

Untersuchungen zur genotoxischen und mutagenen Wirkung des Mykotoxins Patulin

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)
vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

David Schumacher

aus Marl

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Metzler
Koreferent: Prof. Dr. H. Krug

Tag der mündlichen Prüfung: 25.4.2005

Danksagung

Ich danke ...

- Herrn Prof. Dr. Manfred Metzler für die Überlassung des interessanten Themas und seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.
- Frau Dr. Leane Lehmann für die gute Betreuung, die wertvollen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- meinen Kollegen Jörg Wagner, Lars Rohnstock und Simone Höhle für Diskussion, Rat und Tat, sowie Rosi Förster und Sybille Mayer für die Arbeit in der Zellkultur.
- den Zellkulturdiplomanden Eva-Maria Brugger, Ute Franz, Magret Geller, Agneta Jan-
ecki, Thorsten Jung, Eric Lerch, Anja Restle und Aleka Vavelidou für die Unterstützung.
- Dr. Harald Esch, Dr. Stefan Kranz, Dr. Ingo Ehleben, Dr. Andreas Zeller und Dr. Holger
Blessing für die Aufmunterungen im grauen Alltag.
- Herrn Dr. Uli Hädinger für die Unterstützung und Hilfe beim Bestrahlen der Zellen, sowie
Herrn Prof. Dr. Bernd Epe (Universität Mainz, Institut für Pharmazie) und Serge Boiteux
(Commissariat à l'Énergie Atomique, Unité Mixte de Recherche 217, Centre National de
la Recherche Scientifique, Service de Radiobiologie Moléculaire et Cellulaire, Fontenay
aux Roses) für die Fpg-überexprimierenden E. coli.
- allen nichtgenannten Mitgliedern der Arbeitskreise Metzler und Hartwig, die zum Gelin-
gen dieser Arbeit beigetragen haben.
- ganz besonders meinen Eltern, die mir den Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht haben.



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Patulin	1
1.1.1	Vorkommen und Bedeutung	1
1.1.2	Toxikologie von Patulin	3
1.2	Glutathion	7
1.3	Testsysteme	9
1.3.1	Mikrokerntest	9
1.3.2	Alkalische Filterelution	12
1.3.3	Mutationstests	13
1.4	Positivkontrollen für genotoxische Substanzen	14
1.4.1	Etoposid	14
1.4.2	Mitomycin C	15
1.4.3	Ethylmethansulfonat	16
1.4.4	Quercetin	17
1.4.5	4-Nitrochinolin-N-oxid	17
1.4.6	Sichtbares Licht	18
2	Problemstellung und Zielsetzung	19
3	Ergebnisse und Diskussion	21
3.1	Mikrokerntest	21
3.2	Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels und Einfluß von Patulin auf den GSH-Spiegel	24
3.2.1	Bestimmung des intrazellulären GSH-Spiegels	24
3.2.2	Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels	25
3.2.3	Einfluß von PAT auf den intrazellulären GSH-Spiegel	28
3.3	Einfluß von PAT auf die Zellzyklusverteilung	31
3.4	Einfluß der Kulturbedingungen auf die Zytotoxizität von Patulin	38
3.5	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutationstest	39
3.6	Thymidinkinase-Mutationstest	44
3.7	Alkalische Filterelution	50
3.7.1	Etablierung der alkalischen Filterelution	50
3.7.2	Nachweis von oxidativen Schäden	54
3.7.3	Induktion von Strangbrüchen und oxidativen Schäden durch PAT	55
3.8	DNA-DNA quervernetzendes Potential	58
3.8.1	Fluorimetrische Methode	58
3.8.2	Alkalische Filterelution	61

4 Zusammenfassung	65
5 Material und Methoden	69
5.1 Geräte	69
5.2 Verbrauchsmaterialien	71
5.3 Substanzen	72
5.3.1 Synthese von GSH-Ethylester	72
5.3.2 Weitere Substanzen	73
5.4 Methoden in der Zellkultur	73
5.4.1 Zellen und allgemeine Zellkulturarbeiten	73
5.4.2 Mikrokerntest	75
5.4.3 Immunologische Färbung	75
5.4.4 Tod-Lebend-Färbung von Zellen	77
5.4.5 Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehalts	78
5.4.6 Messung der Zellzyklusverteilung	79
5.4.7 Koloniebildungsfähigkeit	80
5.4.8 HPRT-Mutationstest mit V79-Zellen	81
5.4.9 TK-Mutationstest mit Maus Lymphomzellen	83
5.4.10 Alkalische Filterelution	85
5.4.11 Untersuchung des DNA-DNA-Interstrang quervernetzenden Potentials	87
5.4.12 Detektion von DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen durch Alkalische Filterelution	88
5.5 Statistik	90
Literaturverzeichnis	91
Anhang	105
Firmen	107
Daten	109

Abkürzungsverzeichnis

6TG	6-Thioguanin
AFE	Alkalische Filterelution
AP-Stellen	apurine und apyrimidine Stellen
BSO	Buthioninsulfoximin
CIB	Chlorbiman
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DDX	DNA-DNA Interstrang-Quervernetzung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMS	Ethylmethansulfonat
ETO	Etoposid
FKS	Foetales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
GSH	Glutathion, reduzierte Form
GSH-EE	Glutathion-Ethylester
GSSG	Glutathion, oxidierte Form
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferas
MLZ	Maus Lymphomzellen
MMC	Mitomycin C
MTT	Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium
NQO	4-Nitrochinolin-N-oxid
P/S	Penizillin / Streptomycin
PI	Propidiumiodid
PS	Pferdeserum
QE	Quercetin
TFT	Trifluorthymidin
TK	Thymidinkinase



1 Einleitung

1.1 Patulin

1.1.1 Vorkommen und Bedeutung

Patulin (PAT, Abb. 1.1) wird von verschiedenen Schimmelpilzen der Gattungen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Byssoschlamys* gebildet (Gaucher, 1979), die es beim Wachstum in das umgebende Medium sezernieren (zusammengefasst unter anderem in McKinley und Carlton, 1991; WHO/JECFA, 1996).

Anfang der 40er Jahre wurde untersucht, ob PAT als Antibiotikum pilzlichen Ursprungs verwendet werden könnte (beispielsweise Waksman *et al.*, 1942; Boyd, 1944). Neben der für Bakterien toxischen Wirkung erwies sich PAT auch als toxisch für höhere Organismen. Eine fehlende Selektivität und eine geringe therapeutische Breite ließen eine medizinische Anwendung nicht zu (Stansfeld *et al.*, 1944).

PAT findet sich hauptsächlich in Obst und Gemüse, aber auch in den daraus hergestellten Lebensmitteln (Yurdun *et al.*, 2001; Ritieni, 2003; Drusch und Ragab, 2003; Beretta *et al.*, 2000; Malmauret *et al.*, 2002; Andersen *et al.*, 2004). Insbesondere braunfaule Äpfel bilden eine wichtige PAT-Quelle (Scott *et al.*, 1972). In der verfaulten Stelle wurden schon Gehalte bis

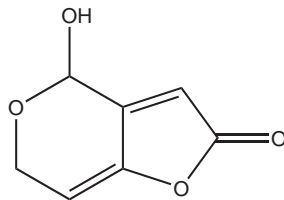


Abb. 1.1: Strukturformel von Patulin.

1 g/kg nachgewiesen (Frank *et al.*, 1976). Außerhalb dieser Stellen sind die Gehalte an PAT gering (Rychlik und Schieberle, 2001).

PAT-bildende *Penicillien* wurden auch auf Oliven nachgewiesen, in denen kein PAT nachweisbar war (Arici, 2000).

Mit der Isotopenverdünnungsanalyse kann PAT in nahezu allen handelsüblichen Apfel- und Traubensäften nachgewiesen werden (Rychlik und Schieberle, 1999). PAT ist besonders in Säften stabil, während es in anderen Lebensmitteln rasch verschwindet (Scott und Somers, 1968; Lieu und Bullerman, 1977). Eine Verarbeitung oder Zubereitung, wie Gär- und Fermentationsprozesse, Alkalisierung, Schwefelung, Aktivkohlezusatz oder Ascorbinsäurezusatz führen zu einer Inaktivierung bzw. zum Verschwinden des Mykotoxins (Bissessur *et al.*, 2001; Gökmen *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2003; Kadakal und Nas, 2002, 2003; Cañas und Aranda, 1996). Vor allem eine „gute Herstellungspraxis“ kann zu niedrigen PAT-Gehalten im Produkt führen (Jackson *et al.*, 2003; EU, 2003a).

Zum Teil tödlich verlaufende Vergiftungen von Vieh und Hühnern, denen verdorbenes Futter gegeben wurde, wurden aufgrund des gefundenen PAT, der Vergiftungssymptomatik oder der Isolation von PAT-bildenden Pilzen, dem Mykotoxin zugeschrieben (Lovett, 1972b; McKinley und Carlton, 1991). Eine PAT-Bildung in feuchtem Mulch soll für das Auslösen von Keim- und Wachstumsstörungen auf Feldern mit nicht untergepflügten Getreidestoppeln verantwortlich sein (Norstadt und McCalla, 1969). Es besteht der Verdacht, daß PAT für die „Bodenmüdigkeit“ von älteren Apfelplantagen verantwortlich ist (Börner, 1963a,b).

Die WHO schlägt eine vorläufige tolerierbare tägliche Aufnahme (PMTDI) von 0,4 µg/kg Körpergewicht vor. Daraus wird ein Grenzwert von 50 ppb abgeleitet (WHO/JECFA, 1996). Die EU hat für Säfte und Spirituosen diesen Grenzwert festgelegt; in Erzeugnissen aus Äpfeln für Säuglinge und Kleinkinder liegt der Grenzwert bei 10 ppb (EU, 2004, 2003b).

Höhere PAT-Gehalte, als es die Grenzwerte in der EU erlauben, sind selten (Majerus und Kapp, 2002; Lai *et al.*, 2000). Die tägliche Aufnahme von PAT in Deutschland liegt zwischen 20 und 70 ng/kg KG und Tag (Majerus und Kapp, 2002).

1.1.2 Toxikologie von Patulin

Akute Toxikologie

Akut toxische Effekte von PAT äussern sich hauptsächlich durch Kapillarschäden und Ödembildung in zahlreichen inneren Organen wie Hirn, Lunge, Leber, Milz, Verdauungstrakt sowie im Bauchraum. Zuvor werden Hyperaktivität, Krämpfe, Blutdruckabfall, Lähmungen, Atemnot, Cyanose der Extremitäten, sowie eine verstärkte Sekretion aus Nase und Augen beobachtet. Die für die Hälfte der Tiere tödliche Dosis (LD_{50}) liegt im Bereich von 5 – 25 mg/kg KG bei intraperitonealer, subkutaner und intravenöser Injektion, bzw. 30 – 40 mg/kg KG bei oraler Applikation (zusammengefasst in WHO/JECFA, 1996).

An der Injektionsstelle sowie im Kaninchenhauttest werden Erytheme, Ödeme, Vereiterungen und Nekrosen beobachtet. Im Draize-Test führt eine 1%ige PAT-Lösung zu eitriger Bindehautentzündung, Ödembildung sowie Abrasionen und bleibenden Trübungen der Hornhaut (Stansfeld *et al.*, 1944; Broom *et al.*, 1944).

Eine Hautsalbe mit 1% PAT verursachte beim Menschen Hautödeme (Stott und Bullerman, 1975); etherische Lösungen mit 0,0005% PAT-Gehalt führten zu deutlichen Hautirritationen (de Witt, 1946). Nach Applikation von PAT mit einem Pflaster kam es zu starken Schwellungen und Hautverletzungen, sowie einige Monate später zum Keloid (Dalton, 1952). Zur Therapie von Erkältungen wurde der Nasen-Rachen-Raum mit einer etwa 0,1%igen PAT-Lösung gespült, was zu starken Schmerzen geführt hat (Gye, 1943). Es kam zu Magenbeschwerden und Erbrechen nach oraler Gabe einer nicht genannten PAT-Menge (Walker und Wiesner, 1944; Freerksen und Bonicke, 1951; de Rosnay *et al.*, 1952).

Kanzerogenität

Dickens und Jones (1961) berichten von Auftreten von Fibrosarkomen an der Injektionsstelle nach wiederholter subkutaner Gabe von PAT an Ratten. Eine orale Verabreichung von PAT an Ratten und Mäusen führte hingegen zu keinen malignen Entartungen; zudem konnten weder transplazentare Effekte, noch Effekte auf die Stillzeit beobachtet werden (Osswald *et al.*, 1978; Becci *et al.*, 1981). Ein Initiations-Promotions-Kurzzeittest an der Rattenleber gab bei oral verabreichtem PAT Hinweise auf eine initiiierende Wirkung (Imaida *et al.*, 1982).

Die *International Agency for Research on Cancer* (IARC) sieht keine ausreichende Datenlage für die Kanzerogenität von PAT im Tiermodell, auch konnte keine Evaluierung der Kanzerogenität von PAT am Menschen vorgenommen werden (IARC, 1986).

Teratogenität

In Ratten und Mäusen erwies sich PAT erst in maternal toxischen Dosen als embryotoxisch, nicht jedoch teratogen (Daily *et al.*, 1977b; Reddy *et al.*, 1978; Hayes *et al.*, 1979). Roll *et al.* (1990) berichten hingegen von leicht teratogenen Wirkungen bei Mäusen in Form von Gaumenspalten und Missbildungen der Niere. Intraperitoneale Injektionen von PAT während des 8. bis 11. Trächtigkeitstages führt bei Mäusen zu einer erhöhten Rate von Fetusresorptionen sowie zu Mißbildungen insbesondere des Gaumens, der Schädeldecke und der Wirbelsäule (Sugiyanto *et al.*, 1993). An Rattenembryokulturen wurden Wachstumsstörungen, Mißbildungen von Mittel- und Kleinhirn sowie Unterkiefer beobachtet (Smith *et al.*, 1993). Bei Hühnerembryos wurden besonders an den Extremitäten Fehlbildungen beobachtet nach Applikation von PAT in die Luftblase des Eies (Ciegler *et al.*, 1976, 1977).

Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung

Nach oraler Gabe von ^{14}C -markiertem PAT wurde ein Großteil der Radioaktivität innerhalb von 24 h in Faeces und Urin ausgeschieden. Etwa 1-2% der Dosis wurde als CO_2 abgeatmet. Die im Körper verbleibende Radioaktivität ist hauptsächlich an Erythrozyten gebunden (Daily *et al.*, 1977a). Studien an Hühnern zeigten eine Verteilung von ^{14}C in allen essbaren Teilen der Tiere einschließlich der Eier, wobei nach Absetzen der Fütterung die Radioaktivität rasch ausgeschieden wird (Lovett, 1971, 1972a). Weder im Urin der Ratten noch in den Hühnereiern konnte PAT selbst nachgewiesen werden.

Nach oraler Gabe an Ratten und Kaninchen wurde ebenfalls kein unverändertes PAT in Blut, Urin, Dick- und Dünndarmsaft, Kot und Lymphe gefunden (Freerksen und Bonicke, 1951). *In vitro* inaktivieren Blut sowie Gewebehomogenate (insbesondere von Leber und Niere) rasch die antibiotischen Eigenschaften von PAT. Hitzedenaturierung der Gewebehomogenate oder des Blutes führen zur deutlichen Verminderung des Effekts, was für eine Beteiligung von Enzymen spricht (Freerksen und Bonicke, 1951).

An Freiwillige wurde PAT enthaltender Apfelsaft gegeben (Dosis: 50 μg); eine Stunde nach Einnahme wurde der PAT-Gehalt im Serum gemessen. Es wurde kein PAT gefunden (Rychlik, 2003).

Am isoliert perfundierten Rattenmagen wurde die Aufnahme von unverändertem PAT beobachtet. Die Dosis (350 bzw. 3,5 mg/l) im Magen nahm innerhalb von 55 min um 26 bzw. 29% ab, davon wurden 17 bzw. 2% PAT in der Perfusionslösung wiedergefunden (Rychlik *et al.*, 2004).

Cytochrom P-450-abhängige Enzyme des Fremdstoffmetabolismus der Leber von Ratte und Maus wurden nicht oder kaum durch PAT induziert (Siraj *et al.*, 1980; Kangsadalampai *et al.*, 1981).

Fliege und Metzler (2000b) haben die Konjugation von PAT mit biologischen Molekülen näher untersucht. Sie haben dabei die Reaktion von PAT mit Glutathion beobachtet und die chemische Struktur der Reaktionsprodukte aufgeklärt. PAT kann mit bis zu drei Molekülen des Thiols reagieren (Fliege und Metzler, 2000a). Auch die Quervernetzung von Rinderserumalbumin wurde beobachtet (Fliege und Metzler, 1999).

Diese und andere Metabolite wurden jedoch bisher nicht *in vivo* oder *in vitro* nachgewiesen.

Unter anaeroben Bedingungen kann *Saccharomyces cerevisiae* PAT reduzieren, dabei entsteht E-Ascladiol und Z-Ascladiol (Moss und Long, 2002). Die Bedeutung dieser Metaboliten ist noch unklar.

Organ- und Zellkulturstudien

Durch PAT kommt es zur Wachstumshemmung und zum Absterben von Zellen. Dies betrifft maligne und nichtmaligne Zelllinien sowie primäre Zellen (zusammengefasst in Friedman, 1990; McKinley und Carlton, 1991; WHO/JECFA, 1996). In kultivierter Rattenniere und Meer-schweinchen-Nierenschnitten wurde die Zellatmung inhibiert (Andraud *et al.*, 1963; Braunberg *et al.*, 1982). Die Membranpermeabilität wird geändert sowie die Zell-Zell-Kommunikation über Gap-Junktions aufgehoben (Riley *et al.*, 1990; Riley und Showker, 1991; Riley *et al.*, 1992; Burghardt *et al.*, 1992; Barhoumi und Burghardt, 1996). PAT hemmt die DNA-, RNA- und Proteinsynthese in Rattenleber *in vivo* und *in vitro*, in Human- und Mauslymphozyten, in Kaninchen-Reticulozytenlysats sowie in Hefe (Moule und Hatey, 1977; Hatey und Moule, 1977; Hatey und Gaye, 1978; Hatey und Moule, 1979; Cooray *et al.*, 1982; Sumbu *et al.*, 1983; Robbana-Barnat *et al.*, 1989; Arafat und Musa, 1995, 1996b,a). PAT führt zur Erniedrigung des intrazellulären Glutathion-Spiegels (Riley und Showker, 1991; Barhoumi und Burghardt, 1996).

In dem Darmepithel-Modell mit CaCo 2-14-Zellen wurde durch PAT der transepitheliale Widerstand reduziert. Dies deutet auf eine Schwächung der *tight junctions* hin, damit einher geht eine Reduktion der Barrierefunktion des Epithels (Mahfoud *et al.*, 2002).

Mutagenitäts- und Genotoxizitätsstudien

Die Ergebnisse von bakteriellen Mutationstests sind uneinheitlich, zum Teil positiv, zum Teil negativ. Ein Einsatz von S9-Mix führte eher zur Entgiftung (zusammengefasst in WHO/JECFA, 1996).

In kultivierten humanen Lymphozyten, CHO-Zellen und primären Hamsterzellen wurde der Schwesterchromatidaustausch erhöht (Korte *et al.*, 1979; Korte, 1980; Cooray *et al.*, 1982; Kubiak und Kosz-Vnenchak, 1983; Liu *et al.*, 2003), nicht jedoch in V79-E-Zellen des Chinesischen Hamsters (Thust *et al.*, 1982). PAT erwies sich als negativ im DNA-Reparatur-Test in primären Ratten-, Maus- und Humanembryo-Hepatozyten (Mori *et al.*, 1984; Belitsky *et al.*, 1985), jedoch als positiv in permeabilisierten *E. coli* (Lee und Röschenthaler, 1986). Umeda *et al.* (1977) beobachtete die Mutagenität im HPRT-Gen von PAT in CH3 Mammakarzinomzellen der Maus. Bei Fruchtfliegen wurde ein geringes Auftreten von Farbmustermutanten gefunden (Belitskii *et al.*, 1983). In CHO und AWRP-Zellen wurden vermehrt DNA-Einzelstrangbrüche detektiert (Stetina und Votava, 1986) sowie in HeLa- und in FM3A-Zellen Einzel- und Doppelstrangbrüche (Umeda *et al.*, 1972, 1977). In menschlichen Embryonierenzellen HEK 293 wurde ein Anstieg von Strangbrüchen und oxidativen Schäden beobachtet (Liu *et al.*, 2003).

Über die Induktion von Chromosomen-Aberrationen in verschiedenen Zelllinien und im Knochenmark des Chinesischen Hamsters wurde berichtet (Umeda *et al.*, 1977; Thust *et al.*, 1982; Roll *et al.*, 1990; Liu *et al.*, 2003). Auch führt die Inkubation mit PAT zur Induktion von Mikrokernen (Alves *et al.*, 2000). Es wurden Kinetochor-positive und -negative Mikrokerni induziert (Pfeiffer *et al.*, 1998), auch das „Verkleben“ der Chromatiden wurde beobachtet.

Toxische Effekte an subzellulären Systemen

In Studien auf subzellulärer und molekularer Ebene wird von einer Vielzahl toxischer Effekte berichtet. Durch PAT werden praktisch alle darauf untersuchten Enzyme in Zellextrakten oder Isolaten gehemmt (zusammengefasst in WHO/JECFA, 1996), beispielsweise die Decarboxylierung von Pyruvat durch Hefeextrakt; die Atmungsaktivität in zellfreiem Meerschweinchen-Hirnextrakt; die Na/K-ATPase in der Harnblase von Kröten; die Na/K-ATPase und die Mg-ATPase in Leber-, Nieren- und Hirnfraktionen von Mäusen; die ATPase-Aktivität humaner Erythrozyten; die Farnesyl-Protein-Transferase aus Rattenhirn; Succinat-Oxidase und -Dehydrogenase, NADH-Oxidase, Succinat-Cytochrom c-Reductase, Cytochrom-Oxidase-Aktivität in zellfreiem *Claviceps purpurea*-Extrakten; Aldolase; Alkoholdehydrogenase; Milchsäuredehydro-

genase, Urease; Phenylalanyl-, Valyl- und Aspartyl-tRNA-Synthetase; RNA-Polymerase I und II, Ribonuclease H.

Desweiteren wird über die Inaktivierung der biologischen Funktion von Proteinen berichtet. Die Polymerisationsfähigkeit des Zellstrukturproteins Tubulin zu Spindeln geht durch PAT-Behandlung verloren (Pfeiffer *et al.*, 1998).

Eine mögliche direkte Schädigung von DNA durch PAT wurde demonstriert (Fliege, 1999).

1.2 Glutathion

Glutathion (Abb. 1.2) ist ein ubiquitär vorkommendes Tripeptid (γ -Glutamyl-L-cysteinyl-glycin). Es besitzt aufgrund seiner Thiol-Gruppe vielfältige biologische Funktionen (Abb. 1.3). Die Biosynthese in Zellen beginnt mit der Verknüpfung der γ -Carboxylgruppe der Glutaminsäure mit Cystein durch die γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase und endet mit der Konjugation mit Glycin durch die Glutathionsynthetase (zusammengefasst in Anderson, 1998; Deneke und Fanburg, 1989).

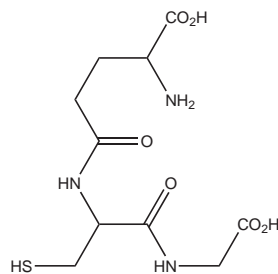


Abb. 1.2: Strukturformel von Glutathion.

In Säugerzellen liegt Glutathion in Konzentrationen von bis zu 10 mM vor. Normalerweise liegen über 99% des Glutathions in reduzierter Form (GSH) vor, ein kleiner Teil liegt in der oxidierten Form (GSSG) vor. Das Gleichgewicht zwischen GSH und GSSG ist wichtig für den Redox-Status von Zellen, Glutathion schützt viele thiolhaltige Enzyme vor Oxidation und der damit verbundenen Inaktivierung (Abb. 1.3). Das Gleichgewicht wird durch die Glutathion-Reduktase aufrechterhalten (zusammengefasst in Meister, 1995b).

Eine wichtige Funktion von Glutathion im Fremdstoffmetabolismus ist die Konjugation mit elektrophilen Metaboliten; neben der Entgiftung wird dadurch die Hydrophilie erhöht (Abb. 1.3).

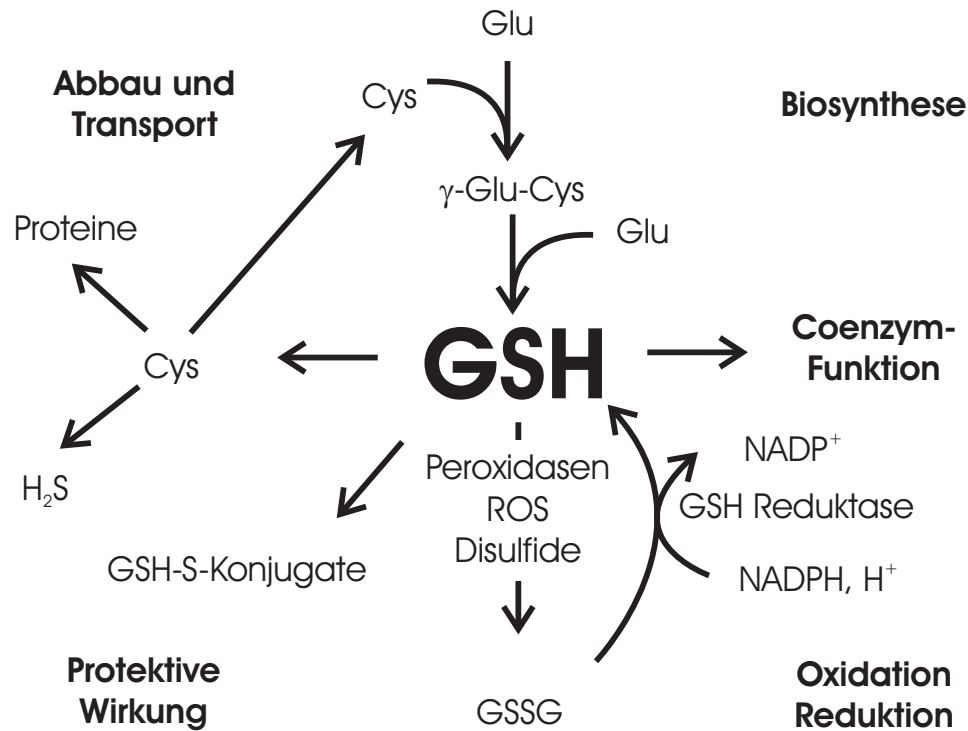


Abb. 1.3: Überblick über die Beteiligung von Glutathion an verschiedenen zellulären Stoffwechselwegen (nach Meister, 1995b; Anderson, 1998). Für Erläuterungen siehe Text.

Diese Reaktionen laufen zum Teil spontan ab, zum Großteil werden sie durch Glutathion-S-Transferasen katalysiert. Die Konjugate werden entweder direkt ausgeschieden, oder treten nach Abspalten von Glycin und Glutamat sowie Acetylierung als Mercaptursäuren im Harn auf.

Eine Erniedrigung des GSH-Spiegels kann durch die Hemmung der Synthese erfolgen. Der geschwindigkeitbestimmende Schritt bei der Biosynthese ist die durch γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase katalysierte Reaktion. Bei zu hohen GSH-Spiegeln wird die Aktivität der γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase herunterreguliert und damit die Biosynthese gehemmt. Die γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase kann selektiv durch Buthioninsulfoximin (Abb. 1.4) gehemmt werden. Dann nimmt der Glutathionspiegel mit der Zeit ab (zusammengefasst in Anderson, 1998; Meister, 1995a).

Eine Erhöhung des Glutathionspiegels kann prinzipiell auf zwei Wegen erfolgen. Entweder (1) kann die Biosynthese gesteigert werden, beispielsweise durch Supplementierung von N-Acetylcystein oder γ -Glutamylcystein (zusammengefasst in Anderson, 1998). Oder (2) es werden

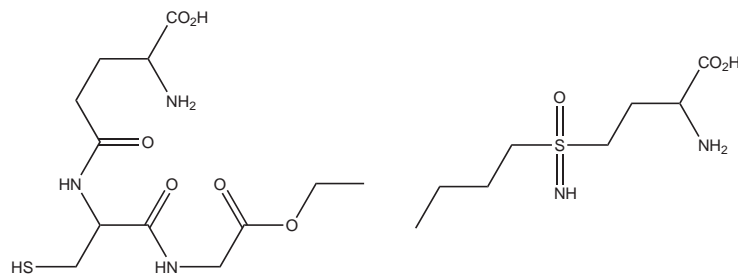


Abb. 1.4: Strukturformeln von Glutathion-Ethylester (links) und Buthioninsulfoximin (rechts).

von der Glutathion-Homöostase unabhängige Stoffwechselwege eingesetzt; durch Gabe eines membrangängigen Glutathionesters (Abb. 1.4) kann der Glutathion-Spiegel recht hoch ansteigen, da der Ester nur enzymatisch in Glutathion und den Alkohol gespalten werden muss. Die Esterase-Aktivität ist unabhängig von der Glutathion-Regulation (Anderson *et al.*, 1985; Anderson und Meister, 1989).

Der Abbau von Glutathion basiert auf der enzymatischen Spaltung der Peptidbindungen. Die einzelnen Aminosäuren können dann erneut verwendet, oder weiter abgebaut werden. Im Rahmen des Katabolismus wird Cystein durch die Cystein-Desulphydrase oder die Cystathionin β -Lyase in Pyruvat und Schwefelwasserstoff abgebaut (Michal, 1993).

Auf Stress können Zellen mit erhöhten Glutathion-Spiegeln reagieren. Dabei wird unter anderem die Expression der Gene für die γ -Glutamyl-Cysteinyl-Synthetase erhöht (beispielsweise Huang *et al.*, 2001, 2000; Kurozumi *et al.*, 2003; Kojima *et al.*, 2000).

1.3 Testsysteme

1.3.1 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein weitverbreitetes und etabliertes Testsystem für die Prüfung von Substanzen auf Genotoxizität. Dabei werden kultivierte Zellen mit der Substanz inkubiert; nach Fixieren der Zellen und Anfärben der Kerne werden die Zellen mikroskopisch auf das Vorhandensein von Mikrokerneln hin untersucht (Parry, 1998).

Mikrokerne sind chromatinhaltige Partikel, die zusätzlich zum Hauptkern in Zellen vorkommen.

Sie bestehen aus ganzen Chromosomen oder Chromosomenbruchstücken, dieses kann einen Hinweis auf die Substanzwirkung geben. Der Nachweis von ganzen Chromosomen erfolgt durch Markierung der Kinetochorproteine mittels Antikörpern (CREST-Antikörper). Werden durch eine Substanz vor allem „Kinetochor-positive“ Mikrokerne induziert, liegt eine aneuploidogene Wirkung vor, diese steht im Gegensatz zur einer klastogenen (chromosomenbrechenden) Wirkung, bei der hauptsächlich „Kinetochor-negative“ Mikrokerne induziert werden.

Mikrokerne liegen in der Nähe des Hauptkerns, nicht weiter als der dreifache Hauptkerndurchmesser, die Größe sollte weniger als ein Drittel des Hauptkerndurchmessers betragen. Der Kern und Mikrokern sollen in der gleichen Fokussierungsebene liegen, einen glatten, runden bis ovalen Umriss besitzen und es sollten keine Verbindungen zwischen Haupt- und Mikrokern bestehen (Countryman und Heddle, 1976). Die Kerne sollten etwa eine gleiche Färbung besitzen und es sollten nicht mehr als drei Mikrokerne pro Zelle vorkommen.

Mikrokerne bestehen aus DNA, die bei der Zellteilung nicht in einen der Tochterkerne integriert wurden (Schultz und Onfelt, 1994). Hierfür gibt es – je nach Wirkungsmechanismus der Substanz – verschiedene Ursachen.

Die Entstehung von Kinetochor-negativen Mikrokernen kann mit der Entstehung von azentrischen Chromosomenaberrationen erklärt werden. Azentrische Chromosomenaberrationen entstehen nach Bildung von Doppelstrangbrüchen der DNA. Je nach Substanzwirkung kann dabei die Beteiligung von zellulären Enzymen nötig sein, wie von DNA-Reparaturenzymen oder Polymerasen; man spricht dann von S-Phase-abhängigen Aberrationen (zusammengefasst in Madle *et al.*, 1993).

Im Folgenden wird der Weg vom substanzinduzierten primären Schaden bis zum Doppelstrangbruch beschrieben (Abb. 1.5).

Doppelstrangbrüche-induzierende Substanzen Wenn eine Substanz Doppelstrangbrüche erzeugt, ist die DNA sofort vom „Chromatid abgetrennt“. Wenn die DNA zu Chromosomen kondensiert, ist diese DNA nicht mehr daran befestigt. Daher wird dieses Stück DNA bei der Mitose nicht zu einem der Tochterkerne hingezogen und darin integriert, es bleibt vielmehr in der Mitoseebene liegen und wird bei der Zellteilung zufällig in eine der Tochterzellen integriert.



Abb. 1.5: Schematische Darstellung der Mikrokern-Entstehung aufgrund von verschiedenen Mechanismen. Erläuterung siehe Text. Dargestellt sind die Veränderungen der Schäden durch die Zelle während der S-Phase und der Mitose. Die obere Zeile gibt den Weg wieder, wenn der Schaden während der G1/G0-Phase entsteht, die untere Zeile gibt den Weg wieder, wenn der Schaden während der G2-Phase entsteht. Die DNA ist schematisch als Chromatid bzw. Chromosom dargestellt.

Einzelstrangbrüche-induzierende Substanzen Trifft eine DNA-Polymerase bei der Replikation auf einen DNA-Einzelstrangbruch, so kann sie nicht darüber „hinwegsynthetisieren“ und bleibt stehen. Der Einzelstrangbruch kann eventuell repariert werden, damit die Replikation fortlaufen kann, wird er es aber nicht, so verbleibt ein Doppelstrangbruch in der DNA. Damit ist bei der folgenden Mitose ein Stück DNA nicht mehr mit dem entsprechenden Chromosom verbunden und kann bei der Kernteilung als Mikrokern aus den Hauptkernen verloren gehen.

Alkylanzien Alkylanzien können DNA-Basen so modifizieren, daß die N-glycosidische Bindung geschwächt wird. Diese Schwächung kann spontan oder enzymatisch zu apurinen / apyrimidinen Stellen führen. Eine apurine Stelle hemmt die DNA-Polymerase bei der Replikation. Dadurch kann ein DNA-Einzelstrangbruch entstehen. In der folgenden S-Phase kann dieser Einzelstrangbruch in einen Doppelstrangbruch überführt werden, der dann zu Mikrokernen führen kann.

DNA-DNA-Quervernetzende Substanzen Bei Quervernetzungen der DNA-Stränge können die Stränge nicht getrennt werden. Daher kann auch keine geordnete, vollständige Replikation stattfinden. Bei der Mitose können quervernetzte Chromatiden nicht getrennt werden und eventuell durch die Mitosespindel „zerrissen“ werden, auch kommt es zu DNA-Brücken zwischen den Tochterkernen.

Durch nur einfach-verknüpfte Quervernetzer werden die selben Schäden wie durch Alkylanzien erzeugt.

Reaktive Sauerstoffspezies-induzierende Substanzen Durch reaktive Sauerstoffspezies wird eine Vielzahl von verschiedenen Schäden induziert. Dazu zählen DNA-Einzelstrangbrüche und AP-Stellen. Durch reaktive Sauerstoffspezies werden auch eine Reihe von DNA-Basenmodifikationen erzeugt. Die Mechanismen mit denen diese Schäden Mikrokerne erzeugen, wurden bereits oben beschrieben.

1.3.2 Alkalische Filterelution

Zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen dient die alkalische Filterelution (AFE). Zellen werden nach der Substanzbehandlung auf einen Filter überführt und darauf lysiert. Mit einem alkalischen Puffer wird dann die DNA heruntergewaschen und der Puffer in Fraktionen aufgefangen.

Darin wird mittels eines DNA-spezifischen Fluoreszenzfarbstoffs die DNA-Menge bestimmt. Die Geschwindigkeit, mit der die DNA vom Filter gewaschen wird, ist ein Maß für die Schädigung der DNA (zusammengefasst in Kohn, 1991).

Die Methode kann mit ionisierender Strahlung auf „Rad-Äquivalente“ oder auf „Strangbrüche pro 10^6 bp“ kalibriert werden.

Mit der „klassischen“ Methode können Einzelstrangbrüche und Doppelstrangbrüche der DNA nachgewiesen werden, aber auch alkalilabile Stellen (Kohn, 1991). Alkalilabile Stellen sind DNA-Schäden, die durch Behandlung mit alkalischen Puffern in Strangbrüche überführt werden, wie AP-Stellen und alkylierte Basen.

Epe *et al.* (1993) haben die Methode so modifiziert, daß mit Hilfe von schadensspezifischen Enzymen auch andere Schäden bestimmt werden können. Durch das bakterielle DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) können 8-Hydroxyguanin und Formamidopyrimidine nachgewiesen werden (zusammengefasst in Epe, 1995). Es werden aber auch methylierte und ethylierte Basen detektiert (Speit *et al.*, 2004). Die zusätzlichen Strangbrüche, die durch das Fpg erzeugt werden, sind direkt proportional zur Anzahl oxidativer Schäden in der DNA.

Bei der Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen wird die DNA quasi länger, da zwei Einzelstränge kovalent miteinander verknüpft sind. Deshalb eluiert die DNA langsamer vom Filter. Da die Geschwindigkeit relativ langsam ist (ähnlich wie in der Kontrolle), ist kein Effekt sichtbar. Daher wird bei der Kontrolle und den substanzbehandelten Ansätzen eine definierte Menge Einzelstrangbrüche erzeugt, dann ist eine Erniedrigung der Elutionsgeschwindigkeit bei substanzbehandelten Ansätzen erkennbar (zusammengefasst in Kohn, 1991). Um Strangbrüche zu erzeugen, wird unter anderem ionisierende Strahlung (Bradley und Dysart, 1985), NaOH (Gantt *et al.*, 1985) oder ein Bleomycin-Fe(II)-Komplex (Batel *et al.*, 1993) eingesetzt.

1.3.3 Mutationstests

Zur Erfassung des mutagenen Potentials von Substanzen dienen *in vitro* Kurzzeit-Mutationstests. Dabei erwerben die Zellen eine Resistenz gegen Selektionsmarker. Häufig werden die Gene Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (in V79-Zellen, in Mauslymphomzellen) und Thymidinkinase (in Mauslymphomzellen) auf Mutationen untersucht. Dabei werden Zellen mit intaktem Gen mit der Testsubstanz inkubiert und für einige Tage weiterkultiviert. Sobald

das Wildtyp-Genprodukt abgebaut ist und nur noch das neue (mutierte) Protein vorhanden ist, werden die mutierten Zellen selektiert. Dazu werden die Zellen in ein Medium gegeben, das einen Wirkstoff enthält, der durch das Wildtyp-Protein für die Zellen giftig wird, während er in Zellen mit mutiertem Gen keine weitere Wirkung hat.

Zellen mit intaktem Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen sterben bei Inkubation mit 6-Thioguanin ab, da sie 6-Thioguanin unter anderem in die DNA einbauen (zusammengefasst in Bradley *et al.*, 1981).

Zur Selektion von Zellen mit Mutationen im Thymidinkinase-Gen werden die Zellen mit Trifluorthymidin inkubiert. Dabei wird dieses zu toxischen Metaboliten aktiviert und auch in die DNA eingebaut (Clive *et al.*, 1979).

Die Mutationen können auf verschiedenen Ursachen beruhen; es können Basenpaar- und Rasterschubmutationen sowie Deletionen detektiert werden. Normalerweise ist es nicht möglich, den Typ der Mutation zu bestimmen. Beim Thymidinkinase-Mutationstest wachsen die Zellen mit Deletionen jedoch langsamer und bilden daher kleinere Kolonien als Zellen mit Punktmutationen. Deshalb kann hier auch der Wirkmechanismus der Substanz näher eingegrenzt werden (Clements, 2000).

1.4 Positivkontrollen für genotoxische Substanzen

1.4.1 Etoposid

Etoposid (Abb. 1.6) ist ein Medikament, das als Zytostatikum eingesetzt wird. Es hemmt spezifisch die Topoisomerase II. Dabei wird der DNA-Enzym-Komplex stabilisiert, wodurch sich proteingebundene DNA-Doppelstrangbrüche bilden, die zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose führen können (Cimini *et al.*, 1997).

Ein Zusammentreffen des DNA-Enzym-Komplexes mit der Replikationsgabel führt zum Abfallen der DNA-gebundenen Topoisomerase-Untereinheiten, dieses ergibt einen Doppelstrangbruch (Kaufmann, 1998; Burden und Osheroff, 1998).

Die Topoisomerase II hat eine wichtige Funktion bei der Kondensation der Chromosomen, ist sie gehemmt, können die Chromosomen nicht (vollständig) getrennt werden (Ferguson und Baguley, 1994; Tuteja *et al.*, 1997; Kaufmann, 1998).

