universität wien

DISSERTATION

Titel der Dissertation

„Charakterisierung genotoxischer Impactkomponenten komplexer Alternariaextrakte“

Verfasser

Diplom-Lebensmittelchemiker Christoph Reinhold Henri Schwarz

angestrebter akademischer Grad

Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A 091 419
Dissertationsgebiet lt. Studienblatt:	Chemie
Betreuerin / Betreuer:	Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

Ich danke Fr. Prof. Dr. D. Marko für die Überlassung des interessanten Themas sowie die wertvollen Hilfestellungen für das Gelingen dieser Arbeit.
Des Weiteren danke ich den Gutachtern Hr. Prof. Dr. Pablo Steinberg und Hr. Univ.-Prof. Dr. Christian Friedrich Wilhelm Becker für die Übernahme der Beurteilung meiner Arbeit.

Inhalt

1 Einleitung 1

2 Theoretische Grundlagen 3

2.1 Schimmelpilze 3

2.2 Mykotoxine 4

2.3 Die Gattung *Alternaria* 6

2.3.1 Schimmelpilze der Gattung Alternaria 6

2.3.2 Mykotoxine der Alternaria spp. 7

2.4 Toxizität von Alternariaextrakten und -toxinen 11

2.4.1 Akute Toxizität der Alternariatoxine 11

2.4.2 Reproduktionstoxische Effekte der Alternariatoxine 11

2.4.3 Mutagene Effekte der Alternariatoxine 12

2.4.4 Genotoxizität in Säugerzellen 12

2.4.5 Karzinogene Wirkung der Alternariatoxine 13

2.5 Wachstum und Toxinbildung von *Alternaria* 14

2.6 Vergleichbarkeit der Studien mit Alternariaextrakten 14

2.7 DNA-Integrität 15

2.7.1 Reparatur von DNA-Läsionen 16

2.7.2 Oxidativer Stress 17

2.7.3 Redox-Cycling 18

2.7.4 Oxidative DNA-Schäden und Endonukleasen 19

2.7.5 Das FPG- (Mut M-) Protein 20

2.7.6 Glutathion 23

2.7.7 Glutathiontransferasen (GSTs) 23

2.7.8 Nrf2/ARE-abhängige Genexpression 24

2.7.9 Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden 25

3 Zielsetzung der Arbeit 29

4 Ergebnisse und Diskussion 31

4.1 Kultivierung der Alternariastämme 31
4.1.1 Vorkultur auf V8-Gemüsesaft-Agar 31
4.1.2 Sporenbildung und Inokulation der Kulturkolben 31
4.1.3 Kultivierung in Reismehlsuspension 32
4.1.4 Kultivierung auf autoklaviertem Reis 33
4.2 Analyse der Alternariatoxine mittels HPLC 34
4.3 Toxinextrakte der Reiskulturen 37
4.3.1 Zeitverlauf der Toxinbildung auf autoklaviertem Reis. 37
4.3.2 Reproduzierbarkeit der Toxinbildung auf autoklaviertem Reis 39
4.4 Genotoxizität der komplexen Extrakte 41
4.4.1 DNA-Strangbrüche durch AOH-haltigen DSM 12633-Extrakt 42
4.4.2 DNA-Strangbrüche durch TeA-haltigen DSM 1102-Extrakt 45
4.4.3 Kein Synergismus zwischen AOH, AME und TeA 48
4.5 Genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung 49
4.5.1 Fraktionierung des A. alternata DSM 12633-Extraktes 50
4.5.2 Detailliertere Fraktionierung der Fraktionen 4 und 5 52
4.6 Isolierung und Identifizierung der unbekannten Peaks 55
4.6.1 Vorreinigung des Rohextraktes mittels Festphasenextraktion (SPE) 56
4.6.2 Präparation der unbekannten Peaks mittels semipräparativer HPLC 57
4.7 Identifikation von Peak 4.1 als Altertoxin II 59
4.7.1 UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.1 bzw. ATX II 59
4.7.2 Ermittlung der akkuraten Masse mittels UHR-ESI-TOF-MS 61
4.7.3 Identifikation mittels NMR 63
4.8 Zuordnung von Peak 4.2 zu Stemphyltoxin III 65
4.9 Mögliche Zuordnung von Peak 5.2 zu Altertoxin III 69
4.10 Präparation größerer Toxinmengen 71
4.10.1 Vorreinigung des komplexen Extraktes durch Ausschütteln 71
4.10.2 HPLC-Präparation 73
4.11 ATX II- und Stemphyltoxin III-Gehalte der Reisextrakte 77
4.12 Screening der Toxinbildung auf verschiedenen Agars 79
4.13 Toxikologische Charakterisierung von ATX II 83

4.13.1 Einfluss von ATX II auf die Zellviabilität ... 83
4.13.2 Genotoxizität von ATX II ... 85
4.13.3 Genotoxizität von ATX II bei 24 h-Inkubation ... 87
4.13.4 Genotoxizität von vermutlichem Stemphyltoxin III ... 88
4.13.5 Genotoxizität von ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III im Extrakt ... 89
4.13.6 Induktion FPG-sensitiver Stellen ... 91
4.13.7 Oxidativer Stress durch ATX II ... 93
4.13.8 Einfluss von ATX II auf die Zellproliferation ... 100
4.13.9 Untersuchung zur Apoptoseinduktion ... 101
4.13.10 Einfluss von ATX II auf die Zellzyklusverteilung ... 103

4.14 Bedeutung der Ergebnisse für Lebensmittel ... 106

5 Zusammenfassung ... 109

6 Material und Methoden ... 113

6.1 Die humane Zelllinie HT29 ... 113
6.1.1 Kultivierung und Lagerung ... 113
6.1.2 In Kulturnahme von Zellstocks ... 113
6.1.3 Herstellen von Zellstocks ... 114
6.1.4 Medienwechsel ... 114
6.1.5 Passagieren der Zellen ... 114
6.1.6 Zellzahlbestimmung und Viabilität ... 115

6.2 Kultivierung der Schimmelpilze ... 117
6.2.1 Verwendete Schimmelpilzstämme ... 117
6.2.2 Reaktivierung der gefriergetrockneten Myzelien ... 118
6.2.3 Herstellen von Sporenstocks zur Lagerung ... 119
6.2.4 Kultivierung auf Reis ... 119
6.2.5 Kultivierung auf Agar ... 120

6.3 Extraktion der Kulturen ... 122

6.4 HPLC-Untersuchung der Extrakte ... 122
6.4.1 Herstellen der Standards ... 122
6.4.2 HPLC-Trennprogramm ... 123
6.4.3 Detektion und Quantifizierung ... 123

6.5 Comet-Assay 125
6.6 Sulforhodamin B (SRB)-Assay 130
6.7 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay 131
6.8 Genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung 133
6.9 Semipräparative HPLC 134
6.9.1 Vorreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE) 134
6.9.2 Vorreinigung mittels Extraktion 136
6.9.3 HPLC-Trennung der Toxine 137
6.10 Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes (tGSH) 140
6.11 Untersuchung der Gentranskription (Realtime PCR) 145
6.12 Apoptoseinduktion (Cell Death Detection ELISA^{PLUS}) 150
6.13 Untersuchung des Zellzyklus 152
6.14 Materialverzeichnis 155
7 Literaturverzeichnis 163
8 Abstracts 172
8.1 Abstract Deutsch 172
8.2 Abstract Englisch 172
9 Formeln 174
10 Lebenslauf 176
11 Dank 181

1 Einleitung

Schimmelpilze kommen ubiquitär vor. Einige Arten werden seit Jahrhunderten in der Nahrungsmittelproduktion genutzt, beispielsweise als "Edelschimmel" in der Käseherstellung. Schimmel als Verderbniserreger verursachen hingegen große wirtschaftliche Schäden bei der Nahrungsmittelproduktion. Nach Schätzungen der *Food and Agriculture Organisation* (FAO) sind 25% der weltweit produzierten Nahrungsmittel durch Schimmelpilze bzw. Mykotoxine belastet. Der daraus resultierende, jährliche Gesamtverlust wird auf 1000 Mio. Tonnen an Nahrungsmitteln geschätzt. Als Mykotoxine werden Sekundärmetabolite einiger Schimmel bezeichnet, die schädliche Wirkungen für Mensch und Tier zeigen. Die toxischen Wirkungen können vielfältig sein. So sind beispielsweise karzinogene, hepatotoxische, nephrotoxische, neurotoxische und immunosuppressive Effekte von Mykotoxinen bekannt. Im Gegensatz zu vielen Bakterientoxinen sind Mykotoxine meist keine Peptide sondern "small molecules", lösen daher keine direkte Immunreaktion aus und sind vielfach hitzestabil, sodass sie auch in verarbeiteten Lebensmitteln gefunden werden können. Obwohl über 400 Mykotoxine bekannt sind, ist nur etwa ein Dutzend durch nationale oder europäische Gesetzgebung reguliert, insbesondere die Aflatoxine, Ergotalkaloide, Ochratoxin A, Deoxynivalenol, T-2 und HT-2, Patulin und Zearalenon.

Vertreter der Gattung *Alternaria* zählen vermutlich zu den zahlenmäßig häufigsten Schimmelpilzen beim Verderb von Lebensmitteln, da sie in allen Klimazonen vorkommen und selbst bei niedrigen Temperaturen noch wachsen und Toxine bilden können. Es wird seit langem ein möglicher Zusammenhang zwischen einer stark erhöhten Inzidenz an Speiseröhrenkrebs und hoher Alternariabelastung von Getreide in der chinesischen Linxian-Provinz diskutiert (Liu et al. 1992). Für die hauptsächlich durch *Alternaria* gebildeten Toxine Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME), Altenuen (ALT), Tenuazonsäure (TeA) und Altertoxin I (ATX I) wurden verschiedene, toxische Wirkungen beschrieben. AOH und AME zeigen demnach DNA-strangbrechende sowie mutagene Wirkung in verschiedenen *in vitro* Testsystemen. Es existieren nur wenige Literaturdaten zu möglichen reproduktionstoxischen Effekten durch AOH oder AME, die teilweise uneindeutig sind und starke Speziesabhängigkeit zeigen. TeA zeigt keinerlei mutagene Effekte in verschiedenen Bakterienstämmen. Zytotoxische Effekte gegenüber unterschiedlichen Zelllilien sind für die ATX I, ATX II, ATX III und TeA bekannt. Akut toxische Effekte wurden für AOH, AME, ALT, TeA, ATX I und ATX II in Mäusen, Ratten, Hühnerembryos und Salinenlarven beschrieben. Die LD_{50} -Werte liegen

dabei jedoch meist im Bereich von 100 - 200 mg/kg KG bzw. darüber, was einer geringen akuten Toxizität dieser Toxine entspricht. Ebenso sind die beschriebene Mutagenität und DNA-strangbrechende Wirkung von AOH und AME *in vitro* vergleichsweise gering.

Im Rahmen einer Stellungnahme der europäischen Lebensmittelsicherheitsbehörde EFSA im Jahr 2011 wurde eine Bewertung möglicher Gesundheitsrisiken durch Alternariatoxine durchgeführt. Die bisher verfügbaren Daten zum Vorkommen der Toxine AOH, AME, TeA und Tentoxin in Lebensmitteln wurden als ausreichend angesehen, um das TTC-Konzept ("threshold of toxicological concern") zur Anwendung zu bringen. Demnach liegt die abgeschätzte, chronische Exposition gegenüber TeA und Tentoxin unterhalb des relevanten TTC-Wertes; ein Gesundheitsrisiko durch diese Toxine in der Nahrung ist folglich unwahrscheinlich. Die chronische Exposition gegenüber AOH und AME übersteigt jedoch den TTC-Wert und weist auf die Notwendigkeit weiterer, toxikologischer Daten zu diesen Toxinen hin (CONTAM 2011). Darüber hinaus wird auf die erforderliche Erweiterung der Datenlage, insbesondere hinsichtlich möglicher Genotoxizität aller Alternariatoxine hingewiesen.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt daher auf der genotoxischen Untersuchung von Alternariaextrakten und soll zur Erweiterung der toxikologischen Erkenntnisse um *Alternaria spp.* und deren Toxine beitragen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Schimmelpilze

Unter dem Begriff Schimmelpilz wird eine systematisch heterogene Gruppe von filamentösen Pilzen bezeichnet, die hauptsächlich den taxonomischen Gruppen der Schlauchpilze (*Ascomyceta*) und Jochpilze (*Zygomyceta*) zugerechnet werden (Sitte 2002; Barkai-Golan 2008). Die meisten Vertreter der Schimmelpilze leben saprophytisch bzw. saprobiontisch, nutzen also totes, organisches Material als Nahrungsquelle und sorgen durch dessen Abbau für einen geschlossenen Stoffkreislauf im Ökosystem. Einigen Schimmelpilzen kommt eine negative Bedeutung für den Menschen zu, beispielsweise bei Mykosen, die einen direkten Befall eines menschlichen oder tierischen Organismus durch einen Schimmelpilz darstellen (z.B. Aspergillose der Lunge durch *Aspergillus fumigatus*). Schimmelpilzbefall von Gebäuden, aber auch Klimaanlagen wird mit Allergieentstehung und Asthma in Verbindung gebracht ("sick-building-syndrome"). Die Verfütterung von schimmelbelastetem Getreide kann weiterhin zu einer Reihe von Erkrankungen bei Nutztieren führen, wie z.B. dem Östrogensyndrom bei Schweinen, Futterverweigerung oder der massenhaften Erkrankung von Truthähnen, dem "Turkey X Disease" (Kück et al. 2009; Berger und Rapp 2011). Einigen Schimmelpilzen kommt bei Nahrungsmitteln auch positive Bedeutung zu, beispielsweise *Penicillium camemberti* und *P. roquefortii* für die Zubereitung von Weichkäse, *Aspergillus oryzae* bei der Produktion von Sojasoße sowie den Edelschimmeln die zur typischen Aromabildung bei traditioneller Salami eingesetzt werden.

