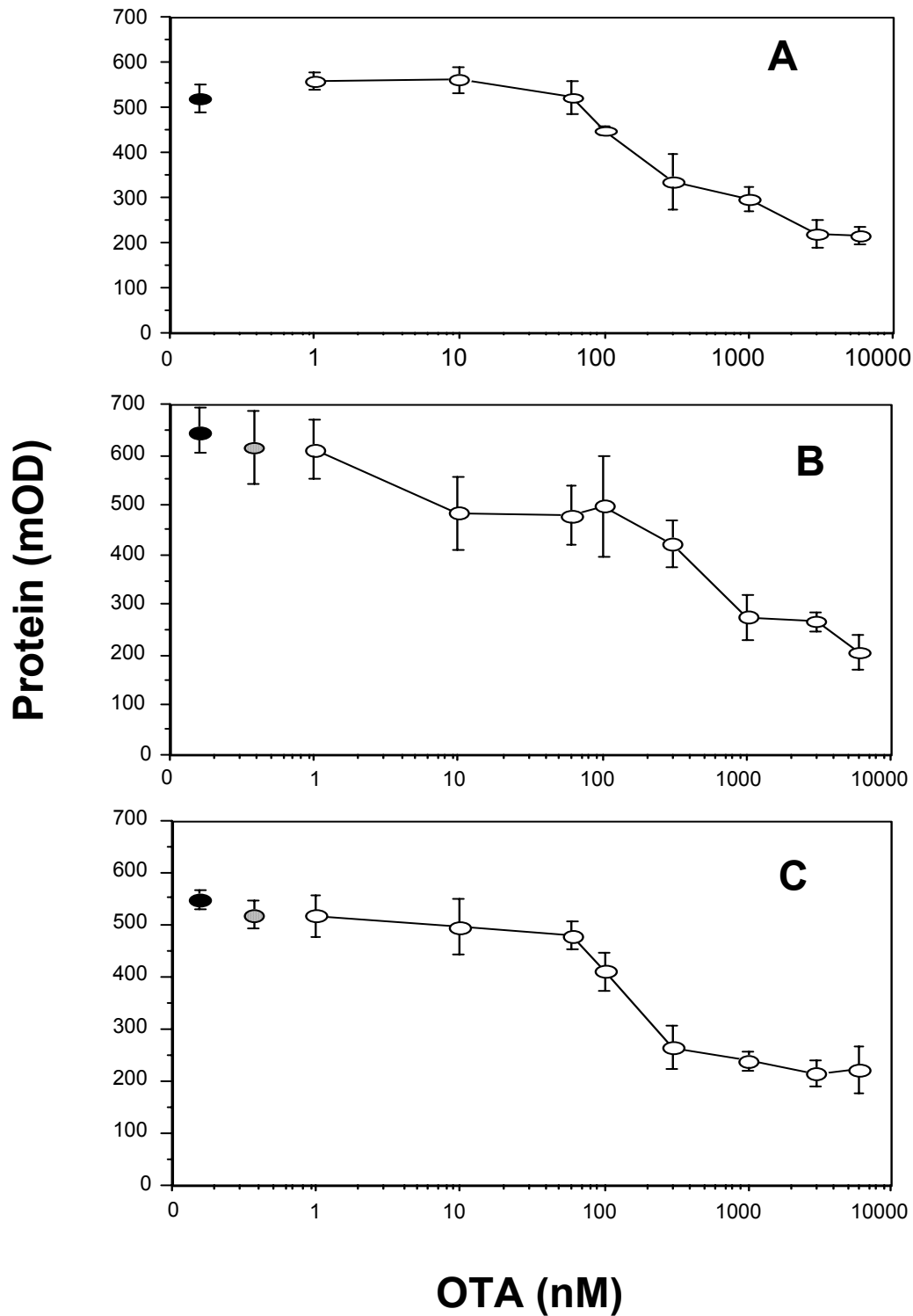


Abb. 27: Zytotoxizität in OSV-Zellen von **A:** OTA allein, **B:** OTA + INDO 10 µM, **C:** OTA + INDO 30 µM nach 21 h Behandlung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von $n = 5-6$ Proben für Zellprotein (in mOD-Einheiten bei 570 nm) sowie \bullet : Lösemittelkontrolle (0,95 % NaHCO₃ / 0,05 % DMSO (v/v)) bzw. \circ : Indometazin-Kontrolle (10 bzw. 30 µM).

Eine Bestimmung der IC-Werte (Inhibitory Concentration, IC 20, IC 50, Konzentration, bei der die mit der Zellzahl eng korrelierte Proteinfärbung um 20 bzw. 50 % reduziert ist) faßt die folgende Tabelle zusammen:

Behandlung	IC20	IC50
OTA allein	140 nM	1800 nM
OTA /INDO 10 µM	100 nM	570 nM
OTA /INDO 30 µM	79 nM	280 nM

Tab. 9: IC-Werte zur Zytotoxizität von OTA bzw. OTA in Kombination mit INDO auf OSV-Zellen in serumfreier Kultur bei 21 h Behandlung

4.3.2.2 Induktion von Mikrokernen durch OTA in serumfreier Zellkultur

Die im Vorfeld durchgeführten Zytotoxizitätsteste ließen erwarten, daß bei serumfreier Kultur unterhalb einer OTA-Konzentration von 0,1 µM noch keine nennenswerte zytotoxische Schädigung eintritt, zumal bei den Mikrokernversuchen die Behandlungsdauer (6 h) deutlich kürzer ist als im Zytotoxizitätstest (21 h).

Tabelle 10 faßt das Ergebnis eines Mikrokerntestes mit OSV-Zellen zusammen, die für 6 h in serumfreiem Medium mit 0,1 – 3 µM OTA behandelt wurden.

Behandlung	Mikrokern/1000 BNC	BNC (%)
Kontrolle (0,1M NaHCO ₃ , 0,25%)	4 ± 1	50 ± 5
OTA (0,1 µM)	4 ± 3	49 ± 6
OTA (1 µM)	45 ± 10	28 ± 6
OTA (3 µM)	153 ± 11	7 ± 2

Tab. 10: Konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen durch OTA in OSV-Zellen in serumfreier Kultur. % BNC = Anteil binukleärer Zellen in der Kultur

Ein Zusatz von 0,1 μM OTA bewirkte keine Erhöhung der Mikrokernrate gegenüber der Lösemittelkontrolle; dagegen führte 1 μM OTA schon zur Verzehnfachung der Rate. Mit 3 μM OTA war eine 38-fach höhere Rate an Mikrokernen zu finden. Gleichzeitig sank ab 1 μM OTA der Anteil an binukleären Zellen auf die Hälfte, bei Zusatz von 3 μM OTA auf etwa ein Siebtel ab. Dies spricht für massive Störungen der Karyokinese und / oder Zytotoxizität.

4.3.2.3 *Einfluß von Indometazin auf die Induktion von Mikrokernen durch OTA bei serumfreier Zellkultur*

In früheren Versuchen mit OSV-Zellen in *serumhaltigem* Kulturmedium fand sich eine dosisabhängige Mikrokerninduktion durch OTA, die bei Zusatz von Indometazin verstärkt wurde (Degen *et al.*, 1997). Im Zusammenhang mit diesen Befunden interessierte besonders, ob ein Zusatz von INDO gegebenenfalls auch unter *serumfreien* Bedingungen einen Einfluß auf die Induktion von Mikrokernen durch OTA ausübt.

Abbildung 28 zeigt das Ergebnis der neuen Versuche zur Mikrokerninduktion durch OTA in Kombination mit INDO (unter Einbeziehung der bereits in Tabelle 10 aufgeführten Werte). In Tabelle 11 sind die Befunde, gemeinsam mit den Anteilen binukleärer Zellen (BNC %), nochmals aufgelistet.

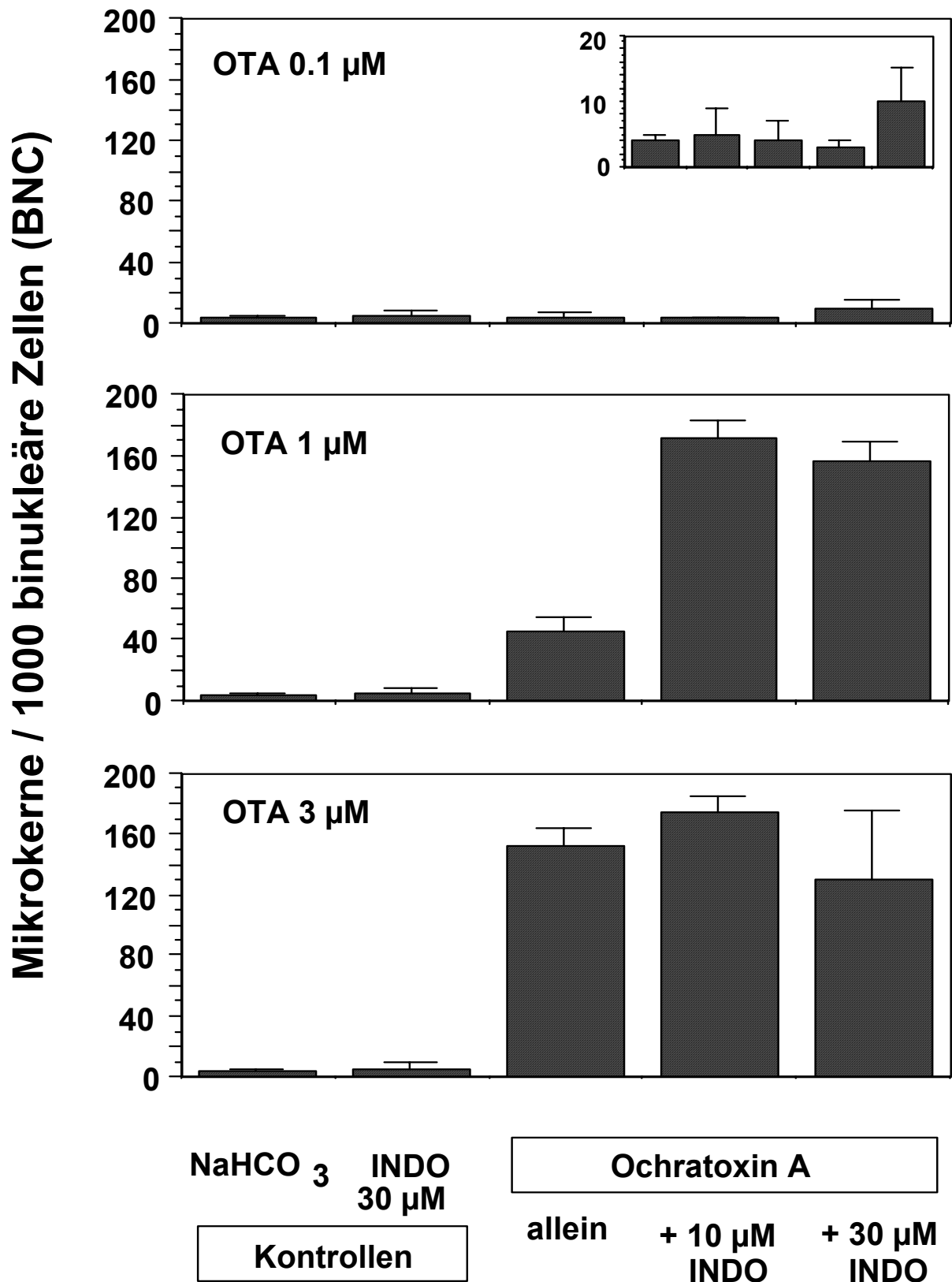


Abb. 28: Konzentrationsabhängige Induktion von Mikrokernen durch OTA und Einfluß von Indometazin (10 bzw. 30 μM) auf die Mikrokerninduktion unter serumfreien Bedingungen.

Behandlung	Mikrokerne/1000 BNC	BNC (%)
Kontrolle (0,1M NaHCO ₃ , 0,25%)	4 ± 1	50 ± 5
Indometazin (30µM, in 0,1 % EtOH)	5 ± 4	47 ± 4
OTA (0,1 µM)	4 ± 3	49 ± 6
+ INDO 10 µM	3 ± 1	46 ± 4
+ INDO 30 µM	10 ± 5	35 ± 5
OTA (1 µM)	45 ± 10	28 ± 6
+ INDO 10 µM	171 ± 12	15 ± 4
+ INDO 30 µM	157 ± 12	9 ± 3
OTA (3 µM)	153 ± 11	7 ± 2
+ INDO 10 µM	174 ± 11	10 ± 3
+ INDO 30 µM	130 ± 45	13 ± 4

Tab. 11: Wertetabelle zur konzentrationsabhängigen Induktion von Mikrokernen durch OTA, Einfluß von Indometazin (10 bzw. 30 µM) auf die Mikrokerninduktion unter serumfreien Bedingungen sowie Anteile von % BNC (binukleäre Zellen) in der Kultur.

OTA in 0,1 µM Konzentration induzierte weder allein noch in Kombination mit 10 µM INDO eine gegenüber der Kontrolle erhöhte Mikrokernrate. Erst in Kombination mit 30 µM INDO zeigte sich eine leichte Erhöhung der Mikrokernrate in Verbindung mit einem etwas geringeren Anteil an binukleären Zellen.

Bei Einsatz von 1 µM OTA war die Mikrokernrate in Gegenwart von INDO (10 bzw. 30 µM) deutlich höher als mit OTA allein (3,8 bzw. 3,5-fach). Auffallend sind ferner die massiven Steigerungen der Mikrokernraten (10- bzw. 30-fach gegenüber der Lösemittel- und INDO-Kontrolle), die in serumfreier Kultur bei Behandlung mit vergleichsweise geringen OTA Konzentrationen (1 und 3 µM) beobachtet werden. Die genotoxischen Effekte von OTA werden durch Zusatz höherer Konzentrationen an INDO (30 µM) nicht wesentlich anders moduliert als bei Zusatz von weniger INDO (10 µM), vermutlich weil bereits unspezifische Toxizität eine Rolle spielt. Betrachtet man in Tabelle 11 die zugehörigen Anteile an binukleären Zellen, so liegt dieser Schluß nahe. Im Prinzip zeigen die Untersuchungen zur Mikrokerninduktion durch OTA in serumfreien Zellkulturen, daß auch unter diesen Bedingungen Indometazin

die Genotoxizität des Mykotoxins verstärken kann. In diesem Fall kann der „Verstärkereffekt“ von Indometazin nicht als Folge einer verstärkten Freisetzung von OTA aus der Bindung an Serumproteine im Medium gedeutet werden. Es wäre aber möglich, daß INDO mit OTA um eine Bindung an intrazelluläre Proteine konkurriert oder auf anderen Wegen die (Geno-)Toxizität des Mykotoxins in den Zellen erhöht, beispielsweise durch eine Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes.

4.4 Einfluß von OTA und Indometazin auf den intrazellulären pH-Wert von OSV-Zellen

Im folgenden wurde die Möglichkeit untersucht, ob aufgrund eines Zusatzes des PHS-Inhibitors Indometazin der intrazelluläre pH-Wert der OSV-Zellen verschoben wird. Dies könnte zur Folge haben, daß die schwache Säure OTA vermehrt in die Zellen aufgenommen bzw. dort in höherem Maße retiniert wird.

Der intrazelluläre pH-Wert wurde mittels der an konfokale Laser Scanning-Mikroskopie gekoppelten Methode der Ratio-Fluorimetrie, unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF (vgl. 3.4; Abbildung 7) bestimmt. Abbildung 29 zeigt ein typisches Bild von mit BCECF beladenen OSV-Zellen.

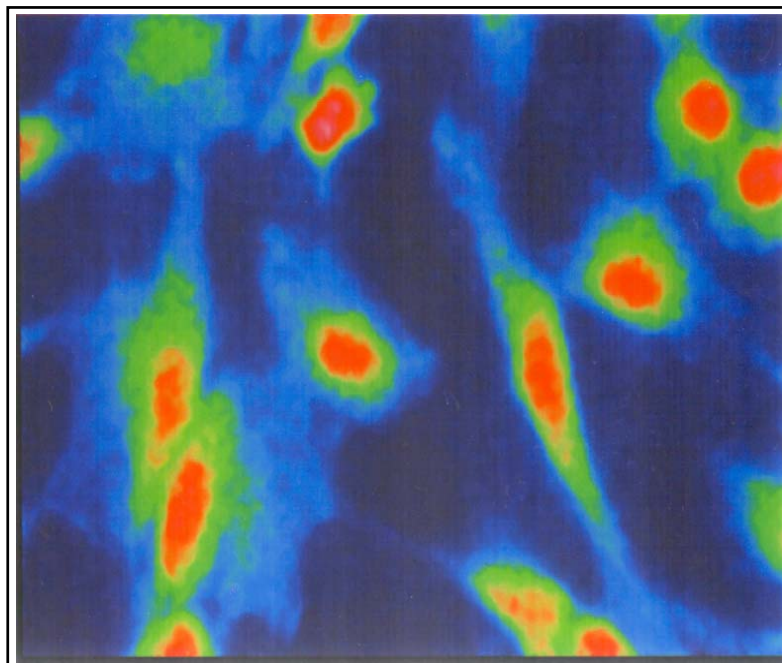


Abb. 29: OSV-Zellen mit BCECF fluoreszenzgefärbt bei einem pH-Wert von 7,3

Zur Validierung einer Messung des intrazellulären pH-Wertes von OSV-Zellen und um zu prüfen, wie die Zellen auf den Zusatz eines bekannten intrazellulären pH-Wert-„shiftern“ reagieren, wurden sie zunächst gegen NH_4Cl exponiert.

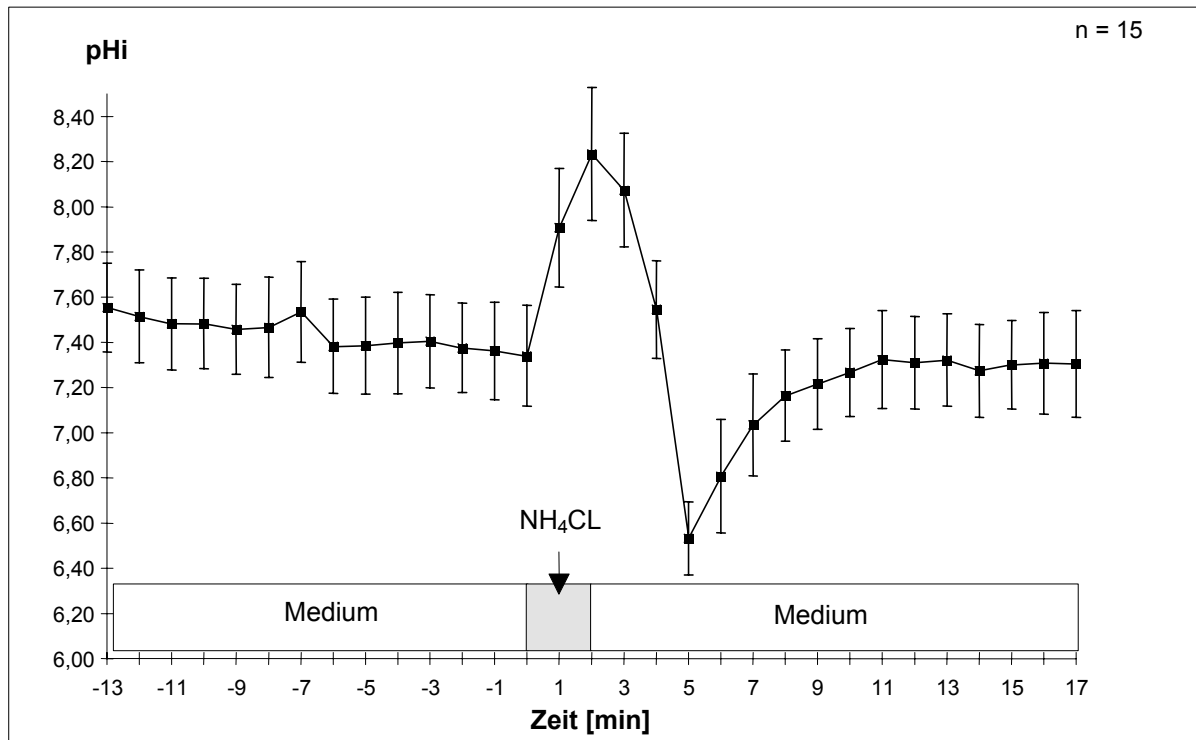


Abb. 30: Änderung des intrazellulären pH-Wertes der OSV-Zellen nach Zusatz von 10 mM NH_4Cl ; dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von $n = 15$ exponierten Zellen

Wie in Abbildung 30 gezeigt, stieg der intrazelluläre pH-Wert unmittelbar nach Zugabe von NH_4Cl um etwa 0,8 pH-Einheiten an, um nach beendeter Exposition unter das Niveau der Ausgangsbedingungen zu fallen, bevor er sich nach wenigen Minuten wieder auf den Ausgangs-pH-Wert von ca. 7,3 einstellte. Ein solcher Verlauf wurde für andere Zellkulturen von Wehner *et al.* (1993) schon beschrieben.

Im folgenden wurde der intrazelluläre pH-Wert bei Exposition der Zellen gegen OTA bzw. OTA in Kombination mit INDO untersucht. Diese Substanzen wurden dabei in vergleichbaren Konzentrationen eingesetzt, wie bei Genotoxizitätstesten in serumhaltiger Kultur (Degen *et al.*, 1997). Dargestellt sind in den folgenden Abbildungen jeweils die Mittelwerte aus den oben rechts angegebenen Zellzahlen.