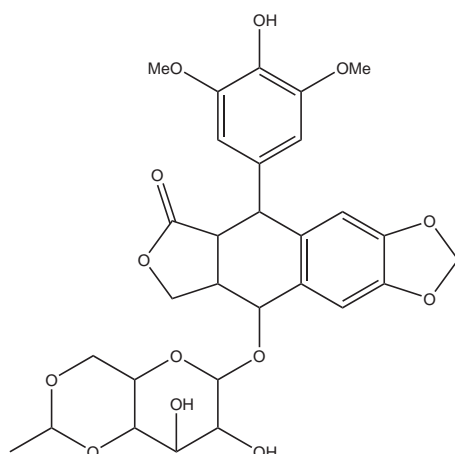


Abb. 1.6: Strukturformel von Etoposid.

1.4.2 Mitomycin C

Mitomycin C ist ein natürliches Antibiotikum, unter anderem gebildet von *Streptomyces caespitosus*. Es wird in der Tumorthherapie als Zytostatikum eingesetzt.

Mitomycin C reagiert nicht direkt mit DNA, es muß durch enzymatische oder chemische Reduktion aktiviert werden. Die enzymatische Reduktion vom Mitomycin C erfolgt durch Flavoreduktasen unter Beteiligung von NADH oder NADPH als Kofaktoren, beispielsweise der NADPH-Cytochrom c-Reduktase, der Xanthinoxidase oder der DT-Diaphorase (zusammengefasst in Kumar *et al.*, 1997).

Nach der Reduktion kommt es zu einer Reihe von spontanen Reaktionen und schließlich zur Öffnung des Aziridin-Rings (Abb. 1.7). Dieses vinyloge Chinonmethid hat eine hohe alkylierende Reaktivität. Vor allem die N²-Aminogruppe von Guanin reagiert mit Mitomycin C.

Nach der Reaktion mit DNA bildet sich ein weiteres elektrophiles Zentrum durch umgekehrte Michaelelimination des Carbamats. Diese Elektrophil kann auch mit DNA reagieren und dadurch die DNA quervernetzen. Daneben sind aber auch Monoaddukte nachweisbar. Die Monoaddukte und das interstrangquervernetzende Addukt sind die Hauptreaktionsprodukte, ein intrastrangquervernetzendes Addukt ist weniger häufig (zusammengefasst in Kumar *et al.*, 1997).

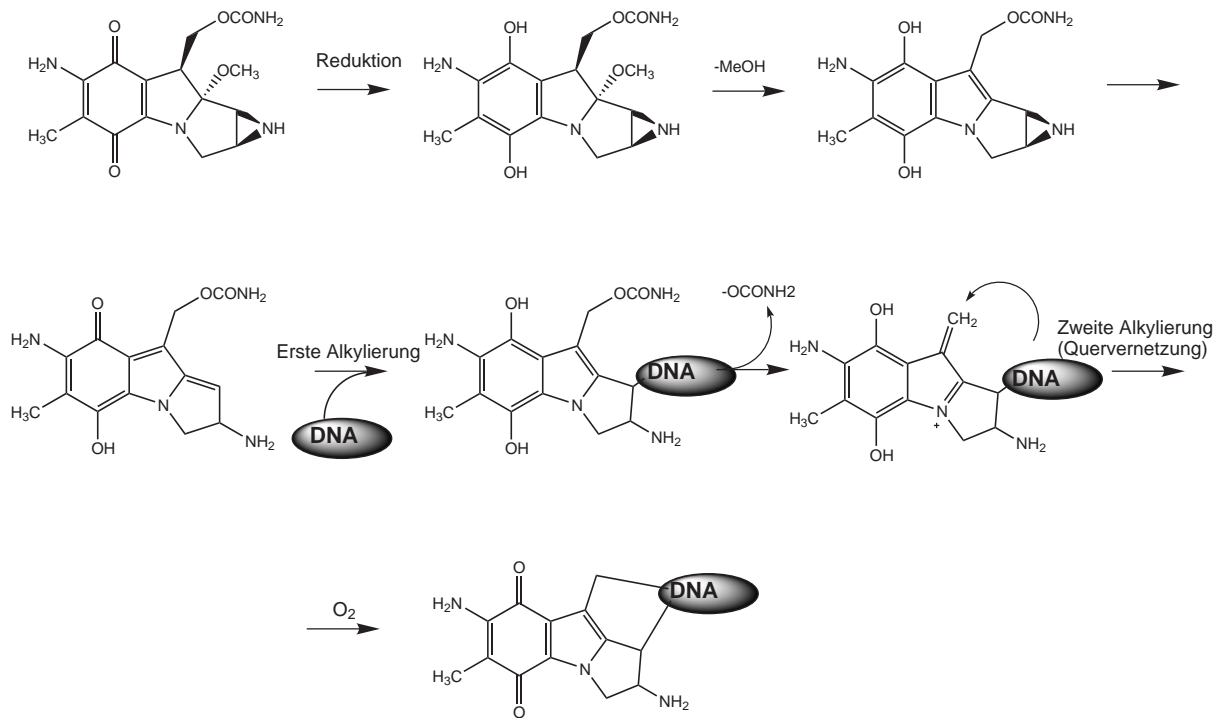


Abb. 1.7: Reduktive Aktivierung von Mitomycin C und die dadurch ermöglichte Quervernetzung von DNA (nach Tomasz, 1995).

1.4.3 Ethylmethansulfonat

Durch Ethylmethansulfonat (EMS) werden praktisch alle zellulären Nukleophile methyliert. EMS alkyliert auch DNA-Basen (Beranek *et al.*, 1980). Beispielsweise N7-Alkylguanin hat eine geschwächte glycosidische Bindung, dieses kann zu apurinen (AP-) Stellen in der DNA führen (Shuker und Farmer, 1992; Shuker und Bartsch, 1994). Werden AP-Stellen nicht repariert, können sie während der folgenden S-Phase in Einzelstrangbrüche überführt werden (zusammengefasst in Kaufmann und Paules, 1996).

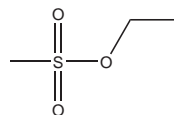


Abb. 1.8: Strukturformel von Ethylmethansulfonat.

1.4.4 Quercetin

Das Flavon Quercetin kommt in Pflanzen vor. Aufgrund der phenolischen Struktur wirkt es protektiv gegen reaktive Sauerstoffspezies. Gleichzeitig kann es aber auch reaktive Sauerstoffspezies generieren (Yamashita und Kawanishi, 2000; Koshy *et al.*, 2003), da es ein ortho-Dihydrochinon ist. Dieses Strukturmerkmal kann durch *redox cycling* Superoxidradikalanionen generieren. Dabei wird ein Semichinon durch Sauerstoff zum Chinon oxidiert und durch Reduktasen unter Einsatz von NAD(P)H zurück in das Semichinon umgewandelt (zusammengefasst in Bolton *et al.*, 2000). Superoxidradikalanion selbst ist nicht besonders reaktiv, es wird durch die Superoxid-dismutase in Wasserstoffperoxid umgewandelt, das in der Fenton-Reaktion Hydroxylradikale bildet (zusammengefasst in Epe, 1995).

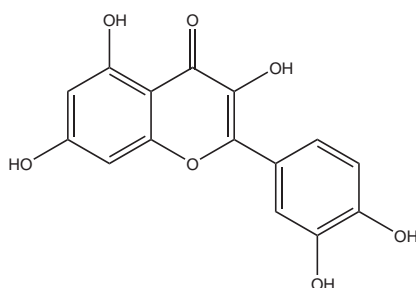


Abb. 1.9: Strukturformel von Quercetin.

Durch Hydroxyl-Radikale werden Fpg-sensitive Stellen (hauptsächlich 8-Oxo-Guanin), Formamidopyrimidine, aber auch AP-Stellen und Einzelstrangbrüche generiert (zusammengefasst in Epe, 1995).

1.4.5 4-Nitrochinolin-N-oxid

4-Nitrochinolin-N-oxid (NQO) reagiert direkt mit der DNA (hauptsächlich N², C8 von Guanin; außerdem N⁶ von Adenosin) (Lu *et al.*, 1990; Daubersies *et al.*, 1992). Dadurch wirkt es klastogen (Jones *et al.*, 1989). Inkubation von Zellen mit hohen Konzentrationen (1,3 μ M in humanen Lymphoblasten) führt zum Zellzyklusarrest und zum Zelltod (Black *et al.*, 1991). NQO-Addukte werden durch die Exzisionsreparatur entfernt (Kaina, 1993). Eine Inkubation von Zellen mit NQO kann auch zur Induktion von oxidativen Schäden führen (Kohda *et al.*, 1986; Yano *et al.*, 1995).

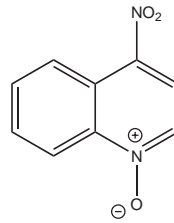


Abb. 1.10: Strukturformel von 4-Nitrochinolin-N-oxid.

Aufgrund des breiten Schadensspektrums, das NQO erzeugt, wird es als Positivkontrolle in Mutationstests eingesetzt.

1.4.6 Sichtbares Licht

Zelluläre Inhaltsstoffe wie Flavine und Porphyrine können Licht und UV-Strahlung absorbieren. Diese sind potentielle Photosensibilisatoren, die Singulett-Sauerstoff und Superoxid generieren können. Gleichzeitig können sie aber auch direkt mit der DNA reagieren (zusammengefasst in Epe, 1995).

Durch Bestrahlung von Zellen mit Licht werden viele Fpg-sensitive Stellen (möglicherweise 8-Oxo-Guanin) und T4 Endonuklease V-sensitive Stellen (Cyclobutanpyrimidin-Photodimere) generiert. Strangbrüche, AP-Stellen und Endonuklease III-sensitive Stellen (5,6-Dihydropyrimidine, 5-Hydroxy-5-methylhydantoin und andere ringkontrahierte und fragmentierte Pyrimidine) werden in geringerem Umfang gebildet (zusammengefasst in Epe, 1995; Kielbassa *et al.*, 1997).

2 Problemstellung und Zielsetzung

Das Mykotoxin Patulin wird durch Schimmelpilze der Spezies *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Byssoschlamys* gebildet. Werden Lebensmittel von diesen Spezies kontaminiert, kann in den Lebensmitteln Patulin gefunden werden. Es werden vor allem Äpfel und andere Früchte befallen, daher wird Patulin darin, aber auch in daraus hergestellten Produkten gefunden.

Aufgrund der Struktur als α, β -ungesättigtes Lakton kann Patulin mit Proteinen reagieren. Frühere Arbeiten im Arbeitskreis konnten die chemische Struktur der Reaktionsprodukte aufklären. Patulin reagiert mit Thiol- und Amino-Gruppen von Proteinen, dadurch können unter anderem Enzyme inhibiert werden.

Patulin erwies sich in *Saccharomyces*-, jedoch nicht in *E. Coli*-Mutationstests als mutagen. *In vitro* Untersuchungen an kultivierten Zellen haben ein klastogenes und aneugenes Potential aufgedeckt. *In vivo* Kanzerogenitätsstudien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Nach oraler Gabe an Ratten und Mäuse wurde keine Tumorentstehung beobachtet. Bei subkutaner Gabe an Ratten entwickelten sich Sarkome an der Injektionsstelle und bei Gabe mittels Schlundsonde in den Rattenmagen traten gutartige Tumoren im Vormagen und im Drüsenmagen auf.

Trotz der häufig beschriebenen *in vitro* Genotoxizität ist der Mechanismus dieser Wirkung von Patulin noch unbekannt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Gründe für die genotoxische Wirkung von Patulin aufzuklären.

Der Mikrokerntest ist ein wichtiges Instrument zur Erfassung von genotoxischen Substanzen. Es ist bei bestimmter Versuchsdurchführung möglich, Hinweise auf den Wirkmechanismus von Substanzen zu erhalten. Dazu muss der Zeitverlauf der Mikrokernelinduktion untersucht werden und mit dem Zeitverlauf der verschiedenen Positivkontrollen, die über unterschiedliche Mechanismen wirken, verglichen werden. Dazu sollten geeignete Positivkontrollen ausgesucht und deren Zeitverlauf der Mikrokernelinduktion untersucht werden.

Die Mikrokernentstehung selbst muss noch keine Konsequenzen für Zellen haben. Daher sollte untersucht werden, ob es nach Behandlung von Zellen auch zu Mutationen kommt. Mutationen sind wichtige Ereignisse auf dem Weg der Tumorentstehung. Dazu sollte der im Arbeitskreis bereits etablierte Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutationstest in V79-Zellen angewendet werden.

Falls dieser Test positiv ausfiel, sollte ein weiterer Mutationstest etabliert werden, der es erlaubt, die Art der DNA-Schäden näher zu charakterisieren. Dieses ist der Thymidinkinase-Mutationstest in Maus-Lymphomzellen, der die Unterscheidung von Punktmutationen und größeren Deletionen erlaubt.

Das intrazelluläre Tripeptid Glutathion spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase von Zellfunktionen. Als Thiol kann es mit Patulin reagieren. Deshalb sollte untersucht werden, ob ein erhöhter oder ein erniedrigter Glutathionspiegel Einfluß auf das mutagene Potential von Patulin hat. Auch sollte der Einfluß von Patulin auf den intrazellulären Glutathionspiegel gemessen werden.

Die beschriebenen Methoden sind eher indirekte Hinweise auf die Ursache des genotoxischen und mutagenen Potentials von Patulin. Daher sollten weitere Methoden etabliert werden, um den toxischen Mechanismus von Patulin näher zu untersuchen. Die Induktion von DNA-Strangbrüchen oder alkalilabilen Stellen und von oxidativen DNA-Basen-Modifikationen ist ein möglicher Mechanismus der Genotoxizität. Um diese Schäden detektieren zu können, sollte die Alkalische Filterelution etabliert werden. Als Positivkontrolle und zur Überprüfung der Empfindlichkeit sollte ionisierende Strahlung eingesetzt werden. Als Positivkontrolle für oxidative Schäden sollte sichtbares Licht verwendet werden.

Patulin kann in zellfreien Systemen DNA quervernetzen. Daher besteht die Möglichkeit, daß Patulin auch in kultivierten Zellen DNA-DNA-Quervernetzungen erzeugt. Auch um diese Schäden zu untersuchen, sollten Methoden etabliert werden. Zum einen sollte das Protokoll der Alkalischen Filterelution modifiziert werden, so daß diese Schäden detektiert werden können. Zum anderen sollte – auch als Kontrolle für die Alkalische Filterelution – eine fluorimetrische Methode etabliert werden, die es ebenfalls erlaubt, DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen zu detektieren. Diese basiert auf der fluorimetrischen Messung von doppelsträngiger DNA und nutzt die schnellere Renaturierung von quervernetzter DNA als von nicht-quervernetzter DNA nach Hitzedenaturierung.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein weit verbreitetes und etabliertes Testsystem für genotoxische Substanzen. Eine Substanz kann aufgrund von verschiedenen Wirkmechanismen genotoxisch wirken, wie der Alkylierung von Nukleotiden, der Induktion von Doppelstrangbrüchen, der Oxidation von Nukleotiden durch reaktive Sauerstoffspezies oder der Quervernetzung der DNA-Doppelstränge. Es wurden Substanzen ausgesucht, die durch die genannten Mechanismen genotoxisch wirken (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Positivkontrollen für genotoxische Substanzen, die aufgrund von verschiedenen Mechanismen wirken.

Wirkmechanismus	Substanz
Induktion von Doppelstrangbrüchen	Etoposid (ETO) (Kaufmann, 1998)
Alkylierung von Nukleotiden	Ethylmethansulfonat (EMS) (Beranek <i>et al.</i> , 1980)
Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies	Quercetin (QE) (Gliszczynska-Swiglo <i>et al.</i> , 2002; Koshy <i>et al.</i> , 2003; Shih <i>et al.</i> , 2004)
Quervernetzung der DNA-Stränge	Mitomycin C (MMC) (Kumar <i>et al.</i> , 1997; Warren <i>et al.</i> , 1998; Merk und Speit, 1999)

V79-Zellen wurden auf Objektträgern mit den Substanzen für 6 h inkubiert und anschließend substanzfrei nachinkubiert. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten fixiert und auf die Induktion von Mikrokerneln hin untersucht.

Der Zeitverlauf der Mikrokernbildung kann Hinweise auf den Wirkmechanismus geben. Besonders hilfreich dabei ist die Kenntnis, wieviele Zellteilungen nötig sind, bis mikrokernhaltige Zellen sichtbar werden.

Etoposid (ETO) stabilisiert den Topoisomerase II–DNA-Komplex und verhindert die Religation der DNA-Enden. Dadurch erzeugt ETO direkt DNA-Doppelstrangbrüche (zusammengefasst in Kaufmann, 1998). Nach Inkubation mit ETO ist direkt nach Substanzexposition ein Anstieg der Mikrokernrate zu beobachten (Abb. 3.1). Die Mikrokernrate zeigt ein Maximum nach der ersten Populationsverdopplung. Zu späteren Zeitpunkten ist die Mikrokernrate wieder niedriger.

Das natürliche Antibiotikum Mitomycin C (MMC) ist ein bifunktionelles alkylierendes Agens, das DNA-Interstrang-Quervernetzungen erzeugen kann. MMC muss durch Reduktion aktiviert werden (Kumar *et al.*, 1997; Tomasz, 1995). Aufgrund der quervernetzenden Wirkung ist nach der ersten Zellteilung und später (alkylierende und quervernetzende Eigenschaften) die Mikrokernentstehung zu beobachten (Abb. 3.1), da die Chromatiden bei der Mitose nicht getrennt werden können.

Ethylmethansulfonat (EMS) alkyliert DNA-Basen (Beranek *et al.*, 1980). Beispielsweise N7-Alkylguanin hat eine geschwächte glycosidische Bindung; dieses kann zu apurinen und apyrimidinen (AP-) Stellen in der DNA führen, die während der folgenden S-Phase in Einzelstrangbrüche überführt werden können. Diese Einzelstrangbrüche werden in der darauf folgenden S-Phase in Doppelstrangbrüche überführt (zusammengefasst in Kaufmann und Paules, 1996). Diese nicht mehr mit dem Genom verbundene DNA geht in der darauf folgenden Mitose aus dem Hauptkern als Mikrokern verloren (Abb. 3.1). Daher sind zwei Zellteilungen nötig, bis Mikrokerne beobachtet werden können.

Aufgrund der ortho-Dihydrochinon-Struktur von Quercetin (QE) können durch *redox cycling* reaktive Sauerstoffspezies (Superoxidradikalanionen, daraus entstehen Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale) entstehen (Koshy *et al.*, 2003). Reaktive Sauerstoffspezies können mit DNA Basenmodifikationen, AP-Stellen und DNA-Einzelstrangbrüche bilden (zusammengefasst in Epe, 1995); daher sollte der Zeitverlauf nach Inkubation mit QE ähnlich wie bei Alkylantizien aussehen (Abb. 3.1). Jedoch ist die Induktion der Mikrokernrate relativ gering, höhere Konzentrationen wirken zytotoxisch (Induktion von Apoptose und Nekrose).

Eine Behandlung von verschiedenen kultivierten Zelllinien mit PAT führt zur Induktion von Mikrokernen (Pfeiffer *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2003).

Auch in dieser Arbeit führt eine Inkubation von V79-Zellen mit PAT ab einer Nachinkubationszeit von 12 h – nach der ersten Zellpopulationsverdopplung – zu einem deutlichen Anstieg

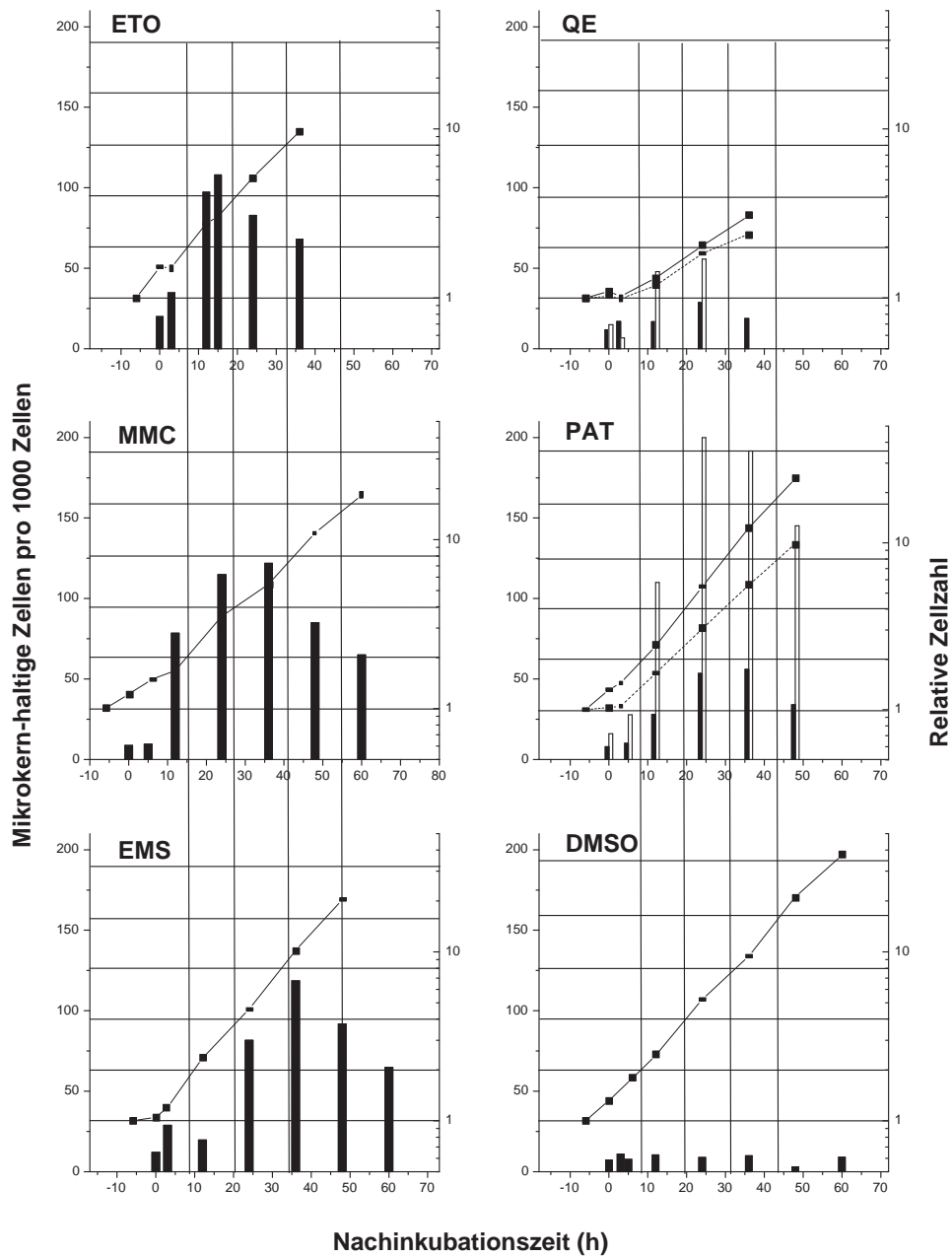


Abb. 3.1: Zeitverlauf des Auftretens von Mikrokern-haltigen Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Inkubation. V79-Zellen wurden mit Etoposid (ETO, 0,25 µM), Mitomycin C (MMC, 1 µM), Ethylmethansulfonat (EMS, 2 mM), Quercetin (QE, 25 µM (schwarzer Balken, durchgezogene Linie) und 50 µM (weißer Balken, unterbrochene Linie)), Patulin (PAT, 0,1 µM (schwarzer Balken, durchgezogene Linie) und 0,5 µM (weißer Balken, unterbrochene Linie)) für 6 h mit 1% DMSO im Medium inkubiert und mit frischem Medium nachinkubiert. Die Diagramme sind nach der Populationsverdopplung ausgerichtet. Die Balken stellen die Rate der Mikrokern-haltigen Zellen (linke Achse) dar, die Punkte (rechte Achse) repräsentieren die Zellzahl relativ zur Zellzahl beim Inkubationsstart (=1).

der Mikrokernrate (Abb. 3.1). Die Mikrokernrate steigt weiter an bis etwa 24 h substanzfreier Nachinkubationszeit und nimmt dann wieder ab. Insgesamt ähnelt dieses Profil dem Profil, wie es MMC erzeugt hat. Der relativ frühe Anstieg der Mikrokernrate kann auch auf einen direkt doppelstrangbrücherezeugenden Mechanismus hindeuten, dieses wäre unter anderem durch die Inhibition der Topoisomerase II möglich.

3.2 Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels und Einfluß von Patulin auf den GSH-Spiegel

3.2.1 Bestimmung des intrazellulären GSH-Spiegels

Zunächst wird eine durchflußzytometrische Methode zur Bestimmung des intrazellulären GSH-Spiegels etabliert. Die Methode basiert auf der Reaktion von Chlorbiman (ClB) mit GSH zu einem blafluoreszierenden Farbstoff, der dann quantifiziert wird.

Die durchflußzytometrische Methode erlaubt jedoch nur eine relative Quantifizierung, während die Bestimmung mittels Ellmans-Reagenz eine absolute Quantifizierung ergibt. Der Vergleich innerhalb einer Zelllinie, um einen substanzabhängigen Effekt zu beobachten, ist jedoch gut mittels Färbung mit ClB möglich (Cook *et al.*, 1991). Vorteilhaft bei dieser Methode ist auch, daß nur relativ geringe Zellmengen (etwa 1 Mio. Zellen gegenüber mindestens 10 Mio. Zellen) benötigt werden.

ClB wird in einer von Glutathion-S-Transferasen katalysierten Reaktion mit GSH konjugiert. Die Affinität der Nager-Enzyme ist dabei deutlich höher als die der humanen Enzyme. Daher können bei Nagerzellen relativ niedrige Farbstoff-Konzentrationen eingesetzt werden (Cook *et al.*, 1991).

Als GSH-Gehalt von V79-Zellen wurde mittels Ellmans-Reagenz etwa $2,4 \pm 1,2$ nmol pro 1 Mio. Zellen bestimmt.

Die in der Literatur beschriebenen GSH-Gehalte variieren stark. Dieses kann an der Aufarbeitung der Zellen liegen (Thioudellet *et al.*, 1995), aber auch die Zelldichte, mit der die Zellen wachsen, hat Einfluß (Schütz, 1997).

Es wurden Gehalte von etwa 4 nmol pro 1 Mio. Zellen (Prise *et al.*, 1992; Thioudellet *et al.*, 1995), aber auch Gehalte zwischen 3,6 bis 7,4 nmol pro 1 Mio. Zellen in konfluenten bzw.

3.2 Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels und Einfluß von Patulin auf den GSH-Spiegel

exponentiell wachsenden Zellen beschrieben (Romero *et al.*, 1997). In unserem Labor wurden in früheren Arbeiten 1,5 bis 4,5 nmol GSH pro 1 Mio. V79-Zellen gefunden (Schütz, 1997).

Nach Inkubation der Zellen mit ClB wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensität gemessen (Abb. 3.2). Die Fluoreszenz beim Maximum der Verteilung gilt als Maß für den GSH-Gehalt. Die Anzahl der gemessenen Signale in der Verteilung entspricht der Zellzahl im Ansatz, d. h. es läßt sich das GSH in allen Zellen anfärben.

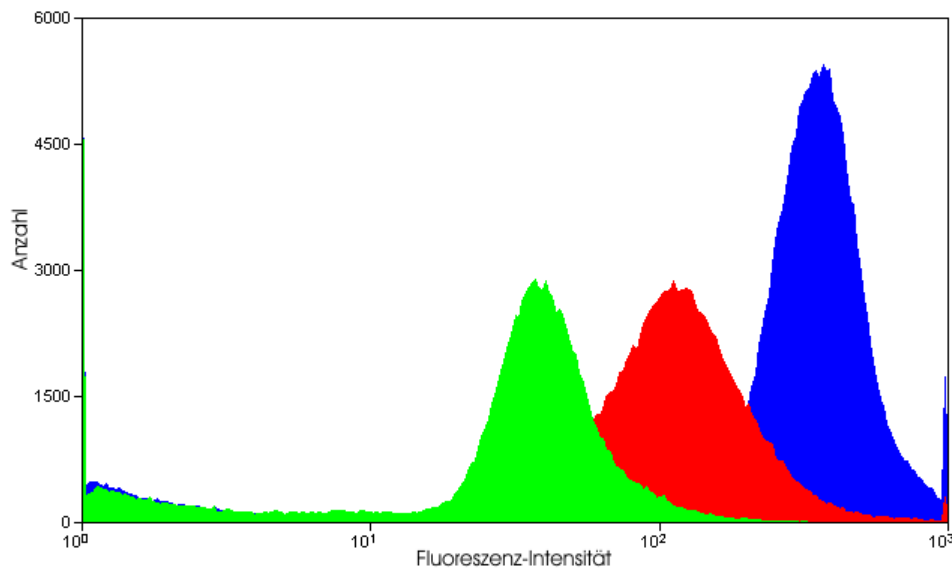


Abb. 3.2: Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von V79-Zellpopulationen mit unterschiedlichen Vorbehandlungen nach Färbung mit ClB. *Links:* 20 μ M BSO für 24 h, *Mitte:* Kontrolle, *rechts:* 16,9 mM GSH-EE für 3 h.

Eine Inkubation der Zellen mit Buthioninsulfoximin (BSO) bzw. Glutathion-Ethylester (GSH-EE) (Kap. 3.2.2) führt zu einer Verschiebung der Verteilung hin zu niedrigeren bzw. höheren Fluoreszenzen (Abb. 3.2), dies entspricht einer Erniedrigung bzw. Erhöhung des GSH-Spiegels.

3.2.2 Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels

Der intrazelluläre GSH-Spiegel soll sowohl erhöht als auch erniedrigt werden.

Zur Erniedrigung wird BSO, ein Inhibitor der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase eingesetzt. Die Arbeiten basieren auf den Vorarbeiten von Schütz (1997) im Arbeitskreis. Nach Inkubation

mit bis zu 20 μM BSO für 24 h ist der intrazelluläre GSH-Spiegel auf bis zu 20 bzw. 40% der Kontrolle (mit Ellmans Reagenz bzw. mit ClB gemessen) erniedrigt (Abb. 3.3), dabei hat BSO keinen Einfluß auf das Zellwachstum. Die GSH-Bestimmung in Zellen mittels Ellmans Reagenz und mittels Reaktion mit ClB gibt einen ähnlichen Trend, jedoch nicht die gleichen Ergebnisse. Eventuell werden zusätzlich zu GSH jeweils noch andere zelluläre Thiole nachgewiesen, wobei die Methoden unterschiedliche Selektivitäten haben. Auch hat die Aufarbeitung der Zellen einen hohen Einfluß auf die Wiederfindung (Thioudellet *et al.*, 1995). In den folgenden Versuchen wird mit einer BSO-Konzentration von 20 μM gearbeitet, dabei haben sich die Ergebnisse dieses Vorversuchs bestätigt.

Zur Erhöhung des GSH-Spiegels wird mit GSH-EE für 3 h inkubiert. GSH-EE diffundiert in die Zellen und der Ester wird enzymatisch in GSH und Ethanol gespalten; durch die ionischen Carboxylat-Gruppen ist GSH dadurch in den Zellen immobilisiert (Anderson *et al.*, 1985). Nach der Inkubation ist gegenüber der Kontrolle ein dreifacher GSH-Spiegel festzustellen (Abb. 3.4). Eine vorherige Erniedrigung des GSH-Spiegels hatte keinen deutlichen Einfluß auf den GSH-Spiegel nach der Inkubation mit GSH-EE (Abb. 3.4). Es wird im Folgenden mit 17 mM GSH-EE gearbeitet. Die Erhöhung des GSH-Spiegels auf etwa das Dreifache hat sich in späteren Versuchen bestätigt.

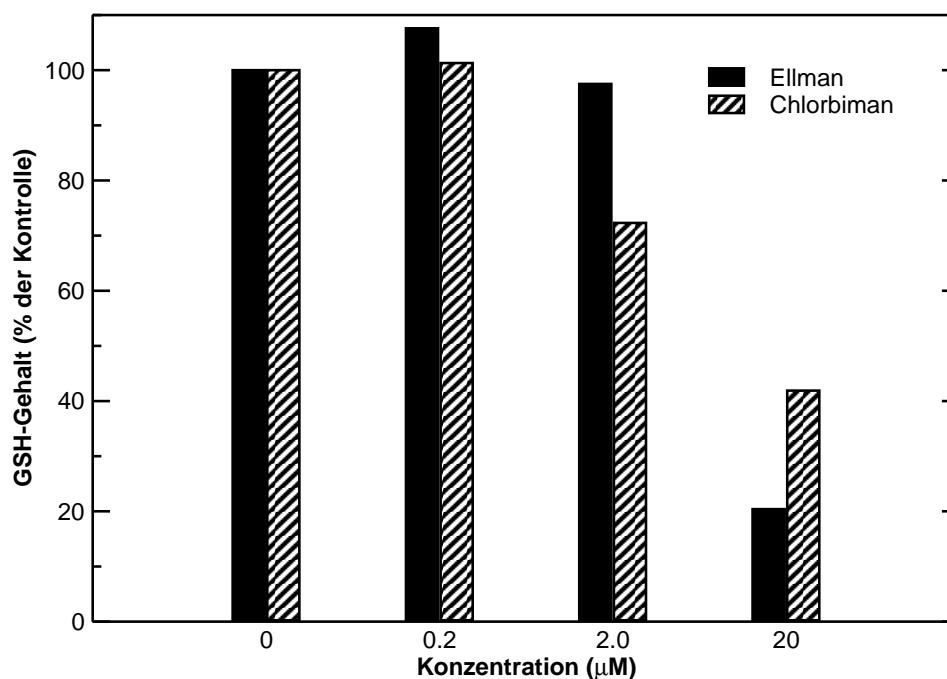


Abb. 3.3: Einfluß von BSO auf den GSH-Spiegel. Der GSH-Spiegel wurde durch Inkubation von V79-Zellen mit verschiedenen BSO-Konzentrationen moduliert. Der GSH-Gehalt wurde mit Ellmans Reagenz und mit Chlorbiman bestimmt.

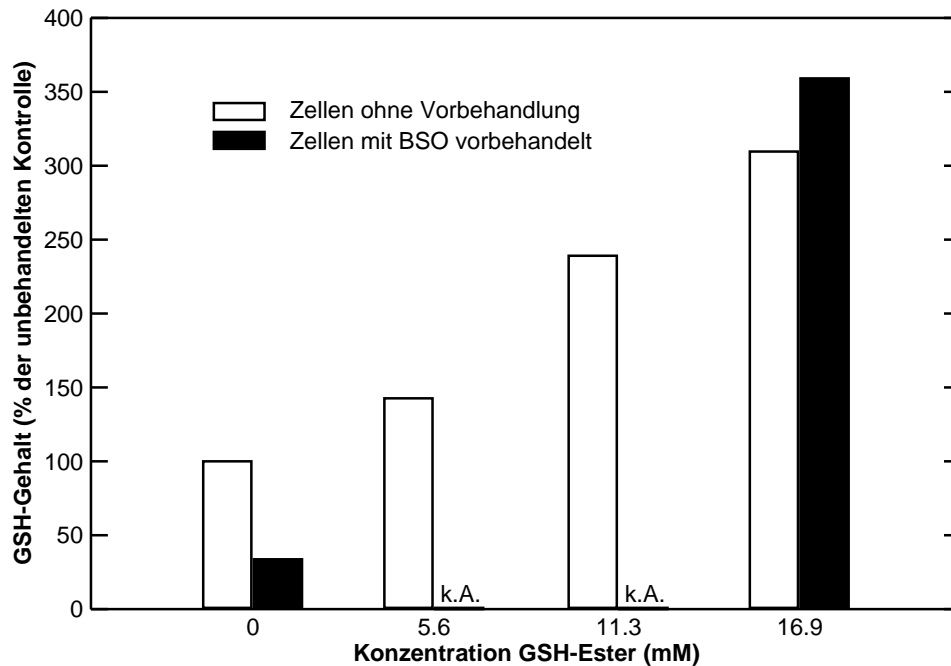


Abb. 3.4: Einfluß von GSH-EE auf den intrazellulären GSH-Spiegel. Die Zellen wurden nach dem Anwachsen (24 h) gegebenenfalls mit 20 μ M BSO behandelt (24 h) und dann mit verschiedenen Konzentrationen GSH-EE inkubiert (3 h). „k.A.“: keine Angabe, wurde nicht untersucht. Der GSH-Gehalt wurde durchflußzytometrisch gemessen. Die Daten stammen aus einem Versuch.

Die Inkubation mit GSH-EE hatte keinen Einfluß auf die Lebendzellzahl (Daten nicht gezeigt). Nach einer anschließenden substanzfreien Nachinkubation war die Lebendzellzahl um etwa 20% gegenüber der Kontrolle reduziert (Daten nicht gezeigt). Während der Inkubation mit GSH-EE ist im Labor ein Geruch nach Thiolen wahrnehmbar. Sowohl das enzymatisch freigesetzte Ethanol als auch die Abbauprodukte von GSH (beispielsweise Schwefelwasserstoff) könnten zur Reduktion des Wachstums beitragen.

Nach einer Erhöhung bzw. Erniedrigung des GSH-Spiegels normalisiert sich der GSH-Spiegel während einer 24-stündigen substanzfreien Nachinkubation wieder (Abb. 3.5). Nach einer Erhöhung des GSH-Spiegels mit GSH-EE sinkt der Spiegel innerhalb von 24 h von $280 \pm 25,3\%$ auf $78,4 \pm 8,3\%$ der Kontrolle. Es kommt offenbar zu einer Überkompensation bei der Regulation des intrazellulären GSH-Spiegels. Die Regulation des GSH-Spiegels erfolgt durch negative Rückkopplung der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase durch GSH (zusammengefasst in Deneke und Fanburg, 1989; Anderson, 1998). Nach einer Erniedrigung des GSH-Spiegels mit BSO steigt der GSH-Spiegel innerhalb von 24 h von $40,2 \pm 5,5\%$ auf $70,8 \pm 9,2\%$ der Kontrolle. Wird die Inkubation mit BSO jedoch fortgesetzt, so bleibt der GSH-Spiegel niedrig (etwa $45,9 \pm 14,3\%$ der Kontrolle).

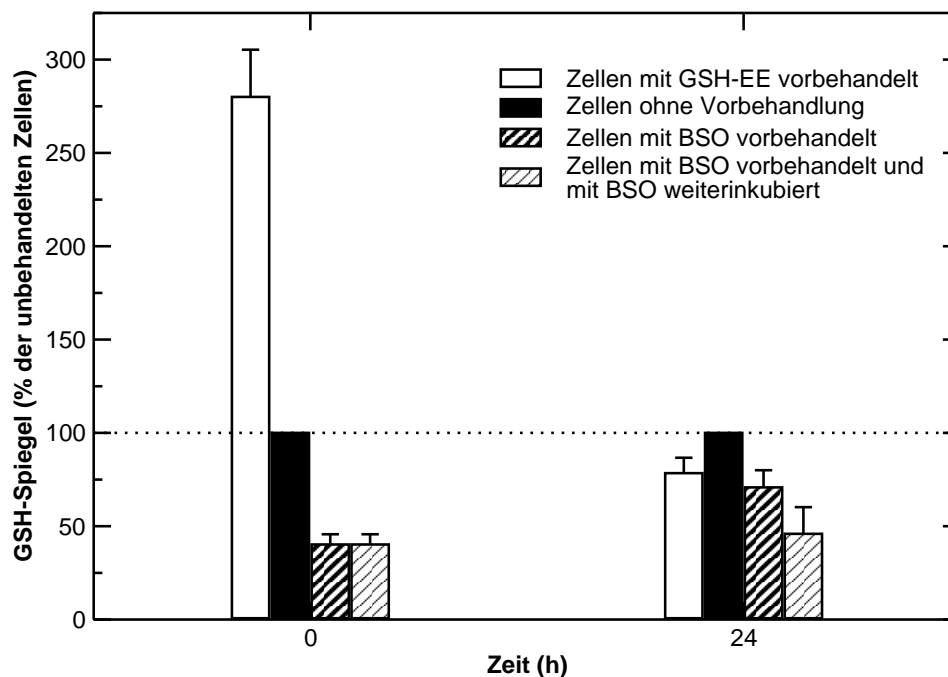


Abb. 3.5: Verhalten des intrazellulären GSH-Spiegels nach Erhöhung (17 mM GSH-EE für 2,5 h) bzw. Erniedrigung (20 μ M BSO für 24 h) und gegebenenfalls substanzfreier Nachinkubation. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

3.2.3 Einfluß von PAT auf den intrazellulären GSH-Spiegel

Wird nach einer Erhöhung bzw. Erniedrigung und 24 h substanzfreier Nachinkubation der GSH-Spiegel gemessen, hat sich der GSH-Spiegel der BSO- und der GSH-EE-vorbehandelten Zellen fast normalisiert (70,8 bzw. 78,4% der Kontrolle, Kap. 3.2.2), während Zellen, deren BSO-Behandlung fortgesetzt wird, einen niedrigen GSH-Spiegel behalten.