2.2 Mykotoxine

Als Mykotoxine werden sekundäre Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen bezeichnet, die für Mensch oder Tier toxische Wirkung besitzen. Im Gegensatz zu Produkten des primären Stoffwechsels kommen diese sekundären Stoffwechselprodukte nicht in allen Organismen vor, sondern sind typisch für einzelne Arten. Da die beobachtete Giftwirkung abhängig vom verwendeten Testsystem sowie speziesabhängig stark schwanken kann, ist eine klare Einordnung als Toxin manchmal schwierig. Die Bezeichnungen der Mykotoxine sind meist der chemischen Struktur entlehnt oder beziehen sich auf Schimmelpilze oder Organismen, von denen sie typischerweise gebildet werden oder in denen sie entdeckt wurden. Beispiele hierfür sind Aflatoxin (gebildet von *Aspergillus flavus*), Zearalenon (entdeckt auf Maispflanzen *Zea mays*) oder Citrinin (entdeckt in "gelbem Reis"). Mykotoxine, deren Bildung typisch für bestimmte Schimmelpilzarten ist, werden häufig in Gruppen zusammengefasst, deren Namen sich von der Art herleitet, wie zum Beispiel Fusarientoxine, Aflatoxine oder Alternariatoxine.

Als bedeutsamste Mykotoxine für den Menschen werden meist die Aflatoxine (Afla), insbesondere Aflatoxin B_1 (AFB_1), Patulin, Ochratoxin A (OTA), Zearalenon (ZEA), T-2-Toxin (T-2), Deoxynivalenol (DON), die Fumonisine $B_{1\text{-}3}$, die Ergot-Alkloide sowie die Alternariatoxine Alternariol (AOH), dessen Monomethylether (AME) sowie Tenuazonsäure (TeA) genannt (Baltes und Matissek 2011).

Da viele Mykotoxine weitgehend hitzestabil sind, können sie bei der Lebensmittelherstellung aus befallenen Grundstoffen in das verarbeitete Lebensmittel übergehen, ohne dass äußere Anzeichen auf die Belastung hindeuten würden. Abhängig von der durch Verzehr aufgenommenen Toxinmenge stellen verarbeitete Lebensmittel aus mykotoxinbelasteten Grundstoffen daher ebenfalls ein mögliches Gesundheitsrisiko dar. Ein Beispiel ist die früher problematische Belastung von Brot und Getreideprodukten mit Ergotalkaloiden durch Verarbeitung von Getreide, das mit Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*) befallen war. Durch moderne Siebe und Ausleseverfahren der befallenen Körner in der Mühlentechnik ist dieses Problem allerdings weitgehend gelöst. Ebenso besteht bei manchen Toxinen die Gefahr des *carry-over*-Effekts, wenn Mykotoxine aus schimmelpilzbefallenen Futtermitteln sich nach der Verfütterung an Nutztiere in tierischen Produkten wiederfinden. Beispiele hierfür wären Aflatoxine in Milch (Fremy und Quillardet 1985) oder auch Ochratoxin A in Schweinefleisch (Pietri et al. 2011).

Klar davon abzugrenzen sind Vergiftungen durch Toxine von Ständerpilzen (*Basidiomyceta*), die nicht zu den Mykotoxinen gerechnet werden, wie zum Beispiel das Amanitin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*).

Ebenso abzugrenzen sind Krankheiten, die durch einen direkten Befall des Organismus durch einen entsprechenden Schimmelpilz verursacht werden. Sie werden als Mykosen bezeichnet und zeichnen sich dadurch aus, dass der Schimmelpilz an sich bzw. sein Wachstum das Krankheitsbild verursachen. Beispiele sind die Aspergillose der Lunge oder auch Dermatomykosen wie Alternariose durch Alternariabefall der Haut. Erkrankungen, die durch die Aufnahme von Mykotoxinen ausgelöst werden, werden als Mykotoxikosen bezeichnet. Ihnen kommt im Zusammenhang mit Lebensmitteln die größte Bedeutung zu.

Welche Bedeutung bzw. Nutzen den Mykotoxinen für den Schimmelpilz zukommt ist oft nicht zu klären. Das von manchen *Alternaria spp.* gebildete Tentoxin (TEN) ist allerdings als Phytotoxin beschrieben worden (Ramm et al. 1994), durch dessen Bildung *Alternaria* seine Wirtspflanze am Ort des Befalls verstärkt schädigen und dadurch seine eigene Ausbreitung erleichtern kann.

2.3 Die Gattung *Alternaria*

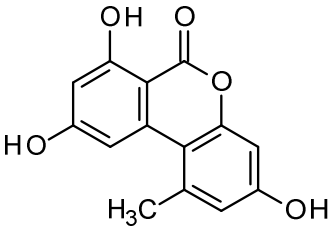
2.3.1 Schimmelpilze der Gattung *Alternaria*

Die Gattung *Alternaria* zählt zu den Fungi imperfecti. Oft gleichgesetzt mit Deuteromyceten fehlt bei dieser Gruppe von Pilzen die sexuelle Befruchtungsphase. Vertreter der Gattung *Alternaria* bilden folglich keinen Fruchtschlauch (*ascus*) aus, sondern vermehren sich vegetativ über die Bildung von Konidien (Konidiosporen). Die Gattung umfasst etwa 40 - 100 Arten, wobei die taxonomische Zuordnung oft schwierig ist (Barkai-Golan 2008; Ostry 2008). Als häufigster Vertreter gilt *A. alternata* (Fr.) Keissl., der vor allem auf Getreide sowie in Baustoffen, Gebäuden und Klimaanlagen gefunden wird. Das Vorkommen anderer wichtiger Vertreter ist teilweise wirtsspezifisch. *Alternaria solani* wird vor allem auf Nachtschattengewächsen wie Kartoffel, Tomate und Tabak gefunden, während *Alternaria brassicae* (Berk.) Sacc. vor allem Vertreter der Kreuzblütler (*Brassicaceae*) befällt und *A. citri* vor allem auf Zitrusfrüchten angetroffen wird. Hingegen ist *Alternaria tenuissima* nicht wirtsspezifisch und wird ubiquitär gefunden. Schimmelpilze der Art *Alternaria* bzw. ihre Toxine sind in vielen verschiedenen Lebensmitteln und Futtermitteln beschrieben worden, wie zum Beispiel in Tomaten (Hasan 1995; Andersen und Frisvad 2004), Oliven (Visconti et al. 1986; Logrieco et al. 1988), Getreide (Zhen et al. 1991; Li und Yoshizawa 2000b; Siegel et al. 2009), Hülsenfrüchten (Ostry et al. 2004), Äpfeln (Robiglio und Lopez 1995), Karotten (Solfrizzo et al. 2005), Beeren (Tournas und Katsoudas 2005), Raps (Vinas et al. 1994), Mais- und Grassilage (Müller 1991) sowie Baumaterial (Arenz et al. 2006). Ebenso ist daraus die globale Verbreitung von *Alternaria spp.* auf allen Kontinenten und in verschiedenen Klimazonen ersichtlich.

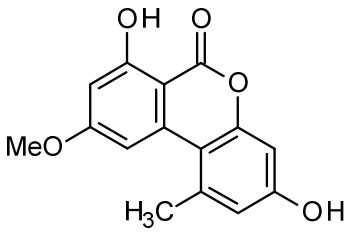
Während der für das Wachstum von *Alternaria* optimale Temperaturbereich 22 - 28 °C beträgt, ist Wachstum auch bei deutlich niedrigeren Temperaturen möglich. Die niedrigste Wachstumstemperatur von *Alternaria* wurde mit -3 °C ermittelt (Sommer 1985), weshalb *Alternaria spp.* eine wichtige Rolle beim Verderb kühlgelagerter Lebensmittel spielen. Da *Alternaria spp.* kaum in der Lage sind feste Fruchtschale zu durchdringen, erfolgt die Infektion üblicherweise an den Stellen der Früchte, die während der Ernte leicht beschädigt wurden (Barkai-Golan 2001). Da Tomaten bei einer Lagertemperatur unterhalb 7 °C dazu neigen Kälteschäden an der Epidermis zu entwickeln, ist die besondere Anfälligkeit für Alternariabefall bei gekühlten Tomaten besonders hoch (Barkai-Golan 2008).

2.3.2 Mykotoxine der *Alternaria spp.*

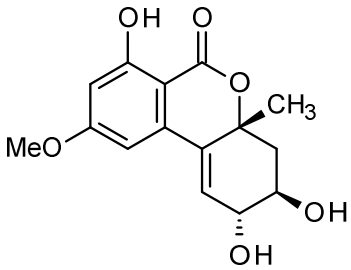
Es sind mehr als 120 Sekundärmetabolite bekannt, die von *Alternaria spp.* gebildet werden können. Während darunter viele als Phytotoxin wirken können, das die Wirtspflanze schädigt, scheinen nur etwa 30 Sekundärmetaboliten für Mensch und Tier als Mykotoxin relevant zu sein (Panigrahi 1997; Barkai-Golan 2008). Unter allen Toxinen der verschiedenen Substanzklassen werden im Allgemeinen fünf Verbindungen als die hauptsächlichen Alternariatoxine angesehen, nämlich die Benzopyronderivate Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Altenuen (ALT), das Tetramsäurederivat Tenuazonsäure (TeA) sowie das Perylenchinonderivat Altertoxin I (ATX I), deren Strukturen in Abbildung 2-1 dargestellt sind. Die Bildung dieser Toxine wurde bei *A. alternata, A. brassicae, A. tenuissima, A. citri, A. longipes* und *A. porri* beobachtet (Barkai-Golan 2008; Ostry 2008). Weiterhin wurde die Fähigkeit zur Bildung der Altertoxine II und III bei *A. tenuissima, A. mali, A. radicina* und *A. tomato* beschrieben (Bottalico und Logrieco 1998). Die Bildung von ATX I durch *Alternaria spp.* sowie die Kontamination von Lebensmitteln durch dieses Toxin ist bisher deutlich weniger untersucht (Ostry 2008; CONTAM 2011). Zu Bildung und Vorkommen der Altertoxine II und III sowie Stemphyltoxin III im Zusammenhang mit *Alternaria* existieren nur sehr wenige Literaturdaten. Die Benzopyronderivate AOH, AME und ALT werden auch als Polyketid-Toxine bezeichnet. Ihr Biosyntheseweg beginnt mit der Kondensation einer Acetyl-Coenzym-A-Einheit mit einer Malonyl-Coenzym-A-Einheit. Anschließend wird die Kette durch fünf weitere Kondensationen verlängert, und vermutlich durch eine anschließende Aldol- bzw. Claisen-Kondensation die Ringstruktur gebildet. Der AME wird durch Methylierung aus AOH gebildet, wobei S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylierungsmittel dient.