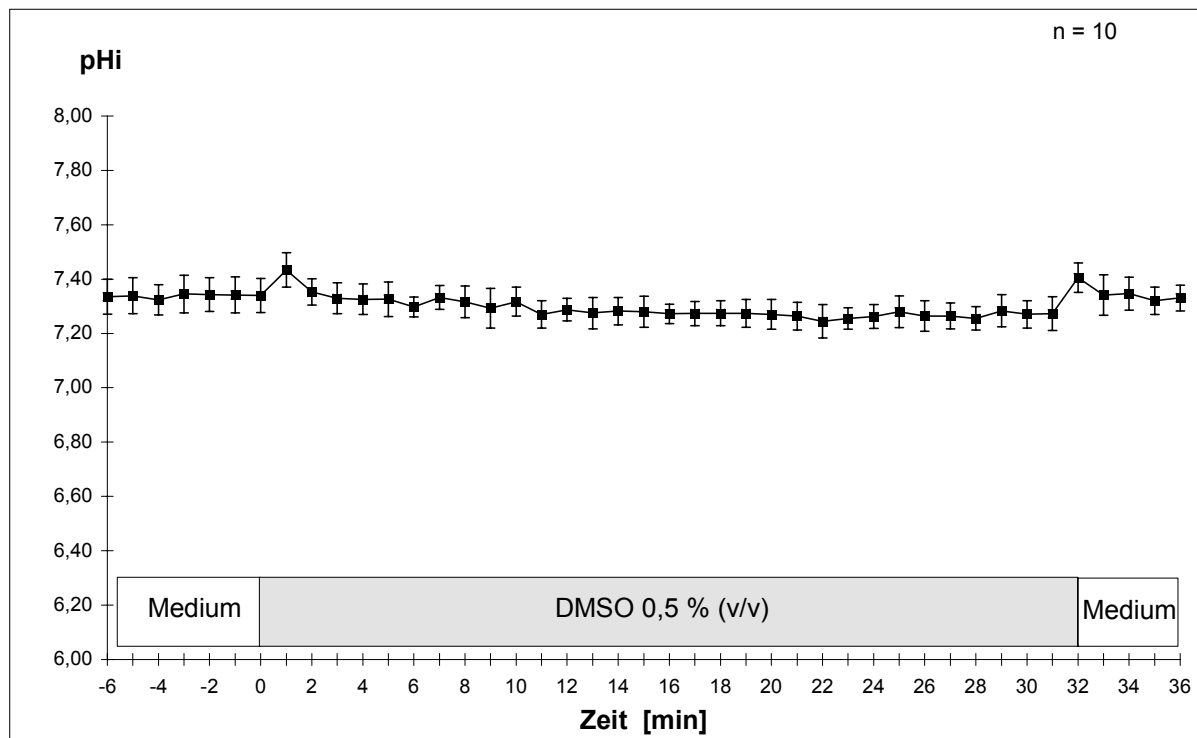


Abb. 31: Intrazellulärer pH-Wert während einer 30 minütigen Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und DMSO (0,5 %, v/v)

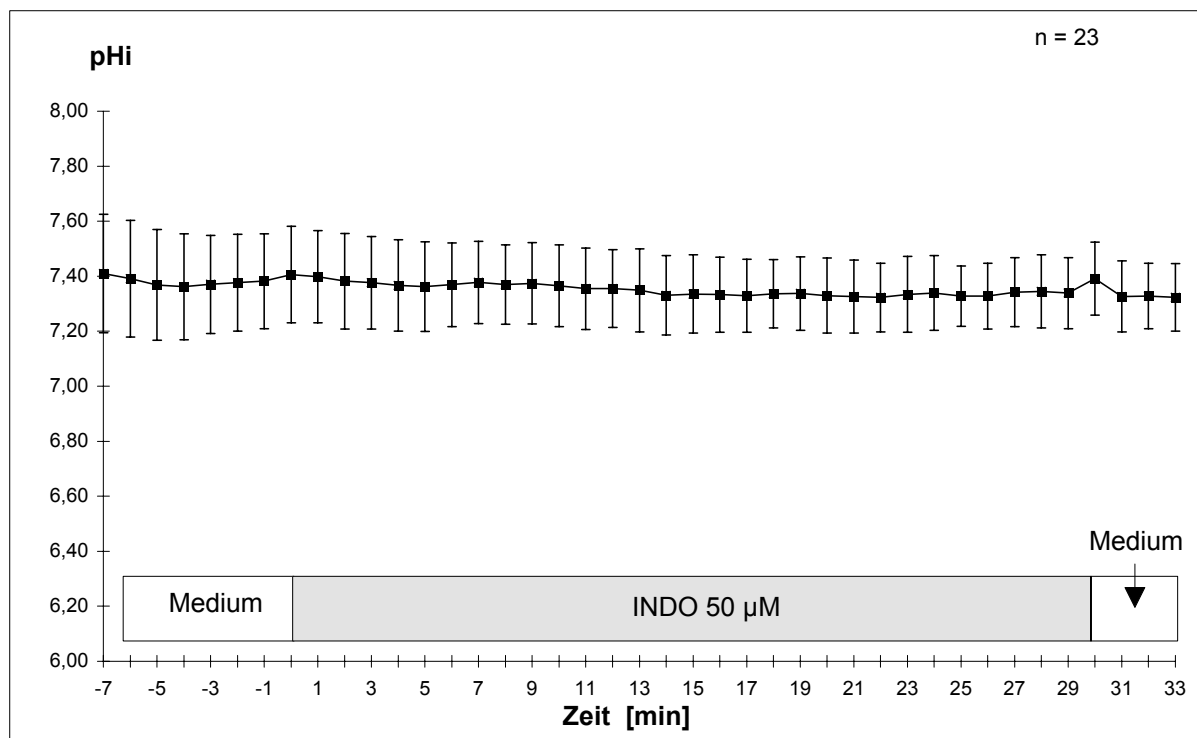


Abb. 32: Intrazellulärer pH-Wert während 30 minütiger Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 50 µM INDO

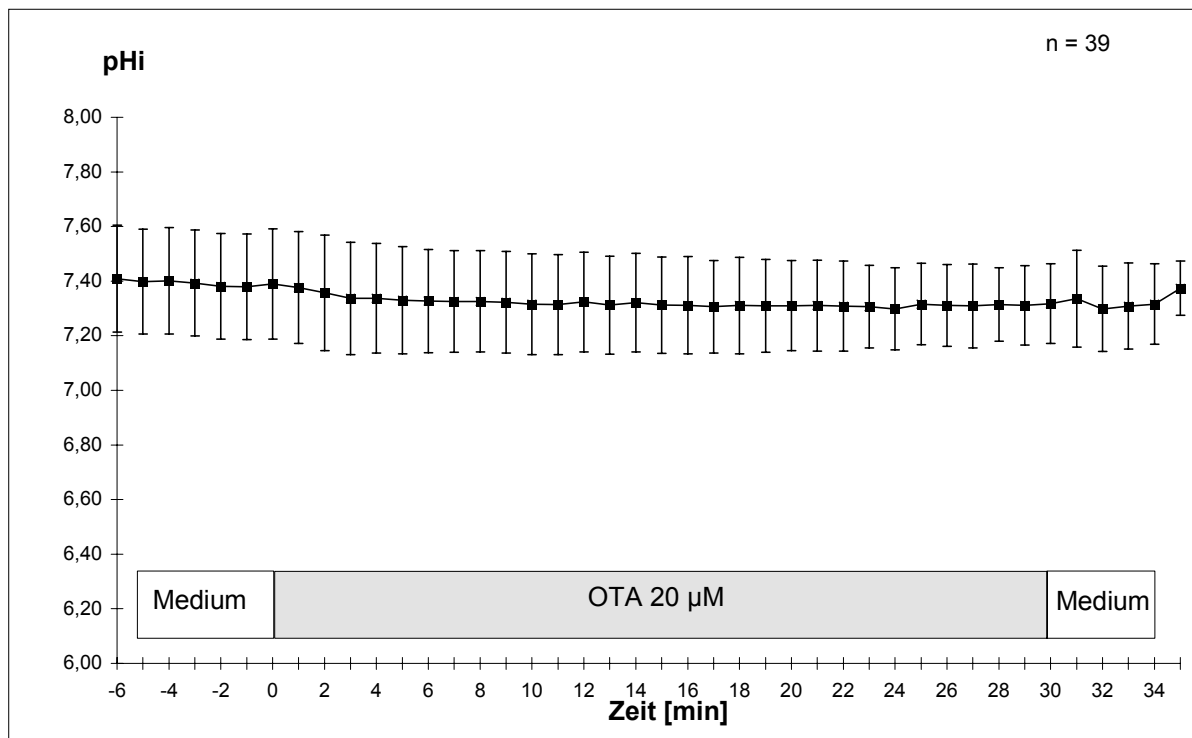


Abb. 33: Intrazellulärer pH-Wert während 30 minütiger Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 20 μM OTA

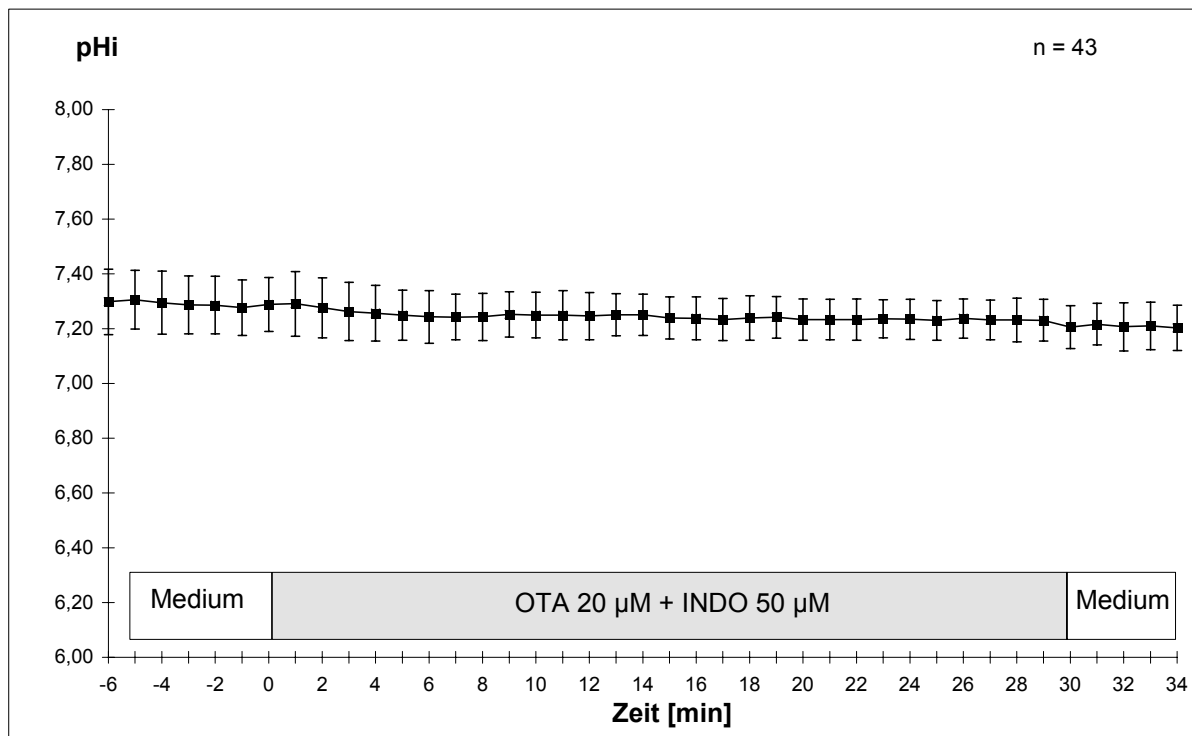


Abb. 34: Intrazellulärer pH-Wert während 30 minütiger Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 20 μM OTA / 50 μM INDO

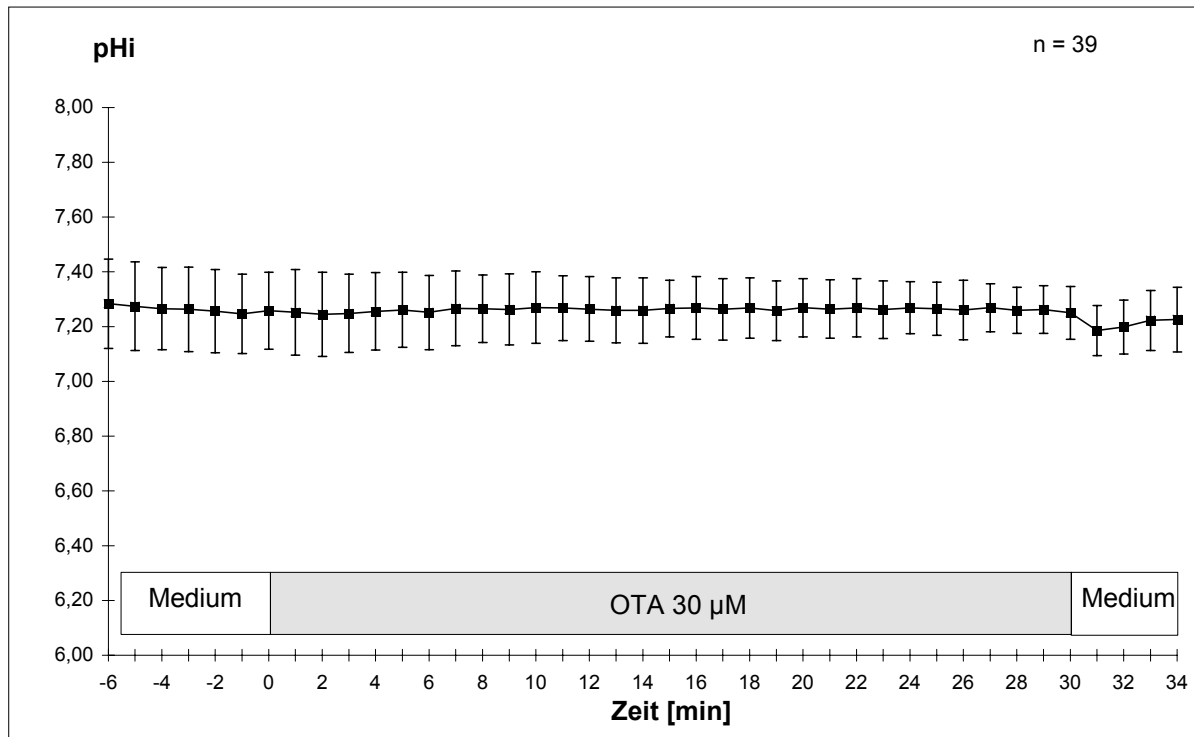


Abb. 35: Intrazellulärer pH-Wert während 30 minütiger Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 30 μ M OTA

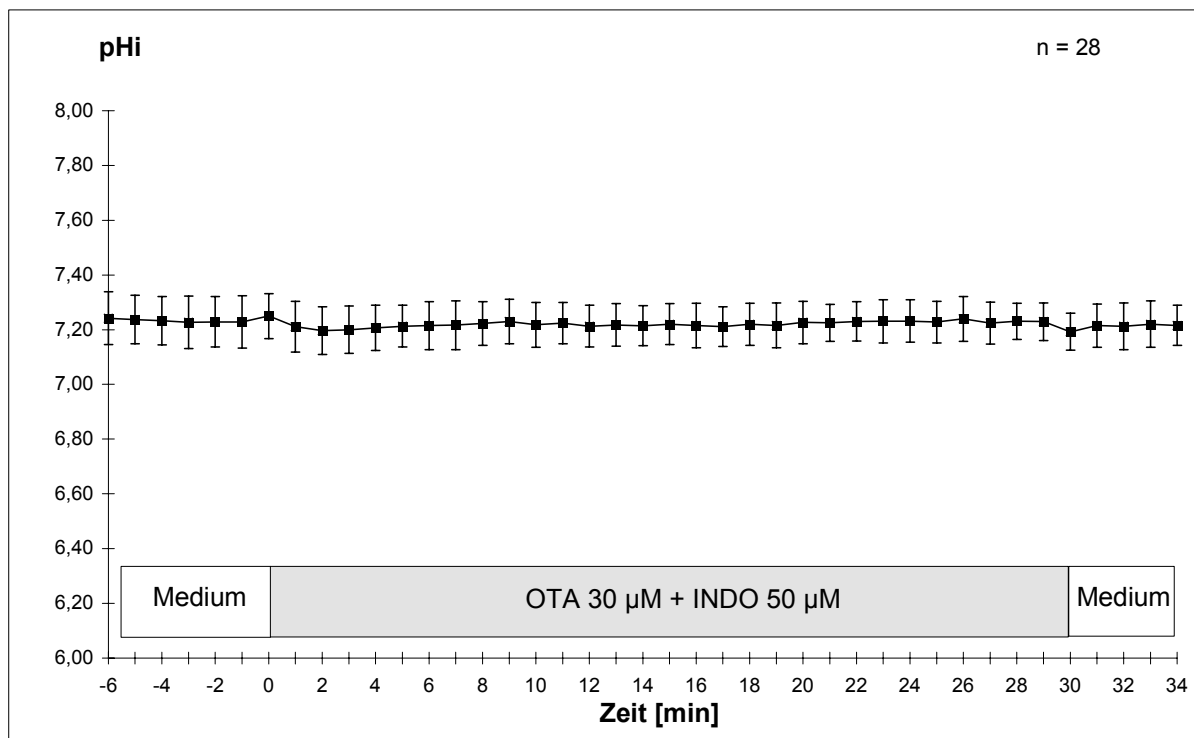


Abb. 36: Intrazellulärer pH-Wert während 30 minütiger Inkubation in Zellkulturmedium mit 10 % FCS und 30 μ M OTA / 50 μ M INDO

Die Abbildungen 31 - 36 zeigen, daß in vergleichbaren Konzentrationen, wie sie auch für den Mikrokerntest an OSV-Zellen eingesetzt wurden, weder INDO noch OTA, noch beide Substanzen in Kombination, einen meßbaren Effekt auf den intrazellulären pH-Wert haben. Es fällt auf, daß die intrazellulären pH-Werte bei Beginn der Inkubationen zwischen 7,2 und 7,4 liegen (im Falle der Positivkontrolle, Abbildung 30, auch höher). Der Grund für diese kleinen Differenzen zwischen den Versuchen ist unbekannt, hat jedoch keinen Einfluß auf das Ergebnis. Unabhängig vom Absolutwert zu Beginn der Inkubation erfolgte jedenfalls keine nennenswerte Änderung desselben im Verlauf der Inkubation mit den geprüften Stoffen (OTA und INDO).

4.5 Bindung von OTA und Indometazin an Proteine des OSV-Zellkulturmediums

4.5.1 Proteingehalt im Zellkulturmedium

Der Proteingehalt im Zellkulturmedium wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt (vgl. 3.6.2). Für Zellkulturmedium mit 2,5 % FCS wurde ein Proteingehalt von 16,63 mg / l Medium ermittelt, für Medium mit 10 % FCS ein Proteingehalt von 55,82 mg / l Medium.

4.5.2 Bindung von OTA an Proteine des Zellkulturmediums

Eine Bindung des Mykotoxins OTA an Proteine des Zellkulturmediums wurde mittels Ultrafiltration bestimmt. Dazu wurde radioaktiv markiertes OTA in unterschiedlichen Konzentrationen mit (zellfreiem) Medium inkubiert, das 2,5 bzw. 10 % FCS enthielt, dann der Anteil freies, ungebundenes Toxin mittels LSC aus dem Ultrafiltrat bestimmt (vgl. 3.6.1). Die im Ultrafiltrat gemessene Radioaktivität wurde anhand der spezifischen Aktivitäten der eingesetzten OTA-Lösungen in μM freies (nicht Protein-gebundenes) Mykotoxin umgerechnet. Abbildung 37 zeigt das Ergebnis.

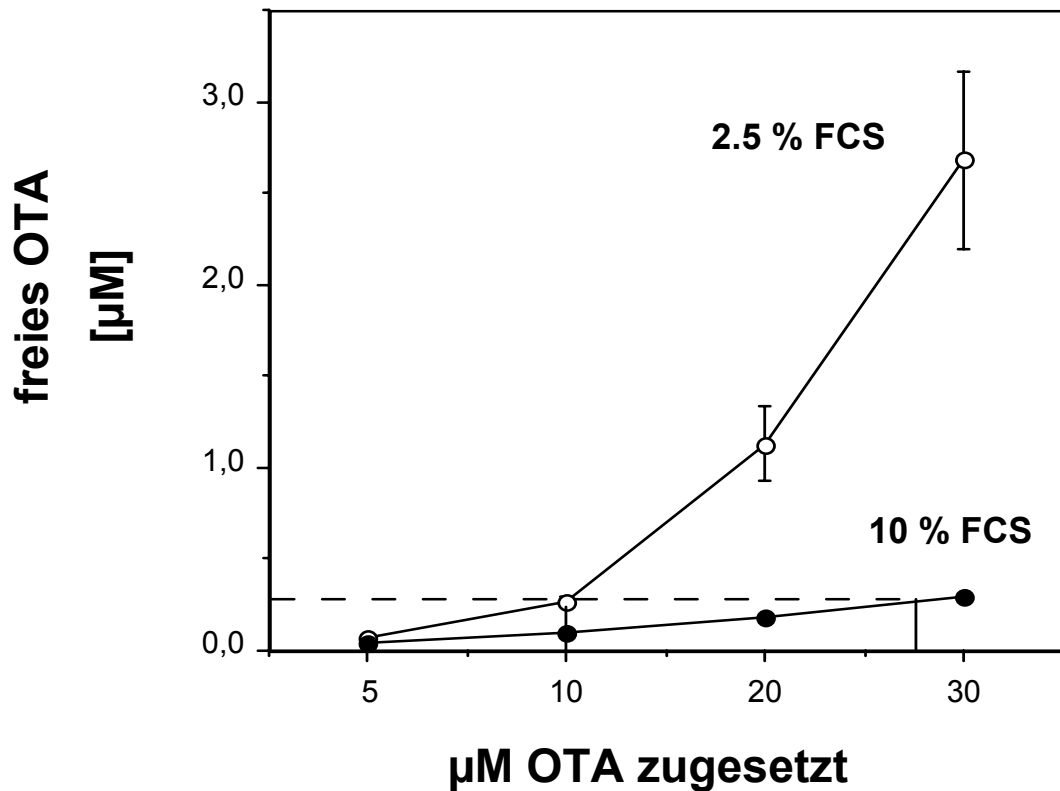


Abb. 37: Konzentration von freiem (nicht protein-gebundenem) OTA in Abhängigkeit von der eingesetzten Mykotoxinkonzentration und bei 2,5 bzw. 10 % FCS im Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen

Wie erwartet zeigen die Kurven, daß bei 10 % FCS im Medium der Anteil an freiem OTA wesentlich niedriger liegt als bei 2,5 % FCS im Medium. Zum Beispiel liegen jeweils 0,25 µM freies OTA vor, wenn bei dem niedrigen Serumgehalt 10 µM OTA zugesetzt wurden bzw. bei hohem Serumgehalt ca. 27 µM. Anders ausgedrückt: Um die gleiche Konzentration an freiem OTA einzustellen, muß bei 10 % FCS im Medium etwa 2 – 3 mal soviel Mykotoxin zugesetzt werden wie in Medium mit 2,5 % FCS.

Unter Bedingungen, die relevant für die durchgeführten Mikrokerntests waren, wurde nun im folgenden untersucht, ob das Mykotoxin durch Indometazin aus einer Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums verdrängt wird.

4.5.3 Verdrängung von OTA durch Indometazin aus der Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums

4.5.3.1 *Verdrängung bei hoher Serumkonzentration im Zellkulturmedium*

Im ersten Versuch wurde Zellkulturmedium mit einem FCS-Gehalt von 10 % mit OTA in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 30 μM) und Zusatz von Indometazin (50 μM) inkubiert. Zur besseren Übersichtlichkeit wurde als Darstellungsform in Abbildung 38 der Quotient aus gebundenem und freiem Mykotoxin in Ansätzen mit und ohne Indometazin gewählt.