Bei PAT-inkubierten Zellen ist hingegen ein Anstieg des intrazellulären GSH-Spiegels um etwa 60% der Kontrolle feststellbar (Abb. 3.6). Dieses gilt auch für BSO-vorbehandelte Zellen (um etwa 65% der entsprechenden Kontrolle). Zellen die mit BSO vor- sowie mit BSO und PAT koinkubiert wurden, zeigen gegenüber der entsprechenden Kontrolle keinen geänderten GSH-Spiegel, jedoch kann der GSH-Spiegel bei höheren Konzentrationen nicht gemessen werden, da die Zellen nach Färbung mit ClB keine auswertbaren Fluoreszenzsignale zeigen. Bei Zellen, die mit GSH-EE vorbehandelt wurden, ist kein PAT-abhängiger Effekt zu beobachten.

Um den Grund zu klären, weshalb sich die GSH-depletierten Zellen nach Inkubation mit hohen PAT-Konzentrationen nicht mit ClB anfärben lassen, wurden entsprechend behandelte Zellen

3.2 Modulation des intrazellulären GSH-Spiegels und Einfluß von Patulin auf den GSH-Spiegel

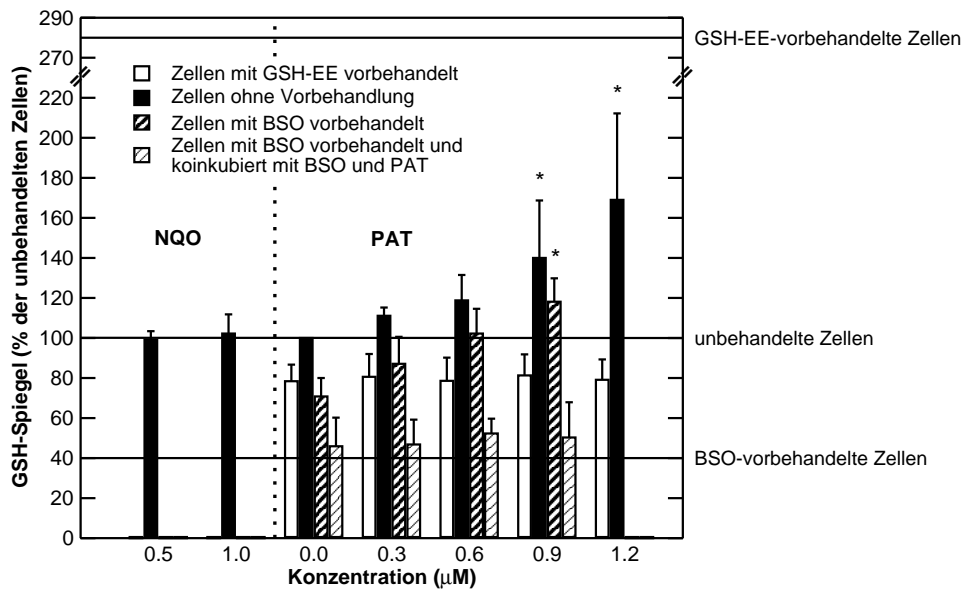


Abb. 3.6: Intrazellulärer GSH-Spiegel in mit GSH-EE oder BSO vorbehandelten V79-Zellen nach Inkubation mit PAT oder NQO. Der GSH-Spiegel beim Inkubationsstart wird mit den horizontalen Linien dargestellt, *oben*: mit 17 mM GSH-EE für 2,5 h vorbehandelte Zellen, *Mitte*: unbehandelte Zellen und *unten*: mit 20 μM BSO für 24 h vorbehandelte Zellen. Nach der Vorbehandlung wurden die Zellen mit PAT (oder PAT und BSO) für 24 h (ko-) inkubiert. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zur entsprechenden Lösungsmittelkontrolle (Student t-Test): *, $p < 0,05$.

mit Propidiumiodid angefärbt: mindestens 10% der behandelten Zellen nahmen dem Farbstoff auf im Vergleich zu weniger als 4% in der Kontrolle, d. h. die Zellmembran hatte hier ihre Barrierefunktion verloren. Gleichzeitig nahm die mit Calcein AM gemessene metabolische Kapazität von 100% auf 60% (bei 0,9 μM PAT) ab. Bei stark zytotoxischer Substanzwirkung ist es also nicht möglich mit CIB den GSH-Spiegel zu messen.

Zum Vergleich wird der GSH-Spiegel von NQO-behandelten Zellen gemessen. Nach Inkubation mit NQO ist keine Beeinflussung festzustellen (Abb. 3.6).

Die Hemmbarkeit des Anstiegs des GSH-Spiegels durch Inkubation mit BSO deutet auf eine aktive, durch die Zelle regulierte Antwort auf die PAT-Inkubation hin, die die erhöhte Biosynthese von GSH beinhaltet.

Im Gegensatz zu dem hier beobachteten Anstieg des GSH-Spiegels beobachteten Riley und Showker (1991) eine Abnahme des zellulären Gehalts an nichtproteingebundenen Thiolen in LLC-PK1-Zellen innerhalb von 30 min Inkubation mit 50 μM PAT. Zu ähnlichen Ergebnissen

kamen Barhoumi und Burghardt (1996) nach Inkubation einer immortalisierten Rattenhepatocyten-Zelllinie mit PAT-Konzentrationen von 1 bis 1000 μM .

Aufgrund dieser Berichte aus der Literatur (Barhoumi und Burghardt, 1996; Riley und Showker, 1991), daß nach PAT-Inkubation der GSH-Spiegel innerhalb von kurzer Zeit absinkt und aufgrund der hier beobachteten relativ raschen Normalisierung des GSH-Spiegels nach seiner Modulation, wurde der GSH-Spiegel auch nach Inkubation mit PAT für 0,5 h und 6 h gemessen, sowie nochmals zum Vergleich nach Inkubation für 24 h.

Nach Inkubation mit bis zu 1,2 μM PAT für 0,5 h ist der GSH-Spiegel marginal (etwa 10%) erniedrigt (Abb. 3.7), diese Erniedrigung liegt an der Grenze des Messbaren. Nach sechsständiger Inkubation mit PAT ist eine deutliche Erhöhung des GSH-Spiegels auf mindestens das Doppelte der Kontrolle zu beobachten. Diese erhöhten GSH-Spiegel sinken in der folgenden Zeit wieder ab, sind nach Inkubation für 24 h aber noch um etwa 20 bzw. 50% erhöht (Abb. 3.7). Diese nach 24 h gemessenen GSH-Spiegel entsprechen den oben dargestellten Ergebnissen (Abb. 3.6).

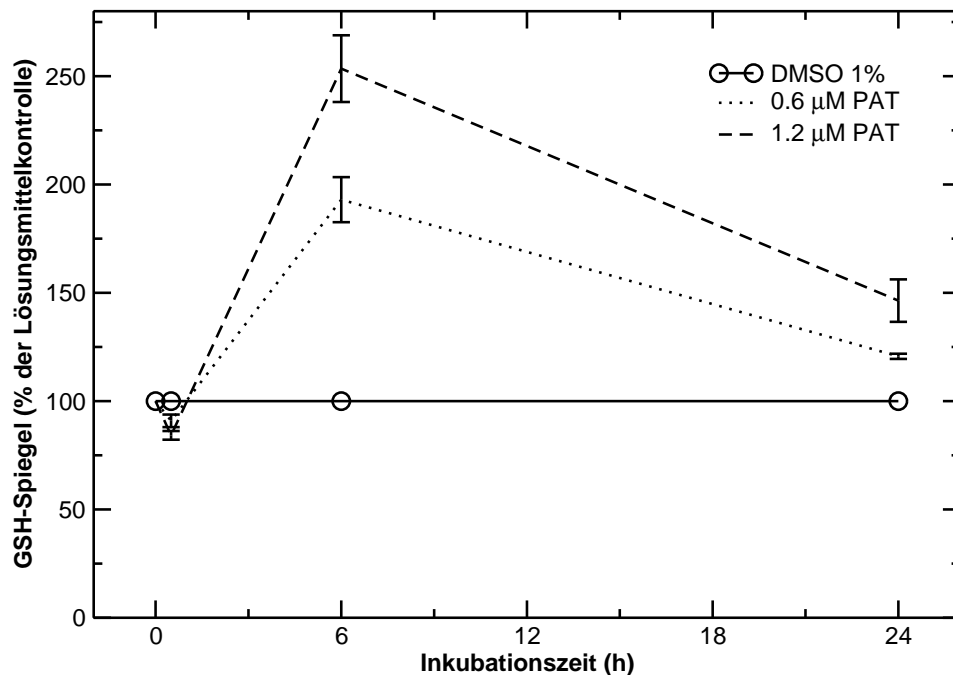


Abb. 3.7: Intrazellulärer GSH-Spiegel in V79-Zellen nach Inkubation mit PAT über verschiedene Inkubationsdauern. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und sind als Mittel \pm Schwankungsbereich angegeben. Die Werte wurden als Prozent der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt.

Das molare Verhältnis zwischen intrazellulärem GSH und der PAT-Konzentration im Medium beträgt etwa 2000:1. Daher ist ein deutliches Absinken des GSH-Spiegels durch Reaktion von GSH mit PAT unwahrscheinlich. Die für LLC-PK1 beschriebenen Effekte kommen aufgrund des Verlustes der strukturellen Integrität der zellulären Plasmamembran zustande (Riley und Showker, 1991). Ein ähnliches Phänomen wurde hier bei Inkubation von V79-Zellen mit 1,2 μM PAT beobachtet. Während Zellen mit normalem GSH-Spiegel nach Behandlung mit 1,2 μM PAT eine intakte Plasmamembran vorwiesen, war die Viabilität in Zellen mit reduziertem GSH-Spiegel nach Behandlung mit 1,2 μM PAT deutlich erniedrigt und die Plasmamembran hatte ihre Barrierefunktion verloren. Daher ließ sich auch das intrazelluläre GSH nicht anfärben bzw. war aus den Zellen ausgelaufen. Deshalb ist die Erniedrigung des intrazellulären GSH-Spiegels eher eine unspezifische zytotoxische Wirkung als eine spezifische Substanzwirkung.

Überraschend war hingegen die Erhöhung des GSH-Spiegels nach Inkubation für 6 und 24 h mit PAT. Ein Anstieg des GSH-Spiegels wurde auch schon für andere Substanzen beschrieben, beispielsweise in Aortaendothel-Zellen des Rindes nach Behandlung mit dem NO-Donor S-Nitrosopenicillamin (Moellering *et al.*, 1999), in menschlichen Leberzellen nach Behandlung mit Thioacetamid (Huang *et al.*, 2000), in Makrophagen-ähnlichen Zellen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen γ -Strahlung (Kojima *et al.*, 2000) und in WI-38-Fibroblasten nach Inkubation mit anorganischem Arsen (Schuliga *et al.*, 2002). Aber auch in V79-Zellen wurde schon ein Anstieg des GSH-Spiegels beobachtet (Ochi, 1993, 1996): Nach Behandlung von V79-Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid kommt es zu einem gesteigerten Einbau von Cystein in säurelösliche Thiole (Ochi, 1993). Eine einstündige Behandlung mit Menadion führt zu einem kurzfristigen (etwa 1,5 h) Ungleichgewicht im GSH/GSSG-Gleichgewicht, auf das die V79-Zellen mit einer gesteigerten γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase-Aktivität (pro mg Protein) reagieren, das längerfristig (mindestens bis zu 6 h) zu einem gesteigerten GSH-Spiegel führt (Ochi, 1996).

Als Antwort auf oxidativen Stress kann die Expression der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase durch Aktivierung des *antioxidative response elements* hochreguliert werden (Rushmore und Kong, 2002). Da der PAT-abhängige Anstieg des GSH-Spiegels durch BSO hemmbar ist, unterstützt dies die Vermutung, daß die GSH-Biosynthese hochreguliert wird.

3.3 Einfluß von PAT auf die Zellzyklusverteilung

In V79-Zellen wurde die Zellzyklusverteilung nach Inkubation mit PAT untersucht. Dazu wurden Zellen mit PAT für 24 h inkubiert und dann durchflußzytometrisch der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt.

Eukaryotische Zellen reagieren auf Stress häufig durch Auslösen eines Zellzyklusarrests. Oft wird der Übergang von der G1- in die S-Phase und der Übergang von der G2- in die M-Phase verlangsamt oder blockiert (Shackelford *et al.*, 1999).

Ohne Behandlung waren $51,5 \pm 1,2$ % der V79-Zellen in der G1/G0-Phase, $24,7 \pm 3,2$ % in der S-Phase und $23,7 \pm 3,6$ % in der G2/M-Phase. Eine Inkubation mit BSO hatte keinen deutlichen Einfluß auf die Zellzyklusverteilung (Abb. 3.8). Ebenso hatte die Inkubation mit NQO für 24 h keinen Einfluß (Abb. 3.9).

Nach Inkubation für 24 h mit PAT ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklusses zu beobachten (Abb. 3.10). Dieser Anteil ist höher in den Zellpopulationen, die mit BSO vor- und ko-inkubiert wurden.

Um diesen Einfluß von PAT auf die Zellzyklusverteilung genauer zu untersuchen, wurde bei einer Inkubation mit $0,6 \mu\text{M}$ PAT über bis zu 24 h im Abstand von 1,5 h die Zellzyklusverteilung

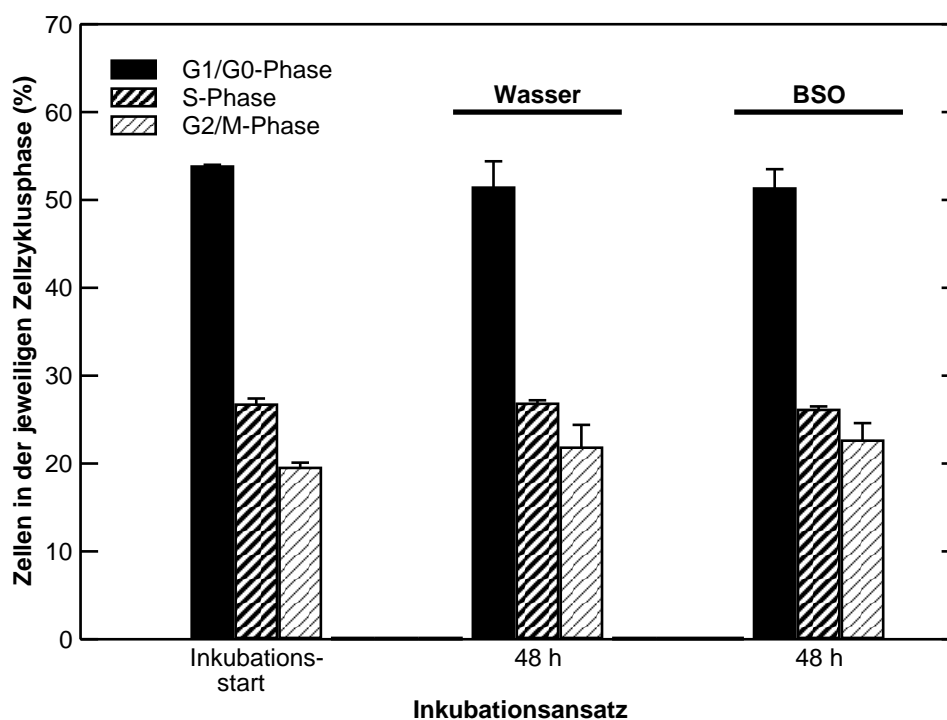


Abb. 3.8: Einfluß von BSO auf die Zellzyklusverteilung von kultivierten V79-Zellen. Die Zellen wurden für 48 h mit $20 \mu\text{M}$ BSO inkubiert. Als Lösungsmittel diente Wasser, 1% Endkonzentration im Zellkulturmedium. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Inkubationen.

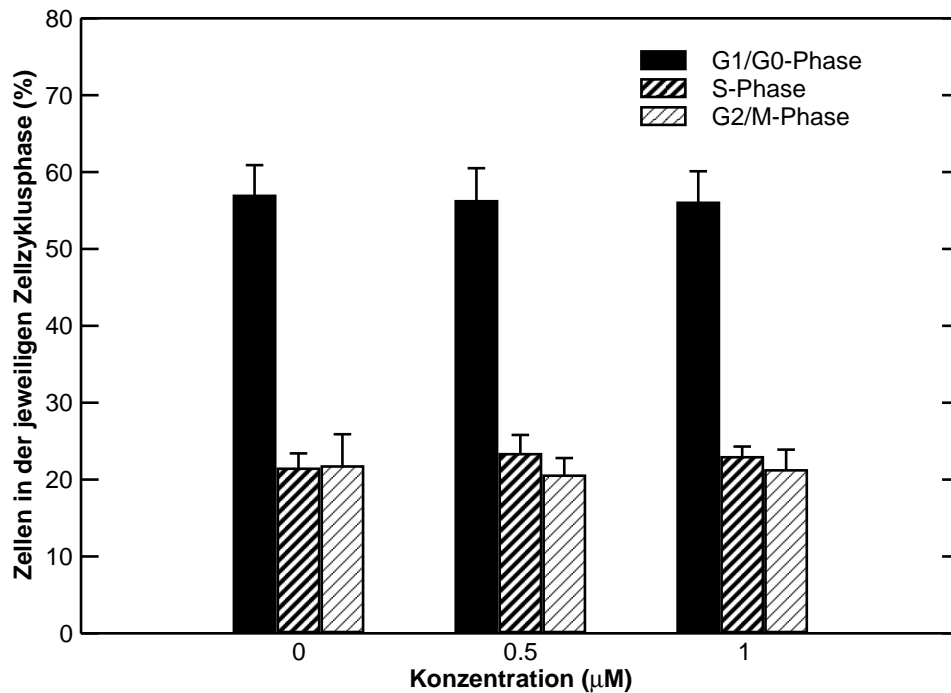


Abb. 3.9: Einfluß von NQO auf die Zellzyklusverteilung von kultivierten V79-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit 0,5 und 1 µM NQO inkubiert (DMSO 1%). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Inkubationen.

lung gemessen. Repräsentative Diagramme sind in Abb. 3.11 gezeigt. Während der ersten 4,5 h nimmt der Anteil der Zellen in der G2/M-Phase kontinuierlich zu. Während dieser Zeit ist es praktisch keiner Zelle möglich, in die G1/G0-Phase einzutreten, jedoch wandern die Zellen aus der G1/G0-Phase in die S-Phase. Daher ist nach 4,5 h Inkubation mit PAT der G1/G0-Peak praktisch verschwunden. Die ersten frisch geteilten Zellen wurden nach 6 h Inkubation beobachtet. In den folgenden 18 h wandert dieses Intervall von 4,5 h bis 6 h mit wenigen Zellen gefolgt von der Welle von in der G2/M-Phase akkumulierten Zellen ohne weitere Störung durch den Zellzyklus. Während der Anteil Zellen in der G1/G0-Phase ansteigt, wird der Anteil Zellen in der S-Phase (9 h) und dann G2/M-Phase (13,5 h) reduziert. Dieses deutet auf eine Länge der S-Phase von etwa 5 h hin. 13,5 h nach Inkubationsstart haben die synchronisierten Zellen die G1/G0-Phase beendet und treten in die S-Phase ein, während die G2/M-Phase von Zellen depletiert ist. Drei Stunden später kommen die synchronisierten Zellen zur G2/M-Phase, während der Anteil Zellen in der G1/G0-Phase deutlich reduziert ist. Daher sehen die Histogramme zwischen 16,5 h und 24 h nach Inkubationsstart etwa so aus, wie 11 h früher. Aufgrund des Phänomens, daß sowohl der mit Zellen depletierte Bereich als auch der mit Zellen akkumulierte Bereich in der S-Phase liegen, sieht das Histogramm 24 h nach Inkubationsstart quasi normal

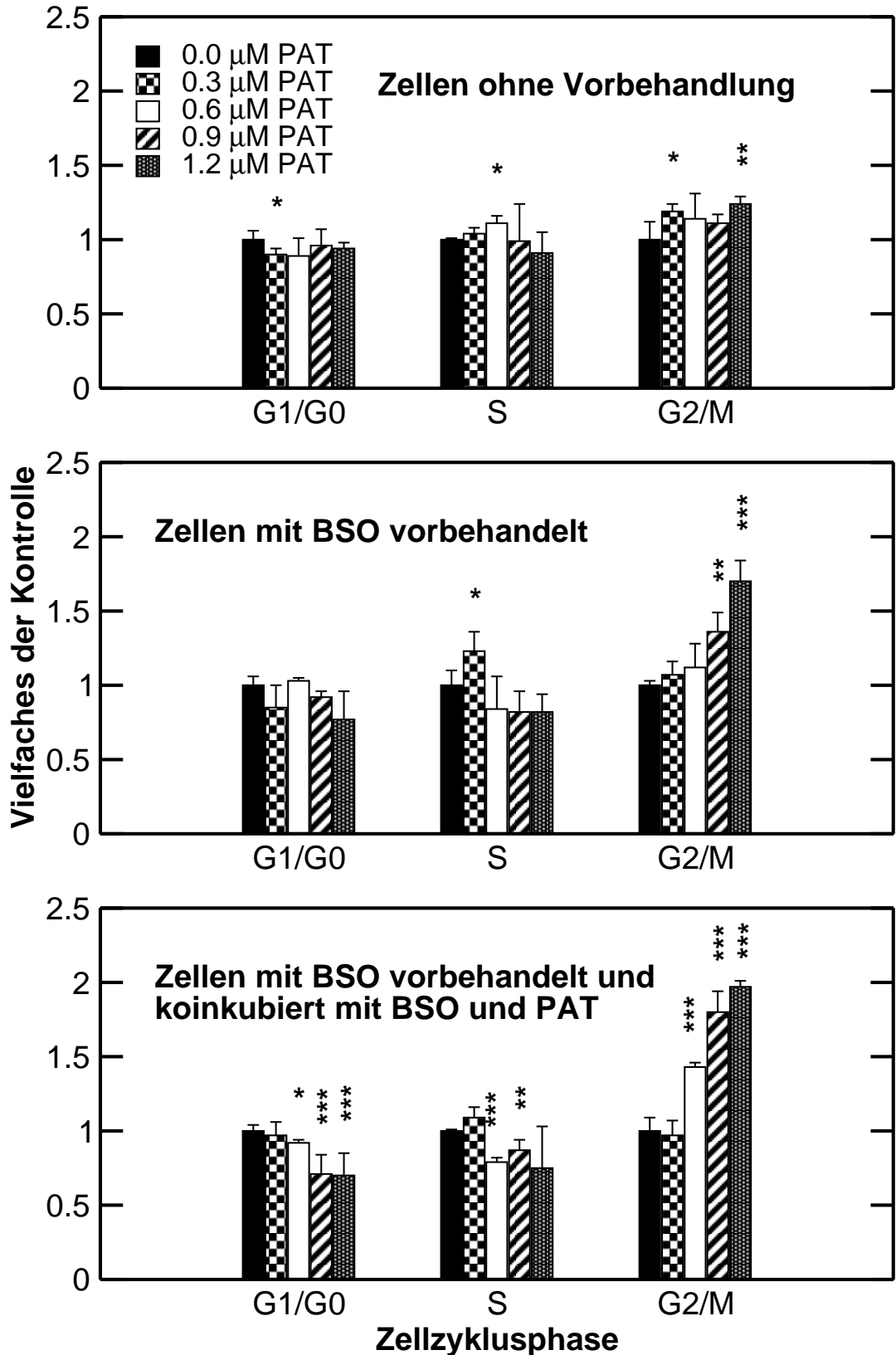


Abb. 3.10: Einfluß von PAT auf die Zellzyklusverteilung. V79-Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgestreut und nach 24 h gegebenenfalls für 24 h mit 20 μM BSO inkubiert, dann für weitere 24 h mit PAT inkubiert (1% DMSO im Medium). Dargestellt sind die Daten aus vier unabhängigen Inkubationen. Signifikante Unterschiede wurden mit dem Student t-Test für unabhängige Werte untersucht: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

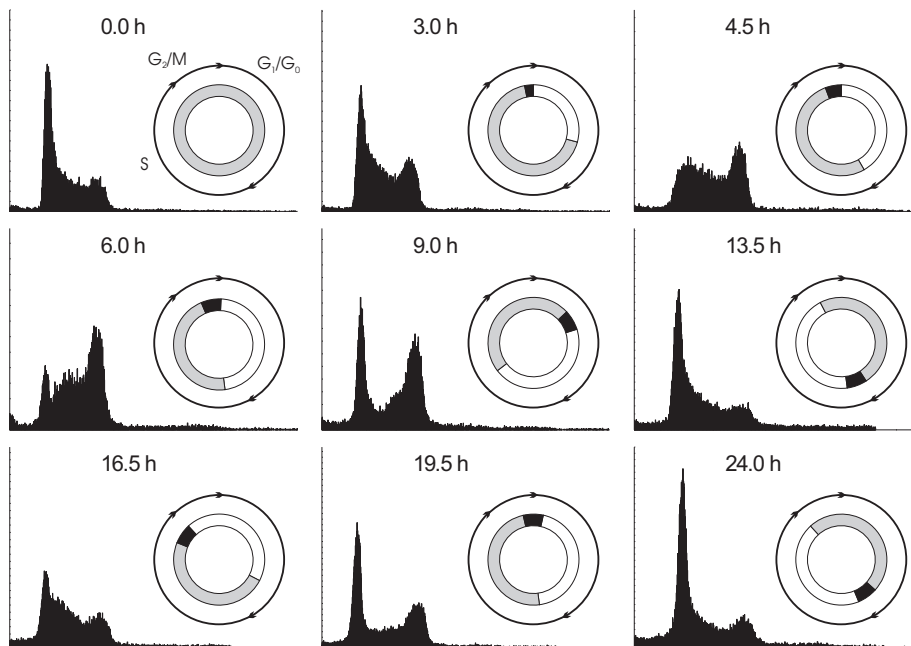


Abb. 3.11: Zeitverlauf des Zellzyklus-Arrests durch PAT in V79-Zellen. V79-Zellen wurden mit $0,6 \mu\text{M}$ PAT behandelt und die Zellzyklusverteilung während der folgenden 24 h alle 1,5 h gemessen. Eine komplette Drehung des Kreises steht für die Vollendung eines Zellzykluses (etwa 11 h). Die Pfeilspitzen markieren die Übergänge zwischen den Zellzyklusphasen. *Grau:* unsynchronisierte Zellen; *weiß:* keine Zellen; *schwarz:* Ansammlung von partiell synchronisierten Zellen (siehe Text).

aus. Drei Stunden später wäre wieder eine deutliche Verschiebung zur S-Phase sichtbar (Daten nicht gezeigt).

Um nun den Effekt von anderen PAT-Konzentrationen und in GSH-reduzierten Zellen zu untersuchen, wurde das gleiche Experiment wiederholt, jedoch mit $0,6 \mu\text{M}$ und $1,2 \mu\text{M}$ PAT in Zellen mit normalem GSH-Gehalt, sowie in Zellen mit reduziertem GSH-Spiegel. Der Zeitpunkt des ersten Wiederauftauchens von Zellen in der G1/G0-Phase ist ein Hinweis auf die Dauer des G2/M-Arrests. Der G2/M-Arrest dauerte 6 h ($0,6 \mu\text{M}$) bzw. 7,5 h ($1,2 \mu\text{M}$) in Zellen mit normalem GSH-Spiegel und 9 h ($0,6 \mu\text{M}$) in Zellen mit reduziertem GSH-Spiegel. Bei den Inkubationen mit längerem G2/M-Arrest wurde die „Lücke“ in der G1/G0-Phase vergrößert, während der Peak mit synchronisierten Zellen mehr Zellen enthielt. Abgesehen von der größeren Lücke von Zellen haben sich die Populationen gleich verhalten – von der Verschiebung um 1,5 h bzw. 3 h im Vergleich zu den mit $0,6 \mu\text{M}$ PAT behandelten Zellen mit normalem GSH-

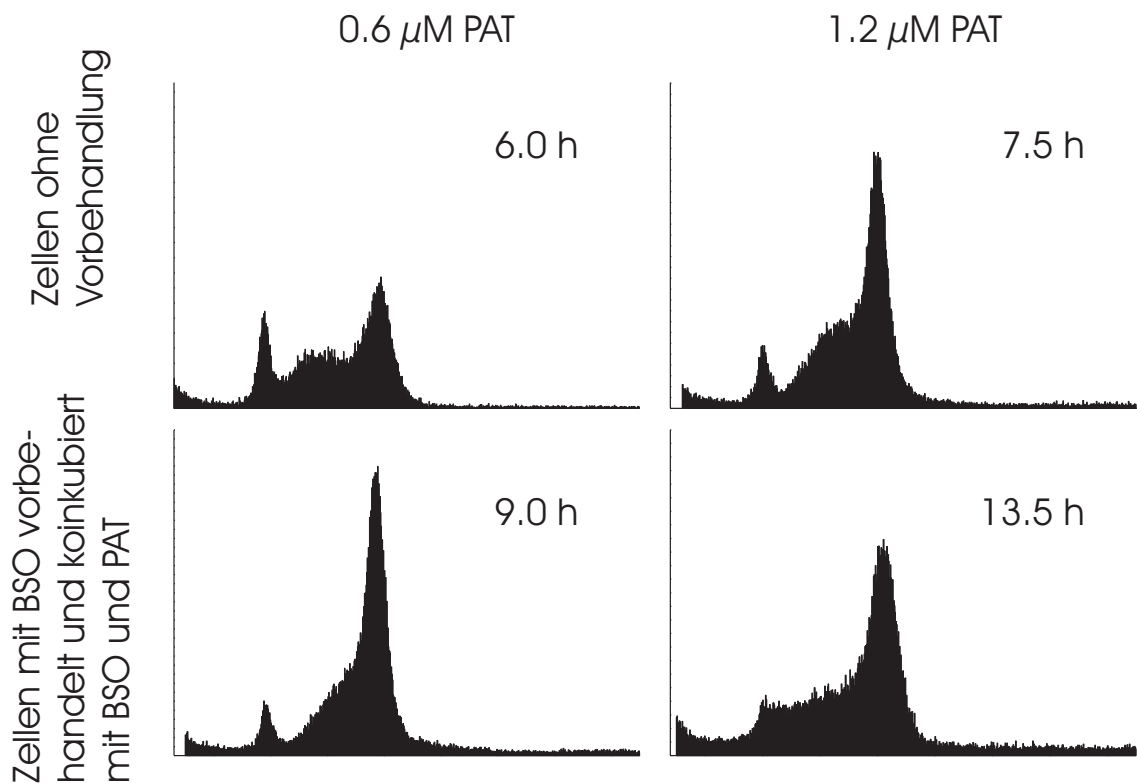


Abb. 3.12: Einfluß von BSO und verschiedenen PAT-Konzentrationen auf die Dauer des G2/M-Arrests in V79-Zellen. Dargestellt ist das Histogramm, bei dem nach dem PAT-induzierten G2/M-Arrest das erste Mal Zellen in die G1/G0-Phase übergehen.

Spiegel abgesehen. Die mit 1,2 μM PAT behandelten GSH-Spiegel-reduzierten Zellen nahmen im beobachteten Zeitraum bis 13,5 h das normale Wachstum nicht wieder auf.

Aufgrund des verlängerten G2/M-Arrestes in GSH-reduzierten Zellen konnten die synchronisierten Zellen innerhalb von 24 h nach Inkubationsstart die S-Phase nicht erreichen, sondern erreichten bloß die G2/M-Phase, daher kam es zum beobachteten Anstieg des Anteils der Zellen in der G2/M-Phase (Abb. 3.10 und 3.12).

Um den PAT-induzierten Arrest näher zu untersuchen und zu bestimmen, ob ein G2- oder Mitose-Arrest vorliegt, wurden V79-Zellen auf Objektträger ausgestreut, mit 0,6 μM PAT für 3, 4 und 5 h inkubiert und fluoreszenzmikroskopisch der Mitose-Index und die Anzahl frisch

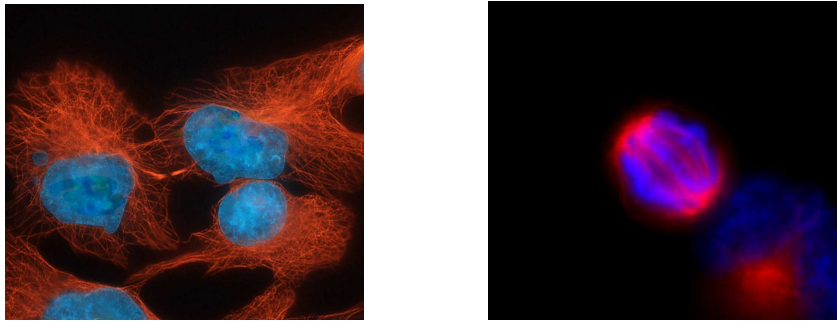


Abb. 3.13: Mikroskopisches Erscheinungsbild von frisch geteilten Zellen (links) und von „verknöteten“ Chromosomen (rechts).

geteilter Zellen bestimmt. Junge G1-Zellen, also frisch geteilte Zellen, können an den noch vorhandenen *midbody*-Proteinen des Tubulin-Gerüsts der Zellen erkannt werden. Dazu wird der zytoplasmatische Mikrotubuli-Apparat der Zellen angefärbt und auf eine hell-leuchtende „Abschnürung“ zwischen den Zellen hin untersucht (Abb. 3.13). Sowohl der Mitose-Index als auch die Anzahl frisch geteilter Zellen nahm zeitabhängig ab (Tab. 3.2). Die leichte Reduktion des Mitose-Indexes kam aufgrund einer Erniedrigung der Anzahl Anaphase- und Telophase-Zellen zustande, während die Anzahl Zellen in der Metaphase kaum beeinflusst war (Daten nicht gezeigt), jedoch waren mitotische Zellen und frisch geteilte Zellen zu allen Zeitpunkten sichtbar. Die wenigen beobachteten Anaphasen und Telophasen zeigten oft „verknötete“ Chromatiden (Abb. 3.13), so daß die Teilungsprodukte aus solchen mitotischen Zellen vermutlich nicht durchflußzytometrisch als G1/G0-Zellen erkannt werden. Nach 5-stündiger Inkubation nimmt der Mitose-Index, jedoch noch nicht die Anzahl frisch geteilter Zellen zu. Dieses passt zu dem durchflußzytometrisch beobachteten Auftauchen von G1/G0-Zellen nach 6 h Inkubation mit PAT. Daher liegt während der ersten vier Stunden Inkubation mit PAT vornehmlich ein G2-Arrest vor. Trotzdem kann ein kleiner Teil der Zellen die Mitose erreichen, wird möglicherweise am Anaphase-Kontrollpunkt verlangsamt und kann die Mitose vollenden. Nach 5 h Inkubation mit 0,6 μM PAT haben die ersten synchronisierten Zellen den G2-Arrest verlassen und haben die Mitose erreicht, jedoch noch nicht vollendet.

Zu den am besten verstandenen G2-Kontrollpunkten gehören die, die den Übergang in die Mitose verhindern. Sie reagieren auf Agentien, die DNA-Schäden, reaktive Sauerstoffspezies und Protein-/Lipid-Schäden auslösen können (zusammengefasst in Pearce und Humphrey, 2001). Bei Bedarf verhindern die Kinasen ATM/ATR die Aktivierung des Hauptmitoseregulators, einer Cyclin-abhängigen Kinase (Cdk) in Zusammenspiel mit Cyclin B. ATM kann den p53-Weg aktivieren, der durch Aktivierung von Cdk-Inhibitoren, wie p21, den Beginn der Mitose verhindert. Da V79-Zellen kein funktionelles p53-Protein besitzen (Chaung *et al.*, 1997), sollte

Tab. 3.2: Marker für Proliferation. V79-Zellen wurden auf Objektträgern für unterschiedliche Zeiten mit Patulin (0,6 μ M) inkubiert. Die Ergebnisse sind als Prozent der Lösungsmittelkontrolle (% K) dargestellt. Sterne markieren von der Lösungsmittelkontrolle signifikant unterschiedliche Werte (χ^2 -Test): **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$. Junge G1-Zellen, siehe Text.

Inkubation (h)	Proliferative Aktivität		
	Mitotische Zellen (% K)	Junge G1-Zellen (% K)	Summe (% K)
3	102,7	46,9 **	51,1 **
4	25,9	27,1 ***	26,9 ***
5	70,0	24,7 ***	33,3 ***

dieser Weg nicht funktionieren. Zusätzlich existiert jedoch auch ein p53-unabhängiger Signalweg, der die Aktivierung der Phosphatase *cell division cycle* (Cdc) 25C verhindert; Cdc25C wird für die ultimale Aktivierung des Cdk1-Cyclin B-Komplexes benötigt. Auch wurde schon eine p53-unabhängige Induktion von p21 in menschlichen Prostatakarzinom-Zellen beobachtet (Choi *et al.*, 2000).

Ähnliche Effekte auf die Zellzyklusverteilung wie in V79-Zellen wurden im Arbeitskreis in primären menschlichen Hautfibroblasten beobachtet (Lehmann *et al.*, 2003), die ein funktionsfähiges p53-Protein exprimieren.

3.4 Einfluß der Kulturbedingungen auf die Zytotoxizität von Patulin

Es wurde untersucht, ob die Anwachszeit und die Zelldichte Einfluß auf die Zytotoxizität von PAT haben. Dazu wurden Zellen für 24 h oder 48 h anwachsen gelassen und mit PAT behandelt (Abb. 3.14). Bei etwa gleicher Zelldichte beim Inkubationsstart hat die Anwachszeit nur einen geringen Einfluß. Jedoch spielt die Zelldichte eine Rolle. Werden etwa 100 000 Zellen (etwa 50 000 /cm²) mit PAT inkubiert, wird die Lebendzellzahl deutlich stärker reduziert als bei einer Inkubation von etwa 300 000 (etwa 150 000 /cm²) Zellen. Die Zellzahl sinkt dann sogar unter die Zellzahl beim Inkubationsstart.

Einen ähnlichen Einfluß von PAT haben Thust *et al.* (1982) auf die Entstehung von aberranten Mitosen beobachtet. Je niedriger die Zelldichte im Ansatz und je höher das Inkubationsvolumen war, desto höher fiel die Rate an Chromosomenaberrationen aus.

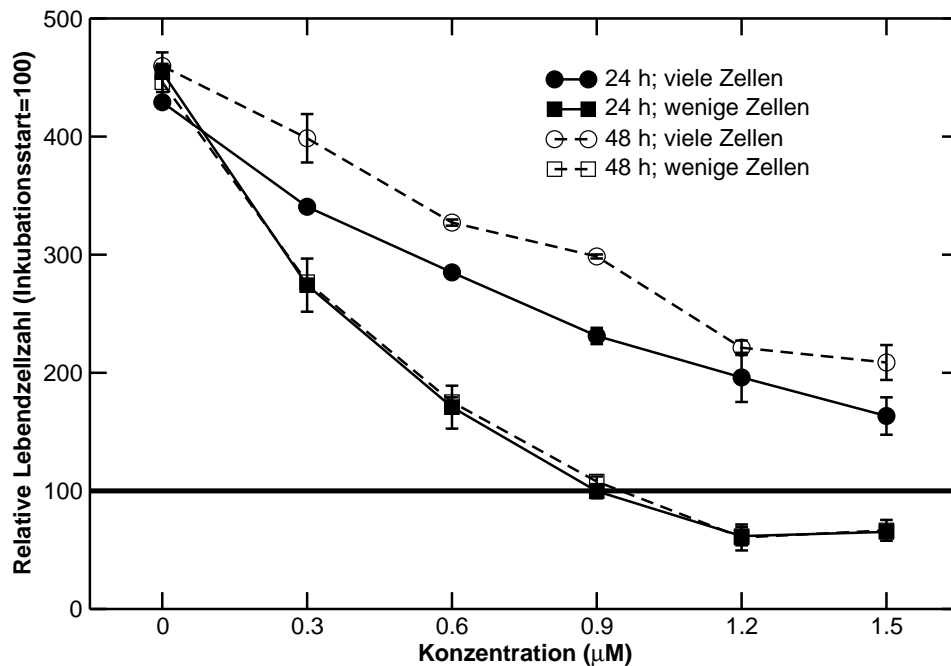


Abb. 3.14: Einfluß der Zellzahl und der Anwachszeit auf die Zytotoxizität von PAT. V79-Zellen wurden so ausgestreut (24-Loch-Platte), daß nach 24 h oder 48 h Anwachszeit jeweils 100 000 (wenige, Ist: 80 000 bzw. 100 000) bzw. 300 000 (viele, Ist: 260 000 bzw. 325 000) Zellen für 6 h in einem Milliliter Medium mit PAT behandelt und dann für weitere 18 h nachinkubiert wurden. Jeder Punkt bildet das Mittel aus zwei Inkubationen \pm Schwankung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Versuch, der mit dem gleichen Ergebnis reproduziert wurde.

Daher muß bei den Inkubationen mit PAT darauf geachtet werden, daß das Verhältnis „Zellen zu Fläche zu Volumen“ vergleichbar gehalten wird.

3.5 Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutationstest

Aufgrund des bekannten klastogenen und aneugenischen Potentials von PAT wurde untersucht, ob dieses genotoxische Potential auch zu Mutationen führt. Dazu wurde die Mutagenität von PAT mit dem Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase- (HPRT) Mutationstest untersucht.