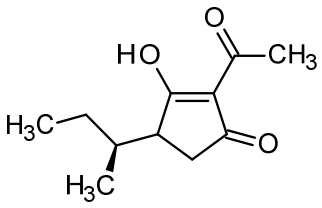
Alternariol
(AOH)



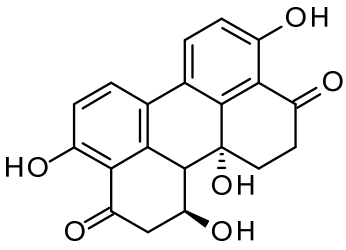
Alternariolmonomethylether
(AME)



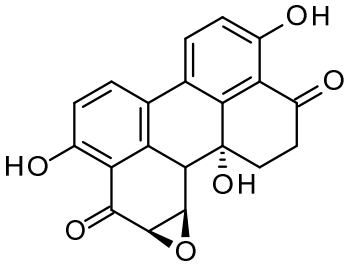
Altenuen
(ALT)



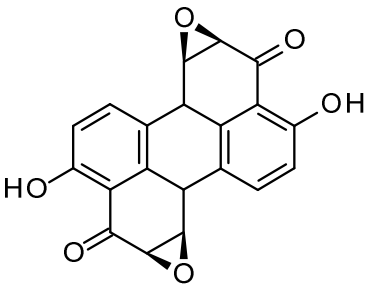
Tenuazonsäure
(TeA)



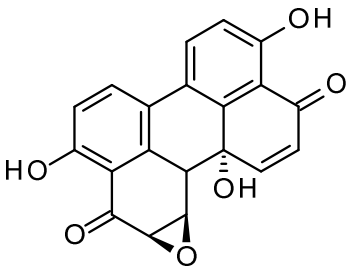
Altertoxin I
(ATX I)



Altertoxin II
(ATX II)



Altertoxin III
(ATX III)



Stemphyltoxin III

Abb. 2-1: Strukturformeln wichtiger Mykotoxine die von *Alternaria spp*. gebildet werden können. Hauptsächlich wurden bisher die Toxine AOH, AME, TeA und ALT untersucht, sowie teilweise ATX I. Zur Bildung der Altertoxine II und III sowie Stemphyltoxin III durch *Alternaria spp.* existieren nur sehr wenige Literaturdaten.

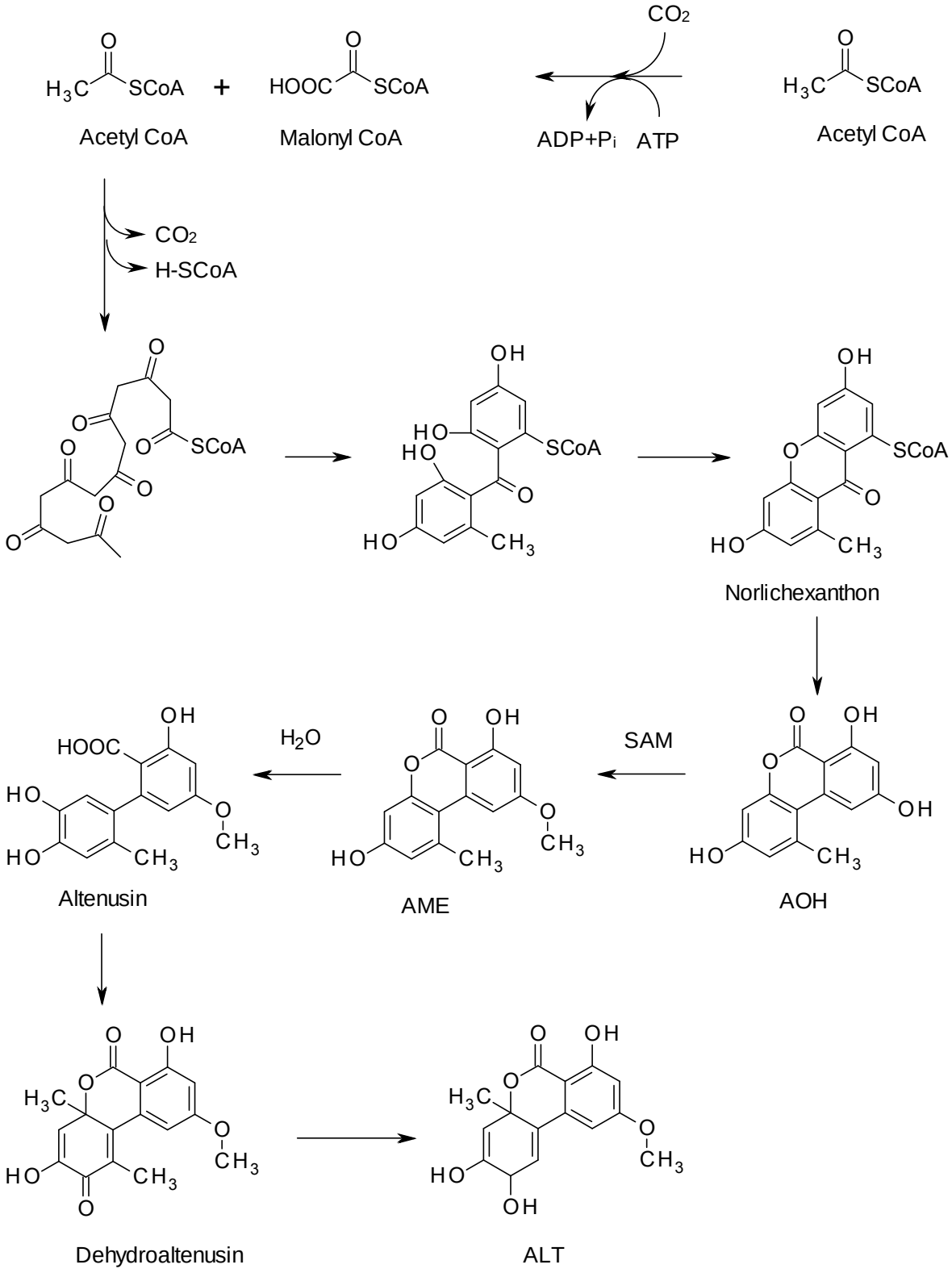
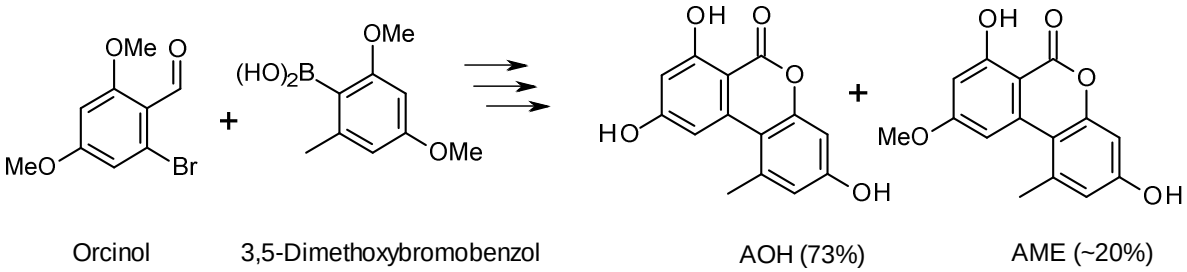


Abb. 2-2: Vermuteter Weg der Biosynthese der Benzopyronderivate AOH, AME und ALT (modifiziert nach Wittkowski (1984) und Stinson et al. (1986)).

Durch Öffnung des Lactonringes am AME-Molekül entsteht Altenusin, das über weitere Oxidations- und Reduktionsschritte zum Altenuen weitersynthetisiert werden kann. Der vermutete Biosyntheseweg ist in Abbildung 2-2 dargestellt (Wittkowski 1984; Stinson et al. 1986). Eine Methode zur Totalsynthese von AOH und AME, ausgehend von Orcinol und 3,5-Dimethoxybromobenzol wurde von Koch et al. (2005) beschrieben (Abbildung 2-3). Ebenso ist eine Methode zur Totalsynthese von Altenuen von Altemöller et al. (2006) publiziert worden, die von Chinasäure und acetalgeschützer Phloroglucinsäure ausgeht.



Orcinol 3,5-Dimethoxybromobenzol AOH (73%) AME (~20%)

Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Totalsynthese von AME und AOH, ausgehend von Orcinol und 3,5-Dimethoxybromobenzol (modifiziert nach Koch et al. (2005)).

2.4 Toxizität von Alternariaextrakten und -toxinen

2.4.1 Akute Toxizität der Alternariatoxine

Werden Ratten lebende Alternariakulturen im Futter verabreicht, ist dies in vielen Fällen tödlich. So führten 57 von insgesamt 85 Alternariakulturen zum Tod eines oder beider Tiere innerhalb von 10 Tagen (Meronuck et al. 1972). Intraperitoneale (*i.p.*) Injektion teilgereinigter Rohextrakte von Alternariakulturen (100 mg/kg KG an drei aufeinanderfolgenden Tagen) waren tödlich für Mäuse. Es sind nur wenige Tierversuchsdaten zur akuten Toxizität der reinen Mykotoxine vorhanden, doch scheint diese vergleichsweise gering zu sein. Die LD_{50}-Werte für AOH und AME liegen über 400 mg/kg KG, während bereits 50 mg/kg ALT zum Tod eines Drittels aller Mäuse führte. Die einmalige Gabe von 200 mg/kg KG (*i.p.*) ATX-I bzw. ATX-II waren ebenfalls für Mäuse tödlich (Pero et al. 1973). Die LD_{50}-Werte für TeA betragen, abhängig von der Verabreichungsform 125 mg/kg KG (*i.v.*) bis 225 mg/kg KG (*oral*) (Woodey und Chu 1992). Kein Hinweis auf akute Toxizität war bei Ratten zu beobachten, denen bis zu 24 mg AOH, 39 mg AME bzw. 10 mg TeA pro kg Futter verabreicht wurden (Sauer et al. 1978). In Hühnerembryo-Assay ermittelten Griffin und Chu (1983) für TeA einen LD_{50}-Wert von 548 mg/kg KG; AOH und AME zeigten hingegen selbst bei Injektionen von 1000 µg/Dottersack keinen Effekt bezüglich Überleben der Embryonen.

2.4.2 Reproduktionstoxische Effekte der Alternariatoxine

Pero et al. (1973) beobachteten reproduktionstoxische Effekte durch AOH bei Mäusen, wenn dem trächtigen Tier an drei Tagen je 100 mg/kg KG (*s.c.*) verabreicht wurden. Eine Verabreichung am 9. - 12. Schwangerschaftstag führte zu einem signifikanten Anstieg toter und resorbierter Föten, die Verabreichung am 13. - 16. Tag zu Missbildungen der Föten. Keinerlei reproduktionstoxische Effekte wurden von Griffin und Chu (1983) im Hühnerembryo-Assay beobachtet. Selbst die höchste eingesetzte Konzentration von 1000 µg/Ei AOH, 500 µg/Ei AME bzw. 1000 µg/Ei ALT hatte keinen Einfluss auf die Entwicklung der Tiere, wobei diese extrem hohen Dosen bereits durch die Löslichkeit der Toxine im Lösemittel DMSO begrenzt wurden. Zwar starben einige Hühnerembryos als Folge der akut toxischen Gaben an TeA (bis 1500 µg/Ei), die überlebenden Tiere zeigten jedoch keinerlei Entwicklungsstörungen. Der Einsatz noch höherer Konzentrationen war aufgrund der begrenzten Löslichkeit der Toxine, insbesondere von AME, nicht möglich.

2.4.3 Mutagene Effekte der Alternariatoxine

Mutagene Wirkungen von Alternariatoxinen wurden in verschiedenen bakteriellen Testsystemen beobachtet, wobei die Effekte stark abhängig von den verwendeten Zelllinien waren. Es wurden potent mutagene Effekte durch AOH und AME im *Bacillus subtilis* "rec assay" beschrieben (Kada et al. 1984). In *Salmonella typhimurium* waren die Effekte stark stammabhängig, sodass bei TA98 und TA100 keine oder nur sehr schwache Mutagenität durch AOH und AME beobachtet wurde (Scott und Stoltz 1980; Davis und Stack 1994), wohingegen AOH sowohl mit als auch ohne metabolische Aktivierung mutagen bei TA102 wirkte (Schrader et al. 2006). Tenuazonsäure zeigte keinerlei mutagene Wirkung gegenüber den getesteten Stämmen TA97, TA98, TA100 TA102 oder TA104 (Schrader et al. 2006).