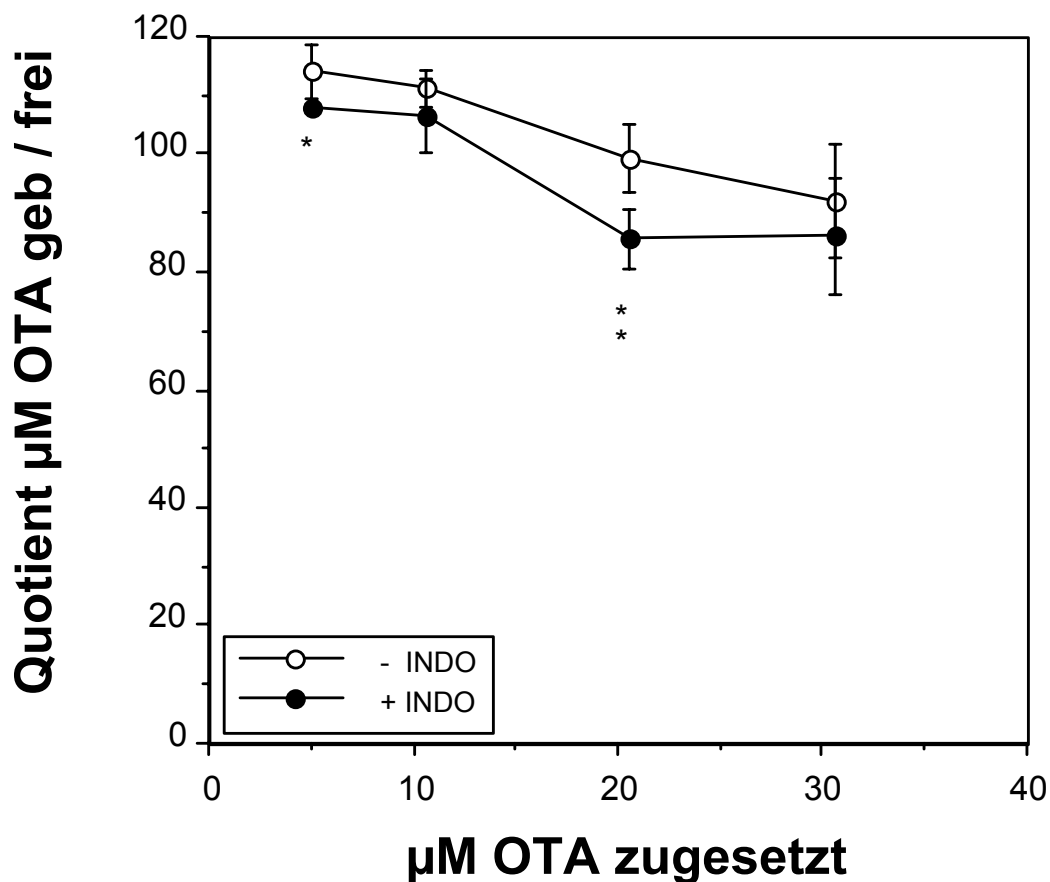


Abb. 38: Verdrängung von OTA (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch Indometazin (50 μM) aus der Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 10 % FCS im Medium.

* bzw. **: signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$) nach t-Test

Aus Abbildung 38 ist ersichtlich, daß bei Zusatz von INDO (50 μM) ein Teil des OTA aus seiner Bindung an die Serumproteine (10 % FCS) verdrängt wird: erkennbar

durch einen erniedrigten Wert für den Quotient aus gebundenem und freiem OTA in Gegenwart von INDO. Eine Erniedrigung dieses Quotienten bedeutet eine Erhöhung des ungebundenen, also freien und verfügbaren Mykotoxin-Anteils.

Bei OTA-Konzentrationen von 5 μM und 20 μM war die Verdrängung durch Indometazin aus der Proteinbindung signifikant ($p \leq 0,01$).

4.5.3.2 *Verdrängung bei niedriger Serumkonzentration im Zellkulturmedium*

Nachdem eine Verdrängung des OTA durch Indometazin aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums bei hoher Serumkonzentration beobachtet werden konnte, war zu erwarten, daß sich dieser Effekt bei einer niedrigeren Serumkonzentration im Kulturmedium noch deutlicher bemerkbar macht. Im folgenden wurde dies bei 2,5 % FCS im Medium mit bzw. ohne Zusatz von Indometazin (50 μM) und OTA in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 10, 20, 30 μM) untersucht. Die Befunde sind in Abbildung 39 dargestellt; auch hier wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit als Darstellungsform der Quotient aus gebundenem und freiem Mykotoxin gewählt.

Abbildung 39 zeigt sehr deutlich, daß bei niedrigeren Serumkonzentrationen im Kulturmedium eine Verdrängung von OTA aus der Proteinbindung durch Indometazin erfolgen kann. Die Unterschiede im Quotienten sind bis zur höchsten OTA-Konzentration (30 μM) signifikant und wie erwartet am deutlichsten bei den niedrigsten OTA-Konzentrationen. Ein weiterer Versuch mit ähnlichem Ergebnis ist im Anhang (Abbildung 44) dargestellt.

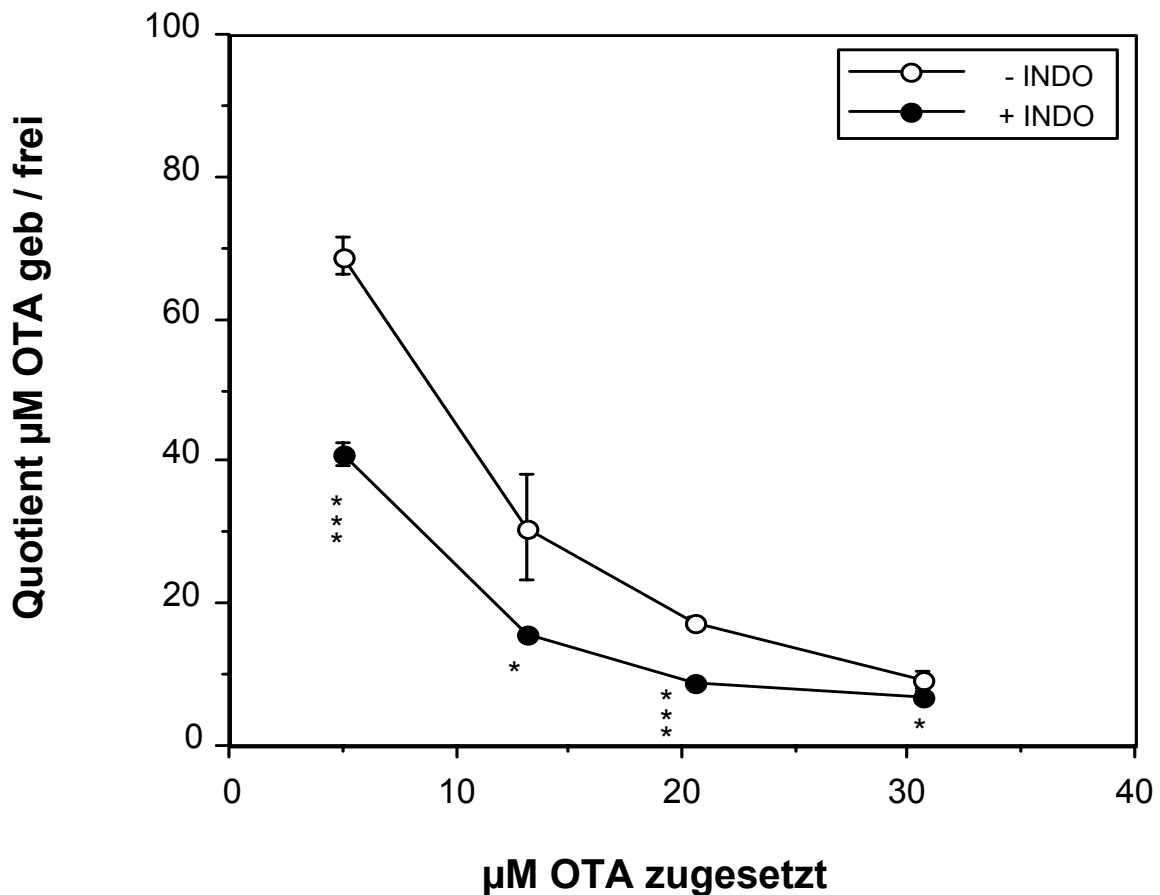


Abb. 39: Verdrängung von OTA (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch Indometazin (50 µM) aus der Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 2,5 % FCS im Medium
 * bzw. ***: signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,001$) nach t-Test

4.5.4 Bindung von Indometazin an Proteine des Zellkulturmediums

Die Proteinbindung von Indometazin wurde analog wie unter 4.5.2 für OTA beschrieben ermittelt. Nun wurde aber radioaktiv markiertes Indometazin in unterschiedlichen Konzentrationen in zellfreiem Medium mit 2,5 bzw. 10 % FCS inkubiert und der Anteil freier, ungebundener Substanz mittels LSC aus dem Ultrafiltrat bestimmt (vgl. 3.6.1). Die im Ultrafiltrat gemessene Radioaktivität wurde anhand der spezifischen Aktivität der verwendeten Stammlösungen in µM freies, nicht proteingebundenes Indometazin umgerechnet. Abbildung 40 zeigt das Ergebnis.

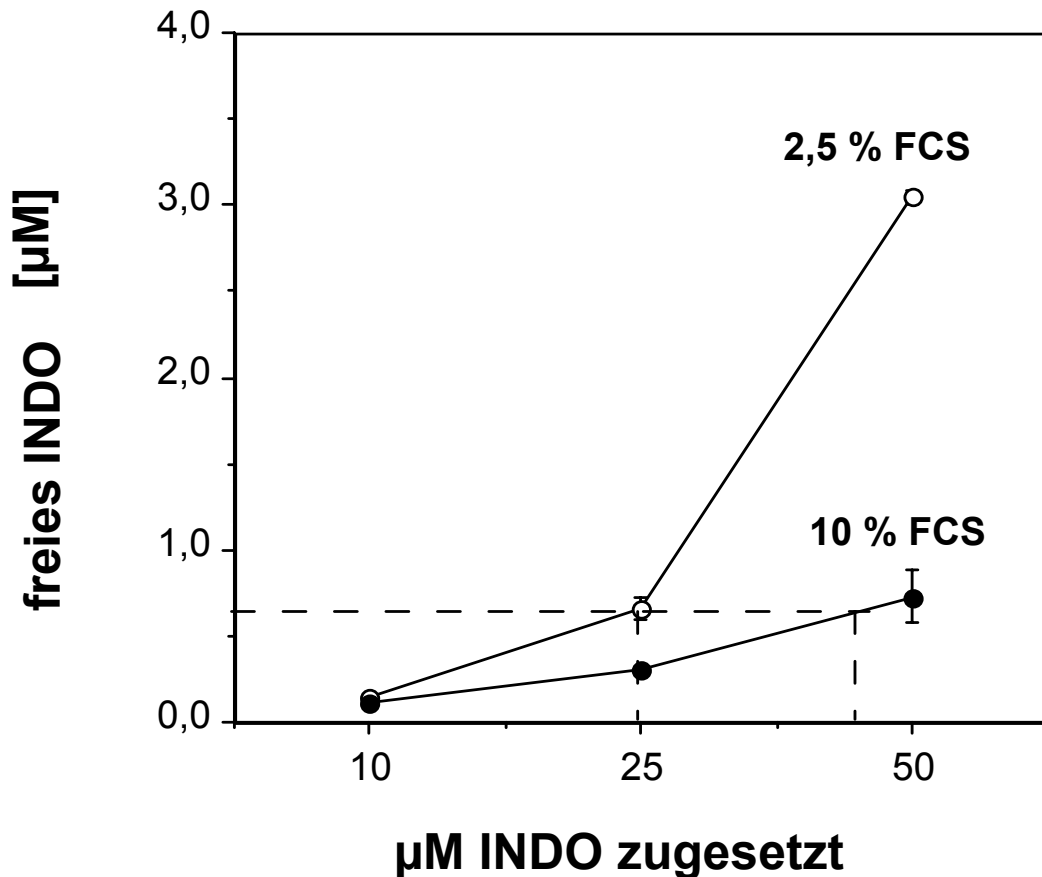


Abb. 40: Konzentration an freiem, nicht proteingebundenem Indometazin in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration und bei 2,5 bzw. 10 % FCS im Medium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen

Wie erwartet zeigen die Kurven, daß bei 10 % FCS im Medium der Anteil an freiem Indometazin niedriger liegt als bei 2,5 % FCS im Medium. Zum Beispiel liegen jeweils etwa 0,65 μ M freies INDO vor, wenn bei dem niedrigen Serumgehalt 25 μ M INDO zugesetzt wurden bzw. bei hohem Serumgehalt ca. 45 μ M. Anders ausgedrückt: Um die gleiche Konzentration an freiem Indometazin einzustellen, muß bei 10 % FCS im Medium etwa doppelt soviel INDO eingesetzt werden wie in Medium mit 2,5 % FCS. Das Ergebnis betätigt somit (was bereits die Verdrängung von OTA aus der Proteinbindung zeigte, nämlich) eine Bindung von Indometazin an Serumproteine. Im folgenden wurde nun untersucht, ob Indometazin durch das Mykotoxin OTA aus seiner Bindung an die Serumproteine des Zellkulturmediums verdrängt wird.

4.5.5 Verdrängung von Indometazin durch OTA aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums

4.5.5.1 *Verdrängung bei hoher Serumkonzentration im Zellkulturmedium*

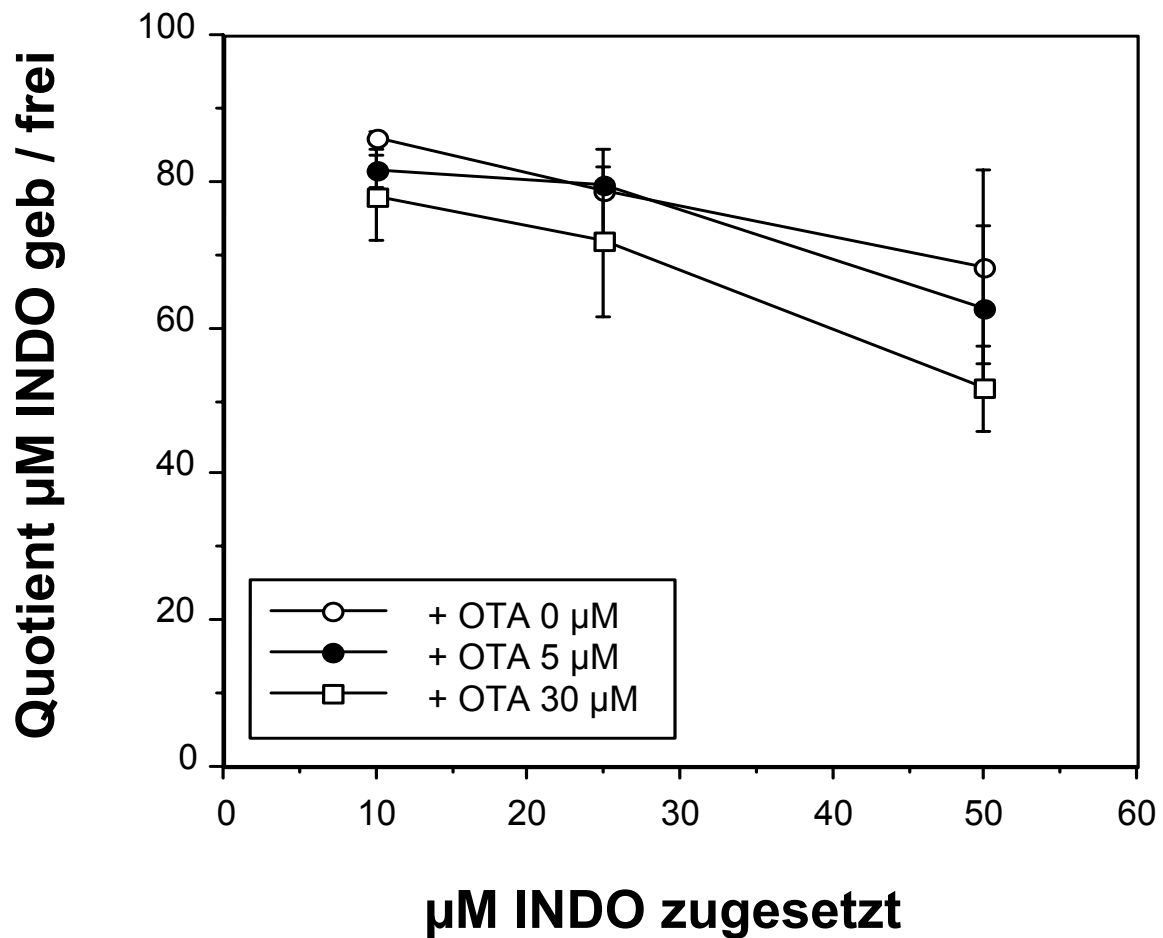


Abb. 41: Verdrängung von Indometazin (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch OTA (5 bzw. 30 µM) aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 10 % FCS im Medium

Wie aus Abbildung 41 deutlich wird, ist OTA in den eingesetzten Konzentrationen nicht in der Lage, Indometazin in signifikantem Umfang aus der Bindung an Serumproteine (10 % FCS) zu drängen. Ein zweiter Versuch mit ähnlichem Ergebnis findet sich im Anhang (Abbildung 45).

4.5.5.2 Verdrängung bei niedriger Serumkonzentration im Zellkulturmedium

Im folgenden sollte geprüft werden, ob bei einer niedrigeren Serumkonzentration im Kulturmedium (2,5 % FCS) eine Verdrängung des Indometazins durch OTA aus der Bindung an Proteine eher zu sehen ist. Abbildung 42 zeigt das Ergebnis dieses Experimentes.

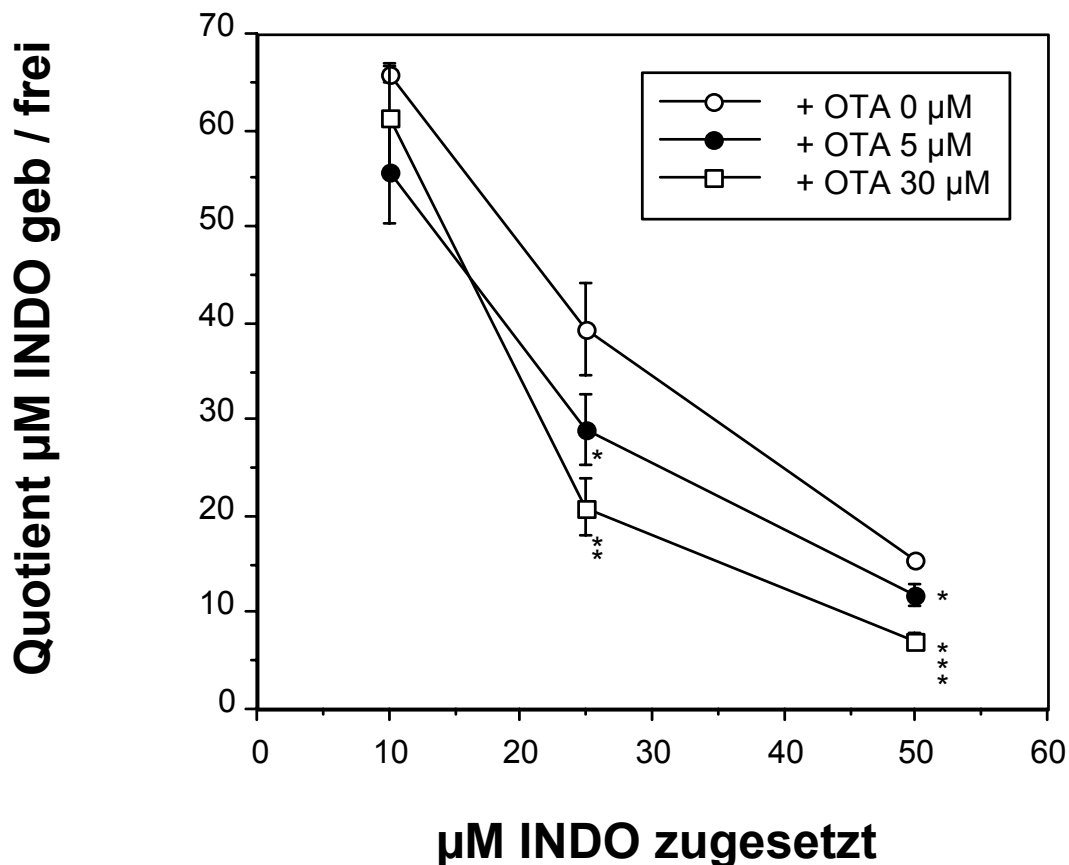


Abb.42: Verdrängung von INDO (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch OTA (5 bzw. 30 µM) aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 2,5 % FCS im Medium

* bzw. ** bzw. ***: signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$) nach t-Test

Wie Abbildung 42 zeigt, kann OTA bei einer geringeren Serumkonzentration im Zellkulturmedium auch Indometazin aus seiner Proteinbindung verdrängen. Die Resultate waren hier nur für die beiden höheren Indometazin-Konzentrationen signifikant: wenn 5 µM OTA oder 30 µM OTA zum Ansatz hinzugegeben werden,

findet man eine signifikante ($p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$) Erniedrigung des Quotienten, d.h. einen Anstieg des ungebundenen Indometazins im Versuchansatz.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente zur konzentrations-abhängigen Serumproteinbindung von OTA und INDO daß

- beide Stoffe eine hohe Affinität zu Serumproteinen haben und daher
- nur ein Bruchteil der nominalen Konzentration in freier Form vorliegt
 - bei 2,5 % FCS im Medium weniger als 1 %
 - bei 10 % FCS im Medium ca. 0,1 %.
- OTA und Indometazin konkurrieren um eine Bindung an Serumproteine und können einander aus dieser Bindung verdrängen.

Je nach Konzentrationsverhältnis zwischen OTA und INDO führt dies zu einer mehr oder weniger deutlichen Verschiebung der Anteile an freier und proteingebundener Substanz.

5 Diskussion

Vorbemerkung: Zwischen dem Abschluss der experimentellen Arbeiten und der Niederschrift dieser Dissertation ergab sich aus beruflichen Gründen ein längeres Zeitintervall (ca. 5 Jahre). Dies mag auf den ersten Blick als „Handycap“ erscheinen, doch liegt darin auch die Chance, eigene Ergebnisse und Hypothesen im Kontext neuer Befunde anderer Gruppen zu diskutieren sowie die Entwicklung der Diskussion über die Wirkmechanismen von Ochratoxin A, insbesondere zur Rolle des Metabolismus für die genotoxischen Effekte, nachzuzeichnen und Interpretationen kritisch zu beleuchten.

5.1 Genotoxische Wirkungen von OTA – und Indizien für eine Rolle des Metabolismus?

Zu Beginn der experimentellen Arbeiten (1995) war ein genotoxisches Potential für OTA zwar bekannt (vgl. Einleitung 1.3, Abschnitt Genotoxizität), doch noch nicht hinreichend charakterisiert. Zu einer besseren Charakterisierung genotoxischer Effekte von OTA trugen u.a. Studien am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo) bei, in denen verschiedene Endpunkte genutzt wurden, um ein breites Spektrum an möglichen Schäden am Erbgut zu erfassen (Tests auf Genmutationen, Auslösung von DNA-Reparatur; DNA-Strangbrüche, Mikrokerninduktion, SCE, vgl. Tabelle 12).

Untersuchungen zur Genotoxizität von Ochratoxin A am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo)			
Zellen	Assay	Befund	Referenz
PUBEC	SCE	positiv	Föllmann <i>et al.</i> , 1995
Humanlymphozyten	SCE	schwach positiv	Pietsch, 1995
PUBEC	UDS	positiv	Dörrenhaus und Föllmann, 1997
Humane Urothelzellen	UDS	positiv	Dörrenhaus <i>et al.</i> , 2000
OSV	Mikrokerne	positiv	Degen <i>et al.</i> , 1997
MDCK	COMET-Assay	positiv	Lebrun und Föllmann, 2002
V79	HPRT-Test (+S9 Mix)	negativ	Föllmann und Lucas, 2003
<i>S. typhimurium</i>	Mutationstest (+ S9 Mix)	negativ	Föllmann und Lucas, 2003
PUBEC = porcine urinary bladder epithelial cells; SCE = sister chromatid exchange; UDS = unscheduled DNA-synthesis; OSV = ovine seminal vesicle cells; MDCK = Madin Darby canine kidney cells; V79 = hamster fibroblasts; HPRT = hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase assay			

Tab. 12: Übersicht über Untersuchungen zur Genotoxizität von OTA am Institut für Arbeitsphysiologie an der Universität Dortmund (IfADo).