Der Test basiert auf der Vorwärtsmutation des HPRT-Gens. Nach der Manifestation des neuen Phänotyps der Zellen werden die mutierten Zellen mit 6-Thioguanin (6TG) selektiert. Nur Zel-

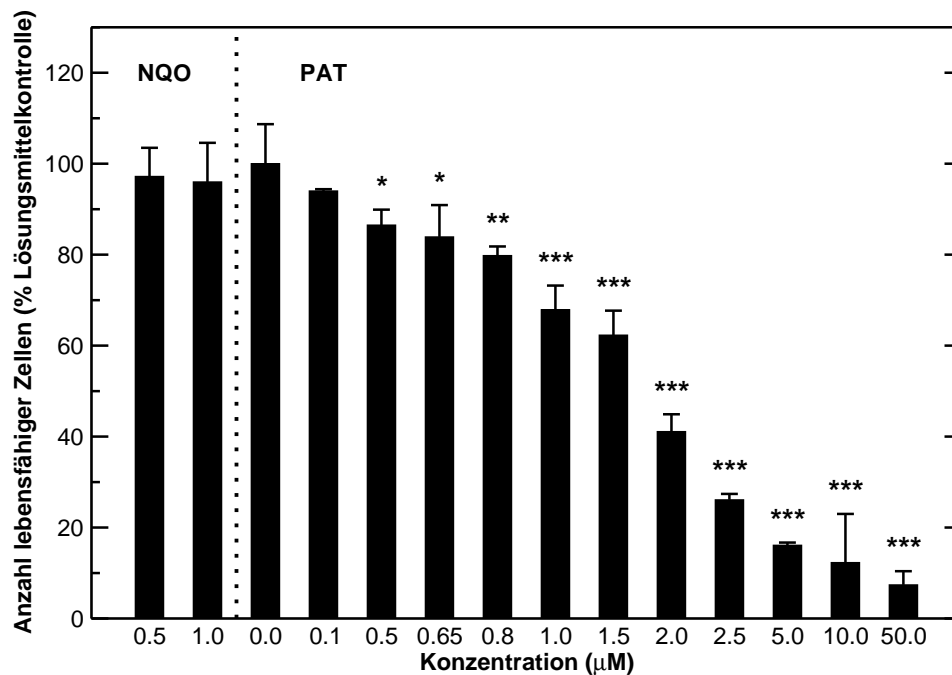


Abb. 3.15: Einfluß von 24 h Inkubation mit NQO und PAT auf die Lebendzellzahl. Dargestellt sind die Daten aus bis zu vier unabhängigen Inkubationen (Mittelwert \pm Standardabweichung). Signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle wurden mit dem Student t-Test für unabhängige Daten untersucht: *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,005$.

len mit defektem HPRT-Gen können in Anwesenheit von 6TG noch wachsen (zusammengefasst in Bradley *et al.*, 1981).

V79-Zellen wurden mit PAT oder NQO als Positivkontrolle (Li *et al.*, 1988; OECD, 1997) für 24 h behandelt und dann für weitere 6 Tage kultiviert. Nach der Inkubation ist eine konzentrationsabhängige Reduktion der Lebendzellzahl zu beobachten (Abb. 3.15). Bei PAT-Konzentrationen von mehr als 2,5 μM waren keine lebensfähigen Zellen mehr vorhanden. NQO hatte keinen Einfluß auf die Lebendzellzahl.

Nach der Selektion der Mutanten mit 6TG wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg der Rate der 6TG-resistenten Zellen beobachtet (Abb. 3.16). Die Spontanmutationsfrequenz liegt bei den verwendeten V79-Zellen bei $7,5 \pm 6$ pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen. Die Positivkontrolle NQO induziert dosisabhängig 6TG-resistente Mutanten. Bereits 0,5 μM NQO induzieren etwa 35 Mutanten pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen. Konzentrationen über 0,5 μM PAT führten zu einem signifikanten Anstieg der Mutationen; bis zu 275 Mutanten pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen werden durch 2 μM PAT induziert.

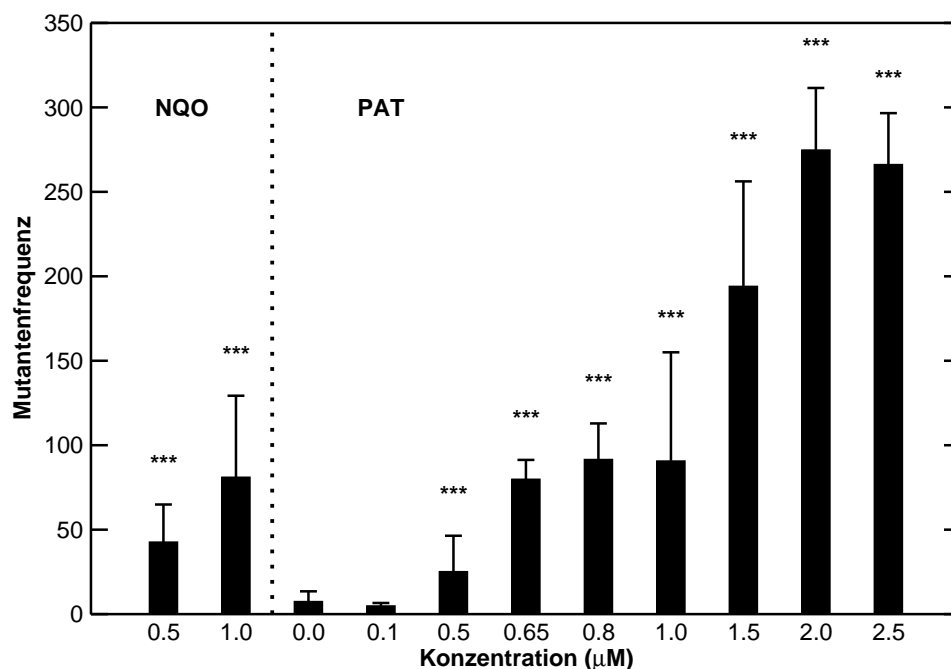


Abb. 3.16: Induktion von Mutationen im HPRT-Gen durch PAT und NQO in V79-Zellen nach Inkubation für 24 h. Dargestellt sind die Daten aus bis zu vier unabhängigen Inkubationen (Mittelwert \pm Standardabweichung). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (Student t-Test): ***: $p < 0,005$.

Diese Ergebnisse bestätigen die Arbeiten von Umeda *et al.* (1977) mit der Brustadenom-Zelllinie FM3A aus C3H Mäusen, in denen ebenfalls ein mutagenes Potential von PAT im HPRT-Gen gefunden wurde. Sowohl hier, als auch bei Umeda *et al.* waren sub-mikromolare Konzentrationen ausreichend, um Mutationen zu induzieren.

Ein Maß für die mutagene Potenz von Substanzen ist die Konzentration, bei der die Mutationsfrequenz gegenüber der Kontrolle verzehnfacht ist (D10C, Bradley *et al.*, 1981). Sowohl bei PAT als auch bei der Positivkontrolle NQO liegt diese Konzentration bei etwa $0,9 \mu\text{M}$. Damit liegt die mutagene Potenz von PAT im gleichen Bereich wie die des bekannten Mutagens NQO.

Aufgrund des positiven Ergebnisses des Standard-HPRT-Tests und der aus der Literatur bekannten Reaktivität von PAT mit Thiolen und Aminen (Fliege und Metzler, 2000a,b) wurde der HPRT-Test so modifiziert, daß der Einfluß des zellulären Thiols GSH auf die Mutagenität untersucht werden konnte.

Der GSH-Spiegel wurde mit BSO bzw. GSH-EE modifiziert (Kap. 3.2.2) und der HPRT-Test erneut durchgeführt. Da zur Erniedrigung des GSH-Spiegels mit BSO zusätzlich 24 h Zeit benö-

tigt werden und die Zelldichte einen relativ großen Einfluß auf die PAT-induzierten Effekte hat (Kap. 3.4), wurde die ausgestreute Zelldichte auf ein Viertel reduziert, um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit anderen Experimenten zu erreichen. Auf diese Weise wurde etwa die gleiche Zelldichte (etwa 6 Mio. Zellen pro Flasche, etwa 32 000 Zellen/cm²) beim Inkubationsstart erreicht.

Nach Inkubation von V79-Zellen mit PAT für 24 h ist eine konzentrationsabhängige Abnahme der Lebendzellzahl festzustellen (Abb. 3.17). Eine Vorbehandlung der Zellen mit BSO hatte keinen Einfluß auf die Zytotoxizität in den mit Lösungsmittel behandelten Zellen, jedoch war in diesen Ansätzen die Zytotoxizität von PAT signifikant erhöht. Eine Koinkubation von BSO und PAT führt zu einem leichten zusätzlichen Rückgang der Lebendzellzahl. Zellen, die mit GSH-EE vorbehandelt wurden, zeigen keine PAT-abhängige Zytotoxizität. Eine Inkubation mit bis zu 1 µM NQO war nicht zytotoxisch (Abb. 3.17).

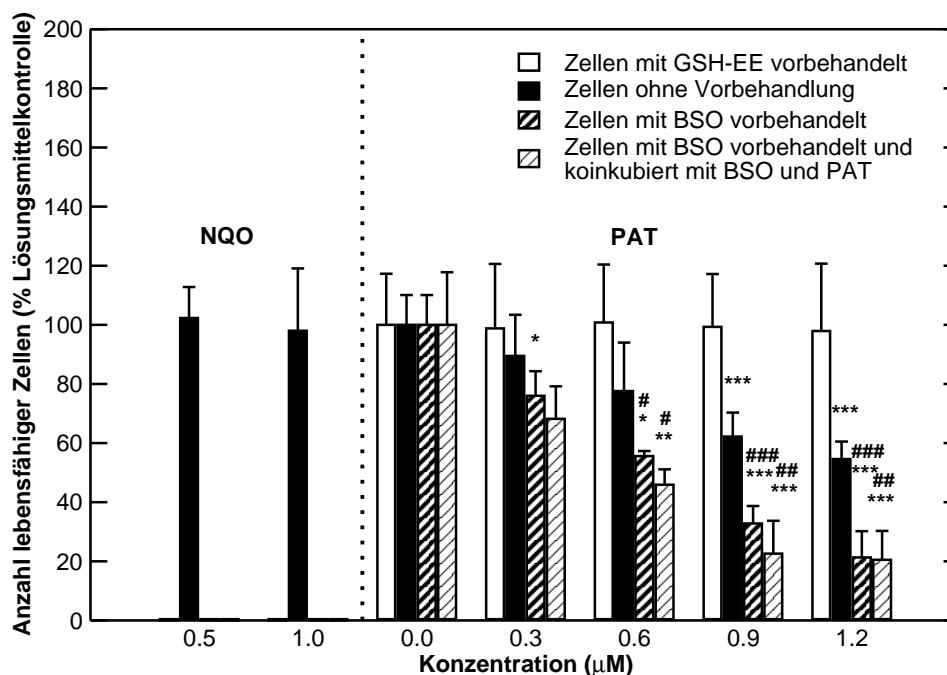


Abb. 3.17: Zytotoxizität von PAT in V79-Zellen mit normalem GSH-Spiegel, in Zellen mit erniedrigtem GSH-Spiegel (20 µM BSO für 24 h) und in Zellen mit erhöhtem GSH-Spiegel (17 mM GSH-EE für 2,5 h). Nach Inkubation für 24 h wurde die Lebendzellzahl gemessen. NQO ist zum Vergleich aufgeführt. Die Zellzahl ist als Prozent der jeweiligen Kontrolle dargestellt. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur zugehörigen Lösungsmittelkontrolle mit dem gleichen GSH-Spiegel; Doppelkreuze markieren signifikante Unterschiede zur entsprechenden Behandlung in Zellen mit normalem GSH-Spiegel (Student t-Test): */#, p<0,05; **/##, p<0,01; ***/###, p<0,005.

In Epithelzelllinien des menschlichen Colons (HT-29-D4 und Caco-2-14) erwies sich PAT ebenfalls als stärker zytotoxisch nach Erniedrigung des GSH-Spiegels mit BSO (Mahfoud *et al.*, 2002).

Die Modulation des GSH-Spiegels hatte keinen Einfluß auf die Mutationsfrequenz in den Lösungsmittelkontrollen (Abb. 3.18). Die Spontanmutationsfrequenz lag bei etwa 8 Mutanten pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen. Ein erhöhter GSH-Spiegel hob die Mutagenität von PAT in den getesteten Konzentrationen vollständig auf, während sich die mutagene Wirkung in V79-Zellen mit normalem GSH-Spiegel bestätigte. Eine vorherige Erniedrigung des GSH-Spiegels führte zu signifikant höheren Mutationsfrequenzen als in den Zellen mit normalem GSH-Spiegel. Gegenüber der Mutagenität in Zellen mit normalem GSH-Spiegel war die Mutagenität etwa doppelt bis dreifach so hoch. Wenn der GSH-Spiegel während der Inkubation mit PAT durch Koinkubation mit BSO niedrig gehalten wurde, so wurde kein zusätzlicher Effekt festgestellt. Der

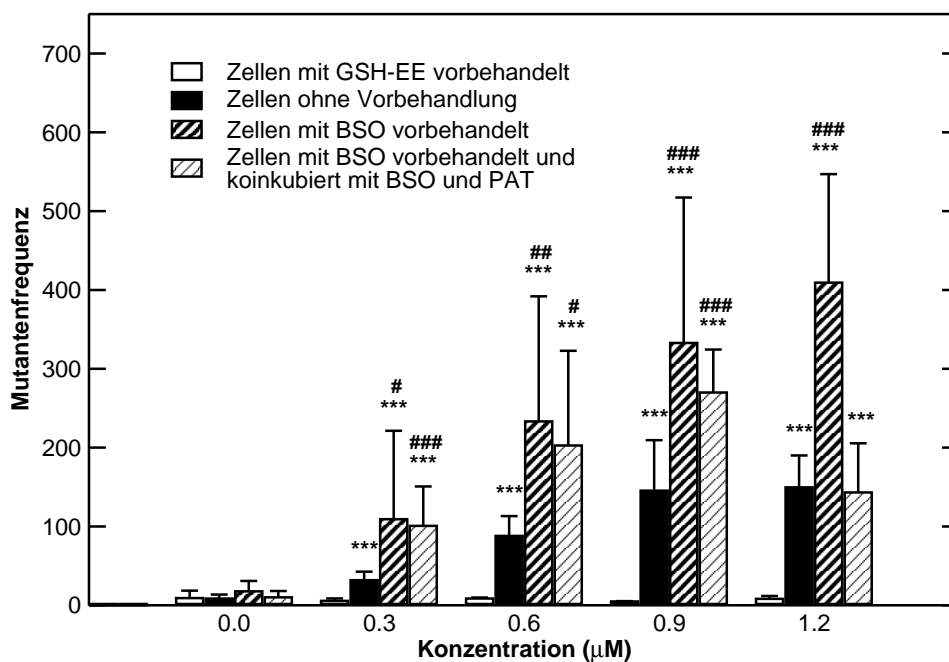


Abb. 3.18: Induktion von Mutationen des HPRT-Gens durch Inkubation mit PAT für 24 h in kultivierten V79-Zellen mit normalem GSH-Spiegel, mit reduziertem GSH-Spiegel und mit erhöhtem GSH-Spiegel. Die Zellen wurden mit 20 µM BSO vorbehandelt, um den GSH-Spiegel zu reduzieren und dann mit PAT inkubiert, oder die Zellen wurden mit BSO vorbehandelt und dann mit 20 µM BSO und PAT für 24 h koinkubiert. Um den GSH-Spiegel zu erhöhen, wurden die Zellen für 2,5 h mit 17 mM vorbehandelt. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± Standardabweichung). Sterne markieren signifikante Unterschiede zur zugehörigen Lösungsmittelkontrolle mit dem gleichen GSH-Spiegel; Doppelkreuze markieren signifikante Unterschiede zur entsprechenden Behandlung in Zellen mit normalem GSH-Spiegel (Student t-Test): */#, p<0,05; **/###, p<0,01; ***/###, p<0,005.

Rückgang der Mutationsfrequenz bei 1,2 μM ist vermutlich auf Zytotoxizität zurückzuführen (Abb. 3.17).

Der hier beobachtete Anstieg der Mutagenität von PAT bei gesenktem GSH-Spiegel entspricht etwa dem oben beschriebenen Einfluß von PAT auf die Zytotoxizität.

Offenbar spielt GSH eine wichtige protektive Rolle gegen die mutagene Wirkung von PAT, obwohl die Reaktionsprodukte von PAT mit einem Molekül GSH reaktiver sind als PAT selbst (Fliege und Metzler, 2000a). Jedoch ist das molare Verhältnis zwischen intrazellulärem GSH und PAT im Medium etwa 2000:1, daher überwiegt die schnelle Reaktion des Monoaddukts mit weiteren GSH-Molekülen zu Produkten mit geringerer Reaktivität. Diese Hypothese wird durch die protektive Wirkung von GSH-EE gestärkt; eine Erhöhung des GSH-Spiegels auf das dreifache des normalen Niveaus hebt die zytotoxische und mutagene Wirkung von PAT vollständig auf.

Neben der Hemmung der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase führt eine Inkubation von Zellen mit BSO auch zu einer verringerten Reparatur von γ -Strahlen-induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen (Revesz und Edgren, 1984; Snyder und Lachmann, 1989) und DNA-Doppelstrangbrüchen (Prise *et al.*, 1992) und von strahleninduzierten DNA-Protein-Quervernetzungen (Oleinick *et al.*, 1988). Bei BSO-behandelten Küken wurde die Aktivität der intestinalen alkalischen Phosphatase gehemmt (Marchionatti *et al.*, 2001). Die mRNA-Spiegel des *multidrug resistance protein* (MDR) P-Glykoproteins (MDR-1) und des *lung resistance-associated protein* wurden in menschlichen Tumorzelllinien durch Behandlung mit BSO reduziert (Köhler, 2002). Die Autoren gehen zumeist davon aus, daß diese Ergebnisse indirekte Konsequenzen aus dem erniedrigten GSH-Spiegel oder Ungleichgewichten des Redox-Status sind.

Da in dieser Arbeit der Einfluß einer BSO-Behandlung auf die Expression oder Funktion von Proteinen nicht untersucht wurde, können andere Mechanismen – wie eine erniedrigte DNA-Reparatur – nicht ausgeschlossen werden, die die Mutagenität von PAT erhöhen könnten. Jedoch ist die Reaktivität von PAT mit Thiol-Gruppen sehr hoch und daher erscheint es vernünftig, daß eine Reaktion von PAT mit GSH eine wichtige Entgiftungsreaktion darstellt.

3.6 Thymidinkinase-Mutationstest

Aufgrund der HPRT-Mutagenität von PAT in V79-Zellen wurde die Mutagenität im Thymidinkinase (TK)-Gen in Maus Lymphomzellen (MLZ) untersucht. Dieser Test erlaubt es, die Art der Mutationen näher zu beschreiben (Clive *et al.*, 1979; Clements, 2000). Die Selektion erfolgt mit

Trifluorthymidin (TFT). TFT-resistente Kolonien, die eine normale Wachstumsgeschwindigkeit haben, tragen Punktmutationen, während Kolonien mit einer langsameren Wachstumsgeschwindigkeit Deletionen im TK-Gen aufweisen (Clements, 2000). Dieses Wachstumsverhalten der Kolonien erlaubt es, die Art der PAT-induzierten Schäden näher zu charakterisieren. Kleine Kolonien nehmen bis zu einem Viertel der Fläche einer Kavität von 96-Loch-Platten ein.

Zum Vergleich und zur Kontrolle der Methode wird die Positivkontrolle NQO (Clements, 2000) eingesetzt.

Eine Inkubation von MLZ mit PAT für 24 h führt zu einer dosisabhängigen und signifikanten Reduktion der Lebendzellzahl (Abb. 3.19). Eine vorherige Reduktion des GSH-Spiegels auf etwa 35% der Kontrollzellen erhöhte die Zytotoxizität deutlich.

Das relative Gesamtwachstum (Clements, 2000) fällt nach Behandlung mit bis zu 0,5 μM PAT in keinem Fall unter 10% (Daten nicht gezeigt). Daher muss nicht von einem „high dose effect“, also einem zytotoxischen Artefakt ausgegangen werden, und die Daten stehen zur weiteren Interpretation zur Verfügung (Moore *et al.*, 2003).

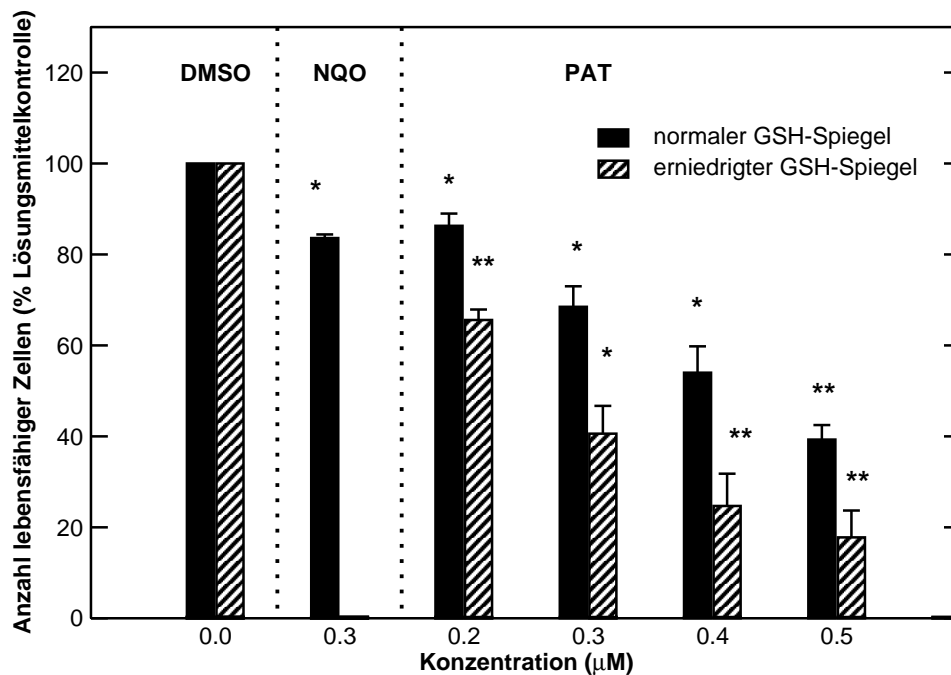


Abb. 3.19: Zytotoxizität von PAT nach Inkubation von MLZ für 24 h. Zur Reduktion des GSH-Spiegels (gestreifte Balken) wurden die Zellen für 24 h mit 20 μM BSO und anschließend mit den Substanzen (1% DMSO im Medium) inkubiert. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm Schwankung). Signifikante Unterschiede zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Student t-Test): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$.

In der Lösungsmittelkontrolle haben die verwendeten MLZ eine Spontanmutationsfrequenz von etwa 70 Mutanten pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen (Abb. 3.20). Die Mutationsfrequenz wird durch die Positivkontrolle 0,3 μM NQO auf etwa 365 erhöht.

PAT erhöht die Anzahl TFT-resistenter Zellen konzentrationsabhängig und signifikant auf bis zu 122 TFT-resistente Zellen pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen (Abb. 3.20). Eine Reduktion des intrazellulären GSH-Spiegels auf 35% der Kontrolle hat keinen Einfluß auf die Spontanmutationsfrequenz, jedoch waren in den mit PAT behandelten Zellen die Mutationsfrequenzen signifikant höher (bis zu 200 TFT-resistente Zellen pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen).

Für Moore *et al.* (2003) ist eine Induktion von mehr als 100 TFT-resistenten Zellen pro 1 Mio. lebensfähiger Zellen in *einem* Versuchsansatz ausreichend, um ein mutagenes Potential festzustellen. Dieses Kriterium sehen Moore *et al.* (2003) gegenüber einer signifikanten Erhöhung als aussagekräftiger an. Auch dieses Kriterium wurde erreicht (Daten nicht gezeigt).

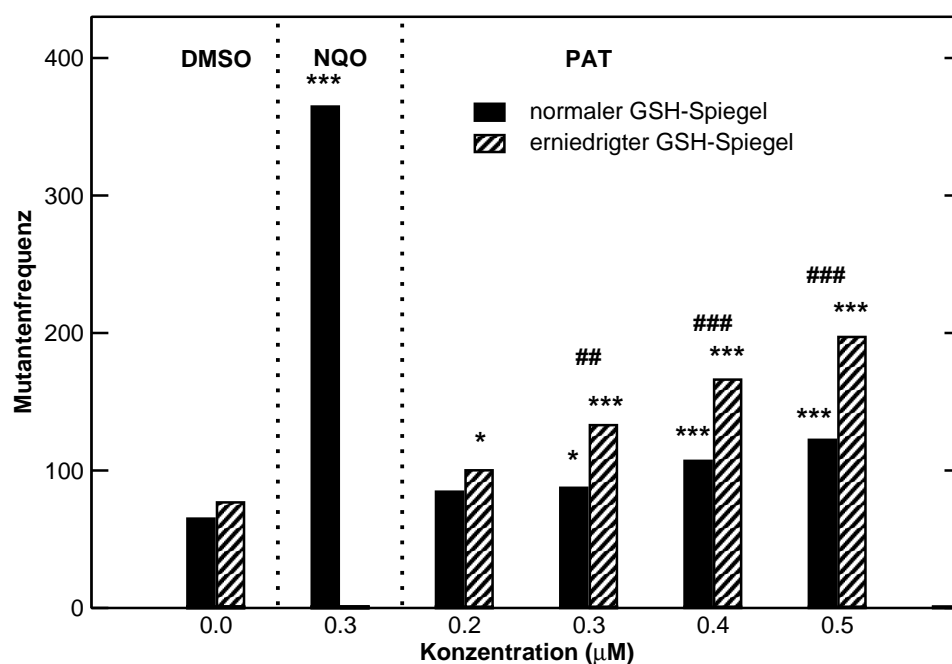


Abb. 3.20: Mutationsfrequenz nach Inkubation mit DMSO (1% im Medium), NQO und PAT für 24 h. Die Daten sind das Mittel aus zwei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten Zellen (Sterne), sowie zwischen Zellen mit normalem und niedrigem GSH-Spiegel, die mit der selben PAT-Konzentration behandelt wurden (χ^2 -Test): */#, $p < 0,05$; **/###, $p < 0,01$; ***/####, $p < 0,001$.

Im Vergleich zum HPRT-Test sind beim TK-Test die Spontanmutationsraten mit etwa 70 höher. Der normale Bereich der Spontanmutationsfrequenz liegt zwischen 50 und 200 (Moore *et al.*, 2003) oder zwischen 20 und 100 (Nestmann *et al.*, 1991).

MLZ mit Punktmutationen haben eine normale Wachstumsgeschwindigkeit, während Zellen mit Deletionen eine langsamere Wachstumsgeschwindigkeit haben und daher kleine Kolonien bilden (Clive *et al.*, 1979; Clements, 2000). PAT induzierte beide Arten der Mutationen. Jedoch nimmt der Anteil kleiner Kolonien Konzentrations-abhängig zu (Abb. 3.21). Bei mit NQO behandelten Zellen sind etwa ein Drittel der Kolonien klein.

Die Ergebnisse des TK-Mutationstests bestätigen die Relevanz der PAT-induzierten Mutagenität. PAT induziert bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen Mutationen. Im Vergleich zu V79-Zellen sind in MLZ niedrigere Konzentrationen nötig, um Mutationen zu induzieren. Vielleicht liegt bei MLZ eine bessere Substanzzugänglichkeit vor, da es sich um eine Suspensionskultur handelt. Die Mutationen beruhen auf Punktmutationen und Deletionen, der Anteil von Deletionen nimmt mit steigender Konzentration zu.

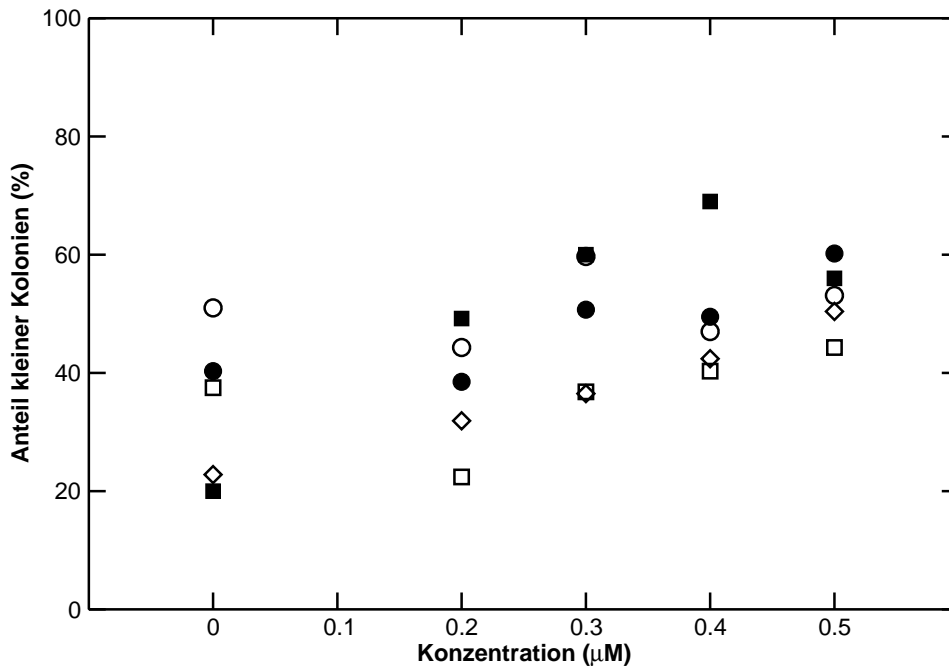


Abb. 3.21: Konzentrationsabhängigkeit des Anteils kleiner TFT-resistenter Kolonien nach Behandlung von MLZ mit PAT. Alle Punkte mit den gleichen Symbolen stammen aus parallelen Experimenten mit Zellen mit normalen (leere Symbole) und reduziertem (gefüllte Symbole) GSH-Spiegel.

Der GSH-Spiegel liegt in den verwendeten MLZ bei etwa $33,5 \pm 4,7$ nmol pro 10 Mio. Zellen. Begleiter *et al.* (1988) geben den GSH-Gehalt mit 4 fmol pro Zelle an. Eine Erniedrigung des intrazellulären GSH-Spiegels auf 35% führt zu einer signifikanten Erhöhung der PAT-induzierten Mutationsfrequenz.

Zum Vergleich und zur besseren Interpretierbarkeit der Ergebnisse des Mutationstests wurde auch in MLZ die Induktion von Mikrokernen durch PAT untersucht. Dazu wurden aus den Inkubationsansätzen des Mutationstests Zellen entnommen und auf Mikrokern hin untersucht.

Bereits nach 24 h Inkubation ist ein Anstieg der Zellen mit Mikrokern feststellbar (Abb. 3.22). Konzentrationen höher als $0,1 \mu\text{M}$ induzieren signifikant erhöhte Mikrokernraten. Nach weiteren 24 h substanzfreier Nachinkubation sinkt die Mikrokernrate wieder, jedoch ist die Mikrokernrate gegenüber der Kontrolle noch signifikant erhöht.

Beim Vergleich der Ergebnisse von PAT und NQO fällt auf, daß durch NQO deutlich mehr Mutationen als Mikrokern induziert werden als es bei PAT der Fall ist. Eine Inkubation mit $0,3$ oder $0,4 \mu\text{M}$ PAT induziert etwa so viele Mikrokern wie $0,3 \mu\text{M}$ NQO. Hingegen werden durch $0,3 \mu\text{M}$ NQO etwa dreimal soviel Mutationen induziert wie durch $0,5 \mu\text{M}$ PAT. Da eine

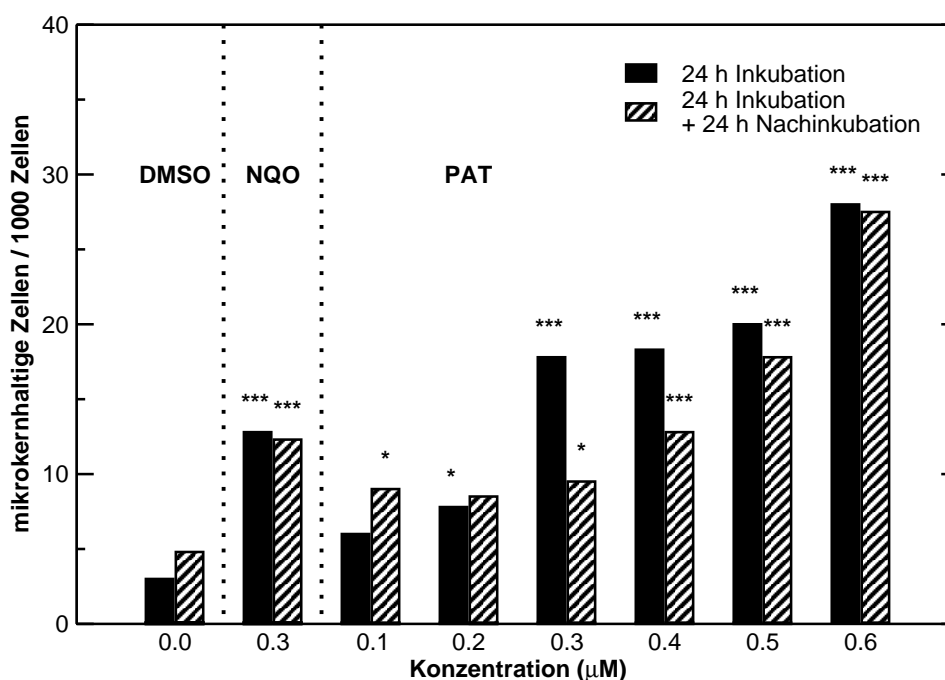


Abb. 3.22: Induktion von mikrokernhaltigen Zellen nach Inkubation von MLZ mit PAT und NQO. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und gegebenenfalls weitere 24 h Substanz-frei nachinkubiert. Die Werte sind die mittlere Häufigkeit aus bis zu vier unabhängigen Versuchen. Sterne geben signifikante Unterschiede gegenüber der jeweiligen Kontrolle wieder (χ^2 -Test): *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$; ***, $p < 0,001$.

Deletion eher zu einem Mikrokern führt als eine Punktmutation, wird die Induktion von kleinen Kolonien mit der Mikrokerninduktion verglichen (Abb. 3.23). Hier zeigt sich, daß diese beiden Parameter besser vergleichbar sind; die Induktion von Mikrokernen und kleinen Kolonien ist ähnlich. Vor allem die Ergebnisse für NQO stimmen besser überein.

Auch die GSH-Abhängigkeit der Mikrokern-Induktion wurde untersucht (Abb. 3.24). Dazu wurde der GSH-Spiegel durch Vorbehandlung mit 20 μM BSO über einen Zeitraum von 24 h erniedrigt. Bei Konzentrationen höher als 0,3 μM PAT ist die Mikrokernrate in den GSH-reduzierten Zellen deutlich erhöht.

Sowohl die Mikrokerninduktion als auch die Induktion von Mutanten erfolgen im gleichen Konzentrationsbereich. Es kommt zu dosisabhängigen und signifikanten Anstiegen. Eine Erhöhung der Mikrokernrate und der Mutationsfrequenz ist bereits bei Konzentrationen mit keiner oder geringer Zytotoxizität zu beobachten. Daher muss von einem relevanten genotoxischen Ereignis ausgegangen werden.

Die sehr hohe Reaktivität von Patulin mit Thiolen und Aminen kann eventuell die mangelnde kanzerogene Wirkung von PAT bei oraler Gabe erklären (Osswald *et al.*, 1978; Becci *et al.*, 1981), während es bei Injektion an der Stelle des ersten Kontakts zur Sarkom-Bildung kam (Dickens und Jones, 1961). PAT würde schon im Magen-Darmtrakt vor allem mit Nahrungsbestandteilen

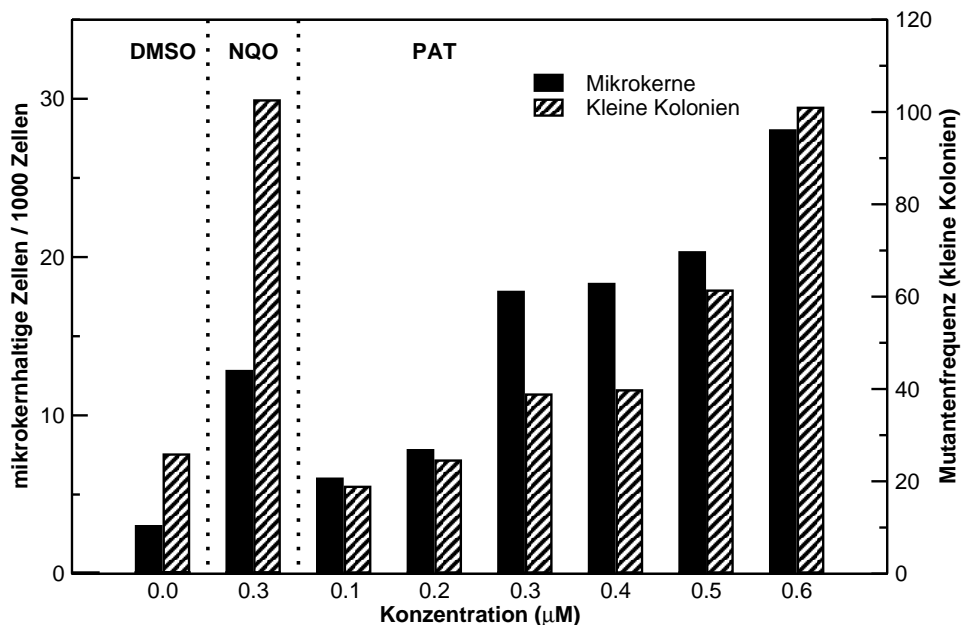


Abb. 3.23: Induktion von Mikrokernen und kleinen Kolonien durch Inkubation mit NQO und PAT für 24 h. Die Mikrokernrate wurde direkt nach der Inkubation bestimmt. Die Mutationsfrequenz der kleinen Kolonien wurde nach der Selektion bestimmt.

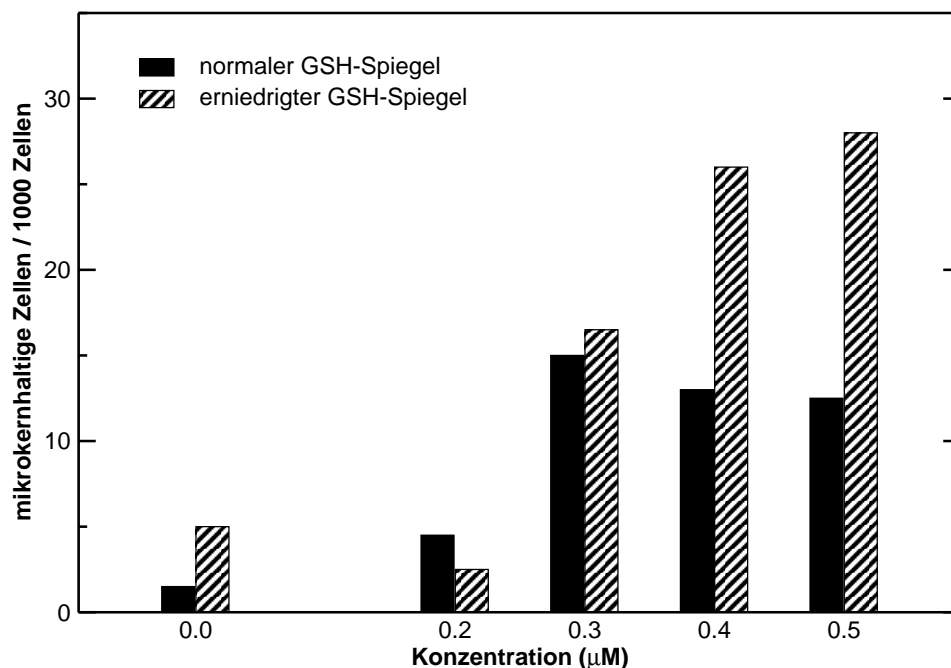


Abb. 3.24: Induktion von mikrokernhaltigen Zellen nach Inkubation von Zellen mit normalem bzw. reduziertem intrazellulärem GSH-Spiegel mit PAT für 24 h. Die Zellen wurden für 24 h mit 20 µM BSO vorbehandelt um dem GSH-Spiegel zu reduzieren. Die Daten sind die mittleren Häufigkeiten aus mindestens zwei Versuchen.

reagieren und steht dann nicht mehr „zur Verfügung“. Hingegen liegt bei der Injektion lokal eine sehr hohe Konzentration vor, daher ist dann ausreichend Substanz vorhanden, um Mutationen zu erzeugen.

3.7 Alkalische Filterelution

3.7.1 Etablierung der alkalischen Filterelution

Die alkalische Filterelution (AFE) nach Kohn *et al.* (1976) erlaubt den Nachweis von DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüchen sowie von alkalilabilen Stellen. Da es experimentell nicht möglich ist, Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen zu unterscheiden, werden die Begriffe hier synonym verwendet, es ist aber in jedem Falle die Summe aus beiden Schadensarten gemeint.

Die Methode basiert auf den unterschiedlichen Geschwindigkeiten, mit denen ungeschädigte DNA und geschädigte DNA in alkalischer Lösung von einem Filter herunter gewaschen werden (Kohn *et al.*, 1976). Dazu werden die Zellen auf einen Polycarbonatfilter überführt, darauf lysiert und dann mit der alkalischen Lösung behandelt. Je stärker die DNA geschädigt ist, desto schneller wird sie von dem Filter gewaschen. Die Geschwindigkeit (Steigungszunahme gegenüber der Kontrolle) gilt als Maß der Schädigung.