Die stärksten mutagenen Effekte wurden für die Altertoxine I - III beschrieben, wobei ATX III die stärkste mutagene Wirkung zeigte (Stack und Prival 1986), in etwa 10% der Mutagenität des starken Hepatokarzinogens AFB_1. Stemphyltoxin III war ebenfalls mit und ohne metabolische Aktivierung mutagen in *S. typhimurium* TA98 und TA1537, wobei seine Mutagenität etwa im Bereich von ATX I lag (Davis und Stack 1991).

2.4.4 Genotoxizität in Säugerzellen.

Von Brugger et al. (2006) wurde eine konzentrationsabhängige Zunahme von Mutationen am TK- und HPRT-Lokus in kultivierten Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79) durch AOH beschrieben. Diese war ab einer Konzentration von 10 µM signifikant. Ebenso wurde die Induktion kinetochor-negativer Mikrokerne in V79-Zellen und kultivierten humanen Adenokarzinomzellen (Ishikawa) durch AOH beobachtet (Lehmann et al. 2006). In mehreren humanen Zelllinien zeigten sich AOH und AME als deutlich DNA-strangbrechend im Einzelzell-Gelelektrophorese-Assay (Comet-Assay). Die Erhöhung der DNA-Strangbruchrate war konzentrationsabhängig und signifikant ab 1 µM AOH bzw. 10 µM AME in HT29-Zellen, ab 10 µM in A431-Zellen (humane Epithelkarzinomzelllinie) und 50 µM in HCT116 (humane Kolorektalkarzinomzelllinie) (Fehr et al. 2009; Fehr et al. 2010). Eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate durch AOH und AME im mikromolaren Bereich wurde auch von Pfeiffer et al. (2007) in V79-Zellen, HT29-Zellen und HepG2-Zellen (humane Leberkarzinomzelllinie) nach einstündiger Inkubation beobachtet. Nach 24-stündiger Inkubation waren jedoch

deutlich weniger DNA-Strangbrüche bei HepG2 festzustellen, bei HT29 waren keine DNA-Strangbrüche mehr erkennbar. Da die Toxine nach 24 Stunden zu 75% bzw. gänzlich (HepG2 bzw. HT29) in glucuronidierter Form vorlagen wird angenommen, dass zelluläre Detoxifizierung durch Glucuronidierung für den beobachteten Rückgang der strangbrechenden Wirkung verantwortlich ist (Pfeiffer et al. 2007).

2.4.5 Karzinogene Wirkung der Alternariatoxine

In mehreren epidemiologischen Studien wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen starker Alternariakontamination von Getreide und einer deutlich erhöhten Inzidenz an Ösophaguskrebs nahegelegt (Dong et al. 1987; Liu et al. 1991; Liu et al. 1992; Li und Yoshizawa 2000a). In der chinesischen Linxian Provinz wurde eine Morbidität beobachtet, die zehnfach über dem Landesdurchschnitt liegt, während dort AOH-Mengen bis zu 731µg/kg Weizen gemessen wurden (Li und Yoshizawa 2000a). In einer Stellungnahme der EFSA (CONTAM 2011) zu möglichen Gesundheitsrisiken durch Alternariatoxine wird jedoch darauf hingewiesen, dass in den genannten Fällen neben *Alternaria spp.* weitere toxinbildende Schimmelpilze (wie z.B. *Penicillium cyclopidium, Fusarium moniliforme, Aspergillus nidulans* und *Aspergillus fumigatus*) auf den Getreideproben gefunden wurden (Liu et al. 1991; Zhen et al. 1991), sowie in den betroffenen Gebieten eine insgesamt höhere Belastung mit verschiedenen Schimmelpilzen vorlag, sodass ein direkter Zusammenhang zu *Alternaria* nicht ohne weiteres hergestellt werden kann.

Bei Mäusen, denen über 10 Monate im Trinkwasser 50 - 100 mg/kg KG AME bzw. 25 mg/kg KG TeA verabreicht wurden, konnten elektronenmikroskopisch präkarzinogene Veränderungen festgestellt werden (Yekeler et al. 2001). Ob die Ergebnisse dieser Studie jedoch ausreichen um die gezogenen Schlüsse ausreichend zu belegen, wird in der Stellungnahme der EFSA bezweifelt (CONTAM 2011), da insbesondere die beschriebenen, histopathologischen Läsionen des ösophagealen Gewebes anhand der vorhandenen Abbildungen nicht nachvollzogen werden konnten. Gleiches gilt mangels Abbildungen für die von Liu et al. (1992) beobachtete Tumorentwicklung in einer BALB/c Nacktmaus, der humanembryonales, ösophageales Gewebe implantiert wurde, dass zuvor *in vitro* mit AOH inkubiert wurde.

2.5 Wachstum und Toxinbildung von *Alternaria*

Wie bei allen Mikroorganismen unterliegen Wachstum und Toxinbildung bei *Alternaria spp.* verschiedenen Umwelteinflüssen, insbesondere dem Nährsubstrat, der Temperatur, der Feuchtigkeit (a_w-Wert) und dem pH-Wert, was sich bereits durch die Bevorzugung bestimmter Wirtspflanzen zeigt. Magan et al. (1984) haben mit verschiedenen, isolierten *A. alternata* Kulturen die stärkste Toxinbildung bei 25 °C und einem a_w-Wert von 0,98 beobachtet. Eine Erhöhung der Temperatur um nur 5 °C führte bereits zu einer Verringerung der AOH-, AME- und ALT-Bildung um 90 - 95% bei ansonsten identischen Kulturbedingungen. Ähnlich starke Rückgänge in der Toxinproduktion wurden bei einer Verringerung des a_w-Wertes von 0,98 auf 0,95 und 0,90 beobachtet.

Während die Exposition gegenüber Licht keinen erkennbaren Einfluss auf das Mycelwachstum von *Alternaria* zeigt, führt die Beleuchtung von Alternariakulturen zu starker Hemmung der AOH- und AME-Bildung (Soderhall et al. 1978). Durch Beleuchtung während der exponentiellen Wachstumsphase ließ sich die AOH- und AME-Bildung fast komplett unterdrücken, während Beleuchtung in der *lag*-Phase (1. - 2. Tag nach Inokulation) nicht zu einer Hemmung führte. Insbesondere der blaue Spektralanteil des Lichtes scheint für diesen Effekt verantwortlich zu sein. (Haggblom und Unestam 1979; Haggblom und Niehaus 1986). Die geringen Mengen an AOH und AME sind dabei auf eine Hemmung der Toxinbildung zurückzuführen und nicht etwa auf deren beschleunigten Abbau. Alternariol und AME, das den Kulturschalen zugesetzt wurde blieb in gleicher Menge erhalten und auch das Verhältnis AOH : AME blieb unverändert.

Das Ausmaß des Wachstums von *Alternaria* lässt insgesamt keine Rückschlüsse zur Menge der gebildeten Toxine zu.

2.6 Vergleichbarkeit der Studien mit Alternariaextrakten

Selbst unter identischen, kontrollierten Kulturbedingungen unterscheiden sich verschiedene Alternariastämme bzw. -isolate erheblich bezüglich Menge und Art der von ihnen gebildeten Toxine (Magan et al. 1984; Hasan 1995), oft um das hundert- bis tausendfache, während einige Stämme keinerlei Produktion der untersuchten Toxine zeigen. Da die publizierten Arbeiten in den meisten Fällen selbst gewonnene Alternariaisolate verwenden, ist ein direkter Vergleich der Toxinbildung zwischen den Studien meist nicht möglich. Zusätzlich können Umweltfaktoren während der Kultivierung, wie Nährmedium, pH-Wert, a_w-Wert, Lichtexposition, Kultur-

dauer und Temperatur starken Einfluss auf die Toxinbildung nehmen, sodass deutliche Abweichungen in der Toxinbildung als Folge geringfügig unterschiedlicher Umweltbedingungen möglich sind (s.o.). In der publizierten Literatur finden sich meist Studien zur Toxinbildung durch *Alternaria*, bei denen mehrere Replikate der Kultivierungen angesetzt und ausgewertet wurden. Wenn diese jedoch parallel angesetzt und kultiviert wurden, ist die Variabilität zwischen den Ansätzen vergleichsweise gering, da unkontrollierte, geringe Abweichungen der Umweltbedingungen parallel alle Replikate in gleichem Maße beeinflussen. Für Kulturansätze, die nicht parallel geführt wurden ist daher eine größere Variabilität durch geringfüge Unterschiede der Umweltfaktoren zu erwarten. Die Vergleichbarkeit toxikologischer Arbeiten mit komplexen Alternariaextrakten ist dadurch erschwert, dass Effekte durch Extraktkomponenten verursacht sein können, die nicht analytisch erfasst und quantifiziert wurden. Werden aus Schimmelpilzextrakt gewonnene Einzeltoxine untersucht, so besteht außerdem die Gefahr, das beobachtete Effekte möglicherweise durch Verunreinigungen verursacht oder überlagert werden, besonders im Hinblick auf die Komplexität der Schimmelpilzextrakte. Durch speziesabhängig unterschiedliche Empfindlichkeit der verwendeten Organismen gegenüber einzelnen Toxinen bei den verschiedenen Testsystemen (Tierart, humane bzw. Säugerzellinie, Bakterienzelllinie, etc.) wird die Vergleichbarkeit zusätzlich erschwert (Pero et al. 1973; Stack und Prival 1986; Boutin et al. 1989; Davis und Stack 1991; Pfeiffer et al. 2007).

2.7 DNA-Integrität

Für die Existenz eines jeden Organismus ist der ständige Aufbau, Umbau und Abbau von Biomolekülen von zentraler Bedeutung. Die Erbinformation, die in Form der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als langes Kettenmolekül vorliegt muss dazu ständig abgelesen, übersetzt und zu den entsprechenden Biomolekülen umgebaut werden. Im Zuge der Zellteilung wird außerdem die gesamte DNA einer Zelle identisch verdoppelt. Da fehlerhafte Erbinformation zu Funktionsverlust bzw. Fehlfunktion der gebildeten Biomoleküle führen können und außerdem bei der Zellteilung weitergegeben werden können, ist die Aufrechterhaltung der DNA-Integrität von größter Bedeutung um den Organismus vor schweren Schäden zu schützen. Durch die Notwendigkeit des ständigen Ablesens und Replizierens großer Mengen gespeicherter Erbinformation, sowie ständige, potentiell schädliche Umwelteinflüsse besteht stets ein Risiko an Erbgutschäden, denen der Organismus durch eine Reihe an Reparatur- und Begrenzungsmechanismen begegnet. Defizite bei der DNA-Reparatur und weiteren zellulären Reaktionen zur Aufrechterhaltung der DNA-Integrität werden mit einem erhöhten Risiko in Verbindung gebracht an verschiedenen Krebsarten zu erkranken oder sind typisch für eine

Reihe an Erbkrankheiten (McKinnon und Caldecott 2007; Maynard et al. 2009; Blagosklonny 2011)

2.7.1 Reparatur von DNA-Läsionen

Durch den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies und anderer elektrophiler Substanzen auf die DNA treten in jeder Zelle täglich zehntausende DNA-Läsionen auf (McKinnon und Caldecott 2007). Im Gegensatz zu Proteinen, Lipiden und RNA können schadhafte DNA-Moleküle nicht einfach durch neue, intakte Moleküle ersetzt werden, was die Reparatur von Schäden erforderlich macht, um die Anhäufung und Weitergabe von Erbgutfehlern zu verhindern. Die schnelle und effiziente Erkennung von DNA-Schäden ist daher von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genetischen Integrität der Zelle, was durch verschiedene Reparaturmechanismen bewerkstelligt wird (Zharkov 2008). Bei der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) werden beschädigte DNA-Basen entfernt und durch intakte Basen ersetzt (Zharkov 2008). Durch BER werden insbesondere DNA-Schäden wie 8-Oxoguanin (8-OxodG) und ringgeöffnete Formamidopyrimidine (FapydG, FapydA) repariert, welche die häufigsten DNA-Schäden infolge von oxidativem Stress sind (Maynard et al. 2009) (siehe auch Abschnitt 2.7.4). Bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) wird das gesamte schadhafte Nukleotid aus dem DNA-Strang entfernt und ersetzt (Hoeijmakers 1993). Durch die "Mismatch"-Reparatur (MMR) werden Fehlpaarungen von DNA-Basen im DNA-Doppelstrang behoben und somit das Risiko von Fehlern bei der Replikation und Transkription um mehrere Größenordnungen gesenkt (Jiricny 2006). Verglichen mit DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) oder DNA-Basenmodifikationen treten DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) weitaus seltener auf, stellen jedoch schwere DNA-Schäden dar und sind häufig die Folge einer Kollision der DNA-Replikationsgabel mit nicht reparierten DNA-Modifikationen, wie beispielsweise DNA-Addukten. Für den betroffenen DNA-Strang bedeutet ein DSB den Totalverlust der gesamten genetischen Information ab der Bruchstelle. Zur Reparatur von DSBs existieren in der Zelle hauptsächlich zwei Wege, nämlich die homologe Rekombination (HR) und das "non homologous end joining" (NHEJ). Bei der HR dient der homologe DNA-Strang eines Schwesterchromatids der DNA-Polymerase als Vorlage für die Replikation über die Bruchstelle hinaus, was die korrekte Ergänzung des gebrochenen Doppelstranges ermöglicht. Durch die Notwendigkeit einer identischen Vorlage ist die HR jedoch auf die späte S-Phase und G_2-Phase beschränkt (West 2003).