OTA-Behandlung von Harnblasenepithelzellen des Schweins (PUBEC) führte zu vermehrter DNA-Reparatur, deren Intensität von der einwirkenden Mykotoxin-Konzentration abhängig war und die eine Schädigung anzeigt. Auch OTA-Behandlung von Rattenhepatozyten führte zur konzentrationsabhängigen Induktion der DNA-Reparatur. Im Vergleich zu Leberzellen ist die mit dem UDS-Test nach-

weisbare OTA-Wirkung in Harnblasenzellen aber ausgeprägter (Dörrenhaus und Föllmann, 1997), eine Beobachtung, die zu der bevorzugten Schädigung dieses Zielorgans durch OTA im Tierversuch passt.

Darüberhinaus weisen konzentrationsabhängige Effekte im SCE-Assay mit zwei Zelltypen auf eine genotoxische Wirkung von OTA hin (Föllmann *et al.*, 1995; Pietsch, 1995). Schadeffekte wurden auch mit Hilfe des Mikrokern-Assays näher untersucht, einem Test, der *aneuploidogene* (Fehlverteilungen ganzer Chromosomen bei der Zellteilung) und/oder *clastogene* Substanzwirkungen (Bildung von Chromosomenbruchstücken) anzeigt. OTA-Behandlung von OSV-Zellen führte zu einer konzentrationsabhängigen Induktion von Mikrokernen (Degen *et al.*, 1997). Eine detaillierte Analyse der Mikrokerne ließ auf überwiegend clastogene, aber auch auf aneuploidogene Wirkungen schließen. Dies wurde später in einem weiteren Mikrokern-Assay mit SHE-Zellen (syrian hamster embryo fibroblasts) bestätigt (Dopp *et al.*, 1999).

Weitere Untersuchungen aus jüngster Zeit mit Hilfe des Comet-Assay und MDCK-Zellen runden das Bild nun weiter ab: Positive Befunde sprechen für Schadwirkungen wie DNA-Strangbrüche in OTA-behandelten Zellen, die aber offenbar auch in gewissem Umfang (zeitabhängig) wieder repariert werden. Durch Variation der Behandlungsbedingungen wurde ferner gezeigt, daß der Zusatz eines Hemmstoffs der DNA-Reparatur die genotoxischen Effekte von OTA noch verstärkt. Bei Koinkubation mit Substanzen, die über sogenannte Transporter in Zellen aufgenommen werden, wird andererseits die Toxizität von OTA deutlich vermindert. Die Befunde sprechen dafür, daß DNA-Reparatur die Ausprägung der Schäden moduliert und Transporter wie OATP (organischer Anionentransporter) die Aufnahme von OTA in Zellen maßgeblich beeinflussen (Lebrun und Föllmann, 2002).

Diese und weitere Untersuchungen (siehe unten) belegen nunmehr eindeutig ein genotoxisches Potential für OTA. Das Schadensspektrum ist für OTA aber offenbar ein anderes als für Aflatoxin B₁, ein sehr potentes kanzerogenes Mykotoxin, das vor allem Genmutationen auslöst (Eaton und Gallagher, 1994; Dirheimer, 1998; Smela *et al.*, 2002). Dies zeigen Befunde für bakterielle und andere Mutagenitätsteste mit OTA. Hier interessieren diese Befunde primär unter dem Aspekt einer Metabolisierung / Bioaktivierung von OTA.

Hennig *et al.* (1991) berichteten ein positives Ergebnis im Ames-Test bei Verwendung eines mit OTA-präinkubierten Hepatozyten-Überstandes. In vergleichbaren,

noch umfangreicheren Versuchen mit etlichen *Salmonella typhimurium* Stämmen konnte dies aber nicht bestätigt werden: Föllmann und Lucas (2003) fanden *keine* Punkt- oder Leseraster-Mutationen. Auch im HPRT-Test (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase) mit V79-Zellen (Hamsterfibroblasten) war bei Einsatz von Hepatozyten-Überstand oder externem Metabolisierungssystem (S-9 Mix aus Leber oder Niere) keine Mutagenität für OTA zu finden. Auch weitere Ames-Teste mit und ohne Einsatz verschiedener Enzymsysteme (Cytochrom-P450 und/oder HRP) zeigten nur negative Befunde (Kuczuk *et al.*, 1978; Würzler *et al.*, 1991; Zepnik *et al.*, 2001), während ein Ames-Test für OTA (mit Nierenmikrosomen) positiv war (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1999).

Andere Befunde lassen eine metabolische Aktivierung von OTA als notwendig für eine genotoxische Wirkung erscheinen:

Bei Tests mit NIH/3T3 Zellen, die mit CYP-Isoenzymen transfiziert wurden und einen Shuttle-Vector mit dem lacZ'-Gen als Reporter gen für Mutationen enthielten, führte OTA-Behandlung primär zu großen Deletionen (De Groene *et al.*, 1996b). Da diese auch Folge clastogener Effekte sein können, und solche z.B. im Mikrokerntest auftreten (Degen *et al.*, 1997; Dopp *et al.*, 1999) ist der Befund kein Widerspruch zu den oben genannten negativen Resultaten für OTA in bakteriellen und Säugerzell-Assays, er spricht aber für eine Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen.

Malaveille *et al.* (1994) berichten, daß die in einem modifizierten SOS-Chromotest in *E. coli* gefundenen genotoxischen Effekte von OTA durch Zusatz von Trolox C, einer wasserlöslichen Form des Vitamin E (eines Radikalfängers), komplett zu unterdrücken waren. Sie vermuteten, daß durch Peroxidase-Aktivität in den Bakterien ein OTA-Radikal (möglicherweise ein Alkoxy-Radikal am C8) entsteht, das die genotoxischen Effekte (SOS DNA repair) auslöst. OTA (und einige Strukturanaloga) war(en) in diesem Test *ohne* Zusatz eines externen metabolisierenden Systems wirksam; ein Bakterienenzym mit peroxidativer Aktivität wurde nicht charakterisiert. *E. coli* gehören zu den wenigen Organismen, die keine endogenen CYP450 Enzyme exprimieren.

Später berichteten Gillman *et al.* (1999) über Untersuchungen mit einem wasserlöslichen Fe-Porphyrin-Oxidationssystem (FeTPPS) zur *in vitro* Modellierung des Mykotoxin-Metabolismus: Bei Oxidation mit FeTPPS und H₂O₂ förderte OTA die Entstehung von Einzelstrangbrüchen in supercoiled Plasmid-DNA, vermutlich durch Bildung

reaktiver Sauerstoffspezies (Hydroxylradikale). Die Autoren fanden Anhaltspunkte für eine Phenol-Oxidation über ein intermediäres Phenoxy-Radikal zu einem (dechlorierten) OTA-Chinon-Derivat, das in Gegenwart eines reduzierenden Agens (Natrium-Ascorbat) zum Hydrochinon reduziert wurde. Unklar ist bisher, inwieweit dieses *in vitro* System tatsächlich zelluläre metabolische Prozesse modelliert, da keines dieser Produkte *in vivo* oder in Zellkultur beschrieben worden ist. Das Hydrochinon ist zwar durch Autoxidation „abbaubar“, doch ein Chinon sollte an Nukleophile, z.B. Protein oder Glutathion, binden und somit (indirekt) nachweisbar sein.

Bei Inkubation von [³H]-OTA mit primären Hepatozyten von Ratte oder Mensch entstanden nur geringe Mengen an 4-Hydroxy-OTA und zwei neue Metabolite (Hexose und Pentose-Konjugate), doch fand sich keine Evidenz für eine kovalente Bindung oder metabolische Aktivierung (Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002). Ein erniedrigter Quotient an reduziertem/oxidiertem Glutathion in OTA-behandelten Zellen weist auf oxidativen Stress hin; der Befund spricht aber nicht zwingend für die Entstehung von OTA-Radikalen, weil verschiedene Auslöser für oxidativen Streß in Frage kommen (Sies, 1997; Gate *et al.*, 1999).

Ferner hatte die Gruppe um Dirheimer und Pfohl-Leszkowicz gezeigt, daß eine OTA-Behandlung von Nagern und Zellkulturen zu DNA-Modifikationen führt, die mit Hilfe der ³²P-Postlabelling-Methode nachweisbar sind (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1991; 1993, a-e; Grosse *et al.*, 1995, a,b; Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996; Castegnaro *et al.*, 1998). Die als „DNA-Addukte“ angesehenen Modifikationen (spots) zeigten teilweise unterschiedliche Muster in verschiedenen Organen von Ratte und Maus und in verschiedenen Zellen. Dies wurde als Hinweis auf Organ-spezifischen Metabolismus gewertet. Daß die Adduktlevel bzw. die Intensität einzelner Flecke *in vivo* unter Gabe von Indometazin und Aspirin geringer waren, sprach nach Ansicht der Autoren für eine Beteiligung der Prostaglandin-H-Synthase an der Bildung reaktiver OTA-Intermediate (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996). Interessanterweise führte *in vitro* auch Zusatz von Katalase, Superoxiddismutase, Ascorbinsäure oder α -Tocopherol zu einer deutlichen Verringerung der Adduktanzahl und Menge (Grosse *et al.*, 1997). Dieser Befund spricht dafür, daß reaktive Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species) – generiert infolge OTA-induzierter Zytotoxizität – zumindest für einen Teil der „Addukte“ verantwortlich sein könnten.

Die Identität der vermeintlichen DNA-Addukte ist aber bislang nicht geklärt: Eine Arbeit legt nahe, daß mit mikrosomal aktiviertem OTA hauptsächlich Guanin-Modifikationen entstehen (Obrecht-Pflumio und Dirheimer, 2000). Andere Gruppen haben in jüngster Zeit mit hochempfindlichen Methoden versucht, eine Bindung von tritiiertem OTA an DNA nachzuweisen, aber mit negativem Befund (Gautier *et al.*, 2001a; Gross-Steinmeyer *et al.*, 2002). Dazu passen ältere Arbeiten, in denen ebenfalls keine Bindung von [³H]-OTA an DNA detektierbar war (Rasonyi, 1995; Schlatter *et al.*, 1996). Diese Autoren bezweifeln daher, daß reaktive OTA-Intermediate entstehen und kovalent an DNA binden.

Die zu Beginn der Dissertation (und auch heute noch) schwierige Datenlage läßt sich kurz wie folgt zusammenfassen:

Es besteht **Konsens**, daß OTA ein genotoxisches Potential aufweist und erbgutverändernde Wirkungen zeigt, aber offenbar *keine* Punkt- und Leseraster-Mutationen induziert (Benford *et al.*, 2001).

Kontrovers diskutiert wird die Bedeutung des Metabolismus (einer Bioaktivierung) von OTA; der **Dissens** kann in zwei Positionen ausgedrückt werden:

- **Position 1:** Oxidativer Metabolismus ist notwendig für genotoxische Effekte; er wird von Cytochrom P450 und / oder Peroxidasen katalysiert.
- **Position 2:** Metabolismus ist nicht notwendig für genotoxische Effekte; diese werden von bzw. durch OTA ausgelöste Sekundärprozesse bewirkt.

5.2 Aufgabenstellung dieser Arbeit vor dem Hintergrund kontroverser Vorstellungen zum Wirkungsmechanismus von OTA

Wie oben dargestellt, gab (und gibt es weiterhin) unterschiedliche Positionen dazu, welche Rolle eine metabolische Aktivierung von OTA für genotoxische Effekte spielt und welche Enzyme eine Bioaktivierung katalysieren.

Zum einen wurde eine Beteiligung von Cytochrom P450 Enzymen postuliert, und zwar in Hinblick auf unterschiedlich hohe Tumorinzidenzen und „Adduktspiegel“ in zwei Rattenstämmen sowie geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Ausprägung der teils miteinander korrelierten Endpunkte (Castegnaro *et al.*, 1998; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1998). Andererseits postulierte die Gruppe um Dirheimer und Pfohl-Leszkowicz auch eine Rolle für Prostaglandin-H-Synthase (PHS), da diese Peroxidase in relevanten Zielgeweben (siehe unten) exprimiert wird (Davis *et al.*, 1981), in Niere und in Harnblase OTA-exponierter Tiere vergleichsweise hohe „DNA-Adduktspiegel“ gefunden wurden (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993 c - e), und bei Gabe von Indometazin und Aspirin, zwei bekannten PHS-Inhibitoren, die Addukt mengen in der Harnblase deutlich reduziert wurden (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996).

Die Autoren schlossen auf eine metabolische Aktivierung von OTA durch PHS, die von Indometazin verhindert wurde. Jedoch sind auch andere Erklärungen des *in vivo* Befundes und die quasi protektive Wirkung von Indometazin denkbar: So führt beispielsweise Behandlung von OTA-exponierten Ratten mit Piroxicam zur erhöhten renalen Ausscheidung von OTA (Baudrimont *et al.*, 1995). Piroxicam ist - wie Indometazin - ein nicht-steroidales anti-inflammatorisches Agens (NSAID) mit ausgeprägter Bindung an Plasmaproteine (Skerlj, 1989). Es käme bei Verdrängung von OTA aus seiner Bindung an Plasmaproteine zur erhöhten (schnelleren) renalen Elimination und daher zu geringeren Spiegeln des Mykotoxins im Zielgewebe. Der protektive Effekt von NSAIDs wäre also auf eine veränderte Kinetik von OTA zurückzuführen, und nicht auf die Hemmung einer PHS-katalysierten Aktivierung.

Gegen die Hypothese einer PHS-abhängigen Bioaktivierung sprechen die *in vitro* Befunde aus dem Mikronukleus-Assay mit OSV-Zellen, wo Indometazin die Genotoxizität von OTA verstärkte (Degen *et al.*, 1997). Dabei handelt es sich um ein Zellkultursystem, das in Hinblick auf seine fremdstoffmetabolisierende Leistung gut charak-

terisiert ist. OSV-Zellen exprimieren PHS Enzym in hohem Maße (Freyberger *et al.*, 1987; Foth, 1992; Degen, 1993 a,b); eine Aktivität der Cytochrom P 450 Enzyme ist zwar durch Ah-Rezeptor Liganden induzierbar, aber nicht konstitutiv vorhanden (Schuhmacher *et al.*, 1996).

Verglichen mit der *in vivo* Situation werden durch die geringere Komplexizität der Zellkultur weitere Untersuchungen und eine Ausdeutung der Ergebnisse begünstigt. Wie eingangs dargestellt, wurden zur Klärung des Befundes aus dem Mikronukleus-Assay drei Arbeitshypothesen zu Interaktionen von OTA und INDO aufgestellt (vgl. Abschnitt 1.5) und untersucht.

Die durchgeführten Experimente fokussierten auf drei Fragen:

- 1) Wird OTA durch OSV Zellen und/oder mikrosomale Prostaglandin-H-Synthase (PHS) bzw. Meerettich-Peroxidase (HRP) metabolisiert?
- 2) Haben OTA und INDO, in Konzentrationen wie im Mikrokern-Assay, einen Einfluss auf den intrazellulären pH-Wert von OSV-Zellen?
- 3) Konkurrieren OTA und INDO um Bindung an Serumproteine?

Die dazu erhobenen Ergebnisse und Schlußfolgerungen werden im folgenden diskutiert.

5.3 Wird OTA von Peroxidasen (PHS, HRP) oder in OSV-Zellen (im Sinne einer Bioaktivierung oder Detoxifizierung) metabolisiert?

Zunächst wurde untersucht, ob OTA durch **mikrosomale Prostaglandin H Synthase (PHS)** umgesetzt wird: Dazu wurden Schafsamenblasen-Mikrosomen (ram seminal vesicle microsomes, RSVM) als Enzymquelle und Arachidonsäure als Kofaktor eingesetzt und tritiiertes OTA mit aktivem Enzym bzw. in Kontrollansätzen (ohne/mit inaktiviertem RSVM) inkubiert (vgl. 3.8.1). Nach Aufarbeitung wurden die Ansätze mit HPLC und Fluoreszenzdetektion bzw. LSC analysiert.

Ein Vergleich der Fluoreszenzprofile von kompletten Inkubationen mit Kontrollen zeigte weder signifikante Unterschiede in der OTA-Menge noch deutliche Zunahmen an neuen Metaboliten (polarere, unpolarere Peaks). Zwar waren in kompletten An-

sätzen neben OTA noch weitere fluoreszierende Substanzen/Produkte in geringer Menge detektiert worden, doch eher weniger als in den Kontrollansätzen ohne PHS-Aktivität.

OT alpha konnte in keinem der Ansätze nachgewiesen werden. Aufsetzversuche mit dem OTA-Derivat OTB zeigten, daß sowohl in kompletten Ansätzen als auch in Ansätzen ohne Enzym eine Substanz von der Säule eluiert, die offenbar mit OTB co-chromatographiert. Eine genauere Analyse dieses Peaks wurde nicht vorgenommen, da er in ähnlicher Menge auch in den Kontrollen auftrat, also offenbar nicht enzymatisch gebildet wird, sondern wahrscheinlich während der Aufarbeitung der Proben entsteht und somit ein Artefakt darstellt. Aus den gleichen Gründen wurde die Natur der übrigen Peaks ebenfalls nicht weiter analysiert, zumal es sich dabei nur um Spuren (geringe Fluoreszenzintensität) handelte.

Die Entstehung neuer radioaktiv markierter Metaboliten wurde auch durch fraktioniertes Auffangen des HPLC-Eluates und Analyse mit LSC untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 16 dargestellt. Es zeigte sich, in Übereinstimmung mit dem HPLC-Fluoreszenzprofil, daß die im Eluat gemessene Radioaktivität sich nahezu ausschließlich in den Fraktionen wiederfand, die OTA entsprechen. Nur ein sehr geringer Anteil der eingesetzten Radioaktivität eluierte vor OTA von der Säule (Hinweis auf polarere Produkte), u.a. eine Fraktion mit der Retentionszeit von OTB. Dies spricht dafür, daß es sich bei dem im Fluoreszenzprofil detektierten Peak tatsächlich um OTB handelt. Auch hier waren die Mengen in kompletten Ansätzen und Kontrollen vergleichbar und sprachen gegen eine Enzym-katalysierte Bildung.

Weder die Ergebnisse der HPLC Analyse noch die unter 4.2.1.4 beschriebenen Befunde einer Analyse der Überstände mittels DC und Autoradiographie ergaben einen Hinweis darauf, daß OTA durch die Peroxidase PHS metabolisiert wird.

Möglicherweise könnten bei einer metabolischen Umsetzung des Mykotoxins durch PHS aber reaktive OTA-Intermediate entstanden sein, die bei den genannten Analysen der Extrakte nicht erfasst wurden. Dagegen sprechen aber die in Abbildung 14 gezeigten Daten: Die in verschiedenen Inkubationsansätzen gemessene Radioaktivität lag nur zu maximal 0,8 % gebunden an mikrosomales Protein vor, und in kompletten (also enzymatisch aktiven) Ansätzen war die Radioaktivitätsmenge geringer als oder vergleichbar mit den Kontrollen ohne Arachidonsäure oder mit Inhibitor- (INDO-) Zusatz.

Um ausschließen zu können, daß die „Null-Befunde“ für OTA auf einer mangelnden Aktivität des verwendeten Mikrosomenbatches beruhen, wurde eine Inkubation mit dem als PHS-Substrat bekannten *trans*-Diethylstilbestrol (Degen *et al.*, 1982; Degen und McLachlan, 1985) durchgeführt. Sie zeigte, daß der verwendete Enzymbatch diese Substanz sehr effizient zum Metaboliten Z,Z-Dienestrol oxidierte (vgl. 4.2.1.5).

Als **Zwischenfazit** läßt sich festhalten, daß aus Experimenten mit aktivem mikrosomalem Enzym keine Hinweise für eine PHS-katalysierte Umsetzung von OTA vorliegen, weder im Sinne einer metabolischen Aktivierung (keine Zunahme proteingebundener Radioaktivität nachweisbar), noch als detoxifizierende Metabolisierung (keine Zunahme von OT alpha, OTB oder neuen Metaboliten nachweisbar).

Im folgenden wurde dann untersucht, ob das Mykotoxin möglicherweise durch eine andere Peroxidase, die **Meerrettichperoxidase (HRP)** metabolisiert werden kann. Für eine Reihe von Fremdstoffen kann HRP als „Modellperoxidase“ für die PHS dienen und generiert die gleichen Metabolite wie das Säugerenzym (z.B. E-DES). Andererseits gibt es auch Unterschiede im Spektrum der Substrate, die von PHS und HRP umgesetzt werden: Beispielsweise wird Anilin von HRP, aber nicht von PHS oxidiert; Amitrol und Lipoic acid werden von PHS, aber nicht von HRP oxidiert (Übersicht in Degen *et al.*, 2002).

Anders als mikrosomale PHS wurde HRP in hochreiner Form eingesetzt: Bindung der Ausgangssubstanz OTA bzw. reaktiver Intermediate an Enzymprotein ist daher von vornherein zu vernachlässigen und nicht Gegenstand der Analysen. Dies ermöglichte aber, das Verfahren zur Aufarbeitung der Proben weniger aufwendig zu gestalten als mit PHS. So kann die Gefahr des Entstehens von Artefakten während der Aufarbeitung reduziert werden, und es sollten günstigere Bedingungen für den Nachweis etwaiger entstehender Metabolite vorliegen.

Die unter 4.2.2 dargestellten Ergebnisse, insbesondere die Abbildungen 20 und 21 zeigen eine praktisch vollständige Wiederfindung des eingesetzten OTA in allen Inkubationsansätzen. In Untersuchungen mit dieser Peroxidase fanden sich also ebenfalls keine Anzeichen einer OTA-Metabolisierung. Zur Absicherung der metabolischen Aktivität des Enzyms wurde eine Kontrollinkubation von HRP mit E-DES

durchgeführt: Sie zeigte, daß das Enzym unter unseren Inkubationsbedingungen aktiv ist und eine Oxidation von OTA hätte katalysieren können.

Unser negativer Befund für OTA steht in Einklang mit einem kürzlich publizierten Ergebnis von Zepnik *et al.* (2001): Diese Autoren fanden bei Inkubation von OTA mit HRP keine detektierbare Umsetzung des Mykotoxins und auch keine Aktivierung zu mutagenen Produkten.