Kohn *et al.* (1976) haben beschrieben, daß 1 Gy ionisierende Strahlung zu 0,18 Strangbrüchen pro 10^6 bp führt.

Um die Empfindlichkeit der AFE zu überprüfen und die Methode auf „Strangbrüche pro 10^6 bp“ zu kalibrieren, wurden V79-Zellen mit ionisierender Strahlung aus einem Linearbeschleuniger behandelt.

Es zeigte sich, daß die Empfindlichkeit ungenügend war (Abb. 3.25). Besonders bei den niedrigen Dosen (bis 2,5 Gy) konnte keine Zunahme der Strangbruchraten festgestellt werden. Da bei den hohen Dosen eine Zunahme der induzierten Steigung feststellbar war, lag die Vermutung nahe, daß ein Problem bei der Detektion geringer DNA-Mengen vorlag.

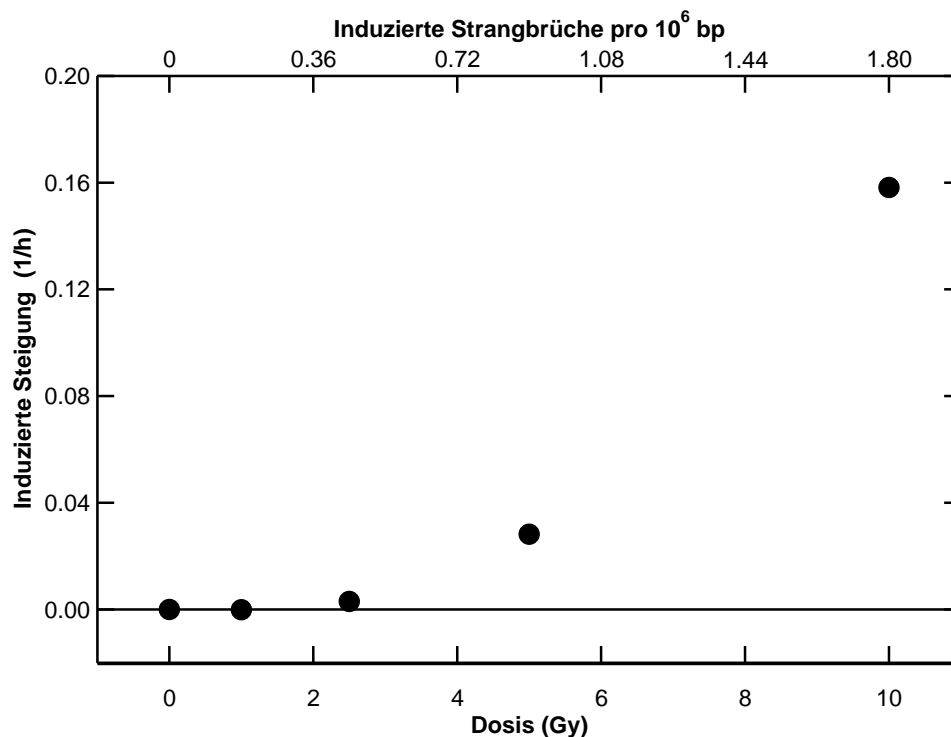


Abb. 3.25: Induktion von Strangbrüchen durch ionisierende Strahlung. Die Zellen wurden direkt nach der Bestrahlung aufgearbeitet.

Daher wurde die DNA-Quantifizierung überprüft. Es wurden verschiedene Konzentrationen Hoechst 33258-Farbstoff eingesetzt (Abb. 3.26).

Die ursprüngliche Hoechst-Menge (1,41 μM) führte bei niedrigen DNA-Mengen zur Reduktion der Fluoreszenz und erlaubte damit keine Quantifizierung bei weniger als 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNA, während dieses mit der niedrigeren Farbstoff-Konzentration (0,47 μM) (Pflaum und Epe, 2000) möglich ist. Die Nachweis- bzw. die Bestimmungsgrenzen liegen bei 0,062 bzw. 0,21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (berechnet mit „Kalibo“). Mit den neuen Parametern wurde die Kalibrierung wiederholt (Abb. 3.27).

Nun ist auch bei einer Bestrahlung mit weniger als 2,5 Gy ein Anstieg der Strangbruchrate zu detektieren; eine Dosis von mehr als 0,5 Gy entspricht etwa einer Induktion von mehr als 0,09 Strangbrüchen pro 10^6 bp. Durch Bestrahlung mit 1 Gy wird die Steigung um 0,0071 /h erhöht. Mit DNA der eingefrorenen Zellen ist die gemessene induzierte Steigung größer (0,0218 /h Gy), jedoch bleibt der dosisabhängige Trend bestehen.

Die AFE wurde damit erfolgreich etabliert und besitzt eine ausreichende Empfindlichkeit zum Nachweis von DNA-Schäden.

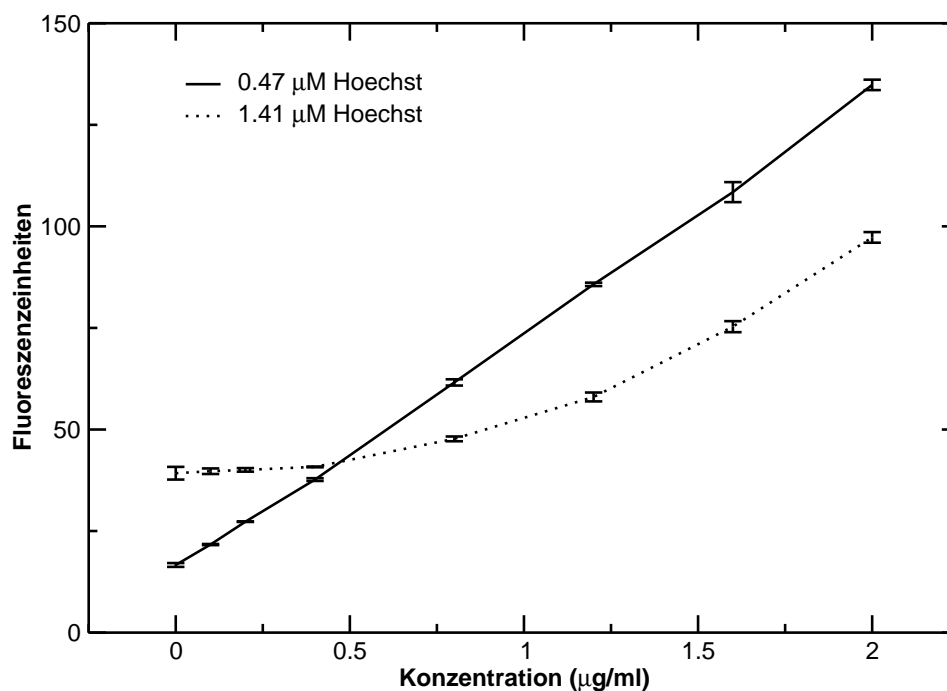


Abb. 3.26: Kalibrierkurven zur Quantifizierung von DNA mit unterschiedlichen Konzentrationen des DNA-Farbstoffs Hoechst 33258. Anregung bei 360 nm, Emission bei 450 nm.

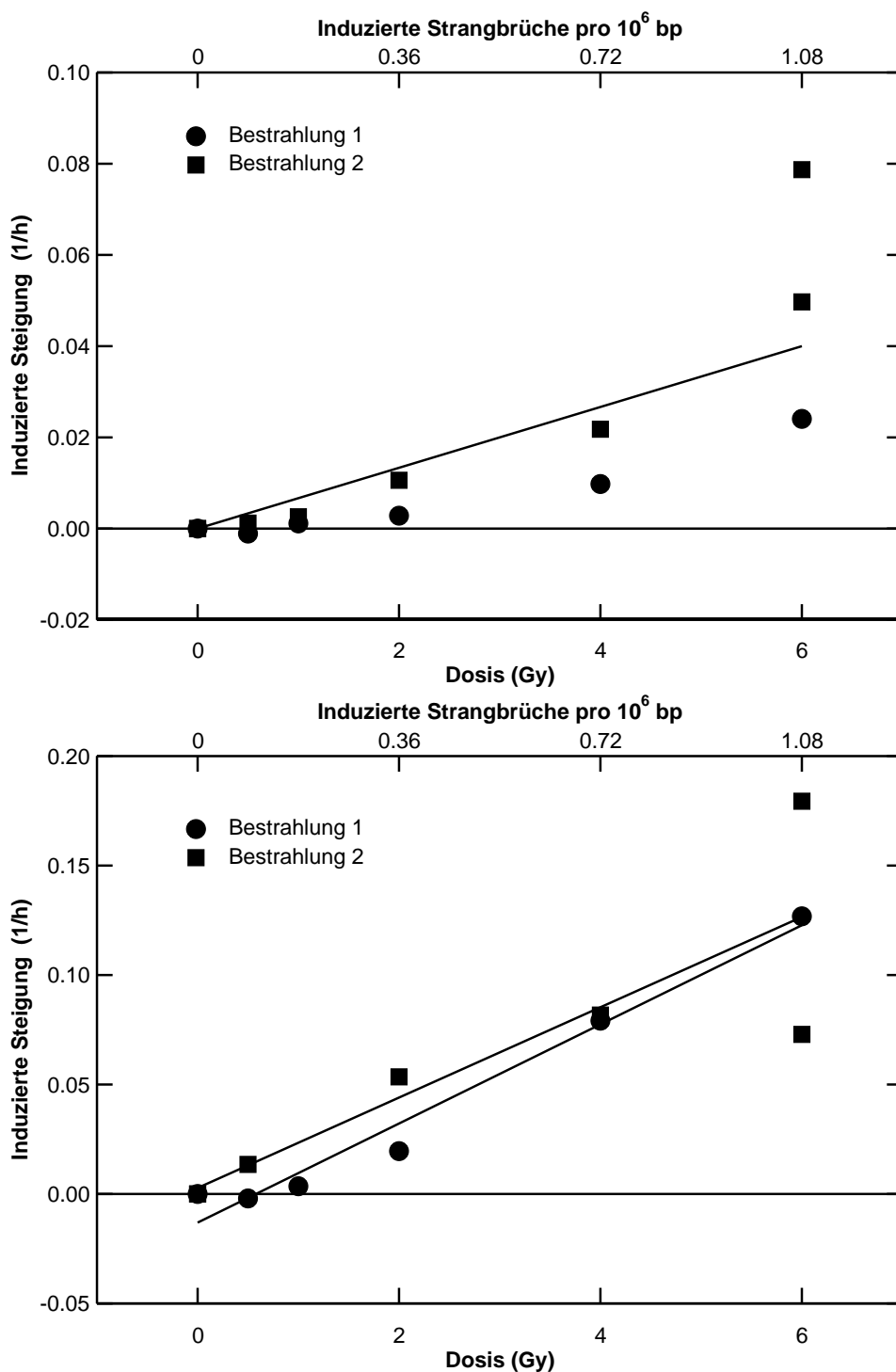


Abb. 3.27: Induktion von Strangbrüchen durch ionisierende Strahlung. Ein Teil der Zellen wurde direkt nach der Bestrahlung aufgearbeitet und auf Strangbrüche hin untersucht (oben). Ein weiterer Teil der Zellen wurde in PBS-G suspendiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und später aufgearbeitet (unten).

3.7.2 Nachweis von oxidativen Schäden

Der Nachweis von oxidativen DNA-Schäden beruht auf dem spezifischen Einschneiden der DNA an Stellen mit oxidativen DNA-Schäden (Epe *et al.*, 1993). Das bakterielle DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) schneidet selektiv an Stellen mit 8-Hydroxyguanin und Formamidopyrimidin (zusammengefasst in Epe, 1995). Es werden aber auch methylierte und ethylierte Basen detektiert (Speit *et al.*, 2004). Die zusätzlichen Strangbrüche, die durch das Fpg erzeugt werden, sind direkt proportional zur Anzahl oxidativer Schäden in der DNA. Die Umrechnung erfolgt daher auch mit den in Kap. 3.7.1 bestimmten Faktoren.

Zur Induktion von oxidativen Schäden wurden kultivierte Zellen mit sichtbarem Licht auf Eis bestrahlt (Pflaum *et al.*, 1998; Kielbassa *et al.*, 1997). Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe der AFE untersucht. Es wurde ein zeitabhängiger – und damit dosisabhängiger – Anstieg der Strangbruchrate und der Rate oxidativer Schäden beobachtet (Abb. 3.28). Eine Bestrahlung für 10 min entspricht einer Dosis von 1,5 kJ (pers. Mitteilung T. Schwerdtle).

Der Grundschaden der V79-Zellen beträgt etwa 0,2 Fpg-sensitive Stellen pro 10^6 bp. Durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht für 10 min wurde die Anzahl der Strangbrüche um etwa 0,2 pro 10^6 bp und die Anzahl der oxidativen Schäden um etwa 3,2 pro 10^6 bp erhöht.

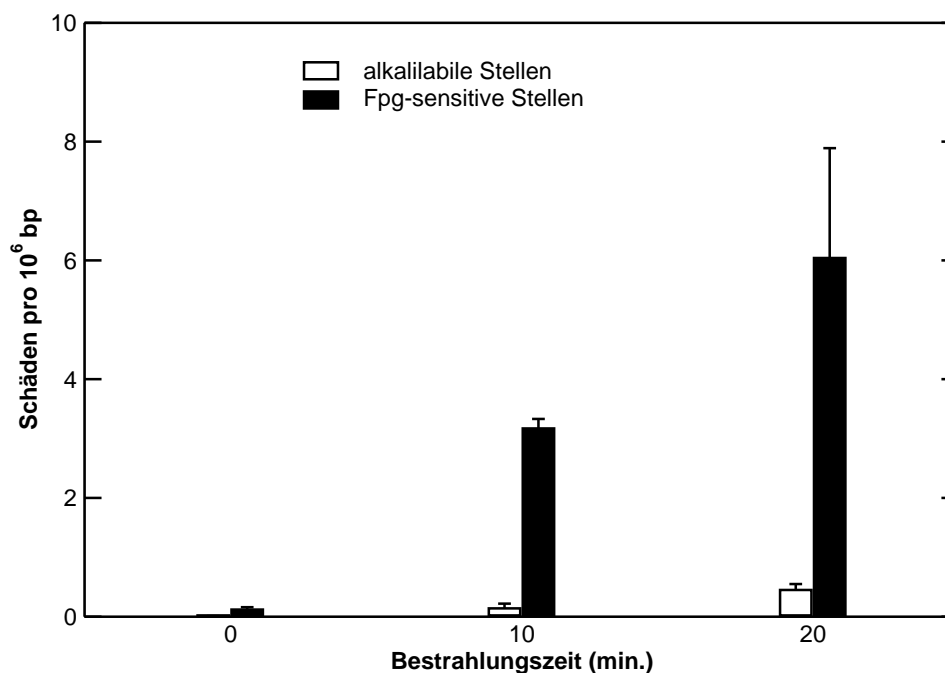


Abb. 3.28: Induktion von Strangbrüchen und oxidativen Schäden durch sichtbares Licht. V79-Zellen wurden in PBS-G suspendiert und auf Eis mit sichtbarem Licht bestrahlt.

Pflaum *et al.* (1998) berichten, daß die Anzahl Fpg-sensitiver Stellen vom Porphyrin-Gehalt der Zellen abhängt. Eine Erhöhung des Gehalts führte auch zu höheren Raten von oxidativen Schäden. Vermutlich wirken Porphyrine als intrazelluläre Photosensibilisatoren, die reaktive Sauerstoffspezies erzeugen. Epe (1995) geht davon aus, daß durch Licht angeregte Photosensibilisatoren direkt mit DNA reagieren können, oder daß durch Licht Singulett-Sauerstoff generiert wird.

3.7.3 Induktion von Strangbrüchen und oxidativen Schäden durch PAT

V79-Zellen wurden für eine Stunde in Suspension mit PAT inkubiert und anschließend auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden untersucht (Abb. 3.29). Bei Konzentrationen kleiner etwa 6 μM war kein Anstieg dieser Schäden zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen konnte jedoch ein dosisabhängiger Anstieg von oxidativen Schäden und von Strangbrüchen beobachtet werden.

Die Koloniebildungsfähigkeit gilt als ein etwas empfindlicherer Parameter als die Färbung mit Trypanblau. Sie gibt auch an, ob ein Schaden bzw. ein Schadensniveau mit dem Überleben der Zellen vereinbar ist. Nach Inkubation mit mehr als 2,4 μM PAT waren keine lebensfähigen Zellen mehr nachweisbar (Abb. 3.29).

Aufgrund von toxischen Wirkungen auf Zellen kann die Kompartimentierung der Zellen gestört werden (Nekrose) oder es kann im Rahmen des programmierten Zelltodes zur Aktivierung von Nukleasen kommen (Apoptose). Bei beiden Mechanismen kommt es zur starken Fragmentierung der DNA. Diese kommt allerdings nicht durch eine spezifische Wirkung zustande, sondern ist eine unspezifische zytotoxische Wirkung. Daher empfehlen Elia *et al.* (1993) für Rattenhepatozyten eine obere Grenze von 30% mit Trypanblau anfärbbare Zellen nach dreistündiger Inkubation. Eine Messung der Zytotoxizität mit Trypanblau direkt nach der Inkubation ist nicht in jedem Fall ausreichend empfindlich (Storer *et al.*, 1996); gerade bei Kurzzeit-Inkubationen kann die Plasmamembran bei sterbenden Zellen noch intakt sein. Daher sollte Zytotoxizität (auch) später gemessen werden (Storer *et al.*, 1996), wobei mindestens 70% der Zellen intakte Plasmamembranen haben sollten.

Da die Konzentrationen, die einen Anstieg der Strangbruchrate und der Rate oxidativer Schäden auslösen, stark zytotoxisch wirken, wurde darauf verzichtet, mittels statistischer Tests signifikante Unterschiede zu berechnen, denn der Effekt hat keine biologische Relevanz.

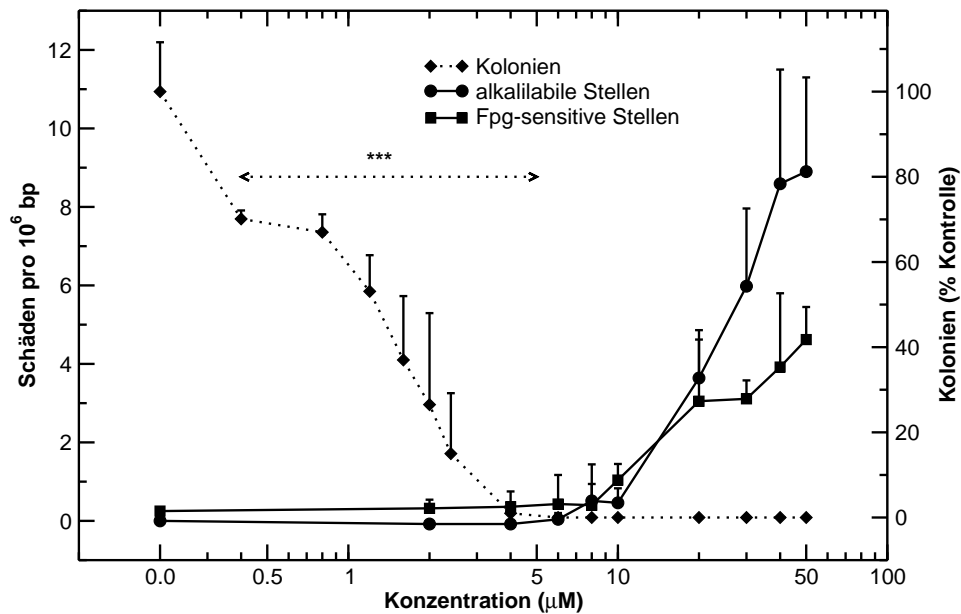


Abb. 3.29: Induktion von Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden nach Inkubation von in Medium suspendierten V79-Zellen für 1 h mit PAT. Unter gleichen Bedingungen wurde die Koloniebildungsfähigkeit der inkubierten Zellen untersucht. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle wurden mit dem Student t-Test untersucht: ***, $p < 0.005$.

Auch bei längerer Inkubation (4 h, adhärent) wurde bei Konzentrationen bis 2,4 μM kein Anstieg von Strangbrüchen oder oxidativen Schäden beobachtet (Abb. 3.30). Aufgrund der starken Zytotoxizität wurden hier keine höheren Konzentrationen eingesetzt.

Da kein Anstieg der Strangbruchrate beobachtet wird, scheidet eine Hemmung der Topoisomerase II (Kap. 3.1) aus. Dieses hätte gegebenenfalls mit der neutralen Filterelution näher untersucht werden müssen.

Umeda *et al.* (1972) beobachteten mittels Dichtezentrifugation in zytotoxischen Konzentrationen (200 μM PAT) die Induktion von Strangbrüchen in HeLa-Zellen. Eine fünfstündige Erholungszeit nach der einstündigen Inkubation ließ die Strangbruchraten weiter ansteigen.

Umeda *et al.* (1977) beobachteten nach Inkubation von FM3A Zellen für eine Stunde mit 20 bzw. 64 μM PAT sowie nach Inkubation für 24 h mit 6,4 bzw. 20 μM einen Anstieg der Strangbruchrate. Die Autoren weisen darauf hin, daß diese Konzentrationen deutlich (mindestens Faktor 10) höher sind als die Konzentrationen, die Mutationen und Chromosomenaberrationen induzieren.

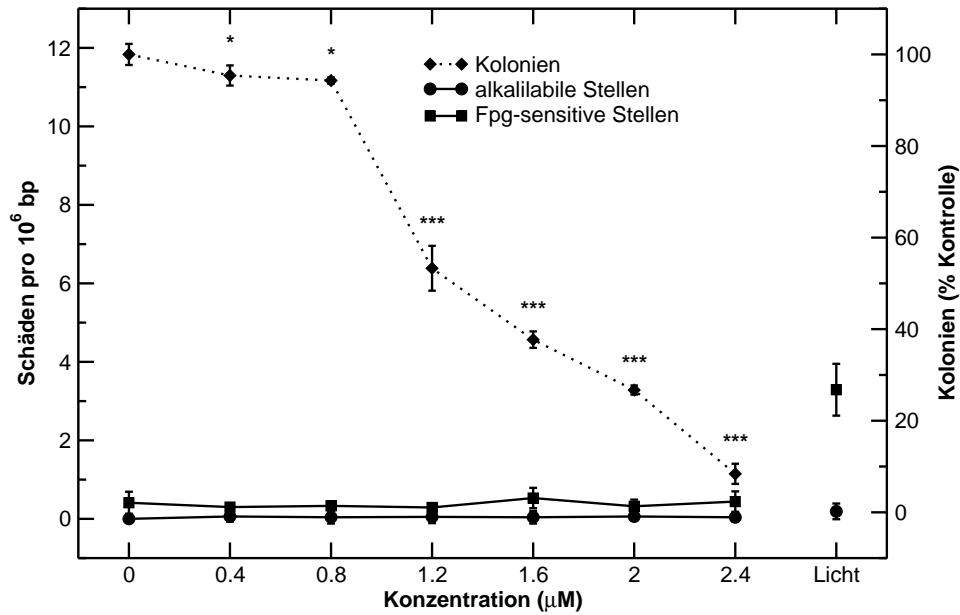


Abb. 3.30: Induktion von Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden nach Inkubation von V79-Zellen für 4 h mit PAT. Zum Vergleich sind Daten von mit Licht (1,5 kJ) bestrahlten Zellen dargestellt. Unter gleichen Bedingungen wurde die Koloniebildungsfähigkeit der inkubierten Zellen untersucht. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Zellen und der Kontrolle wurden mit dem Student t-Test untersucht: *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.005$

In Rattenfibroblasten und in Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters wurden in zytotoxischen Konzentrationen (12 bis 60 μM , 0,5 bis 3 h) mittels Alkalischer Entwindung die Induktion von Strangbrüchen beobachtet (Stetina und Votava, 1986).

In neuerer Zeit haben Liu *et al.* (2003) mit der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) Nierenzellen eines menschlichen Embryos (HEK293) auf die Induktion von Strangbrüchen und oxidativen Schäden durch PAT untersucht. Sie fanden bei Inkubation mit mehr als 10 μM PAT für 2 h einen Anstieg beider Schadensarten. Ein MTT-Test zum gleichen Zeitpunkt gemessen zeigte keine Zytotoxizität. Inkubation für 24 h mit PAT führt ab 2 μM zu deutlicher Zytotoxizität.

Es ist keine Untersuchung bekannt, die bei keiner oder geringer Zytotoxizität die Induktion von Strangbrüchen oder oxidativen DNA-Schäden durch PAT beschreibt. Die Alkalische Entwindung, die Einzelzellgelelektrophorese und die AFE sind ausreichend empfindliche Methoden, die bei anderen Substanzen auch in relevanten Konzentrationen, d. h. beispielsweise mutagenen Konzentrationen, DNA-Schäden detektieren können (beispielsweise Sina *et al.*, 1983; Garberg *et al.*, 1988; Storer *et al.*, 1996; Sasaki *et al.*, 2000).

Daher wird davon ausgegangen, daß andere Mechanismen für die mutagene Wirkung verantwortlich sind.

3.8 DNA-DNA quervernetzendes Potential

3.8.1 Fluorimetrische Methode

Im zellfreien System führt die Inkubation von DNA mit PAT zu Quervernetzungen (Fliege, 1999). Daher wurde untersucht, ob auch im Zellkultur-System ein Potential zur DNA-DNA Interstrang-Quervernetzung (DDX) von PAT nachweisbar ist. Dazu wurde ein Testsystem (de Jong *et al.*, 1986) etabliert, das auf der Detektion von doppelsträngiger DNA beruht. DNA wird in der Hitze denaturiert; je mehr doppelsträngige DNA nach dem Abkühlen im Ansatz vorhanden ist, desto stärker ist das quervernetzende Potential.

Das Fluoreszenzsignal der Kontrolle unterliegt relativ starken Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen; da dieses Signal mit in das Ergebnis eingerechnet wird, kommt es auch zwischen den einzelnen Versuchen zu starken Schwankungen. Deshalb werden hier nur repräsentative Versuche dargestellt. Die Achsen zwischen den einzelnen Versuchen sind daher nicht direkt vergleichbar.

Als Positivkontrolle wurde MMC (Merk und Speit, 1999) eingesetzt. Es wurde sowohl die Konzentrationsabhängigkeit als auch die Zeitabhängigkeit der Induktion von DDX untersucht. Nach Inkubation von V79-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von MMC ist ein dosisabhängiger Anstieg der DDX-Rate zu beobachten (Abb. 3.31). Nach Inkubation von V79-Zellen mit MMC gibt es ein Maximum an DDX nach 12 h, die Rate an DDX sinkt dann wieder. Offenbar werden die DNA-Schäden repariert.

Schließlich wurde die Induktion von DDX durch PAT untersucht. Auch hier wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit des quervernetzenden Potentials erfasst (Abb. 3.32).

Nach Inkubation von V79-Zellen mit PAT ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg der quervernetzten DNA zu sehen. Nach Inkubation mit PAT scheint sich ein Plateau zu bilden. Da PAT direkt mit DNA reagieren kann (Fliege, 1999), ist ein schneller Anstieg der quervernetzten DNA möglich, während MMC erst durch Reduktion aktiviert werden muss (Tomasz, 1995). Aufgrund der Thiol-Reaktivität kann PAT evtl. die DNA-Reparatur hemmen, was eine Abnahme der Anzahl der DNA-Schäden wie bei MMC verhindern würde.

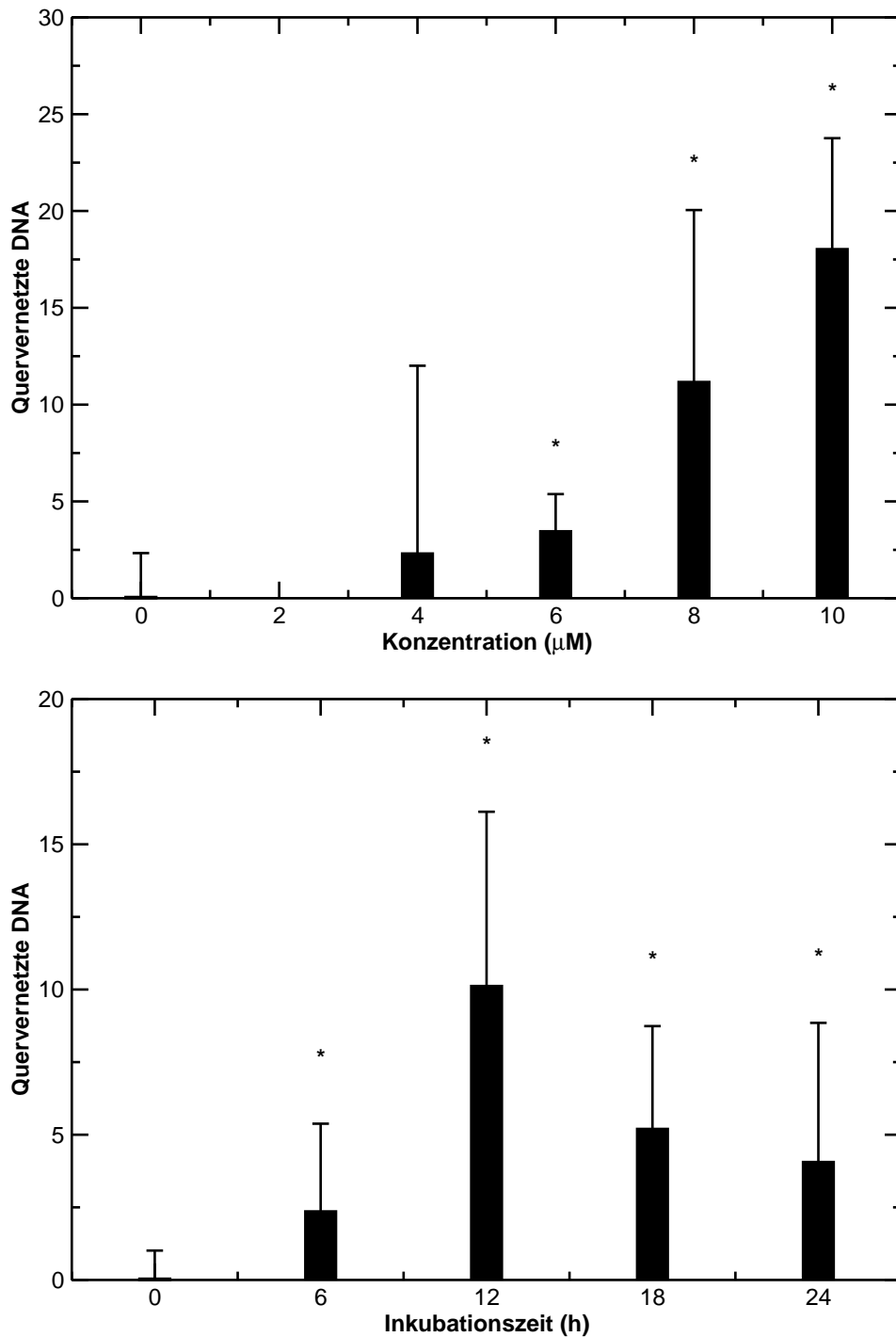


Abb. 3.31: Induktion von quervernetzter DNA nach Inkubation mit MMC. V79-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (oben) MMC inkubiert oder mit 10 μM MMC für verschiedene Zeiten behandelt (unten). Die Ergebnisse sind als Anstieg der doppelsträngigen DNA relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt. Dargestellt sind die Daten aus einem repräsentativen Versuch mit bis zu fünf Aufarbeitungen je Inkubation. Signifikante Unterschiede von behandelten Zellen zur Lösungsmittelkontrolle wurden mit dem Student t-Test untersucht: *, $p < 0,05$.

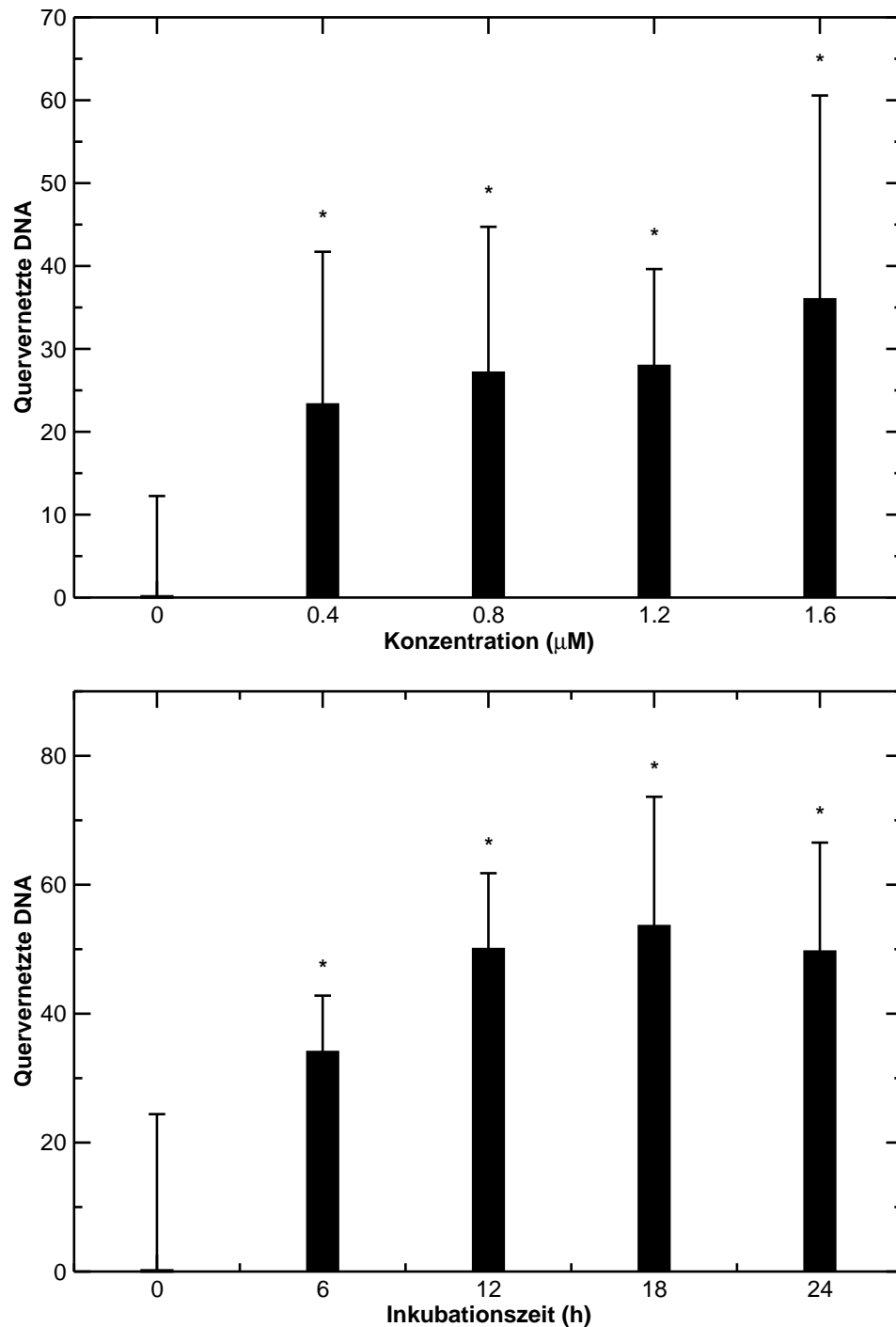


Abb. 3.32: Induktion von quervernetzter DNA nach Inkubation mit PAT. V79-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen (oben) PAT inkubiert oder mit 1,5 μM PAT für verschiedene Zeiten behandelt (unten). Die Ergebnisse sind als Anstieg der doppelsträngigen DNA relativ zu unbehandelten Zellen dargestellt. Dargestellt sind die Daten aus einem repräsentativen Versuch mit bis zu fünf Aufarbeitungen je Inkubation. Signifikante Unterschiede von behandelten Zellen zur Lösungsmittelkontrolle wurden mit dem Student t-Test untersucht: *, $p < 0,05$.

3.8.2 Alkalische Filterelution

Durch Modifikation des Protokolls für die AFE können auch DNA-DNA-Quervernetzungen erfasst werden. Dazu müssen definiert Strangbrüche in die DNA der behandelten und der unbehandelten Zellen eingeführt werden. Wenn die DNA quervernetzt ist, ist sie quasi länger und eluiert daher langsamer vom Filter als die nicht-quervernetzte DNA aus der Lösungsmittelkontrolle (Kohn *et al.*, 1981; Bradley und Dysart, 1985). Um Strangbrüche zu erzeugen, wurden die Zellen mit sichtbarem Licht bestrahlt und dann die DNA mit Fpg-Protein behandelt.

V79-Zellen wurden mit PAT inkubiert und zum Teil auf Eis mit sichtbarem Licht bestrahlt. In den unbestrahlten Zellen bestätigt sich (Abb. 3.33), daß PAT keine Strangbrüche oder oxidative Schäden induziert (Kap. 3.7.3). Nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht ist ein Anstieg der oxidativen Schäden zu beobachten. Dieser Anstieg wird durch vorherige Inkubation mit PAT um 1/3 reduziert, dieses entspricht der Induktion von DDX.

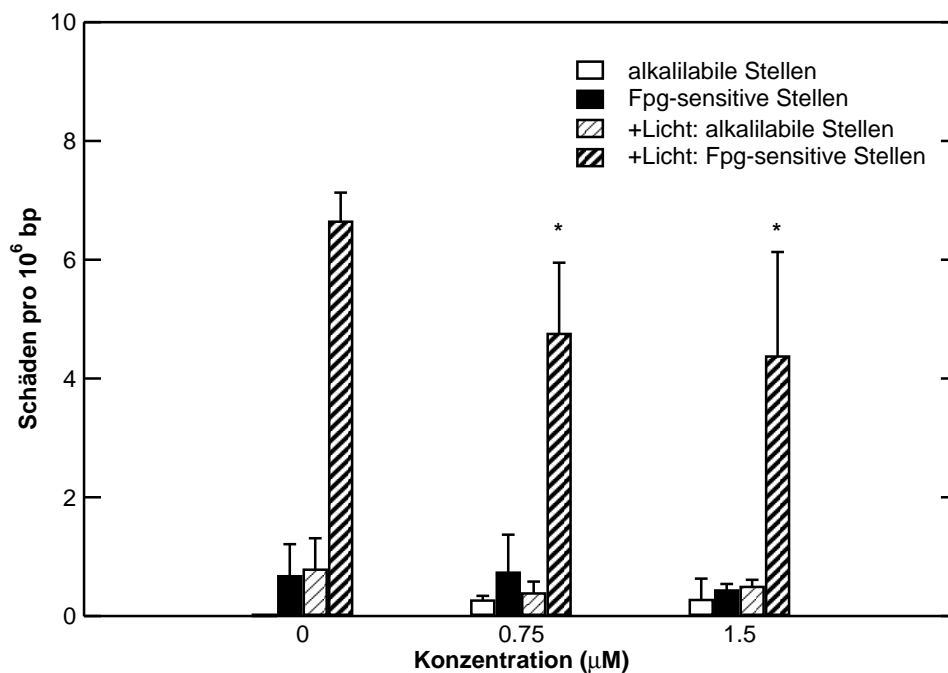


Abb. 3.33: Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen nach Inkubation von V79-Zellen mit PAT für 4 h. Zur Induktion von Strangbrüchen wurden die Zellen für 20 min mit sichtbarem Licht bestrahlt. Die Zellen wurden ohne und mit Bestrahlung auf die Induktion von Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden hin untersucht. Es sind die induzierten Schäden je nach Behandlung getrennt dargestellt. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikante Unterschiede der behandelten Zellen zur Kontrolle (Student t-Test): *, $p < 0,05$.

Eine evtl. gesteigerte DNA-Reparatur kann keinen Einfluß auf die Reduktion der oxidativen Schäden haben, da die Zellen nach der Inkubation bis zur Lyse auf Eis gelagert werden. Möglich ist jedoch ein protektiver Effekt von intrazellulären Antioxidantien, die als Reaktion auf die PAT-Inkubation gebildet werden und die die durch Licht induzierten reaktiven Sauerstoffspezies abfangen können (Shan *et al.*, 1990; Morley *et al.*, 2003).

Da dieses Problem nicht direkt experimentell lösbar ist, wurde eine Elutionsmethode eingesetzt, die die Strangbrüche nach der Lyse in die DNA einfügt (Batel *et al.*, 1993). Dazu werden die Zellen auf dem Filter lysiert und anschließend die DNA mit einer Lösung eines Bleomycin-Fe(II)-Komplexes behandelt. Dieser induziert direkt Strangbrüche. Eine vorherige Inkubation mit bis zu 2 μM PAT reduziert die durch Bleomycin induzierten Strangbrüche um bis zu 15% (Abb. 3.34).

Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der Zytotoxizität von PAT nicht eingesetzt werden.