Tab. 2-1: Verschiedene Arten von DNA-Schäden und hauptsächliche Wege der Reparatur. (modifiziert nach Maynard et al. (2009)). PAKs: Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.

Ursache des DNA-Schadens	Art des Schadens	Weg der DNA-Reparatur
ROS, ionis. Strahlung, Alkylantien	Veränderte Base, abasische Stelle, Einzelstrangbrüche	BER
UV-Licht, cis-Platin, PAKs	Intra-DNA-Strang-Crosslinks, sperrige DNA-Addukte	NER
Ionis. Strahlung, Alkylantien, cis-Platin	Inter-DNA-Strang-Crosslinks, Doppelstrangbrüche	DSB-Reparatur (rekombinative Reparatur und Endverknüpfung)
Replikationsfehler	Basenfehlpaarungen, Einfügungen, Löschungen	MMR

Umgekehrt ist die Reparatur über den Weg des NHEJ zu jedem Zeitpunkt im Zellzyklus möglich und verknüpft gebrochene, oftmals nicht zusammengehörige, DNA-Stränge ohne dazu ein Schwesterchromatid zu benötigen (McKinnon und Caldecott 2007). Beide Wege der DSB-Reparatur sind für die Zelle notwendig, und selbst das fehleranfällige NHEJ ist für die Zelle vorteilhafter, als unabgeschlossene DNA-Stränge bestehen zu lassen (Wyman und Kanaar 2006). In Tabelle 2-1 sind häufige DNA-Schäden und deren Ursachen sowie die hauptsächlichen Reparaturwege für diese Schäden dargestellt.

2.7.2 Oxidativer Stress

Als oxidativer Stress wird das Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies und der antioxidativen Pufferkapazität der Zelle verstanden. Die wichtigsten Beispiele für prooxidative Moleküle stellen das Hydroxylradikal $OH^{\bullet}$, das Superoxidanion $O_2^{\bullet -}$ sowie das Wasserstoffperoxid H_2O_2 dar. Auf Seiten der antioxidativ wirksamen Moleküle sind besonders das zelluläre Antioxidans Glutathion, die Enzyme Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase, Superoxiddismutase, Katalase sowie α-Tocopherol, Lactat und Pyruvat zu nennen (Garrido et al. 2004). Im Zuge der oxidativen Phosphorylierung zur Gewinnung von ATP in den Mitochondrien aerober Organismen entsteht $O_2^{\bullet -}$ als Zwischenprodukt, sowie durch Reduktion von O_2 durch verschiedene Oxidasen wie NADPH-Oxidase, Xanthin-Oxidase und Cyclooxygena-

se (Evans et al. 2003). Die Bildung reaktiver Spezies durch Umweltfaktoren sowie eine verringerte antioxidative Pufferkapazität der Zelle sind weitere Hauptgründe für oxidativen Stress. Ein wichtiger Weg der oxidativen Schädigung von DNA, Proteinen und Lipiden sowie Entgiftungsreaktionen ist schematisch in Abb. 2-4 dargestellt. Neben $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ und H_2O_2 sind weitere reaktive Spezies beschrieben, die für die Entstehung von oxidativem Stress relevant sein können. Da es sich dabei um reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies handeln kann, wird neben oxidativem Stress teilweise auch von nitrosativem Stress gesprochen (Jakubowski und Bartosz 2000). In Tabelle 2-2 sind weitere reaktive, radikale sowie nicht radikale Spezies angegeben, die das Redoxgleichgewicht in Zellen beeinflussen können (Caimi et al. 2004; Halliwell 2006).

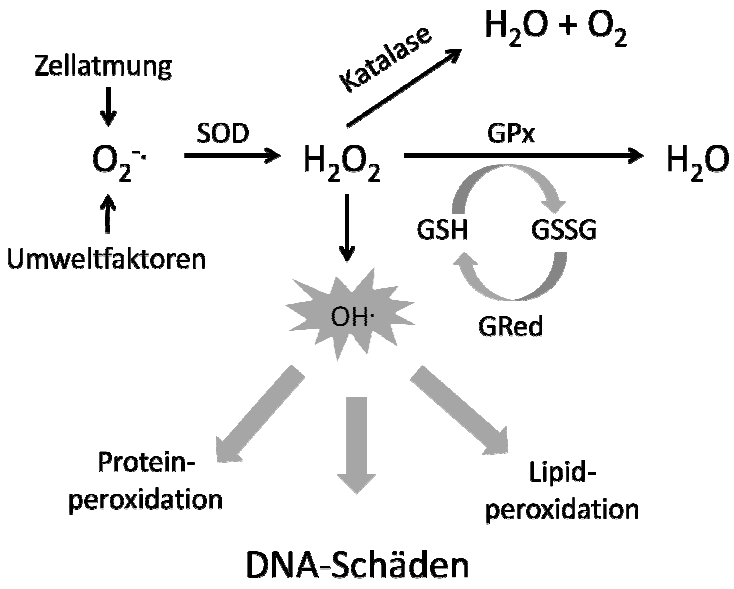


Abb. 2-4: Schematische Darstellung der oxidativen Schädigung sowie Entgiftungsreaktionen von ROS in der Zelle. SOD: Superoxiddismutase; GPx: Glutathionperoxidase; GRed: Glutathionreduktase. (modifiziert nach Guetens et al. (2002)).

2.7.3 Redox-Cycling

Bestimmte Moleküle sind in der Lage reaktive Spezies zu generieren, ohne dabei verbraucht zu werden. Insbesondere für Chinone und Chinonderivate ist dieser Prozess beschrieben, die in der Chinonform, der reduzierten Hydrochinonform und radikalischen Zwischenformen (Semichinonform) vorliegen können. Durch Übertragung eines Elektrons vom Semichinon auf molekularen Sauerstoff kann $O_2^{\bullet -}$ gebildet werden. Das dabei entstandene Chinon kann daraufhin durch Reduktase enzymatisch wieder zum Semichinon reduziert werden, und wie-

derum Superoxid bilden. Dieser Prozess wird als "Redox-Cycling" bezeichnet und kann zu erheblicher ROS-Bildung führen, da das Chinon dabei nicht verbraucht wird (Eisenbrand et al. 2005). Ein Beispiel für einen Redox-Cycler ist das synthetische Vitamin K_3 (Menadion), das sich daher als Positivkontrolle zur Induktion von ROS *in vitro* eignet.

Tabelle 2-2: Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (modifiziert nach Caimi et al. (2004) und Halliwell et al. (2006)).

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Radikale	Keine Radikale
Superoxid ($O_2^{\bullet -}$)	Wasserstoffperoxid (H_2O_2)
Hydroxyl ($OH^{\bullet}$)	Ozon (O_3)
Hydroperoxyl ($HO_2^{\bullet}$)	Singulett Sauerstoff ($\Delta g\ O_2$)
Peroxyl ($RO_2^{\bullet}$)	Organische Peroxide (ROOH)
Alkoxyl ($RO^{\bullet}$)	

Reaktive Stickstoffspezies (RNS)

Radikale	Keine Radikale
Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$)	Salpetrige Säure (HNO_2)
Stickstoffdioxid ($NO_2^{\bullet}$)	Nitrosylkation (NO^+)
	Nitrosylanion (NO^-)
	Distickstofftetroxid (N_2O_4)
	Distickstofftrioxid (N_2O_3)
	Peroxynitrit (ONOO)
	Nitrylkation (NO_2^+)

2.7.4 Oxidative DNA-Schäden und Endonukleasen

Die häufigste Form der DNA-Schädigung infolge von oxidativem Stress stellt das 8-Oxoguanin (8-OxodG) dar (Bjelland und Seeberg 2003), das durch Angriff eines Hydroxylradikals auf das C8-Atom des Guanins gebildet werden kann. Ebenfalls häufig tritt das 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FapydG) auf, das durch Ringöffnung aus der gleichen radikalischen Vorstufe entstehen kann wie das 8-OxodG (Song et al. 2007) (siehe Abbildung 2-5A).

Diese DNA-Basenmodifikationen besitzen mutagenes Potential, da 8-OxodG bei der DNA-Replikation Fehlpaarungen mit Adenin zulässt und somit zu einer G→T-Transversion führen kann (Kamiya 2003) während FapydG durch Fehlpaarungen A→G-, G→T- und G→C-Transversionen verursachen kann (Tudek 2003). Physiologisch treten etwa 1000 oxidative Basenmodifikationen in Form von 8-OxodG pro Zelle und Tag auf, die von den Reparatursystemen der BER überwiegend erkannt und repariert werden (Frosina 2004). Bei dieser Reparatur arbeiten vier Enzyme eng zusammen, nämlich eine Glykosylase, apurine/apyrimidine Endonuklease, Polymerase und Ligase. In humanen Zellen wird die Reparatur durch die humane Oxoguanin-DNA-glykosylase 1 (hOGG1) begonnen (Zhang et al. 2007), die die N-glykosidische Bindung zwischen geschädigter DNA-Base und Desoxyribose spaltet und die schadhafte DNA-Base entfernt. Anschließend wird an der neu entstandenen apurinen/apyrimidinen (AP) Stelle die Desoxyribose durch die Lyase ausgeschnitten, ein neues Nukleotid durch die Polymerase eingefügt und durch die Ligase mit den benachbarten Desoxyribosemolekülen 3'-5'-verbunden.

2.7.5 Das FPG- (Mut M-) Protein

Bei *Escherichia coli* wird die BER durch das Enzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG bzw. Mut M) begonnen, das die Entsprechung zum humanen hOGG1 darstellt. FPG ist ein globuläres Monomer, das sowohl DNA-Glykosylaseaktivität als auch AP-Lyaseaktivität besitzt (Zharkov et al. 1997). Die Nukleotidsequenz seines Gens besteht aus 809 Basenpaaren und kodiert für ein Polypeptid aus 269 Aminosäuren mit 30,2 kDa Molekulargewicht.

Es besitzt zwei Domänen, die durch eine Gelenkregion verbunden sind, wobei die C-terminale Domäne an die DNA bindet (Gilboa et al. 2002). Während hOGG1 sehr spezifisch 8-OxodG und FapydG erkennt und ausschneidet (Hu et al. 2005), ermöglicht die flexiblere Bindungstasche des FPG die Verarbeitung weiterer DNA-Modifikationen (Abb. 2-5B). Selbst ringgeöffnete Formamidopyrimidine, die als Folge von N7-Adduktbildung entstanden sind (Abb. 2-5C) können FPG als Substrat dienen, wobei diese Addukte aufgrund der sterischen Hinderung ein schlechteres Substrat darstellen (Coste et al. 2004). Bei 8-OxodG und FapydG verläuft die Erkennung und Spaltung der N-glykosidischen Bindung durch FPG etwa um den Faktor 80 schneller als durch hOGG1 (Frosina 2006).