Aus den erhaltenen Befunden lassen sich folgende Schlußfolgerungen ziehen:

- Die von einigen Autoren (vgl. Abschnitt 5.2) postulierte peroxidative **Bioaktivierung** von OTA kann mit Blick auf die negativen Resultate der experimentellen Studien zur Umsetzung von OTA durch PHS, HRP und OSV-Zellen nicht bestätigt werden. Unsere und die von Zepnik *et al.* (2001) erhaltenen Befunde sprechen vielmehr gegen eine Umsetzung des Mykotoxins OTA durch Peroxidasen wie HRP oder PHS im Sinne einer metabolischen Aktivierung.
 - In jüngster Zeit publizierte Arbeiten anderer fanden auch keine Anhaltspunkte für eine *Cytochrom P450*-katalysierte Bildung reaktiver OTA-Intermediate (vgl. Abschnitt 5.1).
- Ferner kann die Hypothese einer **Detoxifizierung** des Mykotoxins durch PHS (oder andere Enzyme) ad acta gelegt werden, denn:
 - Die Analyse der Inkubationen von OTA mit mikrosomaler PHS, HRP oder OSV-Zellen lieferte keine Hinweise auf eine Bildung von weniger toxischen Metaboliten wie OT alpha oder OTB (bzw. Hemmung ihrer Produktion durch INDO; siehe unten).
 - Auch folgende Überlegung spricht dagegen: Wie von Foth (1992) gezeigt, wird in OSV-Zellen exprimierte PHS schon bei Zusatz von $\leq 5 \mu\text{M}$ Indometazin fast vollständig gehemmt. Daher ist nicht einzusehen, warum ein Zusatz von $50 \mu\text{M}$ INDO zur Zellkultur mehr genotoxisch wirkendes OTA „produziert“ (mittels Hemmung einer OTA-Detoxifizierung) als ein Zusatz von $10 \mu\text{M}$ INDO.

Unsere **Hypothese # 1** (vgl. Abschnitt 1.5) kann also verworfen werden, denn sie erklärt nicht den modulierenden Einfluss von INDO auf die OTA-induzierten Mikrokern-Raten in Zellkultur (Degen *et al.*, 1997). Eine erhöhte Genotoxizität von OTA in

Gegenwart des Inhibitors wäre aber ebenfalls zu erwarten gewesen, falls andere Enzyme als PHS in den OSV-Zellen in nennenswertem Umfang OTA detoxifizieren und wenn INDO diese Reaktion hemmt.

Indometazin ist ein potenter Hemmstoff verschiedener Decarboxylasen (Grygliewski, 1979); von denen ist allerdings nicht bekannt, ob sie OTA umsetzen und ob sie in OSV-Zellen exprimiert werden. Dies gilt sinngemäss auch für Hydrolasen, die eventuell eine Detoxifizierung (zu OT alpha) katalysieren.

Aus diesen Gründen wurde im folgenden eine Umsetzung von OTA durch die OSV-Zellen untersucht, mit besonderem Augenmerk auf eine Bildung von Metaboliten.

Es wurden aber keine Anzeichen für eine Metabolisierung von OTA durch OSV-Zellen gefunden (also keine Zeit- oder Zell-abhängige Bildung neuer Produkte; vgl. Abschnitt 4.1). Auch diese Variante von **Hypothese # 1** (vgl. Abschnitt 1.5) wird daher verworfen.

Zur Erklärung der im Mikrokerntest gefundenen Resultate mit Indometazin waren daher weitere Hypothesen und damit verknüpfte Fragestellungen zu untersuchen.

5.4 Bewirken OTA und Indometazin (allein oder in Kombination) eine meßbare Verschiebung des pH-Wertes in OSV-Zellen?

Mit Konzentrationen, die im Mikrokern-Assay wirksam waren, wurde untersucht, ob OTA bzw. INDO (allein und in Kombination) den intrazellulären pH-Wert der OSV-Zellen beeinflussen. Es wäre denkbar, daß ein Zusatz von INDO den intrazellulären pH-Wert der OSV-Zellen dahingehend ändert, daß die schwache Säure OTA leichter in die Zellen aufgenommen bzw. dort besser retiniert werden kann. Die Bestimmung des intrazellulären pH-Wertes erfolgte unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes BCECF mittels der an konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie gekoppelten Methode der Ratio-Fluorimetrie.

Der intrazelluläre pH-Wert unbehandelter oder nur mit Lösemittel (DMSO) behandelter OSV-Zellen wurde mit ca. 7,3 bis 7,4 ermittelt. Zusatz von OTA allein in Konzentrationen von 20 bzw. 30 µM zum Zellkulturmedium führte in zwei Versuchsreihen bei 30-minütiger Inkubation nicht zu einer Verschiebung des intrazellulären pH-Wertes (vgl. Abschnitt 4.4).

Analog dazu wurden auch Untersuchungen zur Frage einer möglichen intrazellulären pH-Wert Veränderung durch Indometazin allein bzw. Indometazin in Kombination mit OTA durchgeführt. In keinem der Versuchsansätze war bei Zusatz der Substanzen in Konzentrationen, wie sie auch im Mikrokern-Assay in serumhaltigem Kulturmedium eingesetzt worden sind, bei 30-minütiger Inkubationsdauer ein Einfluß auf den intrazellulären pH-Wert zu detektieren.

Als Positiv-Kontrolle wurde ein bekannter "pH-Wert-Shifter", nämlich NH_4Cl in 10 mM Konzentration, dem Medium der OSV-Zellen zugesetzt: Damit wurde der intrazelluläre pH-Wert innerhalb von 1,5 Minuten um etwa 0,8 Einheiten in den alkalischen Bereich verschoben. So konnte gezeigt werden, daß die OSV-Zellen mit einer pH-Wert-Verschiebung reagiert hätten, wenn die anderen Prüfstoffe unter unseren Versuchsbedingungen eine solche hervorgerufen hätten.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, daß OTA in MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine Kidney Cells) den intrazellulären pH-Wert und die Chlorid-Homöostase zu beeinflussen vermag. So wurde berichtet, daß unter Bedingungen, unter denen der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch in den Zellen aktiv war, Zusatz von 1 μM OTA zum Medium innerhalb von 3 - 5 Minuten zu einem Anstieg des intrazellulären pH-Wertes um $0,11 \pm 0,03$ Einheiten führte (Gekle *et al.*, 1994). Dies beruht nach Ansicht der Autoren auf einer Hemmung der Leitfähigkeit der Plasmamembran für Anionen wie Cl^- (Gekle *et al.*, 1993). Da Cl^- über den $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher in die Zelle aufgenommen wird, bricht mit dem durch Hemmung des Cl^- Ausstoßes verbundenen Anstieg der intrazellulären Chlorid-Konzentration auch der Gradient zum Betreiben des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschers zusammen. Die Folge ist eine intrazelluläre Akkumulation an HCO_3^- , die zum Anstieg des intrazellulären pH-Wertes führen soll (Kuramochi *et al.*, 1997).

Gekle *et al.* (1994) konnten mit OTA also einen, wenn auch geringen, Anstieg des intrazellulären pH-Wertes finden, wir aber nicht. Für den (scheinbar) divergierenden Befund kommen zwei Gründe infrage:

- die beiden Zelltypen (MDCK bzw. OSV-Zellen) oder
- unterschiedliche Versuchsbedingungen.

Während Gekle *et al.* (1994) die Folgen einer OTA-Behandlung (1 μM) *in serumfreiem Medium* untersuchten, führten wir unsere Versuche mit OSV Zellen jedoch *in*

Zellkulturmedium mit 10 % FCS und OTA (20 – 30 μM) durch (um die Bedingungen des Mikronukleus-Tests soweit als möglich zu imitieren).

Da OTA bekanntlich sehr gut an Serumproteine bindet, stellt sich die Frage, gegen welche „freien“ Mykotoxin-Konzentrationen die Zellen exponiert waren. Im Vorgriff auf die Diskussion der Befunde zur Proteinbindung von OTA sei hier auf Abbildung 37 verwiesen. Sie zeigt, daß die hohe Affinität des Mykotoxins für Serumproteine den Anteil an freiem, also in Zellen aufnehmbarem OTA, maßgeblich verringert.

Wie in Kapitel 4.5 dieser Arbeit dargestellt, liegen bei 10 % FCS im Kulturmedium nur ca. 0,2 μM der eingesetzten OTA-Menge (20 μM) frei verfügbar, also nicht an Protein gebunden, vor. Dieser Anteil erhöht sich bei 30 μM OTA unwesentlich auf etwa 0,25 μM freies OTA im serumhaltigen Medium. Demgegenüber detektierten Gekle *et al.* (1994) eine intrazelluläre pH-Wert Verschiebung mit MDCK Zellen in *serumfreiem* Medium mit 1 μM OTA, also bei ca. 4-fach höheren Anteilen an freiem Mykotoxin.

Unter den zur Erklärung der Mikrokern-Befunde relevanten Versuchsbedingungen waren keine meßbaren Einflüsse von OTA oder INDO auf den intrazellulären pH-Wert von OSV-Zellen nachweisbar; daher wurde auch **Hypothese # 2** verworfen und stattdessen **Hypothese # 3** (vgl. Abschnitt 1.5) weiter verfolgt.

5.5 Konkurrieren OTA und INDO um Bindung an Serumproteine?

Anders formuliert lautet die Frage:

- Kann INDO das Mykotoxin aus seiner Bindung an Serumproteine verdrängen und folglich den Anteil an freiem OTA im Zellkulturmedium erhöhen?
- Wenn ja, lassen sich damit die Verstärkungseffekte von Indometazin auf die Mikrokerninduktion durch OTA in OSV Zellen erklären bzw. Wenn nein, sind weitere Konkurrenzreaktionen um eine Proteinbindung von Bedeutung?

Von OTA und Indometazin ist bekannt, daß beide Substanzen recht gut, aber reversibel an Serumproteine binden. In der Literatur angegebene Affinitäten von OTA für Albumine variieren je nach untersuchter Spezies: Die angegebenen Werte liegen im Bereich von 10^{-4} M für Schwein, Huhn und Ratte (Galtier *et al.*, 1979), im Bereich von

10^{-5} M für humanes Serumalbumin (Uchiyama und Saito, 1987) und 10^{-6} M für bovinen Serumalbumin (Chu, 1971). Darüber hinaus wurde von Stojkovic *et al.* (1984) beschrieben, daß neben einer Bindung an Albumin offensichtlich eine spezifischere, höher affine Bindung an bislang nicht näher charakterisierte Proteine (Makromoleküle) in humanem und in Schweineplasma (Molekulargewicht ca. 20.000 Da) existiert: Assoziationskonstanten für die Bindung an diese Makromoleküle werden mit $2,3 \times 10^{-10}$ M bzw. $0,59 \times 10^{-10}$ M angegeben.

Dies bedeutet für den Mikrokernassay, der ja in Anwesenheit von 10 % FCS im Kulturmedium durchgeführt wurde (Degen *et al.*, 1997), daß wahrscheinlich nur ein Bruchteil der nominell eingesetzten OTA Konzentration in die Zellen eindringen und dort genotoxisch wirken kann, weil die an verschiedene Plasmaproteine gebundenen Anteile des OTA nicht von den Zellen aufgenommen werden.

Auch Indometazin kann vergleichsweise gut an Serumproteine binden: Ekman *et al.* (1980) geben die Dissoziationskonstanten für 3 Bindungsstellen des INDO an humanes Serumalbumin mit $1,5 - 2,1 \times 10^{-6}$ M, $3,5 \times 10^{-5}$ M bzw. $5,5 \times 10^{-4}$ M an.

Die Annahme, daß INDO das an Serumproteine gebundene OTA aus seiner Bindung zu drängen vermag, ist vor diesem Hintergrund plausibel. Bei einem entsprechenden Zusatz von INDO würde damit mehr freies, also von Zellen aufnehmbares OTA vorliegen, und dies könnte den verstärkenden Effekt auf die Genotoxizität *in vitro* (Degen *et al.*, 1997) erklären.

Um diese Hypothese auch zu belegen, wurden Bindungsstudien mit radioaktiv markiertem OTA bzw. Indometazin unter Bedingungen, wie sie im Mikrokernassay relevant waren, durchgeführt: In zellfreiem Medium mit hohem (10%) oder niedrigem (2,5 %) FCS-Gehalt wurden OTA bzw. Indometazin inkubiert und untersucht, inwieweit die andere Substanz die erstere aus der Bindung zu drängen vermag. Dazu wurde die Methode der Ultrafiltration eingesetzt, und der Anteil ungebundener Substanz im Ultrafiltrat per LSC bestimmt. Die Ultrafiltration mit einer Trennmembran der Porengröße 10.000 Da wurde durchgeführt, da Stojkovic *et al.* (1984) Daten über eine OTA-bindende (Serum-) Komponente mit dem Molekulargewicht 20.000 Da publiziert hatten. Die gewählte Membran konnte somit eine Aufnahme gebundenen OTAs in das Ultrafiltrat und damit eine Verfälschung des Anteils freier Substanz verhindern.

Wie die Abbildung 37 zeigt, liegt der Anteil an freiem OTA bei hoher Serumkonzentration (10 % FCS) im Kulturmedium sehr viel niedriger als bei Einsatz niedrigerer Serumproteinmengen (2,5 % FCS). Es muß, um die gleiche Konzentration an freiem OTA einzustellen, bei hoher FCS-Konzentration im Medium etwa 2 – 3 mal soviel Mykotoxin zugesetzt werden wie in Medium mit geringem Gehalt an FCS.

Dies deckt sich sehr gut mit Befunden von Zytotoxizitätstesten mit OSV-Zellen (vgl. Abbildung 26): Hier war die nominelle Konzentration an OTA, die zu 50 % Zytotoxizität führte, bei 10 % FCS im Medium ca. 2 – 3 mal so hoch wie in Medium mit 2,5 % FCS. Diese Befunde bestätigen, daß primär der Anteil an freiem OTA für die Wirkung auf die Zellen verantwortlich ist. In Zytotoxizitätstests mit anderen Zellen bewirkte ein Zusatz von bovinem Serum-Albumin (BSA) im Medium ebenfalls deutliche Verschiebungen in den Konzentrations-Effekt-Beziehungen (Bruinink und Sidler, 1997)

In einer zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob Indometazin das Mykotoxin aus seiner Bindung an Serumproteine (FCS) herausdrängt. Die Ergebnisse (siehe Abbildungen 38 und 39) zeigten folgendes: Bei hoher Serumkonzentration konnte ein 50 µM INDO-Zusatz zum Inkubationsansatz, der OTA in unterschiedlichen Mengen enthielt, das Mykotoxin bei 5 µM und 20 µM OTA signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$) aus seiner Bindung an Serumproteine verdrängen. Dieser Effekt zeigte sich noch deutlicher, wenn man den Versuch bei einer niedrigeren Serumkonzentration durchführte: Hier konnte INDO (50 µM) das OTA in allen Prüfkonzentrationen signifikant aus der Bindung drängen (Abbildung 39).

Umgekehrt wird auch in den Untersuchungen zur Bindung von radioaktiv markiertem INDO an Serumproteine ein deutlicher Einfluß des FCS-Anteils im Kulturmedium auf die freie Konzentration an INDO erkennbar (Abbildung 40). Wie erwartet liegt auch hier bei 2,5 % FCS ein höherer INDO-Anteil in freier Form vor als bei 10 % FCS: Um die gleiche Endkonzentration an freiem INDO zu erhalten, muß bei hohem Serumgehalt im Medium etwa doppelt soviel INDO zugesetzt werden.

Ferner wurde geprüft, inwieweit OTA das INDO aus seiner Bindung an Serumproteine zu drängen vermag: Bei 10 % FCS im Medium war *keine* wirksame Verdrängung von Indometazin durch die eingesetzten OTA-Konzentrationen festzustellen (Abbildung 41). Bei 2,5 % FCS im Medium war dagegen eine partielle Verdrängung von

INDO aus der Serumproteinbindung nachweisbar, und zwar umso deutlicher, je mehr OTA im Ansatz war (Abbildung 42).

Insgesamt belegen die Versuche folgendes:

INDO konkurriert mit OTA um Bindung an Serumproteine und kann das Mykotoxin aus dieser Bindung verdrängen. Infolge dessen erhöht sich im Medium der Anteil an freiem OTA. Bei der Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve für OTA im Mikronukleus-Assay kann Verdrängung aus Serumbindung durch INDO daher zumindest einen Teil der beobachteten Wirkungsverstärkung erklären.

Eine Übertragung der *in vitro* Befunde auf die *in vivo* Situation ist sehr schwierig: Zum einen beträgt die Serumproteinmenge im Zellkulturmedium nur 0,042 % (bei 2,5 % FCS) bzw. 0,14 % (bei 10 % FCS) dessen, was in humanem Blutplasma vorliegt (40 g/L). Zum anderen sind unterschiedliche Affinitäten von OTA / INDO zu Proteinkomponenten im Serum beider Spezies (Mensch, Kalb) wahrscheinlich (siehe oben). Bei welchen Konzentrationsverhältnissen und in welchem Umfang Indometazin das Mykotoxin *in vivo* aus einer Proteinbindung verdrängt, ist daher nicht ohne weiteres abzuschätzen. Für diese Möglichkeit sprechen ältere Studien (Galtier *et al.*, 1980) mit sauren Pharmaka wie Phenylbutazon: Es verdrängt OTA aus seiner Bindung an Schweinealbumin, und Phenylbutazon-Gabe an männliche Ratten verstärkt die akute Toxizität von OTA deutlich (LD₅₀ 21 mg/kg bei Kombination mit INDO bzw. 33 mg/kg für OTA allein).

5.6 Genotoxizität von OTA und OTA-Analoga bei unterschiedlichen Serumgehalten in Zellkultur - und Modulation durch Indometazin

Im Rahmen der Aufgabenstellung interessierte primär die Frage, ob eine Verdrängung von OTA aus der Bindung an Serumproteine durch INDO die von Degen *et al.* (1997) beschriebenen Effekte in Zellkultur hinreichend erklärt. In dem Fall würde man erwarten, daß im Mikronukleus-Assay unter *serumfreien* Bedingungen die Genotoxizität von OTA bei INDO-Zusatz nicht mehr maßgeblich verstärkt wird.

Um dieser Frage nachgehen zu können, waren zunächst adäquate experimentelle Rahmenbedingungen zu wählen. Dazu wurden in Vorversuchen in serumfreiem Medium in Gegenwart von INDO die OTA-Konzentrationen ermittelt, die bei 24 h Einwirkzeit im Neutralrot-Assay noch keine zu hohe Zytotoxizität zeigten. Der IC 20 Wert für OTA lag bei 100 nM in Gegenwart von 10 µM Indometazin und bei 79 nM in Gegenwart von 30 µM Indometazin. Entsprechende IC 50 Werte lagen bei 570 nM bzw. 280 nM OTA (in Kombination mit INDO 10 µM bzw. 30 µM).

Unter Orientierung am Zytotoxizitätstest wurde OTA dann im Mikronukleus-Assay in *serumfreiem* Medium für 6 h in Konzentrationen von 0,1; 1 und 3 µM eingesetzt: Es zeigte sich, daß OTA eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Mikrokernrate gegenüber der Lösemittelkontrolle bewirkte. Wie erwartet wirkten unter diesen (serumfreien) Bedingungen schon deutlich geringere Konzentrationen genotoxisch als in früheren Untersuchungen mit serumhaltigem Medium.

Ein Indometazin-Einfluß auf die Induktion von Mikronuklei durch OTA wurde mit folgendem Ergebnis untersucht: Bei 0,1 und 1 µM OTA zeigten sich Erhöhungen der Mikrokernrate bei Indometazin-Zusatz, während mit der höheren OTA-Konzentration in Kombination mit INDO (10 oder 30 µM) schon Toxizitätseffekte auftraten (Abbildung 28).

Offensichtlich war, anders als zunächst vermutet, Indometazin auch unter serumfreien Bedingungen in der Lage, die Genotoxizität von OTA zu verstärken. Da dieser Effekt hier aber nicht auf einer Verdrängungsreaktion aus einer Bindung an (extrazelluläre) Proteine des Kulturmediums beruhen kann, muß nach anderen Erklärungen gesucht werden. Eine mögliche Erklärung wäre, daß es - neben der in der vorliegenden Arbeit schon gezeigten Konkurrenz um Bindung an **extrazelluläre** Proteine - auch zur Verdrängung von OTA durch Indometazin aus einer **intrazellulären** Proteinbindung kommt.

Diese Interpretation unseres Ergebnisses wird von kürzlich publizierten Befunden anderer gestützt: So konnten Schwerdt *et al.* (1999) mit Hilfe von Western Blot Analysen verschiedene *intrazelluläre* Proteine in Rattenorganen bzw. Zelllinien detektieren, an die OTA zu binden vermag. Die OTA-bindenden Proteine haben Molekulargewichte zwischen 25 bis 60 kDa; ihre Identität ist noch nicht bekannt. In Bindungsstudien mit OTA und Nierenhomogenaten von Maus, Ratte, Mensch und Schwein

fanden Heussner *et al.* (2002) Evidenz für (zumindest) eine homogene Komponente mit einer spezifischen und sättigbaren OTA-Bindung. In Konkurrenzexperimenten mit organischen Anionen, u.a. mit Indometazin, zeigten sich distinkte (spezies- und geschlechtsspezifische) Muster: Sie sprechen nach Ansicht der Autoren dafür, daß es sich bei der (low affinity, high capacity) Bindungskomponente vermutlich nicht um Transportproteine für OTA handelt, sondern um ein neues, bislang nicht identifiziertes, cytosolisches Protein.

Die Ergebnisse von Heussner *et al.* (2002) sprechen ferner dafür, daß OTA aus einer intrazellulären Proteinbindung von INDO verdrängt werden kann. Dies würde wiederum unseren im Mikrokern-Assay unter serumfreien Bedingungen beobachteten verstärkenden Effekt erklären.

Eine andere Deutung des Kombinationseffektes (OTA plus INDO ist genotoxischer als OTA allein) wird im Ausblick (Abschnitt 5.7) diskutiert.

Weitere Mikrokern-Assays mit dem OTA-Derivat OTB und dem OTA-Metaboliten OT alpha dienten einer Abrundung der Datenlage zur Genotoxizität von OTA-Analoga.

Diese Experimente wurden in Zellkulturmedium mit 10% FCS und mit ähnlichen Konzentrationen wie bei Degen *et al.* (1997) beschrieben durchgeführt, um die neuen Befunde mit den bereits publizierten Daten für OTA vergleichen zu können.

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis des Mikrokern-Assay in OSV-Zellen mit OTB: Ab 12 μM OTB erhöhte sich die Mikrokernrate 2,4-fach gegenüber der Kontrolle. Anders als mit OTA fand sich für Mikrokerninduktion durch OTB keine so deutliche Konzentrations-Effekt-Beziehung (2,8-fache Erhöhung für 18 und 24 μM OTB). Dies ist nicht auf Toxizität zurückzuführen, denn der Anteil binukleärer Zellen war nicht maßgeblich reduziert. Überdies läßt sich feststellen, daß OTB bei Einsatz vergleichbarer Konzentrationen deutlich weniger Mikrokerne induzierte als zuvor OTA (vgl. Abbildung 3), also geringere genotoxische Wirkung zeigt. Indometazin (10 oder 30 μM) in Kombination mit OTB (18 und 24 μM) bewirkte eine leichte Steigerung der Mikrokernrate; der „Verstärkereffekt“ war aber deutlich geringer als der für OTA beobachtete.