Beide AFE-Methoden (Induktion von Strangbrüchen durch Licht und durch Bleomycin-Fe(II)) kommen zu ähnlichen Ergebnissen, nämlich der Reduktion der induzierten Schäden. Diese Re-

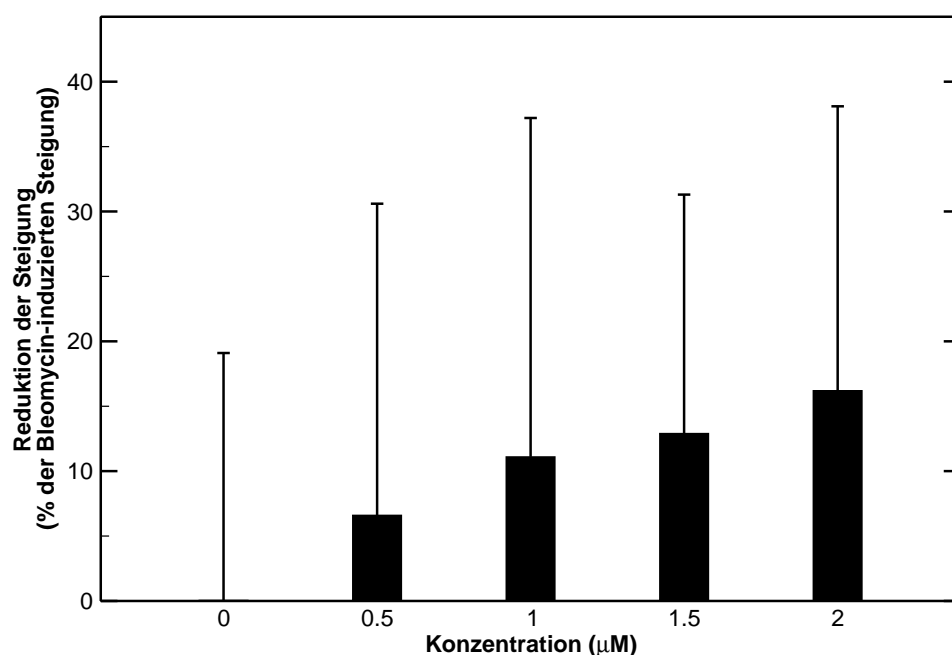


Abb. 3.34: Einfluß einer Inkubation von V79-Zellen mit PAT für 4 h auf die durch Bleomycin-Fe(II)-induzierten Strangbrüche. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

duktion der Schäden deutet auf die Induktion von DDX hin. Dies stimmt mit den Ergebnissen der oben beschriebenen fluorimetrischen Methode nach de Jong *et al.* (1986) überein.

Die Induktion von DDX durch PAT in kultivierten Zellen wurde nach meinem Wissen in der Literatur noch nicht beschrieben.

Alle drei Methoden zeigen bei Konzentrationen, die auch Mikrokerne und Mutationen induzieren können, eine Induktion von DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen an. Quervernetzungen können zu Deletionen führen, dieses würde zu den Ergebnissen des TK-Mutationstests passen.

Die Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen könnte einen möglichen Mechanismus für die genotoxische und mutagene Wirkung von PAT darstellen.

4 Zusammenfassung

Das Mykotoxin Patulin kommt in Lebensmitteln vor, die von den Schimmelpilzspezies *Aspergillus*, *Penicillium* oder *Byssoschlamys* befallen wurden. Es werden vor allem Äpfel und andere Früchte befallen.

Trotz des gut untersuchten Vorkommens von Patulin in Lebensmitteln ist der Wirkmechanismus für das genotoxische Potential von Patulin weitgehend unbekannt.

Der Mikrokerntest ist ein sehr empfindliches Testsystem zur Erfassung von genotoxischen Wirkungen. Er wurde hier dazu eingesetzt, die genotoxische Wirkung von Patulin näher zu charakterisieren. Dazu wurden V79-Zellen mit Substanzen inkubiert, die (a) DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen (Etoposid), (b) Nukleotide alkylieren (Ethylmethansulfonat), (c) die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induzieren (Quercetin) und (d) DNA-Stränge quervernetzen (Mitomycin C). Das Profil mit verschiedenen Inkubationszeiten ergibt einen Hinweis auf den Wirkmechanismus.

Bei Etoposid kam es ab der ersten Zellteilung zur Induktion von Mikrokerneln, die Mikrokernelrate sank dann mit der zweiten Zellteilung wieder ab. Bei Ethylmethansulfonat waren zwei Zellteilungen bis zur Mikrokernelentstehung nötig; nach zwei bis drei Populationsverdopplungen kam es zu einem Maximum. Das Profil von Mitomycin C stand etwa zwischen denen von Etoposid und Ethylmethansulfonat, zunächst wurden keine Mikrokerne induziert, mit der ersten bis zur dritten Populationsverdopplung kam es zum Anstieg der Mikrokernelrate. Patulin verhielt sich im Mikrokerntest ähnlich wie Mitomycin C.

Eine Induktion von Mikrokerneln braucht keine biologischen Konsequenzen zu haben. Daher wurde das mutagene Potential von Patulin untersucht. Mutationen sind wichtige Ereignisse bei der Entstehung von Tumoren. Patulin erwies sich im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Mutationstest als mutagen. Die mutagene Potenz war in etwa gleich hoch wie die des bekannten Mutagens 4-Nitrochinolin-N-oxid.

Mit dem Thymidinkinase-Mutationstest wurde die Art des mutagenen Schadens näher untersucht. Dieser Mutationstest hat die Besonderheit, daß er eine Unterscheidung zwischen Punktmutationen und größeren Deletionen erlaubt. Patulin war auch in diesem Testsystem mutagen und induzierte sowohl Deletionen als auch Punktmutationen. Es gab einen Konzentrations-abhängigen Trend hin zu Deletionen.

Da Patulin mit Thiolen reagieren kann, wurde der Einfluß eines geänderten Glutathion-Spiegels auf Patulin-vermittelte Effekte untersucht. Zur Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Spiegels wurde mit Glutathion-Ethylester inkubiert, wodurch sich der intrazelluläre Glutathion-Spiegel verdreifachte. Eine Inkubation von V79-Zellen mit Buthioninsulfoximin, einem Inhibitor der γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase, führte zu einer Reduktion des Glutathion-Spiegels auf 40% der Kontrolle.

Eine Inkubation von V79-Zellen mit Patulin führte zum kurzfristigen Absinken und dann deutlichen Anstieg auf bis fast das Dreifache des normalen Glutathion-Spiegels. Anschließend fiel der Glutathion-Spiegel wieder ab; er war nach 24 h Inkubation mit Patulin jedoch noch um bis zu 60% erhöht. Dieser Anstieg ließ sich durch Koinkubation mit Buthioninsulfoximin hemmen. Das deutet darauf hin, daß es sich bei der Erhöhung um eine physiologische Reaktion auf die Inkubation mit Patulin handelt, die unter anderem die vermehrte Biosynthese von Glutathion umfaßt.

Wurde der Glutathion-Spiegel vor der Inkubation mit Patulin durch Vorinkubation mit Buthioninsulfoximin erniedrigt, war ebenfalls ein Anstieg des Glutathion-Spiegels festzustellen. Eine vorherige Erhöhung des Glutathion-Spiegels verhinderte den Patulin-vermittelten Anstieg des Glutathion-Spiegels.

Eine Erniedrigung des Glutathion-Spiegels führt zu einer erhöhten Zytotoxizität von Patulin. Auch war die Mutagenität im HPRT-Test signifikant erhöht. Eine Erhöhung des intrazellulären Glutathion-Spiegels auf etwa das dreifache hob die Mutagenität auf. Im Thymidinkinase-Mutationstest bestätigte sich dieser Effekt der erhöhten Mutagenität bei erniedrigtem Glutathion-Spiegel. Die Modulation selbst hatte keinen Einfluß auf die Mutationsfrequenzen.

Kultivierte Zellen reagieren auf Stress häufig durch Auslösen eines Zellzyklusarrestes. Inkubation mit Patulin führte zu einem G2-Arrest des Zellzyklus. Je nach Substanzkonzentration und Vorbehandlung der Zellen hielt der Arrest unterschiedlich lange an; je höher die Substanzkonzentration und je niedriger der Glutathion-Spiegel, desto länger der Arrest. Anschließend proliferierten die Zellen partiell synchronisiert weiter.

Die Induktion von Alkali-labilen Stellen und oxidativen DNA-Basenmodifikationen sind häufig Schäden, die durch toxische Fremdstoffe erzeugt werden. Um diese Schäden nachzuweisen, wurde die alkalische Filterelution etabliert und mittels ionisierender Strahlung kalibriert. Die Nachweisgrenze lag bei etwa 0,1 Schaden pro 10^6 Basenpaaren. In Verbindung mit dem bakteriellen DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidinglycosylase stand ein sehr empfindliches System zur Detektion von oxidativen DNA-Modifikationen zur Verfügung.

Inkubation von Zellen mit Patulin führte zu keinem detektierbaren Anstieg von Alkali-labilen Stellen oder oxidativen DNA-Modifikationen. Erst durch hochzytotoxische Konzentrationen kam es zum Anstieg dieser Schäden.

Da ein Molekül Patulin mit mehreren Nukleophilen reagieren kann, kann es eventuell DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen verursachen. Daher wurden zwei Methoden etabliert, um Quervernetzungen zu detektieren, eine fluorimetrische Methode und eine Methode, die auf der alkalischen Filterelution basiert. Beide Methoden ergaben für Patulin ein DNA-DNA-Interstrang-quervernetzendes Potential. Diese Wirkung wird durch ähnlich niedrige Patulin-Konzentrationen erzeugt, wie sie auch zu Mikrokernen und zu Mutationen führen. Die Induktion von DNA-DNA-Quervernetzungen könnte daher einen möglichen Mechanismus für die genotoxische und mutagene Wirkung von Patulin darstellen.

5 Material und Methoden

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammen von Carl Roth, Fluka/Sigma/Aldrich oder VWR in mindestens der jeweils nötigen Reinheit. Die Firmensitze sind im Anhang aufgelistet.

Wenn nicht anders angegeben, wird VE-Wasser aus der Hausversorgung verwendet.

5.1 Geräte

Sterilbank Uni Equip Uniflow UVUB 1200 Biohazard

Brutschrank

Sanyo CO₂ -Inkubator MCO-17AI

Heraeus B 5061 EK-CO₂

Zellzählgerät, elektronisch Schärfe Systeme CASY®1 DT

Fluoreszenzmikroskop

- Zeiss Axioskop Plan Neofluor
Okular: 10x; Objektive: 63x/100x (Oil)
Filterblocks: A (DAPI), I2/3 (FITC), N2(Rhodamin), Tripelfilter
- Nikon Eclipse E400
Okular: 10x; Objektive: Plan Apo 60x, 100x (Öl)
Filterblocks: UV-2A (DAPI, Ex¹: 330-380, DM²: 400, BA³: 420), G-2A (Rhodamin, Ex: 510-560, DM: 575, BA: 590), FITC (Ex: 465-495, DM: 505, BA: 515-555), Tripelfilter
Dokumentation: Spot-RT monochrom CCD-Digitalkamera (Diagnostic Instruments), MetaView (Universal Imaging Corp.)

Durchflusszytometer Partec PA II, Anregung mit Quecksilberdampfampe

¹Anregung, Wellenlänge in nm

²Dichroistischer Spiegel, Wellenlänge in nm

³Emissionsfilter, Wellenlänge in nm

Lampe für sichtbares Licht Hedler Turbo Lux Profi, Maxi Soft Compact (40 cm x 40 cm)

Phasenkontrastmikroskop Leitz Labovert FS; Objektive: 10x, 20x, 32x

Mikrotiterplattenlesegerät Tecan GENios mit Auswertesoftware XFluor

Handzählgeräte (VWR)

Pipetten

Biozym Precision 0,5 – 10 µl / 5 – 50 µl / 50 – 200 µl

Eppendorf 50 µl / 100 µl / Research 2 – 20 µl / Research 20 – 200 µl / Research 500 – 5000 µl
/ Oktapette / Multipette plus

Abimed Pipetman P5000 / P1000 / P200 / P100 / P20 / P2

Roth 0,5 – 10 µl / 10 – 100 µl / 100 – 1000 µl / 0,5 – 5 ml

Zentrifugen

Heraeus Megafuge 1.0R (Kendro) mit Rotor 2705, Zentrifugenbecher 2252 H, Zytozentrifuge

Eppendorf 5417R

Trockenschrank Heraeus

Wasserbad mgw Lauda, ThermoStar

Waagen

Sartorius Handy H 51 und PT 1200

Mettler ME22, BA25, BE22

Magnetrührer

pH-Meter Metrom 610 Ion-Meter; Schott pH-Elektrode BlueLine 12

Photometer

Tegimenta Kontron UV/VIS-Spektralphotometer Uvikon 930 mit Thermostatic Culator

Jasco V-550 UV/VIS Spektrometer

Fluorimeter

Perkin-Elmer LS-50B Lumineszenz Spektrometer

Shimadzu RF-5301

Vakuumpumpe Membran-Vakuumpumpe Typ: N86KN.18 Förderleistung l/min: 6,0 (Roth)

Ultraschallbad Bandelin Sonorex Super RK255H

Laborspülmaschine Miele Mielabor G 7783 Multitronic

Fraktionssammler Abimed Gilson Fraktionssammler FC 204

Schlauchpumpe Watson Marlow 205 s mit Förderschläuchen 0,8 mm Innendurchmesser (Orange/Orange)

5.2 Verbrauchsmaterialien

CASYTON (Schärfe Systeme)

CASY[®]cup (Schärfe Systeme)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)

Reaktionsgefäße 20 ml (Greiner)

Pipettenspitzen, Plastik 1 ml, 200 µl, 10 µl (Sarstedt)

Pipettenspitzen, Plastik 5 ml, 300 µl (Eppendorf)

Pipettenspitzen Multipette plus 50 ml, 10 ml, 5 ml, 2,5 ml, (Eppendorf)

Pipettenspitzen, Plastik 5 ml (Greiner)

Mikrotiterplatten Nunclon 96-Loch, 24-Loch, 6-Loch, steril (Nunc)

„Quadriperm“-Inkubationsgefäße (Greiner) Multischalen 132x82 mm², 4 Vertiefungen

Zellkulturflaschen Cellstar 550 ml, 175 cm² Wachstumsfläche / 250 ml, 75 cm² / 50 ml, 22 cm² (Greiner)

Petrischalen Durchmesser 145 mm / 94 mm / 35 mm (Greiner)

Objektträger, superfrost (Menzel)

Deckgläser 24x60 mm (Roth oder VWR)

Zentrifugenröhrchen 50 ml (Greiner); 15 ml (Sarstedt); 3,5 ml (Sarstedt); 2 ml (Greiner, „cryo.s“)

Coplinbecher (Glas) (VWR)

Küvetten für die Photometrie aus Quarzglas (Hellma) und aus Polystyrol (Sarstedt)

Küvetten für die Fluorimetrie aus Quarzglas oder optischem Spezialglas (Hellma)

Sterilfilter Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm (Roth oder Sarstedt)

Spritzenkanüle Einmal-Kanülen: Durchmesser: 0,45 mm, 0,55 mm, 0,90 mm, 1,2 mm, (VWR oder Roth)

5.3 Substanzen

Achtung: Zahlreiche der verwendeten Reagenzien sind mutagen und sollen daher nur mit Vorsicht und unter Verwendung der nötigen Schutzausrüstung eingesetzt werden.

5.3.1 Synthese von GSH-Ethylester

Prinzip

Es wird eine saure Veresterung von Glutathion mit Ethanol durchgeführt. Die Vorschrift wurde von Anderson *et al.* (1994) veröffentlicht. Das GSH-Ethylester-Hydrogensulfat kann direkt eingesetzt werden. Es ist nicht nötig, den freien Ester zu isolieren.

Reagenzien

Ethanol absolut, DAB, unvergällt (Roth)

Schwefelsäure konzentriert (Roth)

Glutathion (Fluka)

Diethylether (Roth)

Durchführung

Es werden 50 ml Ethanol mit 1,38 ml Schwefelsäure gemischt (500 ml-Schottflasche) und darin 5 g Glutathion gelöst. Nach Reaktion für 10 h bei 32 °C im Schüttelwasserbad werden 350 ml Ether zugegeben und der sich bildende Niederschlag über Nacht im Kühlschrank gelagert. Der Überstand wird abgossen, der Niederschlag wird mit Ether gewaschen und im Stickstoffstrom von Ether befreit. Das Produkt wird im Vakuumexikator über KOH/P₂O₅ getrocknet. Das Produkt wird in warmem Wasser (40 °C) gelöst und mit Ethanol gefällt. Nach Lagerung im Kühlschrank wird das Produkt abfiltriert und der Niederschlag wie oben getrocknet.

5.3.2 Weitere Substanzen

Buthioninsulfoximin Fluka (CAS-Nr.: 97590-40-4)

Mitomycin C Fluka (CAS-Nr.: 50-07-7)

Quercetin Sigma (CAS-Nr.: 6151-25-3)

Ethylmethansulfonat Sigma (CAS-Nr.: 62-50-0)

Etoposid Sigma (CAS-Nr.: 33419-42-0)

Patulin Patulin wurde von Fliege und Metzler (1999) hergestellt und aufgereinigt. (CAS-Nr.: 149-29-1)

5.4 Methoden in der Zellkultur

5.4.1 Zellen und allgemeine Zellkulturarbeiten

Zellen

V79 Lungenfibroblasten eines männlichen Chinesischen Hamsters (Ford und Yerganian, 1958). Die Zelllinie wurde freundlicherweise von H. Glatt (Bergholz-Rehbrücke) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen adhärent und werden in DMEM mit 10% foetalem Kälberserum (FKS) kultiviert.

MLZ Lymphomzellen einer weiblichen DBA/2-Maus. Die Zelllinie (L5178Y) wurde freundlicherweise von H. Stopper (Würzburg) zur Verfügung gestellt. Die Zellen wachsen in Suspension und werden in RPMI 1640 mit 10% Pferdeserum (PS) kultiviert.

Die Zellen werden in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37 °C kultiviert. Den Medien wird Penizillin (Endkonzentration: 100 IU/ml) und Streptomycin (Endkonzentration: 100 µg/ml) (P/S) zugesetzt.

Reagenzien

Die Zellkulturmedien und Zusätze stammen von Sigma, wenn nicht anders angegeben.

Foetales Kälberserum (Invitrogen)

Pferdeserum (Biochrom) für 30 min bei 56 °C im Wasserbad hitzeinaktivieren.

Penizillin / Streptomycin (Sigma)

10xPBS-CMF 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 11,1 g Na₂HPØ₄ (wasserfrei) (78 mM), 2 g KH₂PØ₄ (15 mM), ad 1 l.

PBS-CMF 10xPBS-CMF wird mit Wasser 1:10 verdünnt (pH: 7,4), autoklaviert. Die Lösung ist bei -20 °C 3 Monate haltbar.

Trypsin 0,2% EDTA in PBS-CMF (pH: 7,4, autoklaviert) mit 10xTrypsin-Lösung (2,5%, Sigma) mischen. Die Mischung ist bei -20 °C 3 Monate haltbar.

Durchführung

Vor der Benutzung werden alle Lösungen auf 37 °C erwärmt.

Auftauen Der Eispfropf wird mit warmem Medium geschmolzen und die Suspension in 10 ml Medium überführt. Die Zellen werden bei 400 g für 5 min abzentrifugiert, in 20 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Sobald die Zellen normal wachsen, können sie für Versuche eingesetzt werden.

Subkultivieren Zum Passagieren von adhärennten Zellen wird das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit 10 ml PBS-CMF und einmal mit 10 ml Trypsin gewaschen und mit etwa 3 ml Trypsin bedeckt solange in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen abgekugelt haben. Die Zellen werden durch Klopfen vom Flaschenboden getrennt, und in 20 ml Medium aufgenommen. Etwa 1 Mio. Zellen werden in 20 ml frischem Medium ausgestreut.

Alle zwei Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das Medium aus der Kulturflasche gegossen und durch 20 ml frisches Medium ersetzt.

MLZ werden durch Verdünnen mit Medium subkultiviert.

Einfrieren V79-Zellen werden in kaltem Einfrier-Medium (Medium mit 20 % FKS, 10 % DMSO) suspendiert (1 Mio. Zellen / ml) und in Portionen zu 1,5 ml für 24 h bei -20 °C eingefroren und dann während weiteren 24 h auf -80 °C abgekühlt. Dann werden die Gefäße in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

Für MLZ besteht das Vorgehen wie oben beschrieben, jedoch werden sie im Einfrier-Medium (RPMI + DMSO + Glycerin + PS = 60 + 8 + 12 + 20) in Portionen zu 10 Mio. Zellen / 1,5 ml suspendiert.

5.4.2 Mikrokerntest

Prinzip

Zellen werden nach dem Anwachsen mit der Testsubstanz behandelt und anschließend substanzfrei nachinkubiert. Während der folgenden Zellteilungen können sich Mikrokerne bilden.

Durchführung

Sterile Objektträger werden innerhalb der Sterilbank in Quadriperm-Inkubationsgefäße gelegt. Etwa 50 000 Zellen werden in 5 ml Medium auf den Objektträgern ausgestreut. Nach 24 h sind die Zellen angewachsen und die Testsubstanz wird zugegeben. Nach der Inkubation wird das Medium gewechselt und die Zellen werden substanzfrei nachinkubiert. Dann werden die Zellen auf den Objektträgern fixiert, gefärbt und mikroskopisch ausgewertet (Kap.5.4.3).

5.4.3 Immunologische Färbung

Reagenzien

2x CB-Puffer Der Puffer besteht aus NaCl (274 mM), KCl (10 mM), Na₂HPÖ₄ (2,2 mM), KH₂PÖ₄ (0,8 mM), MgCl₂ (4 mM), EDTA (4 mM), Pipes (10 mM), Glucose (11 mM). Der pH-Wert ist 6,1.

Triton X-100-Lösung Triton-X-100 (Sigma) wird als 10%ige (w/v) Lösung in Wasser eingesetzt.

Formaldehyd-Fixans Es werden 3,5 g Paraformaldehyd (Merck) in 50 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml NaOH-Lösung (1 M) gemischt. Für 5 min auf 60 °C erhitzen. Davon 40 ml mit dem gleichen Volumen 2x CB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen. Es werden 2 ml Triton X-100-Lösung zugemischt. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4 h haltbar.

PBS-Lösung MgCl₂ (650 µM), CaCl₂ (680 µM) in 1 l PBS-CMF lösen.

Antifade-Lösung 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Sigma) in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit NaHCÖ₃-Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei -20 °C lichtgeschützt aufbewahren.

DAPI-Antifade-Lösung In 10 ml Antifade-Lösung werden 10 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml in H₂O) gelöst (Konz.: 1 µg/ml). In Portionen à ca. 0,7 ml lichtgeschützt bei -20 °C aufbewahren.

PBS-CMF Ein Volumenteil 10x PBS-CMF wird in etwa 5 Volumenteilen Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt und mit Wasser auf 10 Volumenteile aufgefüllt.

Ziegenullserum (Sigma)

BSA-Lösung (1 %, m/v) Rinderserumalbumin (Roth) wird in PBS-CMF gelöst.

Primäre Antikörper

Centromer positive Control („CREST-Antikörper“) (DPC Biermann)

Monoclonaler Anti- α -Tubulin-Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (Sigma)

Primärantikörper-Lösung Die Primärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (CREST: 1:15; Tubulin: 1:500).

Sekundäre Antikörper

Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma); FITC-konjugiert

Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson Immuno Research); CY3-konjugiert

Sekundärantikörper-Lösung Die Sekundärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (Anti-Human: 1:200; Anti-Maus: 1:250).

Fixierung der Zellen

Die Objektträger werden für 5 min in Formaldehyd-Fixans gestellt. Anschließend bis zur Verwendung in Methanol ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) gelagert.

Färbung der Zellen

Alle Inkubationsschritte erfolgen in einer feuchten Kammer bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Die Objektträger werden dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Es wird mit $200\text{ }\mu\text{l}$ Ziegenserum (Deckglas) für 1 h inkubiert. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger in PBS-CMF geschwenkt.

Mit $50\text{ }\mu\text{l}$ Primärantikörper-Lösung (Deckglas) für 1 h inkubieren. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Die Objektträger für 1 h mit je $50\text{ }\mu\text{l}$ Sekundärantikörper-Lösung (Deckglas) behandeln. Die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF waschen.

Die Objektträger werden mit etwa $30\text{ }\mu\text{l}$ DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt.

Die Markierung ist im Dunkeln mehrere Wochen haltbar.

5.4.4 Tod-Lebend-Färbung von Zellen

Prinzip

Zur Färbung der Zellkerne werden die Zellen mit einem membrangängigen DNA-Farbstoff (z. B. Hoechst 33342) inkubiert. Alle Kerne und Kernfragmente nehmen den Farbstoff auf und sind damit sichtbar. Dies eignet sich besonders zur Gegenfärbung bei anderen Färbungen.

Zur Bestimmung der metabolischen Aktivität werden die Zellen mit einem Prä-Fluorophor (z. B. Calcein AM, Fluoresceindiacetat) behandelt, den die Zelle aktiv in ein Fluorophor umwandelt.

Die Integrität der Zellmembran lässt sich untersuchen, indem die Zellen mit einem nicht-membrangängigen DNA-Farbstoff (z. B. Propidiumiodid) behandelt werden. Nur Zellen mit perforierter Membran zeigen die Fluoreszenz, während Zellen mit intakter Membran kein Signal zeigen.

Nach diesen Färbungen kann die Auswertung sowohl fluoreszenzmikroskopisch, als auch durchflußzytometrisch erfolgen.

Reagenzien

Hoechst 33342-Lösung 0,5 mM in DMSO (Sigma)

Calcein AM-Lösung 1 mg/ml in DMSO (Sigma)

Fluoresceindiacetat 0,5 mg/ml in DMSO (Sigma)

Propidiumiodid-Lösung 1 mg/ml in Wasser (Sigma)

Durchführung

Die Zellen werden in Medium (ggf. angewachsen) mit 0,5 μ M Hoechst 33342 inkubiert. Nach mindestens 10 min können die Zellen untersucht werden. Die Färbung mit diesem Farbstoff stört die Zellhomöostase nicht weiter und kann daher auch für Langzeituntersuchungen eingesetzt werden (Haraguchi *et al.*, 1999).

Die Zellen werden in Medium für 1 h mit 1,5 μ g/ml Calcein AM inkubiert. Dann sollte direkt ausgewertet werden (Filtersatz für Durchflußzytometer: KG 1, BG 12, TK 500, TK 560, OG 590, EM 520; doppeltlogarithmische Auftragung).

Die Zellen werden in Medium für 15 min mit 0,5 µg/ml Fluoresceindiacetat inkubiert. Dann sollte direkt ausgewertet werden.

Die Färbung mit Propidiumiodid (10 µg/ml) erfolgt 5 bis 10 min vor der Auswertung, da es ansonsten auch in Zellen mit intakter Zellmembran eindringt.

Nebenbemerkung

Objektträger mit Deckglas eindecken, dann können Objektträger direkt mikroskopiert werden, das heißt, sie müssen nicht mit Antifade eingedeckt werden.

5.4.5 Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehalts

Prinzip

Die Methode basiert auf der enzymkatalysierten Reaktion von GSH mit Chlorbiman. Das Reaktionsprodukt fluoresziert blau. Diese Methode wurde von Cook und Mitchell (1995) beschrieben. Diese Färbung erlaubt den relativen Vergleich des intrazellulären GSH-Gehalts von unterschiedlich behandelten Zellen.

Zur absoluten Quantifizierung des GSH-Gehalts wird die Methode von Ellman eingesetzt. Sie basiert auf der Reaktion von Elmanns-Reagenz mit Thiolen zum gelben Farbstoff 2-Nitro-5-thiobenzoat, der fotometrisch quantifiziert wird (Riddles *et al.*, 1983).

Reagenzien

Chlorbiman-Lösung 40 mM Chlorbiman (Sigma) in DMSO

Färbe-Lösung 400 µM Chlorbiman in PBS-CMF (1 % DMSO).

Trichloressigsäure-Lösung 15 % (m/m) Trichloressigsäure in Wasser

10xTRIS-EDTA 500 mM TRIS, 10 mM EDTA (pH 8,0)

1xTRIS-EDTA 50 mM TRIS, 1 mM EDTA (pH 8,0)

DTNB-Lösung 0,125 mM DTNB (Sigma) in Ethanol

Durchführung

Etwa 1 Mio. Zellen werden in 300 µl Färbe-Lösung suspendiert und für 45 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Dann wird die Färbelösung durch PBS-CMF ersetzt und die GSH-abhängige Fluoreszenz der Zellen wird sofort durchflußzytometrisch bestimmt.

Geräteeinstellungen: UV-Anregung, Chromatischer-Strahlenteiler TK 420, Emissions-Longpass-Filter GG 435, Detektor. Die Signale werden auf einer log₃-Skala aufgezeichnet und die Daten mit der Flowmax-Software ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität des Maximums der Verteilung wurde als intrazellulärer GSH-Gehalt verwendet.

15 Mio. Zellen werden zweimal mit 5 ml PBS-CMF gewaschen und in 200 µl PBS-CMF bei -80 °C lysiert. Dann werden die Zellen für 10 min im Ultraschallbad aufgeschlossen, die Proteine werden mit 20 µl Trichloressigsäure-Lösung gefällt und abgetrennt (2900 g, 5 min). Vom Überstand werden in Halbmikro-Kunststoff-Küvetten 150 µl mit 600 µl 10xTRIS-EDTA und 200 µl 1xTRIS-EDTA gemischt. Die Absorption der Lösung wird vor und nach Zugabe von 50 µl DTNB-Lösung bei 410 nm gemessen. Die Methode wird mit verschiedenen GSH-Lösungen (Menge in der Küvette: bis 90 nmol GSH) kalibriert.

5.4.6 Messung der Zellzyklusverteilung

Prinzip

Die Zellmembran wird aufgeschlossen, so daß mit DAPI die Zellkerne angefärbt werden können. Zur Messung der Zellzyklusverteilung wird der DNA-Gehalt der einzelnen Zellen fluorimetrisch bestimmt und linear aufgetragen.

Zusätzlich kann die Rate von Sub-G1-Signalen gemessen werden. Dieses ist ein Mass für die Induktion von Mikrokernen (Nusse und Kramer, 1984).

Reagenzien

CyStain 1-Step Reagenz (Partec)

CyStain 2-Step Reagenz (Partec)

CyStain DNA Protein 2 staining solution (Partec)

Ethanol (Roth)

Durchführung

Die Fixierung und Färbung erfolgt nach den Kit-Anleitungen des Herstellers. Die Färbung kann mit einem der Kits erfolgen, sie haben untereinander keine besonderen Vorteile.

Es werden je Messung etwa 100 000 Zellen benötigt.

1-Step Reagenz Das Reagenz lysiert die Plasmamembran, daher braucht nicht fixiert zu werden (bei Bedarf, siehe bei 2-Color Reagenz). Die Zellen in der Färbelösung suspendieren, nach etwa 10 min kann die Messung erfolgen.

2-Step Reagenz Das Kit enthält einen Lysepuffer, in dem die Zellen suspendiert werden bzw. der die Zellkerne auch aus adhärennten Zellen herauslöst. Die Zellkern-Suspension wird mit 5 VOL Färbelösung gemischt und nach etwa 10 min kann die Messung erfolgen.

CyStain DNA Protein 2 staining solution Die Zellen werden in 300 µl PBS-CMF suspendiert und mit 700 µl kaltem Ethanol gemischt; die Suspension wird mindestens 12 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zellen werden abzentrifugiert (400 g, 5 min) und in der Färbelösung resuspendiert. Nach etwa 10 min kann die Messung erfolgen.

Die Messung erfolgt an einem Partec PA II Durchflußzytometer, die blaue Fluoreszenz wird gemessen und linear aufgetragen. Die G1-Phase-Signale sollten etwa eine Intensität von 200 Einheiten haben.

Filtersatz: KG 1, BG 38, UG 1, TK 420, TK 560, OG 590, GG 435

Soll nach Färbung mit CyStain 1-Step Reagenz zusätzlich die Sub-G1-Rate bestimmt werden, wird gleichzeitig die blaue und rote Fluoreszenz gemessen (log₃-Skala). Die G1-Phase-Signale sollten in beiden Messkanälen etwa eine Intensität von 100 Einheiten haben.

5.4.7 Koloniebildungsfähigkeit

Prinzip

Mit der Koloniebildungsfähigkeit wird überprüft, ob nach einer Behandlung die Zellen noch lebensfähig sind. Dazu wird eine bestimmte Anzahl Zellen ausgestreut und überprüft, ob diese

während einer Woche zu Kolonien heranwachsen. Die Ergebnisse werden mit der jeweiligen Kontrolle verglichen.

Reagenzien

Medium DMEM, 5 % FKS, 2 % P/S

NaCl-Lösung 0,9 % (m/v) NaCl in Wasser.

Methylenblau-Lösung Methylenblau wird als 0,5 %ige (w/v) Lösung in Methanol eingesetzt.

Durchführung

Es werden 500 Zellen in 10 ml Medium ausgestreut. Je Konzentration werden mindestens drei Petrischalen angesetzt.

Nach etwa einer Woche wird das Medium entfernt, die Schalen mit NaCl-Lösung gespült und die Zellen für 15 min mit Ethanol fixiert; dann werden die Kolonien mit der Methylenblau-Lösung für 30 min gefärbt, der überschüssige Farbstoff wird unter fließendem Wasser abgespült und die Schalen getrocknet.

Auswertung Die Koloniebildungsfähigkeit ist der Anteil gebildeter Kolonien pro Anzahl ausgestreuter Zellen. Das Ergebnis kann als Prozent der Kontrolle ausgedrückt werden.

5.4.8 HPRT-Mutationstest mit V79-Zellen

Prinzip

Der Test basiert auf der Vorwärtsmutation des Gens für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase. Zellen mit einer Mutation in diesem Gen werden mit 6-Thioguanin selektiert und zu Kolonien wachsen gelassen.

Reagenzien

6-Thioguanin-Lösung 6-Thioguanin wird in 1N NaOH gelöst (20 mg/ml).

Selektionsmedium DMEM, 5 % FKS, 2 % P/S, 7 µg/ml 6-Thioguanin.

Durchführung

Vorbereitende Arbeiten Es wird ein V79-Zellen-Stamm ausgewählt, der eine geringe Spontanmutationsrate besitzt. Dieser wird vermehrt und eingefroren. Etwa 3 bis 4 Tage vor Beginn des Versuchs werden die Zellen aufgetaut.

Arbeitsschritte

Tag 0 Für jeden Ansatz werden 1,5 Mio. Zellen benötigt. Sie werden in großen Zellkulturflaschen (182 cm²) in 20 ml Medium ausgestreut.

Tag 1 Nach 24 h wird das Medium gewechselt und die Zellen werden für 24 h mit der Testsubstanz behandelt.

Tag 2 Die Zellen werden abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Es werden 1 Mio. Zellen weitergesetzt.

Tag 5 Passage wie an Tag 2

Tag 7 Die Zellen werden abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Es werden genau 1 Mio. Zellen in 30 ml Selektionsmedium ausgestreut. Für jede Konzentration werden drei Petrischalen angesetzt. Zusätzlich wird die Koloniebildungsfähigkeit dieser Zellen bestimmt (500 Zellen / 10 ml).

Tag 18 Die Schalen werden wie in Kap. 5.4.7 beschrieben, fixiert und gefärbt.

Auswertung Die Anzahl Kolonien pro Platte wird ausgezählt und die

$$\text{Koloniebildungsfähigkeit (PE)} = \frac{\text{Anzahl Kolonien}}{\text{Anzahl ausgestreute Zellen}}$$

und die

$$\text{Mutationsfrequenz (MF)} = \frac{\text{Anzahl 6-TG-resistente Kolonien}}{\text{Anzahl ausgestreute Zellen} \cdot \text{PE}}$$

berechnet. Die Mutationsfrequenz gibt die Anzahl der 6-Thioguanin-resistenten Zellen pro 1 Mio. koloniebildender (das heißt lebender) Zellen an.

Variation für eine Inkubation von Zellen mit erniedrigtem GSH-Spiegel

Tag -1 Für jeden Ansatz werden 0,4 Mio. Zellen benötigt. Sie werden in großen Zellkulturflaschen (182 cm²) in 20 ml Medium ausgestreut.

Tag 0 Nach 24 h wird das Medium gewechselt und die Zellen werden gegebenenfalls mit 20 µM BSO (gelöst in Wasser) inkubiert.

Das weitere Vorgehen entspricht der oben beschriebenen Standardvorschrift.

Variation für eine Inkubation von Zellen mit erhöhtem GSH-Spiegel Das Vorgehen entspricht der oben beschriebenen Standardvorschrift. Um den GSH-Spiegel zu erhöhen, werden die Zellen mit 6,5 mg/ml GSH-EE (17 mM, direkt im Medium gelöst, mit NaOH neutralisiert) für 2,5 h inkubiert. Direkt vor der Inkubation mit der Testsubstanz wird das Medium gewechselt.

5.4.9 TK-Mutationstest mit Maus Lymphomzellen

Prinzip

MLZ werden mit der Substanz inkubiert, wenn sich der neue Phänotyp manifestiert hat, werden mit Trifluorthyminidin (TFT) die mutierten Zellen selektiert und zu Kolonien wachsen gelassen.

Das Koloniewachstum erfolgt in 96-Loch-Platten. Die Methode wurde nach Clements (2000) etabliert.

Reagenzien

Kulturmedium 500 ml RPMI 1640 mit 50 ml PS und 10 ml P/S mischen.

Kloniermedium 450 ml RPMI 1640 mit 100 ml PS und 10 ml P/S mischen.

Methotrexat-Lösung 20 mg Methotrexat in 19,45 ml PBS-CMF mit 0,35 ml 1 M NaOH lösen, mit 0,2 ml 1 M HCl-Lösung neutralisieren.

THG 15 mg Thymidin, 25 mg Hypoxanthin, 37,5 mg Glycin in 50 ml RPMI 1640 bei 37 °C lösen, sterilfiltrieren, bei -20 °C lagern.

THMG 45,5 ml THG mit 0,5 ml Metotrexat-Lösung mischen, in Portionen zu 2 ml bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lagern.

TFT-Lösung Stammlösung (3 mg/ml in PBS-CMF) vor Gebrauch 1:10 mit PBS-CMF verdünnen.

MTT-Lösung Stammlösung (5 mg/ml in PBS-CMF, sterilfiltriert, bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ haltbar) vor Gebrauch 1:2 mit PBS-CMF verdünnen.

Durchführung

Vorbereitende Arbeiten In der Woche vor dem eigentlichen Versuch 15 Mio. Zellen in 50 ml Kulturmedium mit 0,5 ml THMG für 24 h inkubieren. Dann daraus 15 Mio. Zellen entnehmen und in 50 ml Kulturmedium mit 0,5 ml THG für weitere 24 h inkubieren. Sobald die Zellen normal wachsen, können sie eingesetzt werden.

Arbeitsschritte

Tag 1 Je Ansatz werden 10 Mio. Zellen in 50 ml Kulturmedium mit der Testsubstanz für 24 h inkubiert.

Tag 2 Die Zellzahl in den Ansätzen wird bestimmt. Es werden 10 Mio. Zellen in 50 ml Kulturmedium Substanz-frei weiterpassagiert.

Tag 3 siehe Tag 2

Tag 4 Die Zellzahl in den Ansätzen wird bestimmt. Je Ansatz werden vier 96-Loch-Platten mit einer Zellsuspension (10 000 Zellen / ml, $3\text{ }\mu\text{g/ml}$ TFT in Kloniermedium) mit 0,2 ml pro Kavität ausgestreut.

Zusätzlich werden an Tag 2 (PE_1) und an Tag 4 (PE_2) je zwei 96-Loch-Platten mit einer Zellsuspension (8 Zellen / ml in Kloniermedium) mit 0,2 ml pro Kavität ausgestreut.

Nach etwa 7 bis 11 Tagen Inkubation wird in jede Kavität der Lochplatten $20\text{ }\mu\text{l}$ MTT-Lösung zupipetiert und nach einigen Stunden die Anzahl Löcher mit Kolonien gezählt.

Auswertung Für jede Plattengruppe wird der Anteil leerer Kavitäten P und die Kloniereffizienz PE berechnet:

$$P = -\ln \frac{\text{Anzahl leere Kavitäten}}{\text{Anzahl Kavitäten}} \quad PE = \frac{P}{\text{Anzahl Zellen pro Kavität}}$$

Für die einzelnen Ansätze wird das relative Gesamtwachstum RTG berechnet:

$$\text{Relatives } PE = \frac{PE_2(\text{Substanz})}{PE_2(\text{Kontrolle})}$$

$$SG = \frac{\text{Zellzahl an Tag 3}}{\text{An Tag 2 weitergesetzte Zellzahl}} \cdot \frac{\text{Zellzahl an Tag 4}}{\text{An Tag 3 weitergesetzte Zellzahl}}$$

$$RSG = \frac{SG(\text{Substanz})}{SG(\text{Kontrolle})} \quad RTG = RSG \cdot \text{Relatives } PE$$

Die Mutationsfrequenz MF berechnet sich ähnlich mit den Ergebnissen der Selektion und der PE_2 :

$$PE_2 = \frac{P_2}{1,6} \quad PE_{sel} = \frac{P_{sel}}{2000} \quad MF = \frac{PE_{sel}}{PE_2} \cdot 1\,000\,000$$

Die Berechnung kann sowohl für die Gesamtmutationsfrequenz (alle TFT-resistenten Kolonien) als auch für die Mutationsfrequenz für große / kleine Kolonien erfolgen, je nach dem, welche Zahl als „Anzahl leere Kavitäten“ für die Berechnung von P_{sel} eingesetzt wird.