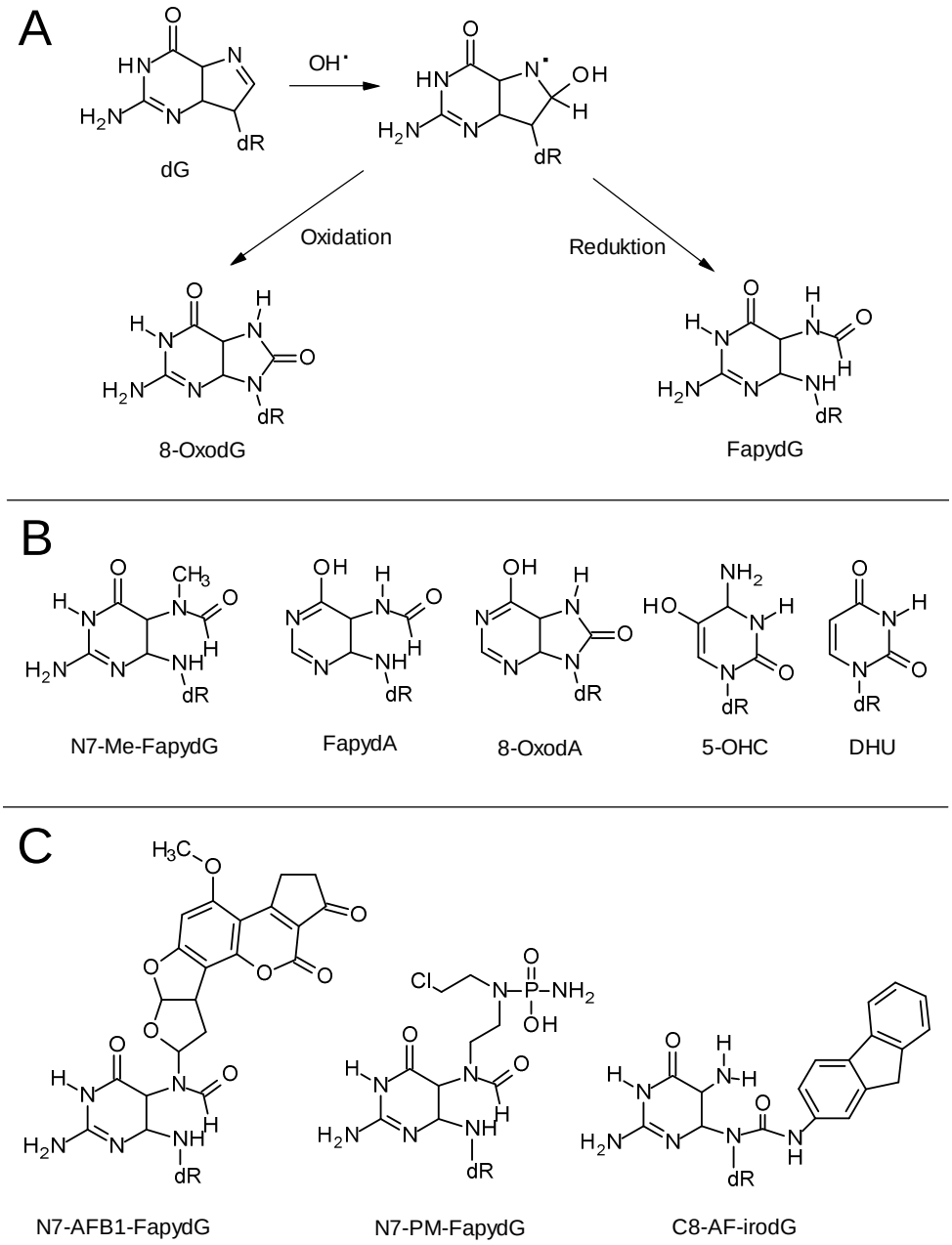


Abb. 2-5: (A) Hauptsächliche DNA-Basenschäden infolge von oxidativem Stress; (B) weniger häufige, oxidative Basenmodifikationen sowie (C) DNA-Basenaddukte die ebenfalls durch Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) erfasst werden. Abkürzungen: 8-OxodG: 8-Oxodeoxyguanin; FapydG: Guanin mit geöffnetem Imidazolring; N7-Me-FapydG: Guanin mit geöffnetem Imidazolring und Methylgruppe in N7-Position; FapydA: Adenin mit geöffnetem Imidazoring; 8-OxodA: 8-Oxodeoxyadenin; 5-OHC: 5-Hydroxycytosin; DHU: Dihydrouracil; N7-PM-FapydG: Guanin mit geöffnetem Imidazolring und Phosphoramid-Mustard-Gruppe in N7-Position; N7-AFB1-FapydG: Guanin mit geöffnetem Imidazolring und Aflatoxin B1-Gruppe in N7-Position; C8-AF-irodG: Derivat des N-(Deoxyguanin-8-yl)-2-aminofluorens mit geöffnetem Imidazolring (modifiziert nach Song et al. (2007) und Coste et al. (2004)).

Der Einsatz von FPG für *in vitro* Assays wie die Einzelzellelektrophorese (Comet-Assay) oder den alkalischen Entwindungsassay (AU-Assay) wird neben der breiten Erfassung von Basenmodifikationen und der hohen Reaktionsgeschwindigkeit durch die kombinierte Glykosylase- und Lyaseaktivität des Enzyms begünstigt. Geschädigte DNA-Basen werden dadurch effektiv zu Nukleotid-Lücken im DNA-Strang umgesetzt, die anschließend als erhöhte DNA-Strangbruchrate detektiert werden können.

2.7.6 Glutathion

Das thiolhaltige Pseudotripeptid Glutathion (GSH) spielt eine zentrale Rolle beim Schutz der Zellen, insbesondere vor oxidativer Schädigung. Es wird aus Glutaminsäure, Cystein und Glycin gebildet, wobei das Cystein über die γ-Carboxylgruppe der Glutaminsäure verbunden ist. GSH kommt eine wichtige Bedeutung bei vielen biochemischen und pharmakologischen Reaktionen zu, da das Molekül einerseits leicht oxidiert wird und andererseits schnell regeneriert werden kann (Dickinson und Forman 2002). Die Aufrechterhaltung der Redox-Homöostase ist wichtig für eine Reihe von zellulären Funktionen wie z.B. Enzymaktivierung, DNA-Synthese, Regulierung des Zellzyklus, Aktivierung der Transkription bestimmter Gene und Apoptose (Powis et al. 1995). Ebenso wird dadurch die Menge an ROS in der Zelle begrenzt, die zu oxidativen Schäden an Proteinen, Peptiden und der DNA führen können. Die reduzierte Thiolform GSH kann leicht oxidiert werden, wobei aus zwei oxidierten GSH-Molekülen das Glutathion-Disulfid GSSG gebildet wird. GSSG kann durch das Enzym Glutathionreduktase (GRed) wieder zur aktiven Thiolform reduziert werden. Physiologisch liegen in nicht gestressten Zellen etwa 99% GSH neben 1% GSSG vor, wobei der Gesamtglutathiongehalt zelltypabhängig etwa 0,5 - 10 mM beträgt (Arrigo 1999). Die Reduktion von H_2O_2 und Hydroperoxiden durch GSH ist nicht direkt möglich sondern wird durch das Enzym Glutathionperoxidase (GPx) katalysiert (Dickinson und Forman 2002). Ebenfalls ist die Reduktion von Alkylradikalen ($R^{\cdot}$) durch GSH unter Bildung von $O_2^{\bullet -}$ beschrieben, das anschließend durch SOD zu H_2O_2 und O_2 umgesetzt wird (Winterbourn 1993).

2.7.7 Glutathiontransferasen (GSTs)

Neben seiner antioxidativen Wirkung kommt GSH eine wichtige Funktion bei der Entgiftung von reaktiven Elektrophilen zu. Durch Konjugation mit GSH wird die Wahrscheinlichkeit gesenkt, dass es zu schädigenden Reaktionen mit Biomolekülen, insbesondere Proteinen und DNA kommt. Diese Konjugation wird durch eine spezialisierte Klasse von Enzymen katalysiert, den Glutathiontransferasen (Glutathion-S-Transferasen, GSTs). Diese werden in zwei Protein-Superfamilien eingeteilt, die löslichen GSTs und die "MAPEG" (membranassoziierten Proteine im Eicosanoid und Glutathionmetabolismus) (Josephy und Mannervik 2006). Die löslichen GSTs sind Dimere aus Untereinheiten von 25 kDa. Am N-Terminus der Untereinheit befindet sich eine α/β-Domäne, die die GSH-Bindungsstelle bildet ("G-site") sowie eine weitere, α-helicale Domäne, die den Hauptteil der "H-site" zur Bindung des elektrophilen Subs-

trates darstellt (Josephy 2010). Zusätzlich zur Entgiftung elektrophiler Fremdstoffe wie Umweltgiften, chemischen Karzinogenen und Chemotherapeutika inaktivieren die GSTs auch endogene α,β-ungesättigte Aldehyde, Chinone, Epoxide und Hydroperoxide, die infolge von oxidativem Stress als Sekundärmetabolite entstehen (Hayes et al. 2005)

2.7.8 Nrf2/ARE-abhängige Genexpression

Viele Gene, die mit Schutz- und Entgiftungsfunktionen der Zelle gegenüber Karzinogenen, ROS/RNS, Elektrophilen und weiteren toxischen Substanzen in Verbindung stehen, werden in ihrer Expression über das "antioxidant responsive element" (ARE) reguliert, das dem Gen als Bestandteil der Promotersequenz in der DNA voransteht. Das ARE besitzt eine Nukleotidsequenz der Form 5'-TGACnnnGC-3', wobei n für beliebige Nukleotide steht. Zum ersten Mal wurde das ARE in der 5'-seitig angrenzenden Region des GSTA2-Gens der Ratte beschrieben (Rushmore et al. 1990), wonach es bei vielen weiteren Genen entdeckt wurde die mit der Detoxifizierung von ROS und Karzinogenen assoziiert sind, wie der NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), Glutamat-Cysteinligase (GCL), Epoxidhydrolase, vielen Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und verschiedenen UDP-Glucuronosyltransferasen (Lee und Johnson 2004; Zhang und Gordon 2004). Erhöhungen der Transkriptionsraten ARE-regulierter Gene sind durch Diphenole, Chinone, Isothiocyanate, Peroxide, Mercaptane, Arsen(III)-Verbindungen und Schwermetalle als ARE-Aktivatoren beschrieben worden (Prestera et al. 1993).

Der Transkriptionsfaktor "nuclear factor erythroid 2–related factor 2" (Nrf2) besitzt zentrale Bedeutung für die Vermittlung von Signalen der ARE-Aktivatoren zur ARE-Sequenz der betreffenden Gene. Die Aktivität von Nrf2 wird dabei durch das "Kelch-like ECH-associated protein 1" (Keap1), reguliert, das am Actin des Zytoskeletts verankert ist. In nicht aktiviertem Zustand liegt Nrf2 an Keap1 gebunden vor, wodurch gleichzeitig sein proteosomaler Abbau beschleunigt wird. Bei oxidativem Stress löst sich Nrf2 vermehrt von Keap1 und kann in den Zellkern translozieren, wo es nach Dimerisierung mit Maf (“Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma protein”) an die ARE-Sequenz binden und eine starke Transkriptionsaktivierung der entsprechenden Gene bewirken kann (Li und Kong 2009; Kensler und Wakabayashi 2010). Der Nrf2/ARE Signalweg ist in Abb. 2-6 schematisch dargestellt. Eine signifikant erhöhte Transkriptionsrate ARE-regulierter Gene stellt folglich einen starken Hinweis für oxidativen Stress der Zelle dar.

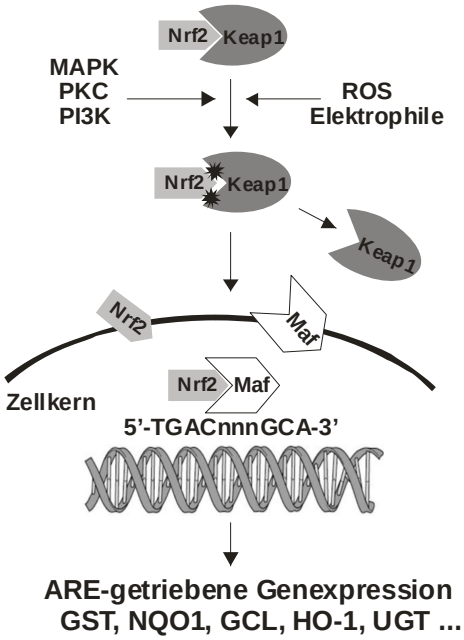


Abb. 2-6: Schematische Darstellung der ARE-aktivierten Genexpression durch Nrf2 (modifiziert nach Lee und Johnson (2004)).

2.7.9 Zelluläre Reaktionen auf DNA-Schäden

Zellen sind unvermeidbar einer Reihe DNA-schädigender Einflüssen ausgesetzt, die sowohl exogen als auch endogen sein können. Während UV-Licht und ionisierende Strahlung sowie karzinogene Umweltchemikalien wichtige exogene Faktoren ausmachen, stellen ROS aus der Atmungskette und methylierende Spezies wichtige endogene Ursachen für DNA-Schäden dar (Norbury und Hickson 2001).