Die Bindung von OTB an Serumproteine wird als nicht so affin beschrieben wie für OTA (Hagelberg und Hult, 1989). Vermutlich liegen im Zellkulturmedium bereits höhere Anteile an freiem OTB vor, und Verdrängung aus der Proteinbindung durch INDO spielt dann eine geringere Rolle als bei OTA. Eine weniger ausgeprägte Bindung von OTB an Plasmaproteine führt wohl auch zu seiner, verglichen mit OTA,

schnelleren Elimination (Li *et al.*, 1997). Eine günstigere Kinetik von OTB wird wiederum zu der geringen Toxizität *in vivo* (Doster *et al.*, 1972; 1974) beitragen.

OT alpha (60 bis 180 µM) induzierte, in zehnfach höherer Konzentration als OTA und OTB, keine erhöhte Mikrokernrate. Auch ein Zusatz von 50 µM INDO bewirkte keine Steigerung der Mikrokern-Rate gegenüber den Kontrollen. Bis zur höchsten eingesetzten OT alpha Konzentration (180 µM) wurde keine Toxizität (geringerer Anteil binukleärer Zellen) beobachtet.

OT alpha zeigte allerdings in einem anderen Test ein schwaches genotoxisches Potential: Es induzierte Schwester-Chromatid-Austausche in epithelialen Zellen der Schweineharnblase, aber nur bei einer OT alpha Konzentration, die 100-fach höher war als eine in diesem Versuch wirksame OTA Konzentration (Föllmann *et al.*, 1995). Generell gilt OT alpha aber als nicht toxischer Metabolit (IARC, 1993; WHO, 2001).

Hier wurde erstmals gezeigt, daß auch das dechlorinierte OTA-Derivat Mikrokerne induziert, OTB also ein genotoxisches Potential aufweist. Die Wirkung von OTB in OSV-Zellen ist aber nicht so ausgeprägt wie die von OTA. Ein Indometazin-Zusatz zum Mikrokern-Assay verstärkte die genotoxische Wirkung von OTB, jedoch ebenfalls nicht in dem Ausmaß wie dies für OTA beobachtet wurde. Für OT alpha war im Mikronukleus-Assay kein genotoxisches Potential nachweisbar; ein Befund in Einklang mit der Sicht dieses OTA-Metaboliten als Detoxifizierungsprodukt.

5.7 Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Der für Ochratoxin A (OTA) in Zellkultur erhobene Ausgangsbefund lautete:

"OTA plus Indometazin ist genotoxischer als OTA allein".

Zur Deutung dieses Befundes sind drei Hypothesen aufgestellt und untersucht worden. Vor dem Hintergrund kontroverser Positionen zur Rolle des Metabolismus für genotoxische Effekte von OTA sind die experimentellen Befunde aber auch darüber hinaus von Interesse:

- Die von einigen Autoren (siehe oben, Abschnitt 5.2) postulierte **peroxidative Bioaktivierung** des Mykotoxins kann aufgrund der negativen Resultate unserer Studien zur Umsetzung von OTA mit PHS und HRP nicht bestätigt werden.
- Ferner kann die Hypothese einer **Detoxifizierung** des Mykotoxins durch PHS (oder andere Enzyme in OSV-Zellen) verworfen werden (**Hypothese # 1**).

Modulierenden Einflüssen von NSAIDs wie Indometazin (INDO) und Aspirin auf genotoxische Effekte von OTA *in vitro* (Induktion von Mikronuklei) oder *in vivo* (DNA-Modifikationen) liegen daher andere Wirkungsmechanismen zugrunde.

- Der im Mikrokerntest beobachtete Verstärkereffekt bei Kombination OTA und INDO konnte **nicht** auf Verschiebungen im intrazellulären pH-Wert von OSV Zellen zurückgeführt werden (**Hypothese # 2**).
- Dagegen spricht viel für **Hypothese # 3**, nämlich eine Verdrängung des Mykotoxins aus seiner Bindung an Serumproteine und/oder intrazelluläre Proteine durch INDO, als Erklärung unseres Ausgangsbefundes. Eine analoge, wenn auch geringer ausgeprägte Verstärkung der Genotoxizität von OTB durch INDO stützt diese Deutung.

Wie die *in vitro* Studien ferner gezeigt haben, stellen bereits Untersuchungen zu Kombinationseffekten in Zellkultur und ihre mechanistische Ausdeutung insgesamt keine leichte Aufgabe dar. Dabei ist diese Situation noch überschaubarer als *in vivo*, wo noch mögliche Interaktionen bei kinetischen Prozessen wie Resorption und Elimination berücksichtigt werden müssen. Die Modulation eines bestimmten Endpunkts bei kombinierter Einwirkung zweier Stoffe *in vivo* eignet sich daher nur bedingt als Basis für eine mechanistische Interpretation. Dies wurde bereits am Beispiel der Minderung von OTA-induzierten „DNA-Addukten“ bei Gabe von INDO oder Aspirin diskutiert (vgl. Abschnitt 5.2).

In dem in Abschnitt 5.1 dargestellten Dissens steckte bereits die Frage nach dem genotoxischen Wirkungsmechanismus, nun spezifischer gefaßt:

Handelt es sich um DNA-Modifikationen, die (nicht durch reaktive OTA-Metabolite sondern) über OTA-induzierten oxidativen Stress entstehen? Wenn ja, würden NSAIDs und Antioxidantien dann nicht auch „protektiv“ wirken?

In diesem Kontext steht auch **Hypothese # 4** (siehe unten), die hier nach Abschluss der experimentellen Arbeiten und mit Blick auf einige in jüngster Zeit publizierte Ergebnisse aufgestellt wird und neue Perspektiven zur Deutung der beschriebenen Kombinationseffekte *in vivo* und *in vitro* eröffnet.

Wie jüngst gezeigt, führt OTA-Behandlung bei Ratten zum Anstieg biologischer Marker, die mit oxidativem Stress assoziiert werden (Gautier *et al.*, 2001b). Man weiß auch, daß OTA *in vitro* intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen beeinflussen (Dopp *et al.*, 1999), mitochondriale Dysfunktion auslösen (Aleo *et al.*, 1991) und Lipidperoxidation fördern kann (Rahimtula *et al.*, 1988; Omar *et al.*, 1990). Beide, sowohl reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS) als auch Lipidperoxidationsprodukte (Malondialdehyd, MDA und 4-Hydroxy-Nonenal, HNE) können zu DNA-Schäden führen (Marnett, 2000).

Zum einen wirken Aspirin und INDO antientzündlich und hemmen Enzyme, die u.a. ROS und MDA generieren (Marnett, 1992), und offenbar wirkt Aspirin oxidativem Stress entgegen (Steinberg *et al.*, 2002). Andererseits wurden kürzlich nach hohen Dosen auch INDO-induzierte mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress beschrieben (Basivireddy *et al.*, 2002).

Vor diesem Hintergrund sind gleichgerichtete oder unabhängige Wirkungen für OTA und INDO denkbar, aus denen Kombinationseffekte resultieren, die antagonistischer oder synergistischer Natur sein können. Die Ausprägungen werden auch von den jeweiligen Konzentrationen in Zielzellen abhängen.

Hypothese # 4 lautet also: OTA schädigt das Erbgut auf *indirektem* Weg, d.h. über Prozesse, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (und deren Sekundärprodukten) führen. Implizit heißt dies auch: Genotoxische Effekte des Mykotoxins können durch eine Reihe von Substanzen moduliert werden, die an verschiedenen Stellen (verstärkend oder hemmend) eingreifen.

Als Möglichkeiten zur besseren Identifizierung der OTA-induzierten zellulären Läsionen bieten sich an: ein Vergleich der „Adduktmuster“ im ^{32}P -Postlabeling-Assay nach

Einwirkung von OTA bzw. Agentien, die oxidativen Stress erzeugen, und andere, neue Analysemethoden zum Nachweis oxidativer DNA-Schäden. Künftige Studien sollten ferner darauf zielen, den primären zellulären Angriffspunkt von OTA zu identifizieren (Wirkungsmechanismus) sowie Dosis-Wirkungs-Zusammenhänge im Niedrig-Dosis-Bereich und deren Modulation zu untersuchen.

Der Wirkungsmechanismus von OTA ist nicht allein von akademischem Interesse, sondern in Hinblick auf einen möglichen Schwellenwert auch bewertungsrelevant (Degen, 2000).

- Welche Rolle spielt Zytotoxizität für genotoxische Effekte von OTA? und
- Wie gut werden OTA-induzierte Schäden repariert?

sind weitere, in diesem Kontext interessierende Fragen. Aspekte wie DNA-Reparatur sind daher in neuerer Zeit bei OTA-Untersuchungen auch stärker in den Blickpunkt des Interesses gerückt (Lebrun und Föllmann, 2002).

6 Zusammenfassung

Ochratoxin A (OTA) ist ein als Nahrungskontaminante bedeutsames Mykotoxin. OTA kann bei Mensch und Tier adverse Effekte wie Nephrotoxizität, Immunotoxizität und Teratogenität hervorrufen. Es ist kanzerogen in Nagern und gilt als "possibly carcinogenic to humans" (Einstufung in die Gruppe 2B durch die IARC 1993).

Zu Beginn dieser Dissertation war ein genotoxisches Potential für OTA bekannt, jedoch noch nicht hinreichend charakterisiert. Kontrovers diskutiert wurde überdies die Bedeutung des Metabolismus von OTA für seine genotoxischen Wirkungen. Von einigen Gruppen wurde und wird eine Metabolisierung von OTA durch Cytochrom P450 Isoenzyme bzw. eine peroxidative Umsetzung durch Prostaglandin H Synthase (PHS) im Sinne einer Bioaktivierung diskutiert. Ausgehend von Befunden zur Mikrokerninduktion durch OTA in OSV-Zellen (Schafsamenblasenzellen, die CYP-defizient, jedoch PHS-kompetent sind) und einer Verstärkung der Genotoxizität bei Zusatz des PHS-Inhibitors Indometazin (INDO) sind im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Ansätze zur Erklärung dieses von Degen *et al.* (1997) publizierten Ergebnisses geprüft und weitere Daten zur Genotoxizität erhoben worden. So wurde OTA *in vitro* mit mikrosomaler PHS und einer weiteren Peroxidase (HRP) sowie mit OSV-Zellen inkubiert und mittels HLPC und Radioaktivitätsdetektion nach entstandenen Metaboliten gesucht. Ferner wurden Einflüsse von OTA bzw. INDO auf den intrazellulären pH-Wert und eine gegenseitige Verdrängung der Substanzen aus der Serumproteinbindung analysiert sowie zwei OTA Derivate im Mikrokerntest auf ihr genotoxisches Potential hin untersucht.

Die wesentlichen Ergebnisse und Schlußfolgerungen sind folgende:

- Experimente mit HRP, mikrosomalem PHS-Enzym oder OSV-Zellen lieferten keine Hinweise für eine peroxidative Umsetzung von OTA, weder im Sinne einer metabolischen Aktivierung (keine Zunahme proteingebundener Radioaktivität nachweisbar), noch als detoxifizierende Metabolisierung (keine Zunahme von OT alpha, OTB oder neuen Metaboliten nachweisbar).
- Unter den für die Mikrokern-Befunde relevanten Versuchsbedingungen waren keine Einflüsse von OTA, INDO und Kombinationen der Stoffe auf den intrazellu-

- lären pH-Wert von OSV-Zellen nachweisbar, die eine erhöhte Retention und damit verstärkte Genotoxizität von OTA in den Zellen erklären würden.
- INDO konkurriert offenbar mit OTA um die Bindung an Serumproteine (im Zellkulturmedium) und kann das Mykotoxin aus dieser Bindung verdrängen. Infolge dessen erhöht sich im Kulturmedium der Anteil an freiem OTA. Bei der Steilheit der Dosis-Wirkungs-Kurve für OTA im Mikronukleus-Assay kann seine Verdrängung aus der Serumbindung durch INDO daher zumindest wesentliche Teile der beobachteten Wirkungsverstärkung erklären.
 - Interessanterweise verstärkte INDO auch unter serumfreien Bedingungen die Mikrokerninduktion durch OTA. Der Effekt ist hier nicht mit einer Konkurrenz um Bindung an (extrazelluläre) Proteine des Kulturmediums zu erklären und beruht vermutlich auf einer Verdrängung von OTA durch INDO aus einer intrazellulären Proteinbindung.
 - Erstmals wurde gezeigt, daß auch OTB Mikrokerne induziert, das dechlorierte OTA-Derivat also ein genotoxisches Potential aufweist. Seine Wirkung in OSV-Zellen ist aber nicht so ausgeprägt wie die von OTA. INDO-Zusatz verstärkte die genotoxische Wirkung von OTB im Mikrokern-Assay, doch nicht in dem Ausmaß, wie dies für OTA beobachtet wurde. Für OT alpha war im Mikronukleus-Assay kein genotoxisches Potential nachweisbar.
 - Insgesamt sprechen die Befunde dafür, daß nicht OTA-Metabolite, sondern das Mykotoxin selbst genotoxische Effekte auslöst. Möglicherweise schädigt OTA das Erbgut auf indirektem Weg, z.B. über Prozesse, die zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (und deren Sekundärprodukten) führen. Implizit heißt dies auch: Genotoxische Effekte des Mykotoxins können durch eine Reihe von Substanzen moduliert werden, die an verschiedenen Stellen (verstärkend oder hemmend) eingreifen. Diese Hypothese eröffnet neue Möglichkeiten für künftige Untersuchungen zur Wirkung von OTA auf den Organismus.

7 Literaturverzeichnis

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. and Cabanes, F.J. (1994) Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2650-2652
- Adler, I.-D. (1984) Cytogenetic tests in mammals. In Vennitt, S. and Parry, J.M. (eds), *Mutagenicity testing: a practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 275-306
- Aleo, M.D., Wyatt, R.D. and Schnellmann, R.G. (1990) Ochratoxin A (OA) and oosporein (OSN) toxicity to rat renal proximal tubules: dissociation of cytotoxicity from lipid peroxidation (LP). *Toxicologist*, **10**, 170
- Aleo, M.D., Wyatt, R.D. and Schnellmann, R.G. (1991) Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not in oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **107**, 73-80
- Ames, B.N., Magaw, R. and Gold, L.S. (1987) Ranking possible carcinogenic hazards. *Science*, **236**, 271-280
- Ballinger, M.B., Phillips, T.D. and Kubena, L.F. (1986) Assessment of the distribution and elimination of ochratoxin A in the pregnant rat. *J. Food Safety*, **8**, 11-24
- Basivireddy, J., Vasudevan, A., Jacob, M. and Balasubramanian, K.A. (2002) Indomethacin-induced mitochondrial dysfunction and oxidative stress in villus enterocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 339-349
- Baudrimont, I., Murn, M., Betbeder, A.M., Guilcher, J. and Creppy, E.E. (1995) Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Toxicology*, **95**, 147-154
- Baudrimont, I., Betbeder, A.M. and Creppy, E.E. (1997) Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in vero cells by aspartame. *Arch. Toxicol.*, **71**, 290-298
- Bauer, J. und Gareis, M. (1987) Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *J. Vet. Med.*, **34**, 613-627
- Beker, D. and Radic, B. (1991) Fast determination of ochratoxin A in serum by liquid chromatography: comparison with enzymic spectrofluorimetric method. *J. Chromatogr.*, **570**, 441-445
- Bendele, A.M. (1985) Evaluation of ochratoxin A for mutagenicity in a battery of bacterial and mammalian cell assays. *Fd. Chem. Toxic.*, **23**, 911-918
- Bendele, A.M., Carlton, W.W., Krogh, P. and Lillehoj, E.B. (1985) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F₁ mouse. *J. Natl. Cancer Inst.*, **75**, 733-742

Benford,D., Boyle,C., Dekant,W., Fuchs,R., Gaylor,D.W., Hard,G., McGregor, D.B., Pitt,J.I., Plestina,R., Shephard.G., Solfrizzo,M., Verger,P.J.P. and Walker,R. (2001) Ochratoxin A. In: *Safety evaluations of certain mycotoxins in food*, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, IPCS International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva, 281-387

Betina,V. (1984) Mycotoxins as secondary metabolites. In Betina,V. (ed), *Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification*. Developments in Food Science 8. Elsevier, pp. 13-24

BgVV Pressemitteilung 15 / 1997

Bilgrami,K.S. and Sinha,K.K. (1992) Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. In Bhatnagar,D., Lillehoj,E.B. and Arora,D.K. (eds), *Handbook of Applied Mycology 5: Mycotoxins in Ecological Systems*, Marcel Dekker, New York, pp. 59-86

Boorman,G.A., Hong,H.L., Dieter,M.P., Hayes,H.T., Pohland,A.E., Stack,M. and Luster,M.I. (1984) Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin A. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 304-312

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

Breitholtz-Emanuelsson,A. Fuchs,R., Hult,K. and Appelgreen,L.-E. (1992) Syntheses of ¹⁴C-ochratoxin A and ¹⁴C-ochratoxin B and a comparative study of their distribution in rats using whole body autoradiography. *Pharmacol. Toxicol.*, **70**, 255-261

Breitholtz-Emanuelsson,A., Olsen,M., Okarsson,A., Palminger,I. and Hult,K. (1993) Ochratoxin A in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J. AOAC Int.*, **76**, 842-846

Bright, G.R., Fisher,G.W., Rogowska, J. and Taylor, D.L (1987) Fluorescence ratio imaging microscopy. *Met. Cell Biol.*, **30**, 157-192

Bruinink, A. and Sidler, C. (1997) The neurotoxic effects of ochratoxin A are reduced by protein binding but are not affected by L-phenylalanine. *Tox. Appl. Pharmacol.*, **146**, 173-179

Castegnaro,M (1991) Destruction of ochratoxin A and citrinin using sodium hypochlorite. In IARC (ed), *IARC Scientific Publications No. 113. Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: Some Mycotoxins*. Lyon, pp. 9-16

Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-Leskowicz, A., Esteve, J., Steinmann, L., Tillmann, T., Michelon, J. and Bartsch, H. (1998) Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int. J. Cancer.*, **77**, 70-75

- Christ,E.J. and Van Dorp,D.A. (1972) Comparative aspects of prostaglandin biosynthesis in animal tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **270**, 537-545
- Chu,F.S. (1971) Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Archs. Biochem. Biophys.*, **147**, 359-366
- Chu,F.S. (1974) Studies on ochratoxins. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **3**, 499-524
- Chu,F.S. (1991) Mycotoxins: food contamination, mechanism, carcinogenic potential and preventive measures. *Mutat. Res.*, **259**, 291-306
- Clark,J.B. (1993) Electrochemical assays: the oxigen electrode. In Eisenthal,R. and Danson,M.J. (eds) *Enzyme Assays - A practical Approach*. Oxford University Press, pp. 181-190
- Cochran,W.G. and Cox,G.M. (1957) *Experimental Designs*. John Wiley & Sons Inc., NewYork
- Cooper,T.G. (1981) *Biochemische Arbeitsmethoden*. Kapitel 2: Spektroskopische Methoden, Walter de Gruyter Verlag Berlin, pp. 33-60
- Creppy,E.E., Størmer,F.C., Kern,D., Röschenthaler,R. and Dirheimer,G. (1983) Effects of ochratoxin A metabolites on yeast phenylalanyl-tRNA synthetase and on the growth and *in vivo* protein synthesis of hepatoma cells. *Chem. Biol. Interact.*, **47**, 239-247
- Creppy,E.E., Röschenthaler,R. and Dirheimer,G. (1984) Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Fd. Chem. Toxicol.*, **22**, 883-886
- Creppy,E.E., Kane,A., Dirheimer,G., Lafarge-Frayssinet,C., Mousset,S. and Frayssinet,C. (1985) Genotoxicity of ochratoxin A in mice: DNA single strand break evaluation in spleen, liver and kidney. *Toxicol. Lett.*, **28**, 29-35
- Creppy,E.E., Chakor,K., Fisher,M.J., Dirheimer,G. (1990) The mycotoxin ochratoxin A is a substrate for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, **64**, 279-284
- Davis,B.B., Mattammal,M.B. and Zenser,T.V. (1981) Renal metabolism of drugs and xenobiotics. *Nephron*, **27**, 187-196
- Degen,G.H. (1993a) Prostaglandin-H synthase containing cell lines as tools for studying metabolism and toxicity of xenobiotics. *Toxicology*, **82**, 243-256
- Degen,G.H. (1993b) SEMV cell cultures: a model for studies of prostaglandin-H synthase-mediated metabolism and genotoxicity of xenobiotics. *Toxicol. Lett.*, **67**, 187-200
- Degen,G.H. (2000) Toxikologische Bewertung von Ochratoxin A: Offene Fragen und Forschungsbedarf. *Mycotoxin Research*, **16 A**, 117 - 222

Degen,G.H. and McLachlan,J.A. (1985) Peroxidase-mediated *in vitro* metabolism of diethylstilbestrol and structural analogs with different biological activities. *Chem. Biol. Interact.*, **54**, 363-375

Degen,G.H., Eling,T.E. and McLachlan,J.A., (1982) Oxidative metabolism of diethylstilbestrol by prostaglandin H synthetase. *Cancer Res.*, **42**, 919-923

Degen,G.H., Wong,A., Eling,T.E., Barrett,J.C. and McLachlan,J.A. (1983) Involvement of prostaglandin synthetase in the peroxidative metabolism of diethylstilbestrol in syrian hamster embryo fibroblast cell cultures. *Cancer Res.*, **43**, 992-996

Degen,G.H., Metzler,M. and Sivarajah,K.S. (1986) Co-oxidation of diethylstilbestrol and structural analogs by prostaglandin synthase. *Carcinogenesis*, **7**, 137-142

Degen,G.H., Gerber,M.M., Obrecht-Pflumio,S. and Dirheimer,G. (1997) Induction of micronuclei with ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures. *Arch. Toxicol.*, **71**, 365-371

Degen,G.H., Vogel, C. and Abel,J. (2002) Prostaglandin Synthases. In: Ioannides,C. (ed.), *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. John Wiley and Sons, pp. 189 - 227

De Groene,E.M., Hassing,I.G.A.M., Bloom,M.J., Seinen,W., Fink-Gremmels,J. and Horbach,G.J. (1996a) Development of Human Cytochrome P450-expressing cell lines: application in mutagenicity testing of ochratoxin A. *Cancer Res.*, **56**, 299 – 304

De Groene,E.M., Jahn,A., Horbach,G.J. and Fink-Gremmels,J. (1996b) Mutagenicity and genotoxicity of the mycotoxin ochratoxin A. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **1**, 21-26

Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. (Hrsg) (1996) *Ernährungsbericht 1996* Frankfurt/Main. Kapitel 4.3 (Rückstände und Verunreinigungen in Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft) und 4.4 (Schimmelpilze in und auf Lebensmitteln), pp. 121-141

DeWitt,D.L., El-Harith,E.A., Kraemer, S.A., Andrews,M.J., Yao,E.Y., Armstrong,R.L. and Smith,W.L. (1990) The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthase. *J. Biol. Chem.*, **265**, 5192-5198

DFG (1990) Ochratoxin A: Vorkommen und toxikologische Bewertung. Mitteilung 12 der Senatskommission zur Prüfung von Lebensmittelzusatz- und -inhaltsstoffen, VCH, Weinheim

Dirheimer,G. (1998) Recent advances in the genotoxicity of mycotoxins. *Revue Med. Vet.*, **149**, 605 – 616

Dirheimer,G. and Creppy,E.E. (1991) Mechanism of action of ochratoxin A. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 171-186