5.4.10 Alkalische Filterelution

Prinzip

Die Alkalische Filterelution nach Kohn *et al.* (1976) erlaubt es, DNA auf Strangbrüche zu untersuchen. Epe *et al.* (1993) haben die Methode so ergänzt, daß spezifische DNA-Schäden detektiert werden können. Die Methode von Pflaum und Epe (2000) wird mit Modifikationen eingesetzt.

Die Zellen werden auf einem Filter lysiert, mittels Schadens-spezifischer Reparaturoendonukleasen werden zusätzliche Strangbrüche eingefügt, und die DNA wird mit einer alkalischen Lösung vom Filter gewaschen. Je stärker die DNA geschädigt ist, desto schneller läßt sie sich herunterwaschen. Die Waschlösung wird in Fraktionen aufgefangen und der DNA-Gehalt mit dem DNA-Farbstoff Hoechst 33258 erfaßt.

Reagenzien

PBS-G 100 ml 10xPBS-CMF, 0,135 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g Glucose, ad 1 l (pH 7,4).

Nuclei-Puffer 100 ml 10xPBS-CMF, 0,2 g EDTA, ad 1 l (pH 7,4).

Lyse-Puffer 7,5 g Glycin (100 mM), 7,44 g Na_2EDTA (20 mM), ad 1 l (pH 10), 20 g SDS.

BE1 3,15 g TRIS/HCl (20 mM), 5,84 g NaCl (100 mM), 0,372 g Na_2EDTA (1 mM), ad 1 l (pH 7,5), autoklaviert bei 8 °C zwei Monate haltbar.

100xBE1-BSA 10 mg/ml BSA in BE1. Bei -20 °C aufbewahren.

FPG-Puffer 10 ml BE1 mit 100 µl 100xBE1-BSA und 10 µl Fpg mischen. Um die Rate der Alkali-labilen Stellen zu bestimmen, wird das Fpg weg gelassen.

Wasch-Puffer 7,44 g Na_2EDTA (20 mM), ad 1 l (pH 10).

Elutions-Puffer 5,844 g EDTA (freie Säure, 20 mM), mit Tetraethylammoniumhydroxyd (Alfa Aesar) pH 12,2 einstellen, ad 1 l.

Neutralisations-Puffer Natriumphosphat (100 mM) in Wasser (pH 6,0)

Hoechst-Lösung 8,82 mg Hoechst 33258 (0,141 mM), ad 100 ml

Färbe-Lösung 450 ml Neutralisations-Puffer mit 3 ml Hoechst-Lösung (Endkonzentration: 0,94 µM) mischen.

Durchführung

Wenn nicht anders angegeben, werden die Lösungen mit 1 ml/min eingezogen.

- System mit Wasser spülen
- Filter (Typ TTTP, Millipore) in Filterhalter (Swinnex SX 00 025, Millipore) einspannen
- Filter mit 5 ml eiskaltem PBS-G spülen
- Zellen⁴ in eiskaltem PBS-G suspendiert aufgeben und einziehen.
- 2x mit 3 ml eiskaltem Nuclei-Puffer spülen.
- 2 ml Lyse-Puffer einziehen.
- 5 ml Lysepuffer innerhalb von 1 h einziehen.
- 2x mit 5 ml, 1x mit 10 ml und 1x mit 5 ml BE1 spülen.
- 2 ml FPG-Puffer aufgeben, den ersten Milliliter mit max. Geschwindigkeit, den Rest innerhalb von 1 h einziehen.
- Mit 5 ml BE1 spülen.
- 5 ml Lysepuffer (mit 0,5 mg/ml Proteinase K, VWR) innerhalb von 0,5 h einziehen.

⁴Nagerzellen: 1,5 Mio. Zellen; humane Zellen: 1,0 Mio. Zellen

- 2x mit 5 ml, 1x mit 10 ml und 1x mit 5 ml BE1 spülen.
- Mit 5 ml Waschpuffer spülen.
- Mit 20 ml Elutionspuffer innerhalb von 8 h eluieren. Dabei 10 Fraktionen über jeweils eine Stunde sammeln.
- Filter entfernen und Anlage mit 5 ml Elutionspuffer spülen. Filter zerkleinern und zusammen mit der Spüllösung und der 11. Fraktion für 15 min ins Ultraschallbad stellen.
- Volumina der Fraktionen messen
- Alle Fraktionen mit 1 VOL Färbe-Lösung mischen und nach 20 min fluorimetrisch den DNA-Gehalt quantifizieren (EX: 360 nm; EM: 450 nm).

Auswertung

Von allen Fluoreszenzen F den Chemikalienblindwert F_{Bw} abziehen. Durch Multiplikation der DNA-Fluoreszenz mit dem jeweiligen Volumen die DNA-Menge je Fraktion DNA_i berechnen. Der Anteil DNA auf dem Filter nach Fraktion n berechnet sich nach folgender Formel:

$$FRAC_n = \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^n DNA_i}{\sum_{i=1}^{11} DNA_i} \right) \cdot 100$$

Es wird $\log FRAC_n$ gegen n aufgetragen und die Anfangssteigung bestimmt. Die zusätzliche (induzierte) Steigung gegenüber der Kontrolle ist ein Mass für die Strangbruchrate.

Die zusätzliche Steigung Fpg-behandelter Ansätze gegenüber nicht-Fpg-behandelter Ansätze ist ein Mass für die Anzahl oxidativer Schäden.

Eine induzierte Steigung von 0,0071 /h entspricht 0,18 Schäden pro 10^6 bp.

5.4.11 Untersuchung des DNA-DNA-Interstrang quervernetzenden Potentials

Prinzip

Die Zellen werden aufgeschlossen und die DNA isoliert. Die Methode basiert auf der schnelleren Renaturierung der quervernetzten DNA im Vergleich zu unbehandelter DNA. Die doppelsträngige DNA wird mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff Ethidiumbromid nachgewiesen.

Reagenzien

Lyse-Lösung 4 M NaCl, 50 mM KH₂PO₄, 10 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Na-Laurylsarkosinat (pH 7,2). Vor der Verwendung werden 0,5 mg/ml Proteinase K zugesetzt.

Heparin 5 000 IE / 0,2 ml (Ratiopharm), vor Gebrauch mit Wasser auf 5000 IE/ml verdünnen.

Ethidiumbromid-Lösung 10 µg/ml Ethidiumbromid, 20 mM K₂HPO₄, 0,4 mM EDTA (pH 12)

Durchführung

Die Zellen werden mit kaltem PBS-CMF gewaschen. Dann werden sie mit 200 µl Lyse-Lösung gemischt. Nach 16 h bei 37 °C werden 25 µl (entspricht 125 IU) zugegeben und für weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Dann werden 3 ml Ethidiumbromid-Lösung zugegeben und gemischt. Es wird die Fluoreszenz F_1 gemessen (Anregung: 525 nm, Emmission: 580 nm). Die DNA wird dann für 5 min bei 100 °C denaturiert und schnell auf Raumtemperatur abgekühlt. Es wird die Fluoreszenz F_2 gemessen.

Die Auswertung erfolgt durch Berechnung der relativen Fluoreszenz f :

$$f = \frac{F_2}{F_1}$$

Aus den relativen Fluoreszenzen der Lösungsmittel-Kontrolle f_K und der Substanz-behandelten Zellen f_S berechnet sich der Anteil quervernetzter DNA:

$$C_S = \frac{f_S - f_K}{1 - f_K} \cdot 100\%$$

5.4.12 Detektion von DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen durch Alkalische Filterelution

Prinzip

Die Methode basiert auf den Angaben von Batel *et al.* (1993). DNA-Strangbrüche werden durch Inkubation der Zell-DNA mit einem Bleomycin-Fe(II)-Komplex erzeugt.

Reagenzien

Lösungen die hier nicht aufgeführt sind, sind in Kapitel 5.4.10 beschrieben.

Bleomycin Bleo-cell (15 000 IE, Cell pharm) in 5 ml Wasser lösen, 75 µl Mercaptoethanol zugeben. Die Lösung im Kühlschrank aufbewahren.

Aktivierter Komplex 1 VOL der Bleomycin-Lösung mit 1 VOL 6 mM FeSO₄ mischen

Reaktionslösung 1 VOL des aktivierten Komplexes mit 1 VOL Waschpuffer und 1 VOL DTT-Lösung (10 mM) mischen. Davon 10 µl mit 35 ml Waschpuffer mischen (0,429 IE / 3 ml). Die Mischung innerhalb von 15 min verwenden.

Lysepuffer NaCl (2 M), EDTA (20 mM), NaLaurylsarkosinat (0,2%) in Wasser, pH 10,0

Durchführung

Wenn nicht anders angegeben, werden die Lösungen mit 1 ml/min eingezogen.

- System mit Wasser spülen
- Filter (Typ GVWP, Millipore) in Filterhalter (Swinnex SX 00 025, Millipore) einspannen
- Filter mit 5 ml eiskaltem PBS-G spülen
- Zellen (1,5 Mio. Zellen) in eiskaltem PBS-G suspendiert aufgeben und einziehen.
- 2x mit 3 ml eiskaltem Nuclei-Puffer spülen.
- 5 ml Lyse-Puffer einziehen.
- 3 ml Lysepuffer (mit 0,5 mg/ml Proteinase K, VW) innerhalb von 40 min einziehen.
- Mit 3 ml Waschpuffer spülen.
- 3 ml Reaktionslösung einziehen.
- Mit 4 ml und mit 10 ml Waschpuffer spülen.
- Mit 20 ml Elutionspuffer innerhalb von 8 h eluieren. Dabei 10 Fraktionen über jeweils eine Stunde sammeln.

Das weitere Vorgehen und die Auswertung entspricht dem Standardprotokoll (Kap. 5.4.10).

Eine Reduktion der durch Bleomycin induzierten Strangbrüche (entspricht der Steigung) durch die Testsubstanz entspricht der Induktion von DNA-DNA-Interstrang-Quervernetzungen

Durch Weglassen / Zugabe von Proteinase K kann ein DNA-Protein-quervernetzendes Potential festgestellt werden.

5.5 Statistik

Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit dem Student t-Test für unabhängige Werte statistisch untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden mit dem Programm „Kalibo“ berechnet.

Literaturverzeichnis

- I. Alves, N. G. Oliveira, A. Laires, A. S. Rodrigues, J. Rueff (2000) *Induction of micronuclei and chromosomal aberrations by the mycotoxin patulin in mammalian cells: role of ascorbic acid as a modulator of patulin clastogenicity*. *Mutagenesis*, **15**(3) 229–234.
- B. Andersen, J. Smedsgaard, J. C. Frisvad (2004) *Penicillium expansum: consistent production of patulin, chaetoglobosins, and other secondary metabolites in culture and their natural occurrence in fruit products*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(8) 2421–8.
- M. E. Anderson (1998) *Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation*. *Chemico-Biological Interactions*, **111-112** 1–14.
- M. E. Anderson, E. J. Levy, A. Meister (1994) *Preparation and use of glutathione monoesters*. *Methods in Enzymology*, **234** 492–499.
- M. E. Anderson, A. Meister (1989) *Glutathione monoesters*. *Analytical Biochemistry*, **183**(1) 16–20.
- M. E. Anderson, F. Powrie, R. N. Puri, A. Meister (1985) *Glutathione monoethyl ester: preparation, uptake by tissues, and conversion to glutathione*. *Archives of biochemistry and biophysics*, **239**(2) 538–548.
- G. Andraud, A. M. Aublet-Cuvelier, J. Conquelet, R. Cuvelier, P. Tronche (1963) *Activite comparee par la respiration cellulaire de la patuline naturelle et d'un isomere synthese*. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*, **157** 144.
- W. Arafat, M. Musa (1996a) *Interaction of the mycotoxin, patulin, with tRNA and free nucleotides*. *Research Communications in Pharmacology and Toxicology*, **1**(2 & 3) 221–224.
- W. Arafat, M. N. Musa (1995) *Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture*. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, **87**(2) 177–186.
- W. Arafat, M. N. Musa (1996b) *Inhibition of protein synthesis in Xenopus laevis oocyte and rabbit reticulocyte lysate by the mycotoxin patulin*. *Research Communications in Pharmacology and Toxicology*, **1**(1) 91–98.
- M. Arici (2000) *Patulin production of Penicillium isolates from fermented olives in a synthetic medium*. *Ernaehrung (Vienna)*, **24**(6) 257–259.
- R. Barhoumi, R. C. Burghardt (1996) *Kinetic analysis of the chronology of patulin- and gossypol-induced cytotoxicity in vitro*. *Fundamental and Applied Toxicology*, **30**(2) 290–7.

- R. Batel, M. Vukmirovic, N. Bihari, R. K. Zahn, W. E. Muller (1993) *Nonradiometric detection of DNA crosslinks in mussel hemolymph by alkaline elution*. Analytical Biochemistry, **212**(2) 402–6.
- P. J. Becci, F. G. Hess, W. D. Johnson, M. A. Gallo, J. G. Babish, R. E. Dailey, R. A. Parent (1981) *Long-term carcinogenicity and toxicity studies of patulin in the rat*. Journal of Applied Toxicology, **1**(5) 256–61.
- A. Begleiter, M. Leith, G. McClarty, G. Goldenberg, J. Wright (1988) *Characterization of L5178Y murine lymphoblasts resistant to quinine antitumor agents*. Cancer Research, **48** 1727–1735.
- G. A. Belitskii, E. M. Khovanova, I. V. Budunova, E. G. Sharupich (1983) *Mycotoxin induction of somatic mutagenesis in Drosophila and DNA repair synthesis in mammalian liver cell cultures*. Byulleten Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny, **96**(7) 83–87.
- G. A. Belitsky, E. M. Khovanova, I. V. Budunova, H. G. Sharuptis (1985) *Mycotoxin induction of somatic mosaicism in Drosophila and DNA repair in mammalian liver cell cultures*. Cell Biology and Toxicology, **1**(3) 133–143.
- D. Beranek, C. Weis, D. Swenson (1980) *A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography*. Carcinogenesis, **1**(7) 595–606.
- B. Beretta, A. Gaiaschi, C. L. Galli, P. Restani (2000) *Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation*. Food Additives & Contaminants, **17**(5) 399–406.
- J. Bissessur, K. Permaul, B. Odhav (2001) *Reduction of patulin during apple juice clarification*. Journal of Food Protection, **64**(8) 1216–1219.
- K. A. Black, G. J. Smith, J. W. Grisham (1991) *Effects of 4-nitroquinoline 1-oxid on population growth, cell-cycle compartmentalization and viability in human lymphoblastoid cells*. Toxicology in Vitro, **5** 193–200.
- J. L. Bolton, M. A. Trush, T. M. Penning, G. Dryhurst, T. J. Monks (2000) *Role of quinones in toxicology*. Chemical Research in Toxicology, **13**(3) 135–160.
- E. M. Boyd (1944) *Patulin*. Canadian Medical Association Journal, **50** 159.
- M. O. Bradley, B. Bhuyan, M. C. Francis, R. Langenbach, A. Peterson, E. Huberman (1981) *Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program*. Mutation Research, **87**(2) 81–142.
- M. O. Bradley, G. Dysart (1985) *DNA single-strand breaks, double-strand breaks, and crosslinks in rat testicular germ cells: measurements of their formation and repair by alkaline and neutral filter elution*. Cell Biol Toxicol, **1**(3) 181–95.
- R. C. Braunberg, O. O. Gantt, L. Friedman (1982) *Toxicological evaluation of compounds found in food using rat renal explants*. Food and Chemical Toxicology, **20** 541–546.
- H. Börner (1963a) *Untersuchungen über die Bildung antiphytotischer und antimikrobieller Substanzen durch Mikroorganismen im Boden und ihre mögliche Bedeutung für die Bodenmüdigkeit beim Ap-*

- fel (Pirus malus L.) I. Bildung von Patulin und einer phenolischen Verbindung durch Penicillium expansum auf Wurzel- und Blattrückständen des Apfels.* Phytopathol. Z., **48** 370–396.
- H. Börner (1963b) *Untersuchungen über die Bildung antiphytotischer und antimikrobieller Substanzen durch Mikroorganismen im Boden und ihre mögliche Bedeutung für die Bodenmüdigkeit beim Apfel (Pirus malus L.) II. Der Einfluß verschiedener Faktoren auf die Bildung von Patulin und einer phenolischen Verbindung durch Penicillium expansum auf Wurzel- und Blattrückständen des Apfels.* Phytopathol. Z., **49** 1–28.
- W. A. Broom, E. Bulbring, C. J. Chapman, J. W. F. Hampton, A. M. Thomson, J. Ungar, R. Wien, G. Woolfe (1944) *The pharmacology of patulin.* British Journal of Experimental Pathology, **25** 195–207.
- D. A. Burden, N. Osheroff (1998) *Mechanism of eucaryotic topoisomerase II and drug targeted to the enzyme.* Biochimica et Biophysica Acta, **1400** 139–154.
- R. C. Burghardt, R. Barhoumi, E. H. Lewis, H. Bailey, K. A. Pyle, B. A. Clement, T. D. Phillips (1992) *Patulin-induced cellular toxicity: a vital fluorescence study.* Toxicology and Applied Pharmacology, **112**(2) 235–244.
- P. Cañas, M. Aranda (1996) *Decontamination and inhibition of patulin-induced cytotoxicity.* Environmental Toxicology and Water Quality, **11** 249–253.
- W. Chaung, L. J. Mi, R. J. Boorstein (1997) *The p53 status of Chinese hamster V79 cells frequently used for studies on DNA damage and DNA repair.* Nucleic Acids Research, **25**(5) 992–4.
- Y. H. Choi, W. H. Lee, K. Y. Park, L. Zhang (2000) *p53-independent induction of p21 (WAF1/CIP1), reduction of cyclin B1 and G2/M arrest by the isoflavone genistein in human prostate carcinoma cells.* Jpn J Cancer Res, **91**(2) 164–73.
- A. Ciegler, A. C. Beckwith, L. K. Jackson (1976) *Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine.* Applied and Environmental Microbiology, **31**(5) 664–667.
- A. Ciegler, R. F. Vesonder, L. K. Jackson (1977) *Production and biological activity of patulin and citrinin from Penicillium expansum.* Applied and Environmental Microbiology, **33**(4) 1004–1006.
- C. Cimini, A. Antocchia, C. Tanzarella, F. Degrassi (1997) *Topoisomerase II inhibition in mitosis produces numerical and structural chromosomal aberrations in human fibroblasts.* Cytogenetics and Cell Genetics, **76** 61–67.
- J. Clements (2000) *The mouse lymphoma assay.* Mutation Research, **455**(1-2) 97–110.
- D. Clive, K. O. Johnson, J. F. Spector, A. G. Batson, M. M. Brown (1979) *Validation and characterization of the L5178Y/TK+/- mouse lymphoma mutagen assay system.* Mutation Research, **59**(1) 61–108.
- J. A. Cook, S. N. Iype, J. B. Mitchell (1991) *Differential specificity of monochlorobimane for isozymes of human and rodent glutathione S-transferases.* Cancer Research, **51**(6) 1606–12.

- J. A. Cook, J. B. Mitchell (1995) *Measurement of thiols in cell populations from tumor and normal tissue*. *Methods in Enzymology*, **251** 203–12.
- R. Cooray, K. H. Kiessling, K. Lindahl-Kiessling (1982) *The effects of patulin and patulin-cysteine mixtures on DNA synthesis and the frequency of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes*. *Food and Chemical Toxicology*, **20**(6) 893–898.
- P. I. Countryman, J. A. Heddle (1976) *The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes*. *Mutation Research*, **41** 312–332.
- R. E. Daily, A. M. Blascka, E. Brouwer (1977a) *Absorption, distribution and excretion of ¹⁴C-patulin by rats*. *J. Toxic. Envir. Hlth.*, **3** 479–489.
- R. E. Daily, E. Brouwer, A. M. Blascka, E. F. Reynaldo, S. Green, W. S. Monlux, D. I. Ruggles (1977b) *Intermediate-duration toxicity study of patulin in rats*. *J. Toxic. Envir. Hlth.*, **2**(3) 713–725.
- J. Dalton (1952) *Keloid resultion from a positive patch test*. *Arch. Dermat. Syphil.*, **65** 53–55.
- P. Daubersies, S. Galiegue-Zouitina, N. Koffel-Schwartz, R. P. Fuchs, M. H. Loucheux-Lefebvre, B. Bailleur (1992) *Mutation spectra of the two guanine adducts of the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide in Escherichia coli. Influence of neighbouring base sequence on mutagenesis*. *Carcinogenesis*, **13**(3) 349–354.
- S. M. Deneke, B. L. Fanburg (1989) *Regulation of cellular glutathione*. *American Journal of Physiology*, **257**(4 Pt 1) L163–73.
- F. Dickens, H. E. H. Jones (1961) *Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances*. *The British Journal of Cancer*, **15** 85–100.
- S. Drusch, W. Ragab (2003) *Mycotoxins in fruits, fruit juices, and dried fruits*. *J Food Prot*, **66**(8) 1514–27.
- M. C. Elia, R. D. Storer, L. S. Harmon, A. R. Kraynak, T. W. McKelvey, P. R. Hertzog, K. P. Keenan, J. G. DeLuca, W. W. Nichols (1993) *Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay*. *Mutation Research*, **291**(3) 193–205.
- B. Epe (1995) *DNA damage profiles induced by oxidizing agents*. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **127** 223–49.
- B. Epe, M. Pflaum, S. Boiteux (1993) *DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems*. *Mutation Research*, **299**(3-4) 135–45.
- EU (2003a) *Empfehlung der Kommission vom 11. August 2003 zur Prävention und Reduzierung der Patulinkontamination von Apfelsaft und Apfelsaftzutaten in anderen Getränken*. *Amtsblatt der Europäischen Union*, **L**(203) 54–59.
- EU (2003b) *Verordnung (EG) Nr. 1425/2003 der Kommission vom 11. August 2003 zur Änderung der*

- Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin. Amtsblatt der Europäischen Union, **L**(203) 1–3.
- EU (2004) Verordnung (EG) Nr. 455/2004 der Kommission vom 11. März 2004 zur Änderung der Verordnung (EG) Nr. 466/2001 in Bezug auf Patulin. Amtsblatt der Europäischen Union, **L**(74) 11.
- L. R. Ferguson, B. C. Baguley (1994) *Topoisomerase II enzymes and mutagenicity*. Environmental and Molecular Mutagenesis, **24**(4) 245–261.
- R. Fliege (1999) *Zum molekularen Wirkmechanismus des Mykotoxins Patulin: Charakterisierung der spontanen Reaktivität gegenüber nucleophilen Modellsubstanzen und biologischen Makromolekülen in vitro*. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- R. Fliege, M. Metzler (1999) *The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups*. Chemico-Biological Interactions, **123** 85–103.
- R. Fliege, M. Metzler (2000a) *Electrophilic properties of patulin. Adduct structures and reaction pathways with 4-bromothiophenol and other model nucleophiles*. Chemical Research in Toxicology, **13**(5) 363–72.
- R. Fliege, M. Metzler (2000b) *Electrophilic properties of patulin. N-acetylcysteine and glutathione adducts*. Chemical Research in Toxicology, **13**(5) 373–81.
- D. Ford, G. Yerganian (1958) *Observations on the Chromosomes of Chinese Hamster Cells in Tissue Culture*. Journal of the National Cancer Institute, **21**(2) 393 – 425.
- H. K. Frank, R. Orth, R. Hermann (1976) *Patulin in foods of vegetable origin. I. Pomaceous fruit and products made from it*. Zeitschrift für Lebensmittel–Untersuchung und –Forschung, **162**(2) 149–57.
- E. Freerksen, R. Bonicke (1951) *Inactivation of patulin in vivo*. Zeitschrift fuer Hygiene und Infektionskrankheiten, **132** 274–91.
- L. Friedman (1990) *Patulin: mycotoxin or fungal metabolite? (current state of knowledge)*. Biodeterior. Res. 3 [Proc. Meet. Pan Am. Biodeterior. Soc.], 3rd, 21–54.
- R. Gantt, E. V. Stephens, S. R. Davis (1985) *Measurement of DNA-protein crosslinks in mammalian cells without X-irradiation*. Analytical Biochemistry, **149**(2) 365–8.
- P. Garberg, E. L. Akerblom, G. Bolcsfoldi (1988) *Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-strand breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution*. Mutation Research, **203**(3) 155–76.
- G. Gaucher (1979) *Mycotoxins – their biosynthesis in fungi: patulin and related carcinogenic lactones*. Journal of Food Protection, **42**(10) 810–814.
- A. Gliszczynska-Swiglo, H. van der Woude, L. de Haan, B. Tyrakowska, J. M. M. J. G. Aarts, I. M. C. M. Rietjens (2002) *The involvement of the pro-oxidant quinone chemistry in quercetin cytotoxicity*. Free Radical Research, **36**(Suppl. 1) 92–93.

- V. Gökmen, N. Artik, J. Acar, N. Kahraman, E. Poyrazoglu (2001) *Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice*. European Food Research and Technology, **213**(3) 194–199.
- W. E. Gye (1943) *Patulin in the common cold. III. Preliminary trial in the common cold*. Lancet, **245**(11) 630–631.
- T. Haraguchi, D.-Q. Ding, A. Yamamoto, T. Kaneda, T. Koujin, Y. Hiraoka (1999) *Multiple-color fluorescence imaging of chromosomes and microtubules in living cells*. Cell Structure and Function, **24** 291–298.
- F. Hatey, P. Gaye (1978) *Inhibition of translation in reticulocyte lysate by the mycotoxin patulin*. FEBS Letters, **95**(2) 252–256.
- F. Hatey, Y. Moule (1977) *Effect of patulin on RNA and protein synthesis in vitro*. Annales de la nutrition et de l'alimentation, **31**(4-6) 867–870.
- F. Hatey, Y. Moule (1979) *Protein synthesis inhibition in rat liver by the mycotoxin patulin*. Toxicology, **13**(3) 223–231.
- A. W. Hayes, T. D. Phillips, W. L. Williams, A. Ciegler (1979) *Acute toxicity of patulin in mice and rats*. Toxicology, **13**(2) 91–100.
- Z. A. Huang, H. Yang, C. Chen, Z. Zeng, S. C. Lu (2000) *Inducers of gamma-glutamylcysteine synthetase and their effects on glutathione synthetase expression*. Biochimica et Biophysica Acta, **1493**(1-2) 48–55.
- Z. Z. Huang, C. Chen, Z. Zeng, H. Yang, J. Oh, L. Chen, S. C. Lu (2001) *Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration*. The FASEB Journal, **15**(1) 19–21.
- IARC (1986) *Patulin*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, **40** 83–90.
- K. Imaida, M. Hirose, T. Ogiso, Y. Kurata, N. Ito (1982) *Quantitative analysis of initiating and promoting activities of five mycotoxins in liver carcinogenesis in rats*. Cancer Letters (Shannon, Ireland), **16**(2) 137–43.
- L. S. Jackson, T. Beacham-Bowden, S. E. Keller, C. Adhikari, K. T. Taylor, S. J. Chirtel, R. I. Merker (2003) *Apple quality, storage, and washing treatments affect patulin levels in apple cider*. Journal of Food Protection, **66**(4) 618–624.
- C. J. Jones, S. M. Edwards, R. Waters (1989) *The repair of identified large DNA adducts induced by 4-nitroquinoline 1-oxid in normal or xeroderma pigmentosum group A human fibroblasts, and the role of DNA polymerases α or δ* . Carcinogenesis, **10**(7) 1197–1201.
- S. de Jong, J. G. Zijlstra, H. Timmer-Bosscha, N. H. Mulder, E. G. de Vries (1986) *Detection of DNA cross-links in tumor cells with the ethidium bromide fluorescence assay*. International Journal of Cancer, **37**(4) 557–61.

- C. Kadakal, S. Nas (2002) *Effect of activated charcoal on patulin, fumaric acid and some other properties of apple juice*. *Nahrung*, **46**(1) 31–33.
- C. Kadakal, S. Nas (2003) *Effect of heat treatment and evaporation on patulin and some other properties of apple juice*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**(9) 987–990.
- B. Kaina, *Mechanismen der DNA-Reparatur und der Mutagenese*. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, R. Fahrig, Hg., 65–86 (Wiss. Buchges., 1993).
- K. Kangsadalampai, D. K. Salunkhe, R. P. Sharma (1981) *Patulin and rubratoxin B: interactions of toxic and hepatic effects and mutagenic potential*. *Journal of Food Protection*, **44**(1) 39–42.
- W. K. Kaufmann (1998) *Human topoisomerase II function, tyrosine phosphorylation and cell cycle checkpoints*. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **217**(3) 327–334.
- W. K. Kaufmann, R. S. Paules (1996) *DNA damage and cell cycle checkpoints*. *The FASEB Journal*, **10**(2) 238–47.
- C. Köhler (2002) *Expression von P-Glykoprotein (MDR-1), MRP-1 und LRO in humanen AII und Clara-Zell-ähnlichen Tumorzelllinien sowie normalen humanen Bronchialepithelzellen*. Dissertation, Universität Halle-Wittenberg.
- C. Kielbassa, L. Roza, B. Epe (1997) *Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light*. *Carcinogenesis*, **18**(4) 811–6.
- K. Kohda, M. Tada, H. Kasai, S. Nishimura, Y. Kawazoe (1986) *Formation of 8-hydroxyguanine residues in cellular DNA exposed to the carcinogen 4-nitroquinoline 1-oxide*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **139**(2) 626–32.
- K. Kohn, R. Ewig, L. Erickson, L. Zwelling, *Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution*. In: *DNA-repair: A laboratory manual of research procedures*, E. Friedberg, P. Hanawalt, Hg., Bd. 1B, 371–401 (Marcel Dekker, New York, 1981).
- K. W. Kohn (1991) *Principles and practice of DNA filter elution*. *Pharmacology & Therapeutics*, **49**(1-2) 55–77.
- K. W. Kohn, L. C. Erickson, R. A. Ewig, C. A. Friedman (1976) *Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution*. *Biochemistry*, **15**(21) 4629–37.
- S. Kojima, K. Teshima, K. Yamaoka (2000) *Mechanisms involved in the elevation of glutathione in RAW 264.7 cells exposed to low doses of gamma-rays*. *Anticancer Research*, **20**(3A) 1589–94.
- A. Korte (1980) *Chromosomal analysis in bone-marrow cells of Chinese hamsters after treatment with mycotoxins*. *Mutation Research*, **78**(1) 41–49.
- A. Korte, R. Slacik-Erben, G. Obe (1979) *The influence of ethanol treatment on cytogenetic effects in bone marrow cells of chinese hamsters by cyclophosphamide, aflatoxin B1 and patulin*. *Toxicology*, **12**(1) 53–61.

- L. Koshy, B. S. Dwarakanath, H. G. Ray, R. Chandra, T. L. Mathew (2003) *Suicidal oxidative stress induced by certain antioxidants*. Indian Journal of Experimental Biology, **41**(11) 1273–1278.
- R. Kubiak, M. Kosz-Vnenchak (1983) *Mutagenic properties of mycotoxins as naturally occurring mutagens: Chromosome aberrations and SCEs induced by patulin*. Mutation Research, **113** 273.
- G. Kumar, R. Lipman, J. Cummings, M. Tomasz (1997) *Mitomycin C-DNA adducts generated by DT-diaphorase: revised mechanism of the enzymatic reductive activation of mitomycin C*. Biochemistry, **36** 14128–14136.
- R. Kurozumi, S. Tokuzumi, S. Kojima (2003) *Does peroxynitrite involve in the elevation of cellular glutathione induced by sodium nitroprusside (SNP) in RAW 264.7 cells?* Biol Pharm Bull, **26**(8) 1070–5.
- C.-L. Lai, Y.-M. Fuh, D. Y.-C. Shih (2000) *Detection of mycotoxin patulin in apple juice*. Yaowu-shipin-fenxi = Journal of food and drug analysis, **8**(2) 85–96.
- K. S. Lee, R. J. Rösenthaller (1986) *DNA-damaging activity of patulin in Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, **52**(5) 1046–54.
- L. Lehmann, U. Franz, M. Metzler (2003) *Genotoxic potential of the mycotoxin Patulin in cultured mammalian fibroblasts*. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology, **367** R166.
- A. P. Li, R. S. Gupta, R. H. Heflich, J. S. Wassom (1988) *A review and analysis of the Chinese hamster ovary/hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase assay to determine the mutagenicity of chemical agents. A report of phase III of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program*. Mutation Research, **196**(1) 17–36.
- F. Y. Lieu, L. B. Bullerman (1977) *Production and stability of aflatoxins, penicillic acid and patulin in several substrates*. Journal of Food Science, **42**(5) 1222–4, 1228.
- B. H. Liu, F. Y. Yu, T. S. Wu, S. Y. Li, M. C. Su, M. C. Wang, S. M. Shih (2003) *Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin*. Toxicology and Applied Pharmacology, **191**(3) 255–63.
- J. Lovett (1971) *Poultry mycotoxicosis as a source of mycotoxins in man's food chain*. Dissertation, University of Minnesota.
- J. Lovett (1972a) *Distribution of C¹⁴ in eggs from patulin-C¹⁴-fed hens*. Bacteriol. Proc., E99.
- J. Lovett (1972b) *Patulin toxicosis in poultry*. Poultry Science, **51**(6) 2097–2098.
- L. J. Lu, J. R. Baxter, M. Y. Wang, B. L. Harper, F. Tasaka, K. Kohda (1990) *Induction of covalent DNA modifications and micronucleated erythrocytes by 4-nitroquinoline 1-oxide in adult and fetal mice*. Cancer Research, **50**(19) 6192–6198.
- S. Madle, B. Beek, C. Nowak, *Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen*. In: *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, R. Fahrig, Hg. (Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 1993).

- R. Mahfoud, M. Maresca, N. Garmy, J. Fantini (2002) *The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione*. Toxicology and Applied Pharmacology, **181**(3) 209–18.
- P. Majerus, K. Kapp, *Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States*. Reports on tasks for scientific cooperation (Brüssel, 2002).
- L. Malmauret, D. Parent-Massin, J. L. Hardy, P. Verger (2002) *Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France*. Food Additives & Contaminants, **19**(6) 524–532.
- A. Marchionatti, A. Alisio, G. Diaz de Barboza, V. Baudino, N. Tolosa de Talamoni (2001) *DL-Buthionine-S,R-sulfoximine affects intestinal alkaline phosphatase activity*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, **129**(2) 85–91.
- E. R. McKinley, W. W. Carlton (1991) *Patulin*. Mycotoxins Phytoalexins, 191–236.
- A. Meister (1995a) *Glutathione biosynthesis and its inhibition*. Methods in Enzymology, **252** 26–30.
- A. Meister (1995b) *Glutathione metabolism*. Methods in Enzymology, **251** 3–7.
- O. Merk, G. Speit (1999) *Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity*. Environmental and Molecular Mutagenesis, **33**(2) 167–72.
- G. Michal (Hg.), *Biochemical Pathways* (Boehringer Mannheim, 1993), 3 Aufl.
- D. Moellering, J. Mc Andrew, R. P. Patel, H. J. Forman, R. T. Mulcahy, H. Jo, V. M. Darley-Usmar (1999) *The induction of GSH synthesis by nanomolar concentrations of NO in endothelial cells: a role for gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase*. FEBS letters, **448**(2-3) 292–6.
- M. Moore, M. Honma, J. Clements, G. Bolcsfoldi, M. Cifone, R. Delongchamp, M. Fellows, B. Gollapudi, P. Jenkinson, P. Kirby, S. Kirchner, W. Muster, B. Myhr, M. O'Donovan, J. Oliver, T. Omori, M. Ouldelhkim, K. Pant, R. Preston, C. Riach, R. San, L. Stankowski, A. Thakur, S. Wakuri, I. Yoshimura (2003) *Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: International workshop on genotoxicity tests workgroup report – Plymouth, UK 2002*. Mutation Research, **540**(2) 127–140.
- H. Mori, K. Kawai, F. Ohbayashi, T. Kuniyasu, M. Yamazaki, T. Hamasaki, G. M. Williams (1984) *Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture/DNA repair test using rat and mouse hepatocytes*. Cancer Research, **44**(7) 2918–2923.
- N. Morley, A. Curnow, L. Salter, S. Campbell, D. Gould (2003) *N-acetyl-L-cysteine prevents DNA damage induced by UVA, UVB and visible radiation in human fibroblasts*. Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology, **72**(1-3) 55–60.
- M. O. Moss, M. T. Long (2002) *Fate of patulin in the presence of the yeast Saccharomyces cerevisiae*. Food Additives & Contaminants, **19**(4) 387–99.
- Y. Moule, F. Hatey (1977) *Mechanism of the in vitro inhibition of transcription by patulin, a mycotoxin from Byssosclamyces nivea*. FEBS Letters, **74**(1) 121–125.

- E. R. Nestmann, R. L. Brillinger, J. P. Gilman, C. J. Rudd, S. H. Swierenga (1991) *Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: II. Mutation in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and L5178Y mouse lymphoma cells*. Mutation Research, **246**(2) 255–84.
- F. A. Norstadt, T. M. McCalla (1969) *Microbial populations in stubble-mulched soil*. Soil Sci., **107**(3) 188–193.
- M. Nusse, J. Kramer (1984) *Flow cytometric analysis of micronuclei found in cells after irradiation*. Cytometry, **5**(1) 20–25.
- T. Ochi (1993) *Mechanism for the changes in levels of glutathione upon exposure of cultured mammalian cells to tertiary-butylhydroperoxide and diamide*. Archives of Toxicology, **67**(6) 401–10.
- T. Ochi (1996) *Menadione causes increases in the level of glutathione and in the activity of gamma-glutamylcysteine synthetase in cultured Chinese hamster V79 cells*. Toxicology, **112**(1) 45–55.
- OECD (1997) *In vitro mammalian cell gene mutation test*. OECD guideline for the testing of chemicals, **476**.
- N. L. Oleinick, L. Y. Xue, L. R. Friedman, L. L. Donahue, J. E. Biaglow (1988) *Inhibition of radiation-induced DNA-protein cross-link repair by glutathione depletion with L-buthionine sulfoximine*. NCI Monogr, **6** 225–9.
- H. Osswald, H. K. Frank, D. Komitowski, H. Winter (1978) *Long-term testing of patulin administered orally to Sprague-Dawley rats and Swiss mice*. Food and Cosmetics Toxicology, **16**(3) 243–7.
- J. M. Parry (1998) *A proposal for a new OECD Guideline for the in vitro micronucleus test*. European Journal of Genetic and Molecular Toxicology, (September) 1–12.
- A. K. Pearce, T. C. Humphrey (2001) *Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways*. Trends in Cell Biology, **11**(10) 426–33.
- E. Pfeiffer, K. Gross, M. Metzler (1998) *Aneuploidogenic and clastogenic potential of the mycotoxins citrinin and patulin*. Carcinogenesis, **19**(7) 1313–8.
- M. Pflaum, B. Epe, *Measuring Oxidative DNA Damage by Alkaline Elution*. In: *Measuring in vivo Oxidative Damage: A Practical Approach*, J. Lunec, H. Griffiths, Hg. (John Wiley & Sons, Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Toronto, Singapore, 2000).
- M. Pflaum, C. Kielbassa, M. Garmyn, B. Epe (1998) *Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects*. Mutation Research, **408**(2) 137–46.
- K. M. Prise, S. Davies, M. R. Stratford, B. D. Michael (1992) *The role of non-protein sulphhydryls in determining the chemical repair rates of free radical precursors of DNA damage and cell killing in Chinese hamster V79 cells*. Int J Radiat Biol, **62**(3) 297–306.