2.7.9.1 Zellzyklusarrest

Zur Aufrechterhaltung der DNA-Integrität des Genoms ist die Reparatur von DNA-Schäden für proliferierende wie für nicht proliferierende Zellen wichtig. Im Falle proliferierender Zellen besteht jedoch zusätzlich das Risiko, dass noch nicht reparierte DNA-Schäden bei der DNA-Replikation zu fixierten Mutationen im Genom führen können, sowie zu DNA-Strangbrüchen (Norbury und Hickson 2001). Beispiele hierfür wären Punktmutationen durch nicht reparierte Basenfehlpaarungen, Leserasterverschiebungen als Folge nicht reparierter Basendeletionen oder DNA-Strangbrüche, die bei der Kollision der Replikationsgabel mit nicht reparierten DNA-Addukten auftreten. Indem der Zellzyklus durch Checkpoint-Mechanismen in der G_1-, G_2- oder S-Phase aufgehalten wird, kann die zusätzliche Zeit zur

notwendigen DNA-Reparatur genutzt werden. Im Zusammenhang mit DNA-Schäden befinden sich die hauptsächlichen Checkpoints im Zellzyklus vor Beginn der DNA-Synthese (G_1/S-Checkpoint) bzw. vor Eintritt in die Mitosephase (G_2/M-Checkpoint). G_1/S-Arreste werden über das Tumorsuppressorprotein p53 vermittelt, dessen Aktivität physiologisch sehr niedrig ist, aber bei DNA-Schäden stark ansteigt, und die Transkriptionsrate von p21, MDM-2 und Bax, sowie weiteren Genen erhöht. Werden in der G_1-Phase DNA-Schäden durch spezielle Proteinkinasen erkannt, insbesondere "ataxia-telangiectasia-mutated" (ATM) oder "ataxia and rad3 related" (ATR), so phosporylieren diese die Checkpointkinasen CHK1 und CHK2, die ihrerseits p53 phosphorylieren und dadurch dessen Aktivität erhöhen. Physiologisch wird die p53-Konzentration niedrig gehalten, indem p53 durch Bindung an MDM-2 einem erhöhten proteosomalen Abbau zugeführt wird. Liegen DNA-Schäden in der Zelle vor, so verringert die ATM-abhängige Phosphorylierung von MDM-2 zusätzlich die Interaktion mit p53 und somit dessen Abbau, was zu einer Stabilisierung der p53-Konzentration beiträgt (Kapoor und Lozano 1998). Die p53-abhängig erhöhte Expression des Inhibitors cyclinabhängiger Kinasen $p21^{WAF1}$ führt daraufhin zur Hemmung cyclinabhängiger Kinasen der G_1-Phase und dadurch zum G_1-Arrest der Zelle, der zelltypabhängig vorübergehend bis andauernd sein kann (Di Leonardo et al. 1994; Canman et al. 1998; Norbury und Hickson 2001). Die zentralen Vorgänge des G_1/S-Arrests sind in Abb. 2-7 schematisch dargestellt.

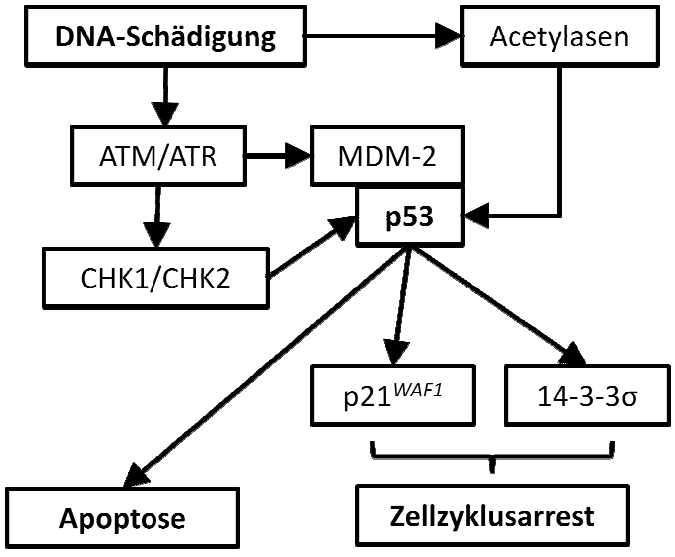


Abb. 2-7: Aktivierung von p53 nach DNA-Schädigung. Die durch DNA-Schäden aktivierten Proteinkinasen ATM/ATR und CHK1/CHK2 inhibieren den p53-Antagonisten MDM-2 und erhöhen die Transkriptionsaktivität von p53. Die Aktivierung von p53 kann sowohl zur Apoptose, als auch zum Zellzyklusarrest führen (modifiziert nach Norbury und Hickson (2001)).

Treten DNA-Schäden während der G_2-Phase auf, so ist ein p53-unabhängiger Zellzyklusarrest am G_2/M-Checkpoint möglich. Der Eintritt der Zelle in die Mitosephase wird dabei verhindert, indem die cyclinabhängige Kinase CDK1 inaktiv bleibt, einerseits durch inhibitorische Phosphorylierung, andererseits durch Abfangen von Teilen des CDK1-Cyclin B-Komplexes außerhalb des Zellkerns. Als Folge von DNA-Schäden werden CHK1 und CHK2 ATM-abhängig phosphoryliert, die ihrerseits Cdc25 phosphorylieren. Durch die Phosphorylierung wird Cdc25 in seiner Aktivität gehemmt während gleichzeitig seine Bindung zu 14-3-3-Proteinen erleichtert wird und Cdc25 daher außerhalb des Zellkernes verbleibt (Vermeulen et al. 2003). Obwohl G_2/M-Arreste unabhängig von p53 ablaufen können, führt eine erhöhte p53-Aktivität zu höherer Expression des 14-3-3σ-Proteins, das durch Bindung von Cyclin B dessen Akkumulation im Zellkern aktiv entgegenwirkt (Norbury und Hickson 2001; Vermeulen et al. 2003) und den Arrest somit verstärkt.

2.7.9.2 Apoptose

Während einzelligen Organismen als Reaktion auf Erbgutschäden nur die DNA-Reparatur zur Verfügung steht, besitzen mehrzellige Organismen zusätzlich die Möglichkeit des gezielten Zelluntergangs durch Apoptose, um eine Weitergabe geschädigter DNA zu verhindern und den Gesamtorganismus vor größerem Schaden zu schützen. Charakteristische Zeichen der Apoptose sind das Abrunden der Zellen, Einbuchtungen der Plasmamembran ("blebbing"), und Spaltung der DNA in Fragmente von 180 - 185 bp bzw. deren Vielfachen ("Apoptoseleiter") (Norbury und Hickson 2001). In Abbildung 2-8 sind zentrale Vorgänge der Apoptose aufgrund von DNA-Schädigung schematisch dargestellt. Dem Tumorsuppressorprotein p53 kommt eine wichtige Bedeutung für die Verbindung zwischen DNA-Schäden und Apoptose zu. Der Prozess der p53-vermittelten Apoptose in Säugerzellen konnte bisher jedoch keinem einzelnen, p53-regulierten Gen zugeordnet werden (Benchimol 2001).

Die frühen Ereignisse bei Apoptose aufgrund von DNA-Schäden ähneln denen beim Zellzyklusarrest bzw. überschneiden sich mit diesen. Die Aktivierung von ATM/ATR-Kinasen nach "Erkennung" von DNA-Schäden und die nachfolgende, aktivierende Phosphorylierung von p53 und inhibitorische Phosphorylierung seines Antagonisten MDM-2 sind sowohl beim Zellzyklusarrest als auch bei der Apoptose zu beobachten. In welchen Fällen und anhand welcher Kriterien die Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose fällt ist bislang nicht eindeutig geklärt. Das Ausmaß der DNA-Schäden, die Art der Schädigung, unterschiedliche Prädisposition verschiedener Zelltypen werden als ursächlich für die Entscheidung für oder wider

die Apoptose angesehen (Waldman et al. 1995; Canman et al. 1998; Norbury und Zhivotovsky 2004). Ebenso finden sich Hinweise, dass die verschiedenen möglichen Wege der p53-Aktivierung zu p53-Formen mit unterschiedlichen Aktivitäten führen können (Gottlieb und Oren 1998). Die Vermutung, dass Apoptose als Konsequenz gescheiterter DNA-Reparatur auftritt, ist zwar logisch, wurde jedoch nicht direkt experimentell belegt. Insbesondere sollte der aktive Prozess der Apoptose nicht mit dem Zelltod infolge starker DNA-Schädigung verwechselt werden, der ein passiver Vorgang ist und auch bei Hefen beobachtet werden kann, die nicht zur Apoptose fähig sind (Wang 2001).

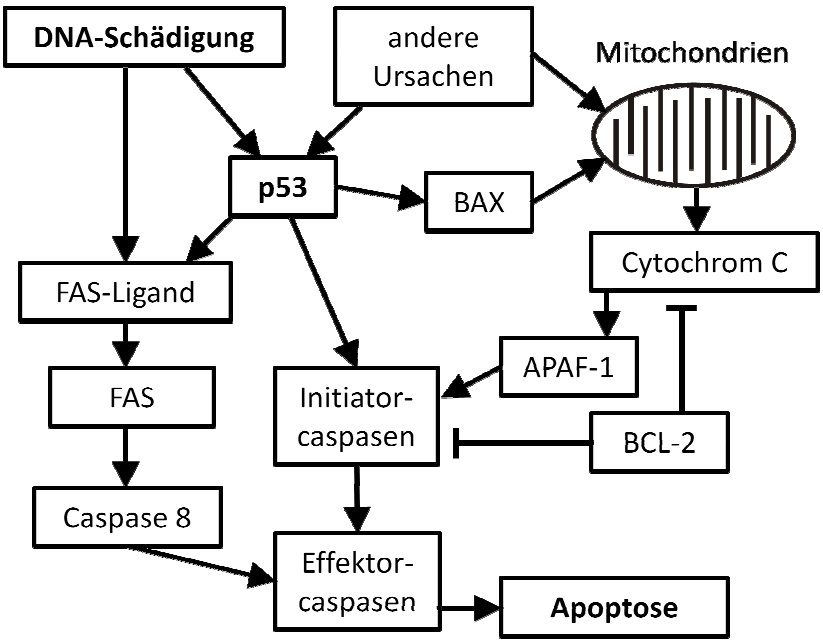


Abb. 2-8: Schematische Darstellung grundlegender Vorgänge der Apoptose nach DNA-Schädigung (modifiziert nach Norbury und Hickson (2001)).

3 Zielsetzung der Arbeit

Die Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* kommen ubiquitär vor und sind für manche Lebensmittel der hauptsächliche Grund für Verderb. Einige der Sekundärmetaboliten von *Alternaria spp.* besitzen toxikologische Relevanz für Menschen und Tiere. Insbesondere dem Mykotoxin Alternariol (AOH), seinem Monomethylether (AME) und der Tenuazonsäure (TeA) wurde bisher das größte Maß an wissenschaftlicher Aufmerksamkeit entgegengebracht. Für AOH und AME sind genotoxische Effekte in verschiedenen *in vitro*-Testsystemen beschrieben worden, insbesondere DNA-strangbrechende Wirkung in verschiedenen Human- und Säugerzelllinien, sowie mutagene Wirkung in Bakterien, Human- und Säugerzellen. Eigene Vorversuche mit komplexen, toxinhaltigen Extrakten kultivierter Alternariastämme deuteten auf ein genotoxisches Potential dieser Extrakte hin, das die Genotoxizität der enthaltenen "Haupttoxine" AOH, AME und TeA übersteigt. Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung mehrerer Alternariastämme, hinsichtlich Art und Menge der von ihnen gebildeten Toxine (typische "Toxinmuster"). Durch den direkten Vergleich zwischen der Genotoxizität verschiedener, komplexer Alternariaextrakte einerseits, und den reinen Toxinen andererseits, sollte untersucht werden, welche Bedeutung den "Haupttoxinen" AOH, AME und TeA für die Genotoxizität der komplexen Extrakte zukommt. Darüberhinaus sollten eventuelle weitere, genotoxische Inhaltsstoffe der Extrakte identifiziert werden. Es sollten nach Möglichkeit ausreichende Mengen dieser unbekannten Inhaltsstoffe in guter Reinheit aus den Extrakten isoliert werden, um einerseits eine Strukturaufklärung zu ermöglichen und darüber hinaus erste Experimente für eine toxikologische Charakterisierung dieser Toxine, insbesondere ihres genotoxischen Potentials zu erlauben. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen somit zur notwendigen Erweiterung der toxikologischen Datenlage der Alternariatoxine beitragen und als Anknüpfungspunkt für weitere Untersuchungen dienen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultivierung der Alternariastämme