Dörrenhaus,A. and Föllmann, W. (1997) Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. *Arch. Toxicol.* **71**, 709-13

Dörrenhaus,A., Flieger, A., Golka, K., Schulze, H., Albrecht, M., Degen, G.H. and Föllmann, W. (2000) Induction of unscheduled DNA synthesis in primary urothelial cells by the mycotoxin ochratoxin A. *Toxicol. Sci.*, **53**, 271-277

Dopp,E., Müller, J., Hahnel, C., and 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**, 713-21

Doster,R.C., Sinnhuber,R.O and Wales,J.H (1972) Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxins A and B in rainbow trout. *Food Cosmet. Toxicol.*, **10**, 85-92

Doster,R.C., Sinnhuber,R.O and Pawlowksi,N.E (1974) Acute intraperitoneal toxicity of ochratoxin A and B and derivatives in rainbow trout. *Food Cosmet. Toxicol.*, **12**, 499-505

Eastmond,D.A. and Tucker,J.D. (1989) Kinetochores localization in micronucleated cytokinesis-blocked Chinese hamster ovary cells: a new and rapid assay for identifying aneuploidy-inducing agents. *Mutat. Res.*, **224**, 517-525

Eaton,D.L. and Gallagher,E.P. (1994) Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu. Rev. Toxicol.*, **34**, 135-172

Ekman,B., Sjödin,T. and Sjöholm,I., (1980) Binding of drugs to human serum albumin-XV. Characterization and identification of the binding sites of indomethacin. *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1759-1765

Eling,T.E., Thompson,D.C., Foureman,G.L., Curtis,J.F. and Hughes,M.F. (1990) Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 1-45

Europäische Gemeinschaft (2002): Verordnung 472/2002 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Konaminanten in Lebensmitteln. Veröffentlicht im Amtsblatt L 75, pp. 18 - 20

Fenech,M and Morley,A.A (1985) Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, **147**, 29-36

Fink-Gremmels,J. (1994) Mykotoxine in der Ätiologie humaner Erkrankungen. *Ernährungs-Umschau*, **41**, 226-229

Fletcher,B.S., Kujubu,D.A., Perrin,D.M. and Hershman,H.R. (1992) Structure of the mitogen-inducible TIS 10 gene and demonstration that the TIS 10-encoded protein is a functional prostaglandin G/H synthase. *J. Biol. Chem.*, **267**, 4338-4344

Föllmann,W. and Lucas, S. (2003) Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian *in vitro* mutagenicity test system. *Arch. Toxicol.* (in press)

- Föllmann,W., Hillebrand,I.E., Creppy,E.E. and Bolt,H.M. (1995) Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PU-BEC) treated with ochratoxin A and alpha. *Arch. Toxicol.*, **69**, 280-286
- Foth,J. (1992) Untersuchungen zur Kooxidation von Fremdstoffen in einer Prostaglandin-H-Synthase kompetenten Zelllinie. Dissertation, Würzburg
- Frank,H.K. (1991) Food contamination by ochratoxin A in Germany. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 77-81
- Freyberger,A. and Degen,G.H. (1989a) Covalent binding to proteins of reactive intermediates resulting from prostaglandin H synthase-catalyzed oxidation of stilbene and steroid estrogens. *J. Biochem. Toxicol.*, **4**, 95-103
- Freyberger,A. and Degen,G.H. (1989b) Prostaglandin H synthase catalyzed formation of reactive intermediates from stilbene and steroid estrogens: covalent binding to proteins. *Arch. Toxicol., Suppl.* **13**, 206-210
- Freyberger,A., Schnitzler,R., Schiffmann,D. and Degen,G.H. (1987) Prostaglandin-H-synthase competent cells derived from ram seminal vesicles: a tool for studying cooxidation of xenobiotics. *Mol. Toxicol.*, **1**, 503-512
- Friis,C., Brinn,R. and Hald,B. (1988) Uptake of ochratoxin A by slices of pig kidney cortex. *Toxicology*, **52**, 209-217
- Fuchs,R., Appelgren,L.-E. and Hult,K. (1988 a) Distribution of ¹⁴C-ochratoxin A in the mouse monitored by whole-body autoradiography. *Pharmacol. Toxicol.*, **63**, 355-360
- Fuchs,R., Radic,B., Peraica,M., Hult,K. and Plestina,R. (1988 b) Enterohepatic circulation of ochratoxin A in rats. *Periodicum Biologorum*, **90**, 39-42
- Fuchs,R., Radic, B., Ceovic, S., Sostaric, B. and Hult, K. (1991) Human exposure to ochratoxin A. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 131-134
- Galtier,P. (1991) Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 187-200
- Galtier,P., Charpentreau,J.-L., Alvinerie,M. and Labouche,C. (1979) The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration. *Drug Metab. Dispos.*, **7**, 429-434
- Galtier,P., Camguilhem,R. and Bodin,G. (1980) Evidence for *in vitro* and *in vivo* interaction between ochratoxin A and three acidic drugs. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, **18**, 493-496
- Gate,L., Paul,J., Ba,G.N., Tew,K.D. and Tapiero,H. (1999) Oxidative stress induced pathologies: the role of antioxidants. *Biochem. Pharmacol.*, **53**, 169-180

Gautier, J.C., Richoz, J., Welti, D.H., Markovic, J., Gremaud, E., Guengerich, F.P. and Turesky, R.J. (2001a) Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chem. Res. Toxicol.*, **14**, 34-45

Gautier, J.C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B. and Turesky, R.J. (2001b) Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 1089-1098.

Gekle, M., Oberleithner, H. and 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*. *Pflügers Arch.*, **425**, 401-408

Gekle, M., Vogt, R., Oberleithner, H. and Silbernagl, S. (1994) The mycotoxin ochratoxin A deranges pH-homeostasis in Madin-Darby canine kidney cells. *J. Membrane Biol.*, **139**, 183-190

Gekle, M., Sauvant, C., Schwerdt, G. and Silbernagl, S. (1998) Tubulotoxic mechanisms of ochratoxin A. *Kidney Blood Press. Res.*, **21**, 277-279

Gekle, M., Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Wilflingseder, D., Pollack, V., Dander, M. and Schramek, H. (2000) Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 837-844.

Gillman, I.G., Clark, T.N., and Manderville, R.A. (1999) Oxidation of Ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 1066-1076

Godin, M., Fillastre, J.P., Simon, P., Francois, A., Le Roy, F. and Morin, J.-P. (1997) Is Ochratoxin A nephrotoxic in human beings? *Advances in Nephrology*, **26**, 181-206

Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, A.M., Creppy, E.E., Dirheimer, G. and Pfohl-Leschkowicz, A. (1995a) Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chem. Biol. Interact.*, **95**, 175-187

Grosse, Y., Castegnaro, M., Mace, K., Bartsch, H., Mohr, U., Dirheimer, G., Pinelli, E., Pfeifer, A. and Pfohl-Leschkowicz, A. (1995b) Cytochrome P450 isoforms implicated in ochratoxin A genotoxicity determined by DNA adduct formation. *Clin. Chem.*, **41**, 1927-1929

Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H. and Pfohl-Leschkowicz, A. (1997) Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Lett.*, **114**, 225-9

Gross-Steinmeyer, K., Weymann, J., Hege, H.G. and Metzler, M. (2002) Metabolism and lack of DNA reactivity of the mycotoxin ochratoxin A in cultured rat and human primary hepatocytes. *J. Agr. Food Chem.*, **50**, 938-945

- Gryglewski,R.L. (1979) Screening and assessment of the potency of anti-inflammatory drugs *in vitro*. In Vane,J.R., Ferreira,S.H. (eds.), *Anti-Inflammatory Drugs*. Springer, Berlin, pp. 3-43
- Guengerich,F.P. (1991) Reactions and significance of cytochrome P 450 enzymes. *J. Biol Chem.*, **266**, 10019-10022
- Hadidane,R., Bacha,H., Creppy,E.E., Hammami,M., Ellouze,F. and Dirheimer,G. (1992) Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*. *Toxicology*, **76**, 233-243
- Hagelberg,S. and Hult,K. (1989) Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J. Appl. Tox.*, **9**, 91-96
- Hald,B (1991) Ochratoxin A in human blood in European Countries. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 159-164
- Harwig,J., Kuiper-Goodman,T. and Scott,P.M. (1983) Microbiological food toxicants: ochratoxins. In Rechcigl,M. (ed), *Handbook of Food-Borne Diseases of Biological Origin*. CRC Press, Boca Raton, pp. 193-238
- Hasinoff,B.B., Rahimtula,A.D. and Omar,R.F. (1990) NADPH-cytochrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron(III)-ochratoxin A complex. *Biochim. Biophys. Acta*, **1036**, 87-81
- Haugland,R.P and Larison, K.D (eds) (1992) Molecular probes, Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 5th edition, Molecular Probes Inc., pp. 133 – 134
- Heddle,J.A. and Salamone,M.F. (1981) The micronucleus assay. I. *in vivo*. In Stich,H.F. and San,R.H.C. (eds), *Short-term tests for chemical carcinogens*. Springer Verlag, New York, pp. 243-249
- Heddle,J.A., Raj,A.S.and Krepinski,A.B. (1981) The micronucleus assay. II. *in vitro*. In Stich,H.F. and San,R.H.C. (eds), *Short-term tests for chemical carcinogens*. Springer Verlag, New York, pp. 250-254
- Hennig,A., Fink-Gremmels,J. and 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. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 255-260
- Hershman,H.R. (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta*, **1299**, 125-140
- Heussner,A.H., O'Brien, E. and Dietrich, D.R. (2002) Species- and sex-specific variations in binding of ochratoxin A by renal proteins *in vitro*. *Exp. Toxic. Pathol.*, **54**, 151-159.

- Hucker,H.B., Zacchei,A.G., Cox,S.V., Brodie,D.A. and Cantwell,N.H.R. (1966) Studies on the absorption, distribution and excretion of indomethacin in various species. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **153**, 237-249
- Hult,K. and Fuchs, R. (1986) Analysis and dynamics of ochratoxin A in biological systems. In Steyn, P.S. and Vleggar, R. (eds): *Mycotoxins and Phycotoxins*. Amsterdam, Elsevier, pp. 365-376
- Hult,K., Teiling,A. and Gatenbeck,S. (1976) Degradation of ochratoxin A by a ruminant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 443-444
- Hult,K., Plestina,R., Habazin-Novak,V., Radic.B. and Ceovic,S. (1982) Ochratoxin A in human blood and Balkan endemic nephropathy. *Arch. Toxicol.*, **51**, 313-321
- Hvidberg,E., Lausen,H.H. and Jansen,J.A. (1972) Indomethacin: plasma concentrations and protein binding in man. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, **4**, 119-124
- IARC (1993) Ochratoxin A. In IARC (ed), *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans; Some Naturally occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins*. Monograph No. 56, Lyon, pp. 489-571
- InVitTox (1990) The ERGATT/FRAME data bank of *in vitro* techniques in toxicology, protocol No. 3
- Jonsyn,F.E., Maxwell,S.M. and Hendricksen,R.G. (1995) Ochratoxin A and aflatoxins in breast milk samples from Sierra Leone. *Mycopathologia*, **131**, 121-126
- Kane,A., Creppy,E.E., Roth,A., Röschenthaler,R. and Dirheimer,G. (1986) Distribution of the [³H]-label from low doses of radioactive ochratoxin A ingested by rats, and evidence for DNA single-strand breaks caused in liver and kidneys. *Arch. Toxicol.*, **58**, 219-224
- Kanisawa,M. and Suzuki,S. (1978) Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A, a mycotoxin. *Gann*, **69**, 599-600
- Kiermeier,F. (1985) Das Mycotoxin-Problem: Ergebnisse der Lebensmittel-Überwachung. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, **180**, 389-393
- Knox,P., Uphill,P.F., Fry,J.R., Benford,J. and Balls,M. (1986) The frame multicentre project on *in vitro* cytotoxicity. *Fd. Chem. Toxic.*, **24**, 457-463
- Krogh,P. (1987) Ochratoxins in Food. In Krogh,P. (ed), *Mycotoxins in Food*, Academic Press, pp. 97-121
- Kuczuk,M.H., Benson,P.M., Heath,H. and Hayes,A.W. (1978) Evaluation of the mutagenic potential of mycotoxins using *Salmonella typhimurium* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.*, **53**, 11-20
- Kuiper-Goodman,T. and Scott,P.M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Environ. Sci.*, **2**, 179-248

- Kulmacz,R.J. and Lands,W.E.M. (1984) Prostaglandin H Synthase. Stoichiometry of heme cofactor. *J. Biol. Chem.*, **252**, 16892
- Kumagai,S. (1988) Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Fd. Chem. Toxic.*, **26**, 753-758
- Kumagai,S. and Aibara,K. (1982) Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **64**, 94-102
- Kuramochi,G., Gekle,M. and Silbernagl,S. (1997) Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and HCO₃⁻ in the tubules and vasa recta. *Pflügers Arch.-Eur. J. Physiol.*, **434**, 392-397
- Kurz,H. Trunk,H. and Weitz,B. (1977) Evaluation of methods to determine protein-binding of drugs. *Drug Res.*, **27**, 1373-1380
- Lea,T., Steien,K. and Størmer,F.C. (1989) Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, **107**, 153-159
- Lebrun,S. and Föllmann, W. (2002) Detection of ochratoxin A-induced DNA damage in MDCK cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch. Toxicol.*; **75**, 734-741
- Li,S., Marquardt,R.R., Frohlich,A.A., Vitti,T.G. and Crow,G. (1997) Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **145**, 82 - 90
- Lindner,E. (1990) Toxikologie der Nahrungsmittel, Thieme, pp. 118 - 148
- Luster,M.I., Germolec,D.R., Burleson,G.R., Jameson,C.W., Ackermann,M.F., Lamm,K.R. and Hayes,H.T. (1987) Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.*, **47**, 2259-2263
- Malaveille,C., Brun,G. and 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**, 141-147
- Markey,C.M., Alward,A., Weller,P.E. and Marnett,L.J. (1987) Quantitative studies of hydroperoxide reduction by prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.*, **262**, 6266-6279
- Marnett,L.J. (1992) Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res.*, **52**, 5575-5589.
- Marnett,L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21**, 361-370.
- Marnett,L.J. and Maddipati,K.R. (1991) Prostaglandin H synthase. In Everse,J., Everse,K. and Grisham,M. (eds.), *Peroxidases; Chemistry and Biology*. CRC Press, Boca Raton, pp. 293-334

- Marquardt,R.R. and Frohlich,A.A (1992) A review of recent advances in understanding ochratoxigenesis. *J. Anim. Sci.*, **70**, 3968-3988
- Meisner,H. (1976) Energy-dependent uptake of ochratoxin A by mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **173**, 132 – 137
- Meisner,H. and Chan,S. (1974) Ochratoxin A, an inhibitor of mitochondrial transport systems. *Biochemistry*, **13**, 2795-2800
- Meisner,H. and Krogh,P. (1986) Phosphoenol-pyruvate carboxykinase as a selective indicator of ochratoxin A induced nephropathy. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.*, **14**, 199-206
- Meisner,H., Cimbala,M and Hanson, R.W. (1983) Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase and poly(A)⁺ RNA level by ochratoxin A. *Arch Biochem. Biophys.*, **223**,264-270
- Micco,C., Ambruzzi,M.A., Miraglia,M., Brera,C., Onori,R. and Benelli,L. (1991) Contamination of human milk with ochratoxin A In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 105-108
- Moss,M.O. (1987) Mould metabolism and the production of mycotoxins. In Krogh,P. (ed), *Mycotoxins in Food*, Academic Press, pp. 30-34
- Moss,M.O. (1996) Mode of formation of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13**, suppl., 5-9
- Müller,G., Kielstein,P., Rosner,H., Bernst,A., Heller,M. and Köhler,H. (1999) Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners. *Mycoses*, **42**, 495-505
- Nesheim,S. (1969) Isolation and purification of ochratoxins A and B and preparation of their methyl and ethyl esters. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **52**, 975-979
- Nesheim,S. (1982) Analytical method 1 - Thin-layer chromatographic determination of ochratoxin A in foodstuffs. In Egan,W., Stoloff,L., Scott,P., O'Neill,I.K., Bartsch,H. and Davis,W. (eds), *Carcinogens, Selected Methods of Analysis. Volume 5: Some mycotoxins*. IARC, Lyon, pp. 255-270
- Nesheim,S., Hardin,N.F., Francis,O.J. and Langham,W.S. (1973) Analysis of ochratoxins A and B and their esters in barley,using partition and thin layer chromatography. *J. AOAC Int.*, **56**, 817-821
- Obrecht-Pflumio,S., and Dirheimer, G. (2000) *In vitro* DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chem. Biol. Interact.*, **127**, 29-44
- Obrecht-Pflumio,S., Grosse,Y., Pfohl-Leszkowicz,A. and Dirheimer,G. (1996) Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Arch. Toxicol.*, **70**, 244-248

- Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G. and Marzin, D. (1999) Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutat. Res.*, **446**, 95-102
- Omar, R.F., Hasinoff, B.B., Mejilla, F. and Rahimtula, A.D. (1990) Mechanism of ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.*, **40**, 1183-1191
- Omar, R.F., Rahimtula, A.D. and Bartsch, H. (1991) Role of cytochrome P-450 in ochratoxin A-stimulated lipid peroxidation. *J. Biochem. Toxicol.*, **6**, 203-209
- Omar, R.F., Gelboin, H.V. and Rahimtula, A.D. (1996) Effect of cytochrome P 450 induction on the metabolism and toxicity of ochratoxin A. *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 207-216
- Petkova-Bocharova, T. and Castegnaro, M. (1991) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan Endemic Nephropathy and urinary tract tumors. In Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 135-137
- Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N. and Castegnaro, M. (1988) Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary system tumours in Bulgaria. *Food Addit. Contam.*, **5**, 299-301
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Michelon, J. and Maru, V. (1991) Comparative incidence pattern of urothelium tumors in and beyond endemic nephropathy regions. In Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 83-87
- Petzinger, E. and Ziegler, K. (2000) Ochratoxin A from a toxicological perspective. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, **23**, 91 - 98
- Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1991) DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. In Castegnaro, M., Plestina, R., Dirheimer, G., Chernozemsky, I.N. and Bartsch, H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 245-253
- Pfohl-Leszkowicz, A., Grosse, Y., Castegnaro, M., Nicolov, I.G., Chernozemsky, I.N., Bartsch, H., Betbeder, A.M., Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1993a) Ochratoxin A-related DNA adducts in urinary tract tumors of bulgarian subjects. In Phillips, D.H., Castegnaro, M. and Bartsch, H. (eds), *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*. IARC, Lyon, pp. 141-148
- Pfohl-Leszkowicz, A., Weber-Lotfi, F., Masfaraud, J.F., Devaux, A., Laouedj, A., Guillemaut, P., Malaveille, C., Rether, B., Monod, G. and Dirheimer, G. (1993b) DNA adduct detection: some applications in monitoring exposure to environmental genotoxic chemicals. In Phillips, D.H., Castegnaro, M. and Bartsch, H. (eds), *Postlabelling Methods for Detection of DNA Adducts*. IARC, Lyon, pp. 373-378

- Pfohl-Leszkowicz,A., Grosse,Y., Kane,A., Creppy,E.E. and Dirheimer,G. (1993c) Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat. Res.*, **289**, 265-273
- Pfohl-Leszkowicz,A., Grosse,Y., Kane,A., Gharbi,A., Baudrimont,I., Obrecht,S., Creppy,E.E. and Dirheimer,G. (1993d) Is the oxidative pathway implicated in the genotoxicity of ochratoxin A? In Creppy,E.E., Castegnaro,M. and Dirheimer,G. (eds), *Human ochratoxicosis and its pathologies*. Colloque Inserm/John Libbey Eurotext, pp. 177-185
- Pfohl-Leszkowicz,A., Grosse,Y., Obrecht,S., Kane,A., Castegnaro,M., Creppy,E.E. and Dirheimer,G. (1993e) Preponderance of DNA-adducts in kidney after ochratoxin A exposure. In Creppy,E.E., Castegnaro,M. and Dirheimer,G. (eds), *Human ochratoxicosis and its pathologies*. Colloque Inserm/John Libbey Eurotext, pp. 199-207
- Pfohl-Leszkowicz,A., Pinelle,E., Bartsch,H., Mohr, U. and Castegnaro, M. (1998) Sex- and strain-specific expression of cytochrome P450s in ochratoxin A-induced genotoxicity and carcinogenicity in rats. *Mol. Carcinog.*, **23**, 76-85
- Pietsch,A. (1995) Untersuchungen zur Induktion von Schwesterchromatid-Austausch durch Ochratoxin A in Humanlymphozyten. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.
- Pitout,M.J. (1969a) A rapid spectrophotometric method for the assay of carboxypeptidase A. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 1829-1836
- Pitout,M.J. (1969b) The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem. Pharmacol.*, **18**, 485-491
- Pitt,J.I. (1987) *Penicillium viridicatum*, *penicillium verrucosum*, and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 266-269
- Pohland,A.E. and Wood,G.E. (1987) Occurrence of mycotoxins in food. In Krogh,P. (ed), *Mycotoxins in Food*, Academic Press, pp. 35-64
- Pohland,A.E., Nesheim,S. and Friedman,L. (1992) Ochratoxin A: a review. *Pure Appl. Chem.*, **64**, 1029-1046
- Rahimtula,A.D., Béréziat,J.-C., Bussachini-Griot,V. and Bartsch,H. (1988) Lipid peroxidation as possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **37**, 4469-4477
- Rasonyi,T. (1995) Mechanistic investigations in ochratoxin A-induced nephrotoxicity and their relevance for the sex-specific renal tumour induction in rats. Dissertation No. 11343, ETH Zürich
- Rice,J.R., Zenser,T.V. and Davis,B.B. (1985) Prostaglandin H synthase-dependent cooxidation and aromatic amine carcinogenesis. In: Marnett,L.J. (ed) *Arachidonic Acid Metabolism and Tumor Initiation*, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 125-169