- C. S. Reddy, P. K. Chan, A. W. Hayes (1978) *Teratogenic and dominant lethal studies of patulin in mice*. *Toxicology*, **11**(3) 219–223.
- L. Revesz, M. Edgren (1984) *Glutathione-dependent yield and repair of single-strand DNA breaks in irradiated cells*. *The British Journal of Cancer Suppl*, **6** 55–60.
- P. Riddles, R. Blakeley, B. Zerner (1983) *Reassessment of Ellman's reagent*. *Methods in Enzymology*, **91** 49–61.
- R. T. Riley, D. E. Goeger, D. M. Hinton (1990) *Mycotoxin-induced alterations in ion transport across cell membranes*. *Microb. Toxins Foods Feeds: Cell. Mol. Modes Action*, [Proc. Symp.], 451–465.
- R. T. Riley, D. E. Goeger, H. Yoo, J. L. Showker (1992) *Comparison of three tetramic acids and their ability to alter membrane function in cultured skeletal muscle cells and sarcoplasmic reticulum vesicles*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **114**(2) 261–267.
- R. T. Riley, J. L. Showker (1991) *The mechanism of patulin's cytotoxicity and the antioxidant activity of indole tetramic acids*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **109**(1) 108–26.
- A. Ritieni (2003) *Patulin in Italian Commercial Apple Products*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**(20) 6086–6090.
- S. Robbana-Barnat, C. LaFarge-Frayssinet, C. Frayssinet (1989) *Use of cell cultures for predicting the biological effects of mycotoxins*. *Cell Biology and Toxicology*, **5**(2) 217–226.
- R. Roll, G. Matthiaschk, A. Korte (1990) *Embryotoxicity and mutagenicity of mycotoxins*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, **10**(1-2) 1–7.
- F. J. Romero, D. Zukowski, W. Mueller-Klieser (1997) *Glutathione content of V79 cells in two- or three-dimensional culture*. *American Journal of Physiology*, **272**(5 Pt 1) C1507–12.
- C. D. de Rosnay, C. Martin-Dupont, R. Jensen (1952) *An antibiotic. Mycoin C*. *Journal de Medecine de Bordeaux et du Sud-Ouest*, **129** 189–199.
- T. H. Rushmore, A. N. Kong (2002) *Pharmacogenomics, regulation and signaling pathways of phase I and II drug metabolizing enzymes*. *Curr Drug Metab*, **3**(5) 481–90.
- M. Rychlik (2003) *Rapid degradation of the mycotoxin patulin in man quantified by stable isotope dilution assays*. *Food Additives & Contaminants*, **20**(9) 829–837.
- M. Rychlik, F. Kircher, V. Schusdziarra, F. Lippl (2004) *Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach*. *Food and Chemical Toxicology*, **42**(5) 729–35.
- M. Rychlik, P. Schieberle (1999) *Quantification of the mycotoxin patulin by a stable isotope dilution assay*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**(9) 3749–55.
- M. Rychlik, P. Schieberle (2001) *Model studies on the diffusion behavior of the mycotoxin patulin in apples, tomatoes, and wheat bread*. *European Food Research and Technology*, **212**(3) 274–278.

- Y. Sasaki, K. Sekihashi, F. Izumiyama, E. Nishidate, A. Saga, K. Ishida, S. Tsuda (2000) *The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database*. *Critical Reviews in Toxicology*, **30**(6) 629–799.
- G. Schütz (1997) *Zum Mechanismus der Krebsentstehung durch Benzol: Interaktion von Benzochinon mit Proteinen der Mitosespindel*. Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- M. Schuliga, S. Chouchane, E. T. Snow (2002) *Upregulation of glutathione-related genes and enzyme activities in cultured human cells by sublethal concentrations of inorganic arsenic*. *Toxicological sciences*, **70**(2) 183–92.
- N. Schultz, A. Onfelt (1994) *Video time-lapse study of mitosis in binucleate V79 cells: chromosome segregation and cleavage*. *Mutagenesis*, **9** 117–123.
- P. M. Scott, W. F. Miles, P. Toft, J. G. Dube (1972) *Occurrence of patulin in apple juice*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20**(2) 450–1.
- P. M. Scott, E. Somers (1968) *Stability of patulin and penicillic acid in fruit juices and flour*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **16**(3) 483–5.
- R. E. Shackelford, W. K. Kaufmann, R. S. Paules (1999) *Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress*. *Environmental Health Perspectives*, **107 Suppl 1** 5–24.
- X. Shan, T. Y. Aw, D. P. Jones (1990) *Glutathione-dependent protection against oxidative injury*. *Pharmacology & Therapeutics*, **47**(1) 61–71.
- C.-M. Shih, H. Lin, Y.-C. Liang, W.-S. Lee, W.-F. Bi, S.-H. Juan (2004) *Concentration-dependent differential effects of quercetin on rat aortic smooth muscle cells*. *European Journal of Pharmacology*, **496**(1-3) 41–48.
- D. E. Shuker, P. B. Farmer (1992) *Relevance of Urinary DNA Adducts as Markers of Carcinogen Exposure*. *Chemical Research in Toxicology*, **5** 450–460.
- D. E. G. Shuker, H. Bartsch, *DNA Adducts of nitrosamines*. In: *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*, K. Hemminki, A. Dipple, D. E. G. Shuker, F. F. Kadlubar, D. Segerbäcker, H. Bartsch, Hg., Bd. 125 von *IARC Scientific Publications*, 73–89 (International Agency for Research on Cancer, 1994).
- J. F. Sina, C. L. Bean, G. R. Dysart, V. I. Taylor, M. O. Bradley (1983) *Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential*. *Mutation Research*, **113**(5) 357–91.
- M. Y. Siraj, A. W. Hayes, A. Takanaka, I. K. Ho (1980) *Effect of patulin on hepatic monooxygenase in male mice*. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*, **4**(2-3) 545–553.
- E. E. Smith, E. A. Duffus, M. H. Small (1993) *Effects of patulin on postimplantation rat embryos*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **25**(2) 267–270.

- R. D. Snyder, P. J. Lachmann (1989) *Thiol involvement in the inhibition of DNA repair by metals in mammalian cells*. *Molecular Toxicology*, **2**(2) 117–28.
- G. Speit, P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz, H. Hoffmann (2004) *Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay*. *Toxicology Letters*, **146**(2) 151–8.
- J. M. Stansfeld, A. E. Francis, C. H. Stuart-Harris (1944) *Laboratory and clinical trials of patulin*. *Lancet*, **1944**, **II** 370–372.
- R. Stetina, M. Votava (1986) *Induction of DNA single-strand breaks and DNA synthesis inhibition by patulin, ochratoxin A, citrinin, and aflatoxin B1 in cell lines CHO and AWRP*. *Folia Biologica (Praha)*, **32**(2) 128–44.
- R. D. Storer, T. W. McKelvey, A. R. Kraynak, M. C. Elia, J. E. Barnum, L. S. Harmon, W. W. Nichols, J. G. DeLuca (1996) *Revalidation of the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds*. *Mutation Research*, **368**(2) 59–101.
- W. T. Stott, L. B. Bullerman (1975) *Patulin. Mycotoxin of potential concern in foods*. *Journal of Milk and Food Technology*, **38**(11) 695–705.
- J. Sugiyanto, M. Inouye, S.-i. Oda, Y. Takagishi, H. Yamamura (1993) *Teratogenicity of patulin, a mycotoxin, in mice*. *Environmental Medicine*, **37**(1) 43–45.
- Z. L. Sumbu, P. Thonart, J. Bechet (1983) *Action of patulin on a yeast*. *Applied and Environmental Microbiology*, **45**(1) 110–115.
- C. Thioudellet, T. Oster, P. Leroy, A. Nicolas, M. Wellman (1995) *Influence of sample preparation on cellular glutathione recovery from adherent cells in culture*. *Cell Biol Toxicol*, **11**(2) 103–11.
- R. Thust, S. Kneist, J. Mendel (1982) *Patulin, a further clastogenic mycotoxin, is negative in the SCE assay in Chinese hamster V79-E cells in vitro*. *Mutation Research*, **103**(1) 91–7.
- M. Tomasz (1995) *Mitomycin C: small, fast and deadly (but very selective)*. *Chem Biol*, **2**(9) 575–9.
- N. Tuteja, T. N. Phan, R. Tuteja, A. Ochem, A. Falaschi (1997) *Inhibition of DNA unwinding and ATPase activities of human DNA helicase II by chemotherapeutic agents*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **236**(3) 636–640.
- M. Umeda, T. Tsutsui, M. Saito (1977) *Mutagenicity and inducibility of DNA single-strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins*. *Gann*, **68** 619–625.
- M. Umeda, T. Yamamoto, M. Saito (1972) *DNA-strand breakage of HeLa cells induced by several mycotoxins*. *Japan. J. Exp. Med.*, **42**(6) 527–535.
- S. A. Waksman, E. S. Horning, E. L. Spencer (1942) *Production of two antibacterial substances, fumigacin and clavacin*. *Science (Washington, DC, United States)*, **96** 202–3.

- K. Walker, B. P. Wiesner (1944) *Patulin and clavacin*. Lancet, **26** 294.
- A. J. Warren, A. E. Maccubbin, J. W. Hamilton (1998) *Detection of mitomycin C-DNA adducts in vivo by ³²P-postlabeling: time course for formation and removal of adducts and biochemical modulation*. Cancer Research, **58**(3) 453–61.
- WHO/JECFA (1996) *Patulin*. Food Additives Series, **35**.
- J. J. de Witt, *Monographs on the progress of research in Holland during the war. No. IV*. In: *Modern Development of Chemotherapy*, E. Havinga, H. Veldstra, Hg. (Elsevier, New York, 1946).
- N. Yamashita, S. Kawanishi (2000) *Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin*. Free Radical Research, **33**(5) 623–633.
- T. Yano, S. Takahashi, T. Ichikawa (1995) *Active oxygen generated in the process of carcinogen metabolism can induce oxidative damage in nuclei*. Res Commun Mol Pathol Pharmacol, **87**(3) 367–370.
- T. Yurdun, G. Z. Omurtag, m. Ersoy (2001) *Incidence of patulin in apple juices marketed in Turkey*. Journal of Food Protection, **64**(11) 1851–1853.

Anhang

Firmen

Abimed Analysen-Technik GmbH Langenfeld
Aldrich Taufkirchen
Alfa Aesar Karlsruhe
AppliChem GmbH Darmstadt
Bandelin electronic Berlin
Biochrom AG seromed Berlin
Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf
Cell pharm GmbH Hannover
Diagnostic Instruments Sterling Heights, MI, USA
DPC Biermann GmbH Bad Nauheim
Eppendorf AG Hamburg
Fluka Taufkirchen
Greiner-Bio-one GmbH Frickenhausen
Hedler Sytemlicht GmbH Runkel / Lahn
Hellma GmbH & Co. KG Müllheim
Heraeus Hanau
Invitrogen GmbH Karlsruhe
JASCO Labor- und Datentechnik GmbH Deutschland Groß-Umstadt
Kendro Laboratory Products GmbH Langenselbold
Kontron
Leitz Wetzlar
Gerhard Menzel, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG Braunschweig
Deutsche Metrom GmbH & Co KG Filderstadt
Mettler Toledo GmbH Giessen
Miele & Cie. KG Gütersloh
Millipore GmbH Eschborn
Molecular Probes Europe BV AA Leiden, NL
Nikon GmbH Düsseldorf
Nunc GmbH & Co. KG Wiesbaden
Partec GmbH Münster
PerkinElmer LAS (Germany) GmbH Rodgau-Jügesheim
Ratiopharm GmbH Ulm
Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe
Sanyo Scientific Bensenville, IL, USA
Sarstedt AG & Co. Nümbrecht
Sartorius AG Göttingen

Schott AG Mainz

Schärfe System GmbH Reutlingen

Shimadzu Deutschland GmbH Duisburg

Sigma Taufkirchen

Tecan Deutschland GmbH Crailsheim

Tegimenta AG Rotkreuz, CH

Uni Equip Martinsried

Universal Imaging Corporation Downingtown, PA, USA

VWR International GmbH Darmstadt

Watson Marlow GmbH Rommerskirchen

Carl Zeiss AG Oberkochen

Daten

Daten zu Abb. 3.1: V79-Zellen wurden nach dem Anwachsen für 6 h mit den Substanzen inkubiert und mit frischem Medium nachinkubiert. Es wurde die Mikrokernrate je 1000 Zellen berechnet. Für die Wachstumskurve wurden V79-Zellen in 24-Lochplatten für 6 h inkubiert und mit frischem Medium nachinkubiert. Nach dem Abtrypsinieren wurden die Zellen elektronisch gezählt und die Lebendzellzahl relativ zum Inkubationsstart berechnet.

	Zeit (h)	Substanz							
		ETO, 0,25 μ M	MMC, 1 μ M	EMS, 2 mM	QE, 50 μ M	QE, 25 μ M	PAT, 0,1 μ M	PAT, 0,5 μ M	DMSO, 1%
Mikrokernrate	0	20,0	8,7	12,0	15,0	11,8	8,0	16,0	7,3
	3	34,8	—	28,8	6,7	17,0	—	—	11,0
	5	—	9,5	—	—	—	10,0	27,8	7,7
	12	97,3	78,5	19,7	47,9	16,8	28,0	110,0	10,5
	15	108,0	—	—	—	—	—	—	—
	24	82,9	114,8	81,6	55,7	28,7	53,4	200,0	8,9
	36	68,0	121,9	118,6	—	18,8	56,0	191,6	9,9
	48	—	85,0	91,8	—	—	34,0	145,1	3,0
	60	—	65,0	64,8	—	—	—	—	9,0
Wachstum	-6	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	0	1,52	1,22	1,05	1,02	1,09	1,32	1,03	1,32
	3	1,51	—	1,20	0,99	1,02	1,44	1,05	—
	6	—	1,49	—	—	—	—	—	1,78
	12	2,76	1,68	2,35	1,18	1,31	2,41	1,65	2,44
	15	3,02	—	—	—	—	—	—	—
	24	5,16	3,51	4,57	1,83	2,03	5,44	3,06	5,23
	36	9,66	5,45	10,19	2,38	3,06	12,28	5,56	9,39
	48	—	10,96	20,34	—	—	24,22	9,86	21,13
60	—	18,26	—	—	—	—	—	37,35	

Daten zu Abb. 3.3: Etwa 730 000 V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach 24 h für weiter 24 h mit BSO inkubiert. Dann wurde der GSH-Gehalt gemessen. Die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt.

Reagenz	BSO-Konzentration (μM)			
	0,0	0,2	2	20,0
Ellman	100,0	107,6	97,5	20,4
Chlorbiman	100,0	101,3	72,3	41,9

Daten zu Abb. 3.4: Etwa 400 000 V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach 24 h gegebenenfalls für weiter 24 h mit BSO inkubiert und anschließend für 3 h mit GSH-EE inkubiert und der GSH-Gehalt gemessen. Die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt.

Ansatz	GSH-EE-Konzentration (mM)			
	0,0	5,6	11,3	16,9
Zellen ohne Vorbehandlung	100,0	142,6	239,1	309,6
Zellen mit BSO vorbehandelt	33,7	—	—	359,1

Daten zu Abb. 3.5: Etwa 400 000 V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach 24 h für weiter 24 h mit BSO oder für 2,5 h mit GSH-EE inkubiert. Dann wurde der GSH-Gehalt gemessen. Nach weiteren 24 h wurde der GSH-Gehalt erneut gemessen (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung). Die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt.

Ansatz	Zeit	
	0 h	24 h
Zellen mit GSH-EE vorbehandelt	280,0 \pm 25,3	78,4 \pm 8,3
Zellen ohne Vorbehandlung	100,0	100,0
Zellen mit BSO vorbehandelt	40,2 \pm 5,5	70,8 \pm 9,2
Zellen mit BSO vorbehandelt und mit BSO weiterinkubiert	40,2 \pm 5,5	45,9 \pm 14,3

Daten zu Abb. 3.6: V79-Zellen mit modifiziertem GSH-Spiegel (Abb. 3.5) wurden für 24 h mit PAT oder mit NQO inkubiert und anschließend der intrazelluläre GSH-Gehalt bestimmt (Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung). Die Daten sind relativ zur Kontrolle dargestellt.

Ansatz	NQO			PAT				
	0,5	1,0	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	
Zellen mit GSH-EE vorbehandelt	—	—	78,4 \pm 8,3	80,6 \pm 11,4	78,6 \pm 11,6	81,3 \pm 10,5	79,1 \pm 10,2	
Zellen ohne Vorbehandlung	99,1 \pm 4,3	102,2 \pm 9,6	100,0	111,1 \pm 4,1	118,8 \pm 12,7	140,0 \pm 28,7	169 \pm 43,2	
Zellen mit BSO vorbehandelt	—	—	70,8 \pm 9,2	87,1 \pm 13,5	102,2 \pm 12,4	118,1 \pm 11,7	—	
Zellen mit BSO vorbehandelt und koinkubiert mit BSO und PAT	—	—	45,9 \pm 14,3	46,8 \pm 12,4	52,3 \pm 7,4	50,3 \pm 17,6	—	

Daten zu Abb. 3.7: Etwa 1,5 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen mit PAT behandelt (rückwärts inkubiert). Nach der Inkubation wurde der intrazelluläre GSH-Spiegel gemessen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten und sind als Mittel \pm Schwankungsbereich angegeben. Die Werte wurden als Prozent der jeweiligen Kontrolle ausgedrückt.

Ansatz	Zeit (h)			
	0	0,5	6	24
DMSO 1%	100,0	100,0	100,0	100,0
0,6 μ M PAT		90,9 \pm 2,9	193,0 \pm 10,4	120,7 \pm 1,2
1,2 μ M PAT		84,2 \pm 2,0	253,5 \pm 15,4	146,4 \pm 9,8

Daten zu Abb. 3.8: Etwa 20 000 Zellen wurden in 6-Loch-Platten in 2 ml Medium ausgestreut, nach dem Anwachsen in 1 ml Medium mit BSO (20 μ M) inkubiert und dann die Zellzyklusverteilung gemessen (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Inkubationen).

Ansatz	Zellzyklusphase		
	G1/G0	S	G2/M
Inkubationsstart	53,8 \pm 0,2	26,7 \pm 0,7	19,5 \pm 0,6
48 h Wasser	51,4 \pm 3,0	26,8 \pm 0,4	21,8 \pm 2,6
48 h BSO	51,3 \pm 2,2	26,1 \pm 0,4	22,6 \pm 2,0

Daten zu Abb. 3.9: Etwa 20 000 Zellen wurden in 6-Loch-Platten in 2 ml Medium ausgestreut, nach dem Anwachsen (48 h) in 1 ml Medium für 24 h mit NQO inkubiert und dann die Zellzyklusverteilung gemessen (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Inkubationen).

NQO-Konzentration (μ M)	Zellzyklusphase		
	G1/G0	S	G2/M
0,0	56,9 \pm 4,0	21,4 \pm 2,0	21,7 \pm 4,2
0,5	56,2 \pm 4,3	23,3 \pm 2,5	20,5 \pm 2,3
1,0	56,0 \pm 4,1	22,9 \pm 1,4	21,2 \pm 2,7

Daten zu Abb. 3.10: Etwa 20 000 Zellen wurden in 6-Loch-Platten in 2 ml Medium ausgestreut, nach dem Anwachsen in 1 ml Medium mit BSO vorinkubiert, dann für weitere 24 h mit PAT inkubiert, und anschließend die Zellzyklusverteilung gemessen (Mittelwerte \pm Standardabweichung aus vier unabhängigen Inkubationen). Die Daten sind als Vielfaches der Kontrolle dargestellt.

Vorbehandlung	PAT-Konzentration (μM)	Zellzyklusphase		
		G1/G0	S	G2/M
Zellen ohne Vorbehandlung	0,0	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,12
	0,3	0,90 \pm 0,04	1,04 \pm 0,04	1,19 \pm 0,05
	0,6	0,89 \pm 0,12	1,11 \pm 0,05	1,14 \pm 0,17
	0,9	0,96 \pm 0,11	0,99 \pm 0,25	1,11 \pm 0,06
	1,2	0,94 \pm 0,04	0,91 \pm 0,14	1,24 \pm 0,05
Zellen mit BSO vorbehandelt	0,0	1,00 \pm 0,06	1,00 \pm 0,10	1,00 \pm 0,03
	0,3	0,85 \pm 0,15	1,23 \pm 0,13	1,07 \pm 0,09
	0,6	1,03 \pm 0,02	0,84 \pm 0,22	1,12 \pm 0,16
	0,9	0,92 \pm 0,04	0,82 \pm 0,14	1,36 \pm 0,13
	1,2	0,77 \pm 0,19	0,82 \pm 0,12	1,70 \pm 0,14
Zellen mit BSO vorbehandelt und mit BSO und PAT koinkubiert	0,0	1,00 \pm 0,04	1,00 \pm 0,01	1,00 \pm 0,09
	0,3	0,97 \pm 0,09	1,09 \pm 0,07	0,97 \pm 0,10
	0,6	0,92 \pm 0,02	0,79 \pm 0,03	1,43 \pm 0,03
	0,9	0,71 \pm 0,13	0,87 \pm 0,07	1,80 \pm 0,14
	1,2	0,70 \pm 0,15	0,75 \pm 0,28	1,97 \pm 0,04

Daten zu Abb. 3.14: V79-Zellen wurden in 24-Loch-Platten so ausgestreut, daß nach der Anwachszeit die angegebenen Zellzahlen je Kavität erreicht wurden. Dann wurden die Zellen für 6 h in einem Milliliter Medium mit PAT behandelt und dann für weitere 18 h nachinkubiert. Jeder Wert bildet das Mittel aus zwei Inkubationen \pm Schwankung. Gezeigt sind die Ergebnisse aus einem repräsentativen Versuch, der mit dem gleichen Ergebnis reproduziert wurde.

Anwachszeit	Zellzahl	PAT-Konzentration (μM)					
		0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5
24 h	260 000	429,1 \pm 0,5	340,6 \pm 1,5	285 \pm 2,8	231,2 \pm 6,9	196,1 \pm 20,8	163,4 \pm 15,8
	80 000	454,5 \pm 16,8	274,2 \pm 22,5	170,9 \pm 18,2	99,7 \pm 6,0	61,7 \pm 7,8	65,3 \pm 0,5
48 h	325 000	459,7 \pm 1,9	398,6 \pm 20,5	327,2 \pm 2,6	298,5 \pm 1,7	221,2 \pm 6,1	208,7 \pm 14,8
	100 000	446,0 \pm 12,9	276,7 \pm 0,6	175,2 \pm 4,0	107,9 \pm 4,3	60,6 \pm 11,0	66,6 \pm 8,8

Daten zu Abb. 3.15 und 3.16: Etwa 1,5 Mio. V79-Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen mit den Substanzen für 24 h inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Lebendzellzahl (dargestellt als % der Kontrolle) und nach der Selektion der Mutanten die Mutationsfrequenz bestimmt. Dargestellt sind die Daten aus bis zu vier unabhängigen Inkubationen (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Substanz	Konzentration (μM)	relative Lebendzellzahl	Mutationsfrequenz
NQO	0,5	97,2 \pm 6,3	42,7 \pm 22,2
	1,0	96,0 \pm 8,6	81,1 \pm 48,2
PAT	0,0	100,0 \pm 8,7	7,5 \pm 6,0
	0,1	94,0 \pm 0,4	4,9 \pm 1,7
	0,5	86,5 \pm 3,4	25,2 \pm 21,2
	0,65	83,9 \pm 7,0	79,9 \pm 11,4
	0,8	79,8 \pm 2,0	91,6 \pm 21,3
	1,0	67,9 \pm 5,3	90,7 \pm 64,3
	1,5	62,3 \pm 5,4	194,1 \pm 62,1
	2,0	41,1 \pm 3,8	274,8 \pm 36,7
	2,5	26,1 \pm 1,3	266,2 \pm 30,4
	5,0	16,1 \pm 0,6	—
	10,0	12,3 \pm 10,7	—
	50,0	7,4 \pm 3,0	—

Daten zu Abb. 3.17: Etwa 400 000 Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen ausgestreut, nach dem Anwachsen mit BSO oder GSH-EE behandelt und anschließend mit PAT oder NQO inkubiert und nach 24 h die Lebendzellzahl bestimmt. Die Zellzahl ist als Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Ansatz	NQO			PAT			
	0,5	1,0	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2
Zellen mit GSH-EE vorbehandelt	—	—	100,0 \pm 17,3	98,8 \pm 21,8	100,8 \pm 19,6	99,3 \pm 17,9	97,9 \pm 22,8
Zellen ohne Vorbehandlung	102,3 \pm 10,5	98,0 \pm 21,1	100,0 \pm 10,1	89,5 \pm 13,9	77,6 \pm 16,4	62,2 \pm 8,1	54,6 \pm 5,9
Zellen mit BSO vorbehandelt	—	—	100,0 \pm 10,1	76,0 \pm 8,3	55,6 \pm 1,7	32,8 \pm 5,9	21,3 \pm 8,9
Zellen mit BSO vorbehandelt und koinkubiert mit BSO und PAT	—	—	100,0 \pm 17,8	68,2 \pm 11,0	45,9 \pm 5,2	22,6 \pm 11,1	20,5 \pm 9,8

Daten zu Abb. 3.18: Etwa 400 000 Zellen wurden in großen Zellkulturflaschen ausgestreut, nach dem Anwachsen mit BSO oder GSH-EE behandelt und anschließend für 24 h mit PAT oder NQO inkubiert und nach einer Woche die Mutanten selektiert. Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm Standardabweichung).

Ansatz	NQO			PAT				
	0,5	1,0	0,0	0,3	0,6	0,9	1,2	
Zellen mit GSH-EE vorbehandelt	—	—	9,1 \pm 9,4	5,6 \pm 3,1	8,6 \pm 1,3	4,8 \pm 0,5	8,1 \pm 3,7	
Zellen ohne Vorbehandlung	47,1 \pm 27,2	89,8 \pm 19,9	8,5 \pm 5,1	31,8 \pm 10,8	88,0 \pm 25,1	145,4 \pm 64,1	149,6 \pm 40,5	
Zellen mit BSO vorbehandelt	—	—	17,7 \pm 13,2	109,2 \pm 112,2	233,3 \pm 158,6	332,8 \pm 184,5	409,3 \pm 137,7	
Zellen mit BSO vorbehandelt und koinkubiert mit BSO und PAT	—	—	10,1 \pm 8,0	100,7 \pm 50,1	202,7 \pm 120,1	269,9 \pm 54,5	143,1 \pm 62,4	

Daten zu Abb. 3.19: Etwa 10 Mio. MLZ (normaler und erniedrigter GSH-Spiegel) wurden in 50 ml Medium für 24 h mit den Substanzen inkubiert und anschließend die Lebendzellzahl bestimmt. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm Schwankung) und wurden auf die Kontrolle normiert.

Ansatz	NQO		PAT			
	0,3	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5
normaler GSH-Spiegel	83,6 \pm 0,8	100,0	86,3 \pm 2,7	68,5 \pm 4,5	54,0 \pm 5,8	39,3 \pm 3,2
erniedrigter GSH-Spiegel	—	100,0	65,6 \pm 2,3	40,6 \pm 6,1	24,7 \pm 7,1	17,8 \pm 5,9

Daten zu Abb. 3.20: Etwa 10 Mio. MLZ (normaler und erniedrigter GSH-Spiegel) wurden in 50 ml Medium für 24 h mit den Substanzen inkubiert und darin die Mutanten selektiert. Die Daten sind das Mittel aus zwei unabhängigen Experimenten.

Ansatz	NQO		PAT			
	0,3	0,0	0,2	0,3	0,4	0,5
normaler GSH-Spiegel	364,7	65,0	84,6	87,4	107,0	122,3
erniedrigter GSH-Spiegel	—	76,8	100,1	133,0	166,1	197,1

Daten zu Abb. 3.21: Anteil kleiner TFT-resistenter Kolonien (in %) nach Behandlung von MLZ mit Patulin. Durch Striche abgetrennte Daten stammen aus parallel durchgeführten Experimenten.

Konzentration	BSO-Vorbehandlung					
	—		+		—	
0,0	51,0	40,3	37,5	20,0	22,8	
0,2	44,3	38,5	22,4	49,2	31,9	
0,3	59,7	50,7	36,8	60,0	36,5	
0,4	47,0	49,5	40,3	69,0	42,4	
0,5	53,1	60,2	44,3	56,0	50,4	

Daten zu Abb. 3.22 und 3.24: MLZ wurden 24 h inkubiert und gegebenenfalls weitere 24 h substanzfrei nachinkubiert. Die Werte sind die mittlere Häufigkeit aus bis zu vier unabhängigen Versuchen. *Unten* sind die Werte aus parallel durchgeführten Experimenten dargestellt. Die Daten sind die mittleren Häufigkeiten aus mindestens zwei Versuchen.

Ansatz	NQO			PAT				
	0,3	0,0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6
24 h Inkubation	12,8	3,0	6,0	7,8	17,8	18,3	20,0	28,0
24 h Inkubation + 24 h Nachinkubation	12,3	4,8	9,0	8,5	9,5	12,8	17,8	27,5
normaler GSH-Spiegel	—	1,5	—	4,5	15,0	13,0	12,5	—
erniedrigter GSH-Spiegel	—	5,0	—	2,5	16,5	26,0	28,0	—

Daten zu Abb. 3.25 und 3.27: V79-Zellen wurden in Medium suspendiert, mit ionisierender Strahlung behandelt und auf die Induktion von Strangbrüchen untersucht. Ein Teil der Zellen wurde in PBS-G suspendiert, in flüssigem Stickstoff gefroren und später aufgearbeitet. Die Schädigung der DNA ist als induzierte Steigung dargestellt.

Dosis	Bestrahlung				
	Nr. 1	Nr. 2	Nr. 3	Nr. 2 (gefr.)	Nr. 3 (gefr.)
0,0	0,0000	0,00000	0,0000	0,00000	0,0000
0,5	—	-0,00109	0,0012	-0,00203	0,0135
1,0	-0,0001	0,00113	0,0026	0,00354	—
2,0	—	0,00284	0,0106	0,01957	0,0535
2,5	0,0030	—	—	—	—
4,0	—	0,00977	0,0218	0,07916	0,0817
5,0	0,0282	—	—	—	—
6,0	—	0,02405	0,0787	0,12683	0,0729
			0,0497		0,1794
10,0	0,1582	—	—	—	—

Daten zu Abb. 3.26: DNA wurde in Elutionspuffer gelöst und Lösungen mit den dargestellten Konzentrationen hergestellt. Diese wurden mit Neutralisationspuffer neutralisiert und gefärbt und anschließend die Fluoreszenz gemessen.

DNA-Konzentration ($\mu\text{g/ml}$)	Hoechst-Konzentration	
	0,47 μM	1,41 μM
0,0	$16,6480 \pm 0,4641$	$39,2415 \pm 1,5608$
0,1	$21,6803 \pm 0,1357$	$39,7265 \pm 0,6866$
0,2	$27,3028 \pm 0,0736$	$40,0578 \pm 0,4414$
0,4	$37,6725 \pm 0,3348$	$40,7908 \pm 0,0909$
0,8	$61,5780 \pm 0,7744$	$47,6948 \pm 0,5902$
1,2	$85,7300 \pm 0,4135$	$58,0120 \pm 1,0951$
1,6	$108,4275 \pm 2,4610$	$75,3108 \pm 1,3553$
2,0	$134,8325 \pm 1,2861$	$97,2860 \pm 1,3030$

Daten zu Abb. 3.28: V79-Zellen wurden in PBS-G suspendiert (0,4 Mio. Zellen pro Milliliter) und auf Eis mit sichtbarem Licht bestrahlt. Die Anzahl Schäden pro 10^6 Basenpaaren ist dargestellt.

Schaden	Bestrahlungszeit (min.)		
	0	10	20
Alkali-labile Stellen	$0,00 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,08$	$0,45 \pm 0,10$
Fpg-sensitive Stellen	$0,12 \pm 0,04$	$3,17 \pm 0,16$	$6,04 \pm 1,85$

Daten zu Abb. 3.29: In Medium suspendierte V79-Zellen (0,4 Mio. Zellen pro Milliliter) wurden für 1 h mit PAT inkubiert, anschließend die Koloniebildungsfähigkeit und die Induktion von Alkali-labilen Stellen und Fpg-sensitiven Stellen untersucht. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Anzahl Schäden pro 10^6 Basenpaaren ist dargestellt.

PAT-Konzentration (μM)	Alkali-labile Stellen	Fpg-sensitive Stellen	Kolonien (%)
0,0	$0,00 \pm 0,00$	$0,25 \pm 0,08$	$100,0 \pm 11,6$
0,4	—	—	$70,1 \pm 2,0$
0,8	—	—	$67,0 \pm 4,2$
1,2	—	—	$53,1 \pm 8,5$
1,6	—	—	$37,0 \pm 15,0$
2,0	$-0,08 \pm 0,04$	$0,32 \pm 0,22$	$26,5 \pm 21,5$
2,4	—	—	$15,0 \pm 14,2$
4,0	$-0,08 \pm 0,08$	$0,36 \pm 0,39$	$1,0 \pm 1,1$
6,0	$0,04 \pm 0,16$	$0,43 \pm 0,74$	$0,0 \pm 0,0$
8,0	$0,51 \pm 0,93$	$0,40 \pm 0,54$	$0,0 \pm 0,0$
10	$0,46 \pm 0,37$	$1,04 \pm 0,41$	$0,0 \pm 0,0$
20	$3,64 \pm 1,22$	$3,05 \pm 1,57$	$0,0 \pm 0,0$
30	$5,98 \pm 1,98$	$3,11 \pm 0,47$	$0,0 \pm 0,0$
40	$8,59 \pm 2,91$	$3,92 \pm 1,88$	$0,0 \pm 0,0$
50	$8,90 \pm 2,40$	$4,62 \pm 0,83$	$0,0 \pm 0,0$

Daten zu Abb. 3.30: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für 4 h mit PAT behandelt. Anschließend wurde die Koloniebildungsfähigkeit und die Induktion von Alkali-labilen Stellen und Fpg-sensitiven Stellen untersucht. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Anzahl Schäden pro 10^6 Basenpaaren ist dargestellt.

PAT-Konzentration (μM)	Alkali-labile Stellen	Fpg-sensitive Stellen	Kolonien (%)
0,0	$0,00 \pm 0,00$	$0,41 \pm 0,28$	$100,0 \pm 2,3$
0,4	$0,06 \pm 0,13$	$0,30 \pm 0,06$	$95,4 \pm 2,2$
0,8	$0,04 \pm 0,16$	$0,33 \pm 0,06$	$94,3 \pm 0,7$
1,2	$0,05 \pm 0,16$	$0,29 \pm 0,10$	$53,3 \pm 4,9$
1,6	$0,04 \pm 0,16$	$0,53 \pm 0,26$	$37,7 \pm 1,8$
2,0	$0,06 \pm 0,11$	$0,32 \pm 0,17$	$26,7 \pm 1,0$
2,4	$0,04 \pm 0,11$	$0,44 \pm 0,26$	$8,4 \pm 2,2$
Licht	$0,44 \pm 0,26$	$3,29 \pm 0,66$	—

Daten zu Abb. 3.31: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für 24 h mit MMC behandelt. Die Daten stammen von einem repräsentativen Versuch mit bis zu fünf Aufarbeitungen.

	MMC-Konzentration (μM)				
	0	4	6	8	10
Quervernetzte DNA	$0,00 \pm 2,33$	$2,31 \pm 9,7$	$3,46 \pm 1,92$	$11,17 \pm 8,88$	$18,03 \pm 5,73$

Daten zu Abb. 3.32: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für 24 h mit PAT behandelt. Die Daten stammen von einem repräsentativen Versuch mit bis zu fünf Aufarbeitungen.

	PAT-Konzentration (μM)				
	0	0,4	0,8	1,2	1,6
Quervernetzte DNA	$0,00 \pm 12,25$	$23,30 \pm 18,42$	$27,13 \pm 17,6$	$27,95 \pm 11,68$	$35,98 \pm 24,59$

Daten zu Abb. 3.31 und 3.32: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für unterschiedliche Zeiten mit $10 \mu\text{M}$ MMC oder $1,5 \mu\text{M}$ PAT inkubiert. Die Daten stammen von einem repräsentativen Versuch mit bis zu fünf Aufarbeitungen je Inkubation.

Substanz	Inkubationszeit (h)				
	0	6	12	18	24
MMC	$0,00 \pm 1,01$	$2,36 \pm 3,02$	$10,12 \pm 6,00$	$5,20 \pm 3,54$	$4,06 \pm 4,79$
PAT	$0,00 \pm 24,41$	$34,06 \pm 8,74$	$50,03 \pm 11,76$	$53,59 \pm 20,06$	$49,64 \pm 16,89$

Daten zu Abb. 3.33: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für 4 h mit PAT behandelt. Ein Teil der Zellen wurde dann in PBS-G suspendiert und für 20 min mit sichtbarem Licht bestrahlt. Die Zellen wurden ohne und mit Bestrahlung auf die Induktion von Strangbrüchen und oxidativen DNA-Schäden hin untersucht. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchen. Die Anzahl induzierter Schäden pro 10^6 Basenpaaren ist dargestellt.

Schaden	PAT-Konzentration (μM)		
	0	0,75	1,5
Alkali-labile Stellen	$0,00 \pm 0,00$	$0,26 \pm 0,08$	$0,27 \pm 0,36$
Fpg-Sensitive Stellen	$0,67 \pm 0,54$	$0,73 \pm 0,64$	$0,43 \pm 0,11$
+Licht: Alkali-labile Stellen	$0,78 \pm 0,53$	$0,38 \pm 0,20$	$0,49 \pm 0,12$
+Licht: Fpg-sensitive Stellen	$6,64 \pm 0,49$	$4,75 \pm 1,20$	$4,37 \pm 1,76$

Daten zu Abb. 3.34: Etwa 2 Mio. V79-Zellen wurden in große Zellkulturflaschen ausgestreut und nach dem Anwachsen für 4 h mit PAT behandelt. Auf dem Filter, nach der Lyse, wurde die DNA mit 0,429 IE Bleomycin behandelt. Die Daten sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

	PAT-Konzentration (μM)				
	0,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Reduktion der Steigung (%)	$0,0 \pm 19,1$	$6,6 \pm 24,0$	$11,1 \pm 26,1$	$12,9 \pm 18,4$	$16,2 \pm 21,9$

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

Zeitschriftenpublikationen

- D. M. Schumacher, M. Metzler, L. Lehmann: Mutagenicity of the mycotoxin patulin in cultured Chinese hamster V79 cells, and its modulation by intracellular glutathione. *Archives of Toxicology* (2005) **79** (2) 110–121
- D. M. Schumacher, J. Wagner, M. Metzler, L. Lehmann: Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Research*, im Druck

Beiträge zu Fachtagungen

- D. Schumacher, S. Mayer, L. Lehmann, M. Metzler: The in vitro micronucleus assay as a tool to classify the mechanism of DNA damage. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* **365** (S1) R156
Poster bei der 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2002 (12.–14.3.2002, Mainz)
- D. M. Schumacher, L. Lehmann, M. Metzler: Untersuchung zur Mutagenität des Mykotoxins Patulin. *Lebensmittelchemie* **57** (1) 3
Poster beim 31. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2002 (9.–11.9.2002, Frankfurt am Main)
- D. M. Schumacher, L. Lehmann, M. Metzler: DNA-DNA cross-linking potential of Patulin. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* **367** (S1) R166
Poster bei der 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie und der 20. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung 2003 (17.–20. 3.2003, Mainz)

- D. M. Schumacher, J. Wagner, L. Lehmann, M. Metzler: Assessment of the genotoxic and mutagenic potential of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology* **369** (S1) R127
Poster bei der 45. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2004 (9.–11.3.2004, Mainz)

- D. M. Schumacher, J. Wagner, L. Lehmann, M. Metzler: Einfluss eines erniedrigten zellulären GSH-Spiegels auf die Mutagenität von Patulin in kultivierten Maus-Lymphomzellen. *Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft*, Heft 3/2004, S. 94
Poster bei dem 26. Mykotoxin-Workshop der Gesellschaft für Mykotoxinforschung e. V. 2004 (17.–19.5.2004, Herrsching)

- D. M. Schumacher, L. Lehmann, M. Metzler: Untersuchung zur Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch das Mykotoxin Patulin in kultivierten V79-Zellen. *Lebensmittelchemie*, im Druck
Poster beim 33. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2004 (13.–15.9.2004, Bonn)

- A. Vavelidou, L. Rohnstock, A. J. Janecki, D. M. Schumacher, L. Lehmann, M. Metzler: Einfluß von 17 β -Estradiol und den Sojaisoflavonen Genistein und Daizein auf die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies und oxidative DNA-Schäden in kultivierten MCF7 BUS 127 Zellen. *Lebensmittelchemie*, im Druck
Poster beim 33. Deutschen Lebensmittelchemikertag 2004 (13.–15.9.2004, Bonn)

- D. M. Schumacher, J. Wagner, L. Lehmann, M. Metzler: Vergleich einer durchflußzytometrischen und einer mikroskopischen Methode zur Bestimmung von Mikrokernen. *Tagungsband*
Poster bei der 21. Tagung der Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung 2004 (5.–8.10.2004, Würzburg)

- D. M. Schumacher, M. Metzler, L. Lehmann: Studies on the genotoxic and mutagenic mechanism of patulin in cultured cells. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, im Druck
Poster bei der 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 2005 (15.–17.3.2005, Mainz)

Lebenslauf

Name	David Michael Schumacher
Geburtsdatum	25. September 1975
Geburtsort	Marl
Staatsangehörigkeit	Deutsch

Schulbildung

Juli 1982 bis Juni 1986	Grundschule Wettenberg-Launsbach
Juli 1986 bis Juni 1987	Gesamtschule Wettenberg
Juli 1987 bis Juni 1995	Gymnasium Mainz-Gonsenheim
20.6.1995	Abitur

Wehrdienst

Juli 1995 bis April 1996	Fernmelderegiment 920 in Kastellaun
--------------------------	-------------------------------------

Hochschulbildung

April 1996 bis November 2000	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
April 1998	Erster Prüfungsabschnitt (Vorprüfung) der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
Mai bis November 2000	Wissenschaftliche Abschlußarbeit (Prof. Dr. Dr. M. Metzler, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe (TH))
14. November 2000	Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
14. November 2000	Abschluß als Diplom-Lebensmittelchemiker an der Universität Karlsruhe (TH)
seit Mai 2001	Wiss. Angestellter am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe (TH)