- Roberts,B.A. and Patterson,D.S.P. (1975) Detection of twelve mycotoxins in mixed animal feedstuffs, using a novel membrane cleanup procedure. *J. AOAC Int.*, **58**, 1178-1181
- Rollins,T.E. and Smith,W.L. (1980) Subcellular localization of prostaglandin-forming cyclooxygenase in Swiss mouse 3T3 fibroblasts by electron microscopic immunocytochemistry. *J. Biol. Chem.*, **255**, 4872-4875#
- Romagna,F. (1993) Mikrokerntestsysteime. In Fahrig,R. (ed), Mutationsforschung und Genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, pp. 290-298
- Röschenthaler,R., Creppy,E.E. and Dirheimer,G. (1984) Ochratoxin A: on the mode of action of an ubiquitous mycotoxin. *J. Toxicol.-Toxin Reviews*, **3**, 53-86
- Ross,D., Mehlhorn,R.J., Moldeus,P. and Smith,M.T. (1985) Metabolism of diethylstilbestrol by horseradish peroxidase and prostaglandin H synthase. *J. Biol. Chem.*, **260**, 16210-16214
- Roth,A., Chakor,K., Creppy,E.E., Kane,A., Röschenthaler,R. and Dirheimer,G. (1988) Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice. *Toxicology*, **48**, 293-308
- Ruf,H.H., Schuhn,D. and Nastainczyk,W. (1984) EPR titration of ovine prostaglandin H synthase with hemin. *FEBS Lett.*, **165**, 293-296
- Scheuer,R. and Leistner,L. (1986) Occurrence of Ochratoxin A in pork and pork products. In: *Proceedings of the 32nd European Meeting of Meat Research Workers*, 24-29 August 1986, Ghent, Belgium, Vol 1, p. 191
- Schlatter,C. (1988) The importance of mycotoxins in foods. *Bibl. Nutr. Dieta* **41**, 55-65
- Schlatter,C., Studer-Rohr,J. and Rasonyi,T. (1996) Carcinogenicity and kinetic aspects of ochratoxin A. *Food Addit. Contam.*, **13**, 43 – 44
- Schuhmacher,U.S., Foth,J., Seiderer,C., Cikryt,P. and Degen,G.H. (1996) Induction of monooxygenase activity in ovine seminal vesicle cell cultures by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Toxic In Vitro*, **10**, 415-421
- Schwerdt,G., Freudinger,R., Silbernagl,S. and Gekle,M. (1999) Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. *Toxicology*, **135**, 1-10
- Scott,P.M. (1996) Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J. AOAC Int.*, **79**, 875-882
- Sies,H. (1997) Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.*, **82**, 291-295
- Skerlj,M. (1989) Binding of piroxicam to rat serum albumin. *Krka's report* No. 1612

- Slayman,C.L. and Moussatos,V.V. (1994) Endosomal accumulation of pH indicator dyes delivered as acetoxymethyl esters. *J. Exp. Biol.*, **196**, 419-438
- Smela,M.E., Hamm, M.L., Henderson, P.T., Harris, C.M., Harris, T.M. and Essigmann, J.M. (2002) The aflatoxin B1 formamidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6655-6660
- Smith,W.L. and Marnett,L.J. (1991) Prostaglandin endoperoxide synthase: structure and catalysis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1083**, 1-17
- Smith,W.L., DeWitt,D.L. and Allen, M.A. (1983) Distribution of prostaglandin I₂ synthase antigen in smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, **258**, 5922-5926
- Sophianopoulos,J.A., Durham,S.J., Sophianopoulos,A.J., Ragsdale,H.L. and Cropper,W.P. (1978) Ultrafiltration is theoretically equivalent to equilibrium dialysis but much simpler to carry out. *Arch. Biochem. Biophys.*, **187**, 132-137
- Sostaric,B. and Vukelic,M. (1991) Characteristics of urinary tract tumors in the area of Balkan endemic nephropathy in Croatia. In Castegnaro,M., Plestina,R., Dirheimer,G., Chernozemsky,I.N. and Bartsch,H. (eds), *Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumors*, IARC, Lyon, pp. 29-35
- Stein,A.F., Phillips,T.D., Kubena,L.F. and Harvey,R.B. (1985) Renal tubular secretion and reabsorption as factors in ochratoxicosis: effects of probenecid on nephrotoxicity. *J. Toxicol. Environ. Health*, **16**, 593-605
- Steinberg,J., Gainnier,M., Michel,F., Faucher,M., Arnaud,C. and Jammes,Y. (2002) The post-exercise oxidative stress is depressed by acetylsalicylic acid. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **130**, 189-199
- Steyn,P.S. (1984) Ochratoxins and related dihydroisocoumarins. In Betina,V. (ed), *Mycotoxins - Production, Isolation, Separation and Purification*. Developments in Food Science 8, Elsevier, pp 183-216
- Steyn,P.S. (1993) Mycotoxins of human health concern. In Creppy,E.E., Castegnaro,M. and Dirheimer,G. (eds), *Human ochratoxicosis and its pathologies*. Colloque Inserm/John Libbey Eurotext, pp 3-31
- Steyn,P.S. (1995) Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol. Lett.*, **82/83**, 843-851
- Stojkovic,R., Hult,K., Gamulin,S. and Plestina,R. (1984) High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochem. Int.*, **9**, 33-38
- Størmer,F.C. and Pedersen,J.I. (1980) Formation of 4-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rat liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 971-975

- Størmer, F.C., Hansen, C.E., Pedersen, J.I., Hvistendahl, G. and 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**, 1051-1056
- Størmer, F.C., Stören, O., Hansen, C.E., Pedersen, J.I. and Aasen, A.J. (1983) formation of (4R)- and (4S)-4-hydroxyochratoxin A and 10-hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1183-1187
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J. and Schlatter, C. (1995) The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Fd. Chem. Toxic.*, **33**, 341-355
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., Dietrich, D.R. (2000) Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Arch. Toxicol.*, **74**, 499-510
- Suzuki, S., Satoh, T. and Yamazaki, M. (1977) The pharmacokinetics of ochratoxin A in rats. *Japan. J. Pharmacol.*, **27**, 735-744
- Syvrtsen, C. and Størmer, F.C. (1983) Oxidation of two hydroxylated ochratoxin A metabolites by alcohol dehydrogenase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1701-1703
- Tatu, C.A., Orem, W.A., Finkelman, R.B. and Feder, G.L. (1998) The Etiology of Balkan Endemic Nephropathy: Still more questions than answers. *Environ. Health Perspect.* **106**, No. 11, 689 - 700
- Thomas, J.A., Buchsbaum, R.N., Zimniak, A. and Racher, E. (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*, **18**, 2210-2218
- Trivedi, A.B., Doi, E. and Kitabatake, N. (1992) Detoxification of ochratoxin A on heating under acidic and alkaline conditions. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 741-745
- Uchiyama, S. and Saito, Y. (1987) Protein-binding potential of ochratoxin A *in vitro* and its fluorescence enhancement. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **28**, 453-460
- Ueno, Y. (1985) The toxicology of mycotoxins. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **14**, 99-132
- van der Merwe, K.J., Steyn, P.S. and Fourie, L. (1965) Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *aspergillus ochraceus* wilh. *J. Chem. Soc.*, 7083-7088
- Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H. and van Dorp, D.A (1977) Purification and characterization of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands. *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315-331
- Varga, J., Kevei, E., Rinyu, E., Teren, J. and Kozakiewicz, Z. (1996) Ochratoxin production by *Aspergillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4461-4464
- Weber, R (1983) Mycotoxine in Lebensmitteln. *Chemie in unserer Zeit*, **17**, 146-151

- Wehner,F., Rosin-Steiner,S., Beetz,G. and Sauer,H. (1993) The anion transport inhibitor DIDS increases rat hepatocyte K^+ conductance via uptake through the bilirubin pathway. *J. Physiol.*, **471**, 617-635
- Wei,Y.-H., Lu,C.-Y., Lin,T.-N. and Wei,R.-D. (1985) Effect of ochratoxin A on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Toxicology*, **36**, 119-130
- Weill,A.E., Tisher,C.C., Conde,M.F. and Weiner,I.D. (1994) Mechanisms of bicarbonate transport by cultured rabbit inner medullary collecting duct cells. *Am. J. Physiol.*, **266** (Renal Fluid Electrolyte Physiol. 35), F466-F476
- WHO (1990) Selected mycotoxins: Ochratoxins, Trichothecenes, Ergot. *Environmental Health Criteria* **105**, Geneva, pp. 29-68
- WHO (2001) Ochratoxin A. In: *Safety evaluations of certain mycotoxins in food*, WHO Food Additives Series 47, FAO Food and Nutrition Paper 74, IPCS International Programme on Chemical Safety, WHO, Geneva
- Wild,D. and Degen,G.H. (1987) Prostaglandin H synthase-dependent mutagenic activation of heterocyclic aromatic amines of the IQ-type. *Carcinogenesis*, **8**, 541-545
- Wolff,J., Bresch,H., Cholmakow-Odechtel, C., Engel,G., Erhardt,S., Gareis,M., Majerus,P., Rosner,H., Scheuer,R. (2000) Belastung des Verbrauchers und der Lebensmittel mit Ochratoxin A. Abschlußbericht (Teilaspekte wurden beim 21. Mykotoxin Workshop in Jena vorgestellt, vgl. Proceedings)
- Wolz,E. (1995) Untersuchungen zur metabolischen Aktivierung von 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin durch Prostaglandin H Synthase. Dissertation, Würzburg
- Wolz,E., Wild,D. and Degen,G.H. (1995) Prostaglandin-H synthase mediated metabolism and mutagenic activation of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f] quinoline (IQ). *Arch. Toxicol.*, **69**, 171-179
- Würgler,F.E., Friederich,U. and Schlatter,J. (1991) Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cnestine in *Salmonella typhimurium* TA 102. *Mutat. Res.*, **261**, 209-216
- Xiao,H., Madhyastha,S., Marquardt,R.R., Li,S., Vodela,J.K., Frohlich,A.A. and Kemppainen,B.W. (1996) Toxicity of ochratoxin A , its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **137**, 182-192
- 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**, 59-67

8 Anhang

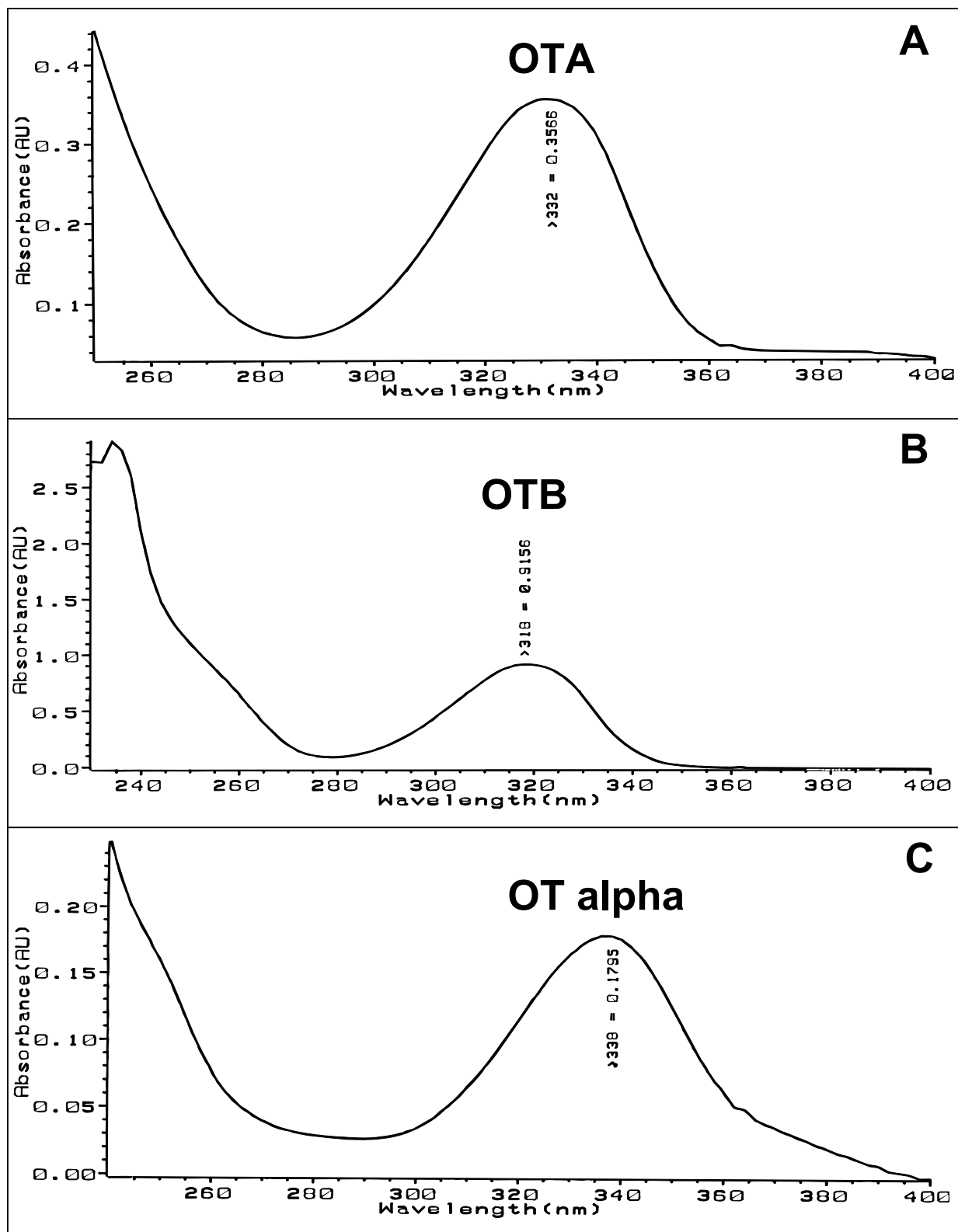


Abb. 43: Typische Spektren von (A) 6,50 mM OTA, (B) 13,65 mM OTB und (C) 0,32 mM OT alpha

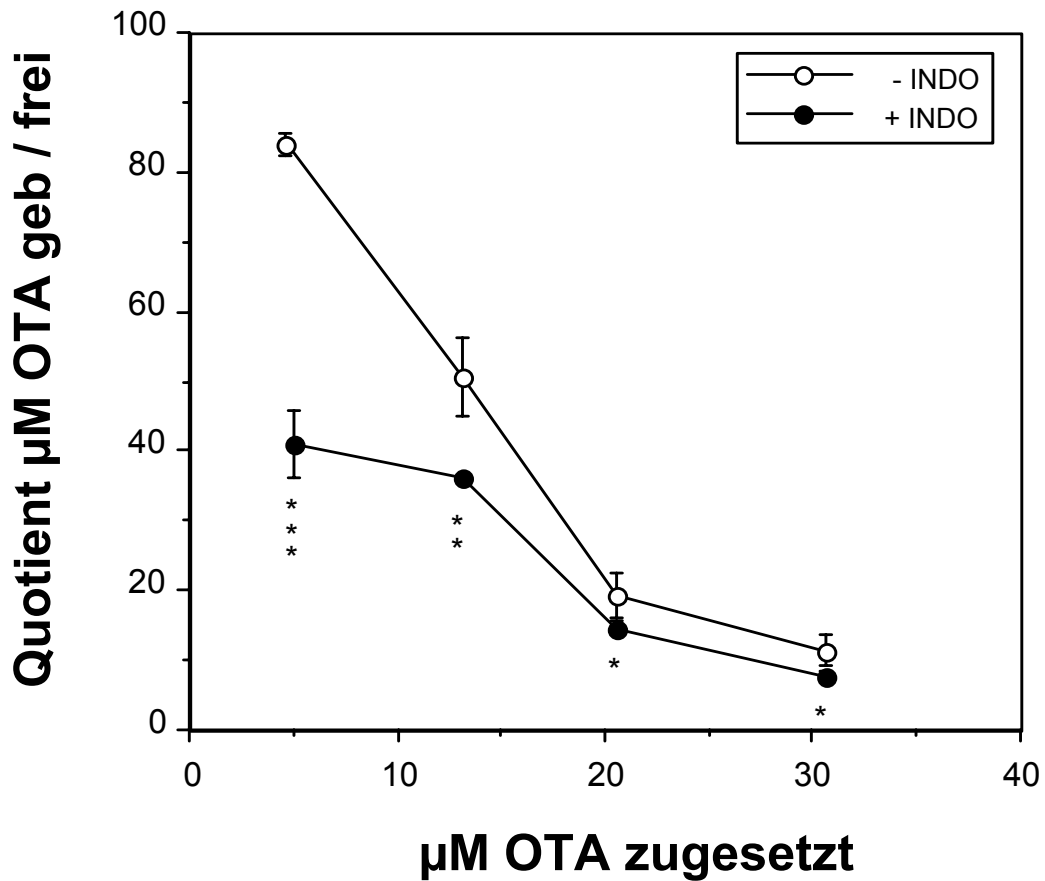


Abb. 44: Verdrängung von OTA (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch Indometazin (50 μM) aus der Bindung an Serumproteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 2,5 % FCS im Medium

* bzw. ** bzw. ***: signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$ bzw. $p \leq 0,001$) nach t-Test

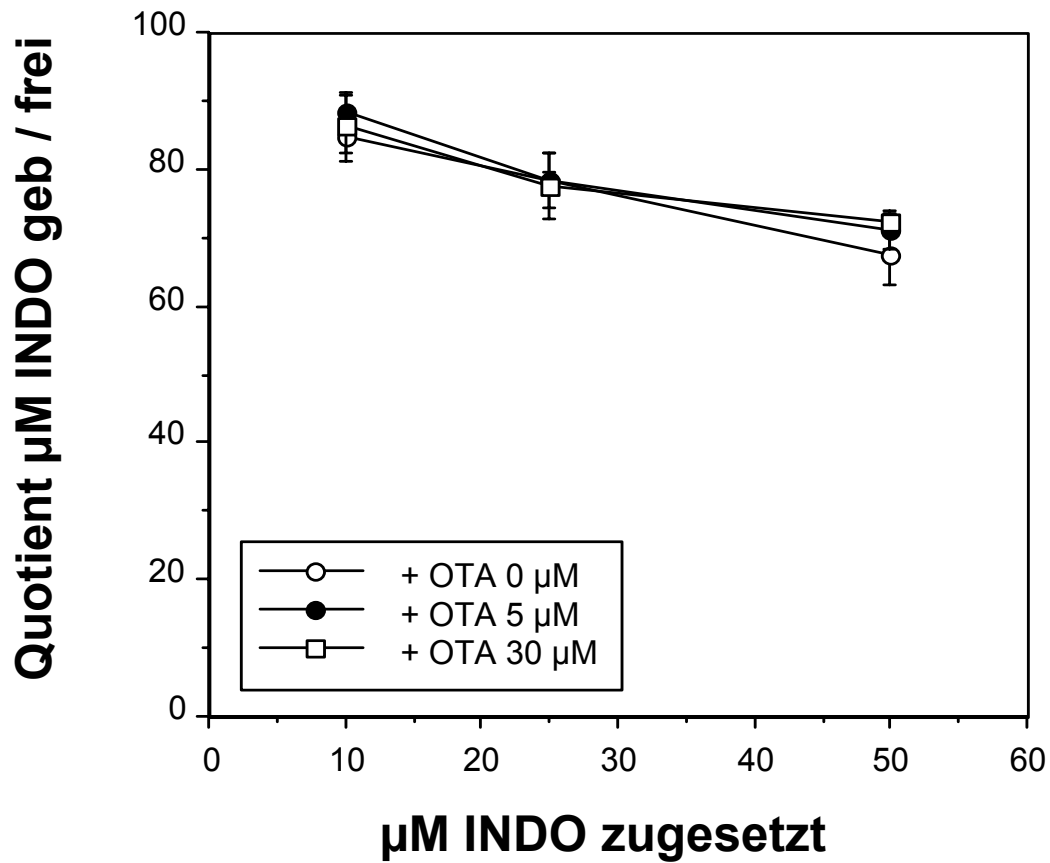


Abb. 45: Verdrängung von Indometazin (in unterschiedlichen Konzentrationen) durch OTA (5 bzw. 30 µM) aus der Bindung an Proteine des Zellkulturmediums. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus jeweils triplikaten Ansätzen bei 10 % FCS im Medium

Lebenslauf

Name Stephanie Stock
geboren am 25. 07. 1965 in Solingen

Schulbildung

1972 - 1976 Besuch der städt. Grundschule Kreuzweg in Solingen
1976 - 1985 Besuch des Gymnasiums Vogelsang in Solingen
10. 05. 1985 Abitur

Berufsbildung

März 1987 - November 1992 Studium der Oecotrophologie an der Justus Liebig-Universität Giessen

April 1991 - Mai 1992 Anfertigung der Diplomarbeit unter Leitung von Frau PD Dr. K. Ziegler, Institut für Veterinär-Pharmakologie und -Toxikologie der Universität Giessen

02. 11. 1992 Diplom, Fachrichtung Ernährungswissenschaft

01. 11. 1992 - 31. 05. 1993 Wissenschaftliche Mitarbeiterin bzw. Wissenschaftliche Hilfskraft im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. H. Daniel, Institut für Ernährungswissenschaft, Abt. Biochemie, der Universität Giessen

seit 01. 07. 1993 Promotion zum Thema " *Das Mykotoxin Ochratoxin A: Untersuchungen zu in vitro Genotoxizität und Metabolismus* " unter Leitung von Frau Prof. Dr. Dr. G. H. Degen und Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt, Institut für Arbeitsphysiologie, Abt. Toxikologie, an der Universität Dortmund

Wissenschaftliche Weiterbildung

- seit Juli 1993 Weiterbildung zur "Fachtoxikologin DGPT"
- Oktober 1994 - Oktober 1997 Kollegiatin im Graduiertenkolleg "Toxikologie und Umwelthygiene" der Heinrich Heine-Universität Düsseldorf unter Leitung von Frau Prof. Dr. R. Kahl
- seit März 1997 Mitglied der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)

Berufspraxis

01. 02.1998 - 30. 09.1999 Tätigkeit als Clinical Research Associate der Firma KFS - Klinische Forschung Scheer
- Seit 01. Oktober 1999 Tätigkeit als Clinical Research Associate der Firma 3M Medica, Neuss, Medizinische Abteilung Gruppe Immunologie, Tätigkeit im internationalen Projektmanagement

Publikationen und Vorträge

Originalarbeiten und Tagungsbeiträge:

- Stock, S., Esser, G., Klockow, D., Bolt, H.M. und Degen, G. H. (1998) Mutagenic properties of 1,2,3,4-tetrahydronaphthalene-1-hydroperoxide, a model compound for organic peroxides in Diesel exhaust.
Archives of Toxicology, **72**, 342-346
- Beier, F., Stock, S., Degen, G. H. und Urfer, W. (1997) Ein adaptives Verfahren zur Auswertung von Mutagenitätsdaten.
Informatik, Biometrie und Epidemiologie in Medizin und Biologie, **28**, 133-147
- Stock, S., Hülsemann, J., Gerber, M. M. und Degen, G. H. (1996) Zur Genotoxizität von Ochratoxin A und Analoga in Zellkulturen aus Schafsamenblasen.
In: Gareis, M. und Scheuer, R.: *Proceedings 18. Mykotoxin Workshop*, Kulmbach, 10. - 12. Juni 1996, pp. 92-96

Abstracts von Tagungsbeiträgen (Vorträge / Poster):

- Stock, S., Tinel, H., Gerber, M. M. und Degen, G. H. (1997) Increased genotoxicity of ochratoxin A in ovine seminal vesicle cell cultures in the presence of indomethacin, an inhibitor of prostaglandin H synthase.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **355**, (Suppl.), R 165
- Degen, G. H., Gerber, M. M. und Stock, S. (1996) Modulation of ochratoxin A-induced genotoxicity in ovine seminal vesicle cell cultures by serum and by indomethacin.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **353**, (Suppl.), R 127
- Stock, S., Esser, G. und Degen, G. H. (1995) Mutagenicity of tetraline-1-hydroperoxide.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., **351**, (Suppl.), R 41
- Stock, S., Hahn, A. und Ziegler, K. (1991) Transport of linear hydrophilic renin-inhibitors in isolated brush-border membrane vesicles from rat small intestine.
Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **372**, 764

Fachvortrag auf Einladung:

- “Untersuchungen zu Metabolismus und Genotoxizität von Ochratoxin A”, gehalten am Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) in Berlin am 13. 06. 1997, Einladung durch Frau Prof. Dr. Gundert-Remy

" OHNE WORTE "

Az80 hm