4.1.1 Vorkultur auf V8-Gemüsesaft-Agar

Da alle von der DSMZ bezogenen Alternariastämme als getrocknete Mycelpellets geliefert wurden, war eine Vorkultivierung nötig. Diese wurde weitestgehend nach Empfehlung der DSMZ durchgeführt. Es wurde für alle Stämme V8-Flüssigmedium für die Rehydratisierung der getrockneten Mycelien verwendet, sowie V8-Agar für die Primärkultivierung in Petrischalen. Dies entspricht für die Stämme *Alternaria alternata* DSM 1102, *A. alternata* DSM 62006 und *A. alternata* DSM 62010 auch der Empfehlung der DSMZ, während für *A. alternata* DSM 12633 Chaetomium-Medium bzw. -Agar und für *A. brassicicola* DSM 62008 Maismehl-Medium bzw. -Agar empfohlen werden. Die beiden letztgenannten Stämme zeigten jedoch auch auf V8-Medium bzw. -Agar gutes Wachstum entsprechend den anderen Stämmen, weshalb es für alle Stämme verwendet wurde. Bereits 48 Stunden nach Inokulierung war bei allen Stämmen bereits Mycelwachstum auf dem Agar zu erkennen, nach etwa einer Woche waren die Petrischalen voll bewachsen und erschienen braun bis schwarz. Die Oberfläche der Schalen war von einem Flaum aus Hyphen bedeckt, der bei *A. alternata* DSM 1102 und *A. alternata* DSM 62006 weißlich-hell war, bei *A. alternata* DSM 12633 und *A. brassicicola* DSM 62008 hingegen dunkler grau bis schwärzlich und bei *A. alternata* DSM 62010 dunkelbraun bis schwarz erschien.

4.1.2 Sporenbildung und Inokulation der Kulturkolben

Die verwendeten Alternariastämme zeigten deutlich unterschiedliche Neigung zur Sporenbildung. *Alternaria alternata* DSM 12633 und DSM 62010 zeigten starke Sporenbildung, sodass es möglich war bereits 14 Tage nach Inokulation mehrere Millionen Sporen von einer Petrischale (d=10 cm) zu spülen. Die Sporenbildung der übrigen verwendeten Stämme war weitaus schwächer ausgeprägt, wobei insbesondere *A. alternata* DSM 1102 sehr wenige Sporen bildete. Für die Inokulierung von autoklaviertem Reis in Erlenmeyerkolben erwies sich Sporensuspension außerdem nur als bedingt geeignet, weshalb hierzu mehrere Stückchen gut bewachsenen Agars von einer Petrischale verwendet wurden (siehe auch Absatz 4.1.4).

4.1.3 Kultivierung in Reismehlsuspension

Es wurde versucht, die Alternariastämme in einer Reismehlsuspension zu kultivieren. Eine Kultivierung in flüssigem Medium erleichtert wesentlich die Bearbeitung sowie die Probennahme, da sich Aliquote der Kulturkolben einfach und reproduzierbar als Volumenaliquote entnehmen lassen. Besonders im Hinblick auf eine Gewinnung größerer Extrakt- bzw. Toxinmengen war eine Submers-Kultivierung wünschenswert, da dies den Einsatz von Fermentern im (semi-) technischen Maßstab erlaubt hätte. Daher wurden exemplarisch Vorversuche mit den Stämmen *A. alternata* DSM 1102 und DSM 12633 mit Reismehlsuspension als Kulturmedium durchgeführt, da Reis als Kulturmedium eine hohe Ausbeute erwarten ließ (Burroughs et al. 1976). Neben Ansätzen in Erlenmeyerkolben als Standkultur wurden die gleichen Ansätze parallel als Schüttelkultur in Schikanen-Erlenmeyerkolben im Schüttelinkubator geführt, einerseits um so die Sedimentation des Reismehls zu verhindern, andererseits um eine verbesserte Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

Selbst drei Wochen nach Inokulation war für beide Stämme kaum Mycelwachstum erkennbar. Bei den Erlenmeyerkolben die als Standkultur angesetzt wurden war lediglich im Bereich der Flüssigkeitsoberfläche am Rand des Erlenmeyerkolbens ein sehr geringes Mycelwachstum erkennbar. Die Schikanen-Erlenmeyerkolben der Schüttelkultur, die analog angesetzt, aber mit 80 RPM im Schüttelinkubator bewegt wurden zeigten ebenfalls lediglich im oberen Bereich der Benetzungszone ein geringes Schimmelwachstum. Zusätzlich enthielten die Kolben aus dem Schüttelinkubator einige wenige dunkle Kügelchen von ca. 2 - 3 mm Durchmesser. Wahrscheinlich sind diese durch die mechanische Ablösung von Teilchen des Schimmelrasens aus dem oberen Benetzungsbereich durch die ständige Bewegung des Mediums entstanden.

Keine der Proben die von den Kulturflaschen genommen wurden zeigte bei der HPLC-Analyse messbare Mengen an AOH, AME, ALT oder TA, weder bei den Erlenmeyerkolben der Stand-, noch der Schüttelkultur. Da nur an der Glaswand im Bereich der Grenzfläche Mycelwachstum beobachtet werden konnte lag die Vermutung nahe, dass direkter Kontakt zur Atmosphäre ein wichtiger Faktor für gutes Wachstum und Toxinbildung der untersuchten *A. alternata* Stämme DSM 1102 und DSM 12633 sein könnte. Die Form der Submers-Kultivierung wurde daher nicht weiter verfolgt.

4.1.4 Kultivierung auf autoklaviertem Reis

Im Gegensatz zur Submerskultivierung zeigten alle untersuchten Stämme auf feuchtem, autoklavierten Reis gutes Wachstum. Die Kultivierung wurde soweit wie möglich in der Dunkelheit durchgeführt, um hemmende Einflüsse von Licht auf die Toxinproduktion so gering wie möglich zu halten (Haggblom und Niehaus 1986). Zur Inokulation der Erlenmeyerkolben (230 g autoklavierter, feuchter Reis in 1 l Erlenmeyerkolben, verschlossen mit Zellstoffstopfen) erwies sich Sporensuspension als nur bedingt geeignet. Während Sporensuspensionen von *A. alternata* DSM 12633 oder DSM 62010 zuverlässig auskeimten und 48 Stunden nach Inokulation deutlich sichtbaren Bewuchs des Reises zeigten, war in einigen Fällen ausbleibendes bzw. verzögertes Wachstum bei einzelnen Kulturkolben zu beobachten, die mit Sporensuspension von *A. alternata* DSM 1102 angeimpft worden waren. Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurden die Erlenmeyerkolben mit autoklaviertem Reis daher mit jeweils sieben, rund ausgestochenen Stücken V8-Agar (d = 7 mm) aus dem Wachstumsbereich einer eigens dafür vorkultivierten Petrischale beimpft. Gleichmäßiges Wachstum wurde durch gründliches Schütteln der Kolben gewährleistet und durch tägliches Schütteln weiterhin der Bildung lokaler Schimmelnester entgegengewirkt. Etwa 1-2 Tage nach Beimpfen des Reises mit Stückchen aktiv wachsender Agarkultur war bei allen Stämmen beginnendes Schimmelwachstum mit bloßem Auge erkennbar. Etwa vier bis fünf Tagen nach Inokulation erschienen alle Reiskörner der jeweiligen Kolben gleichmäßig bewachsen, wobei sich die Farbe des bewachsenen Reises bis zum Ende der zweiten Woche von beige-grau hin zu dunkel braun-schwarz veränderte (Abb. 4-1). Das im Vergleich zur Submerskultur sehr starke Wachstum bestärkte die Vermutung, dass eine Belüftung des Mycels für dessen Wachstum essentiell ist.

Auch bei der Kultivierung auf Reis fielen besonders *A. alternata* DSM 12633 und DSM 62010 durch deutliche Sporenbildung auf, während *A. alternata* DSM 1102 auch hier sehr wenige Sporen bildete.

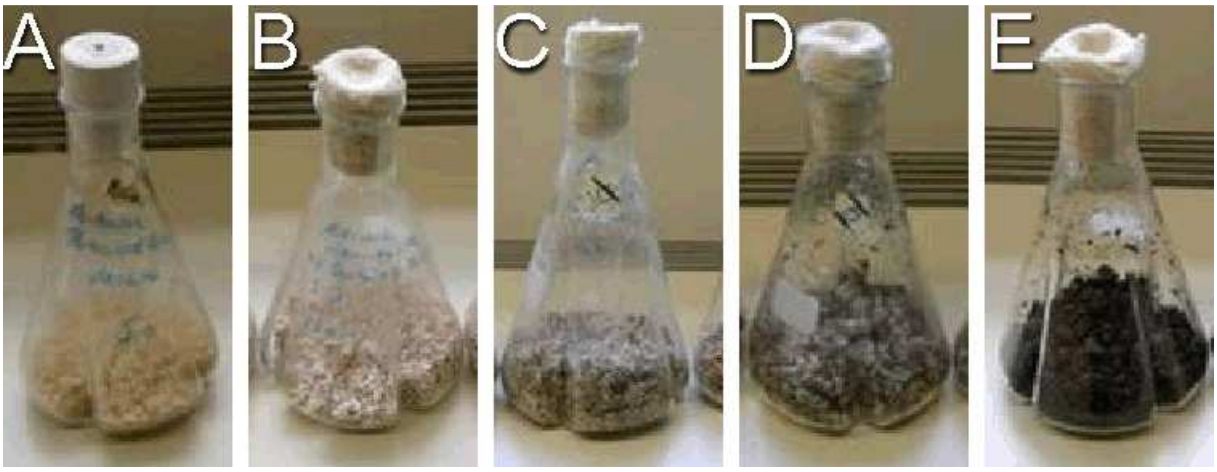


Abb. 4-1: Kulturansatz von *A. alternata* DSM 12633 auf feuchtem, autoklaviertem Reis; (A) 0 Tage, (B) 4 Tage, (C) 7 Tage, (D) 14 Tage und (E) 35 Tage nach Inokulation.

4.2 Analyse der Alternariatoxine mittels HPLC

Zur quantitativen Analyse der Schimmelpilzextrakte wurde die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) eingesetzt. Die Detektion mittels UV/VIS-Diodenarrydetektor ermöglichte die Zuordnung der einzelnen Peaks anhand ihrer UV-Spektren, was für die vorliegende Fragestellung besonders sinnvoll war, da die komplexen Extrakte der Schimmelpilzkulturen oft sehr komplexe Peakspektren zeigten, und die Zuordnung einzig anhand der Retentionszeiten oft schwierig war.

Um die untersuchten Haupttoxine möglichst parallel aus dem komplexen Extrakt analysieren zu können, wurde eine Reverse-Phase-Trennmethode entwickelt, die mittels eines Stufengradienten zwischen Wasser (pH 3, mit Ameisensäure eingestellt) und Acetonitril : Wasser (90:10) eine gute Trennung der untersuchten Toxine AOH, AME, ALT und TeA auf einer Phenomenex Luna C18(2) 5µ-Säule erlaubte. Die untersuchten Toxine eluierten bei Retentionszeiten zwischen 7 und 16 Minuten, wobei das gesamte Trennprogramm mit 35 Minuten Laufzeit relativ lang war. In der Literatur sind häufig schnellere Trennprogramme beschrieben, die bereits nach wenigen Minuten alle Toxinpeaks eluieren (Solfrizzo et al. 2004). Da jedoch bei der Extraktion von Schimmelpilzkulturen deutlich mehr lipophile Naturstoffe mit extrahiert werden als beispielsweise bei wässrigen Lebensmitteln wie Fruchtsäften, Obst, etc., war eine effizientere Auftrennung nötig um Überlagerungen mit weiteren unbekannten Peaks zu vermeiden.

Die Polyketid-Toxine AOH, AME und ALT wurden bei 340 nm detektiert und quantifiziert, da sie bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum besitzen und andere enthaltene Matrix-

substanzen dort kaum absorbierten. Die TeA wurde bei ihrem Hauptmaximum (280 nm) gemessen. Zur Quantifizierung der untersuchten Toxine wurden externe Kalibriergeraden mit je 5 Punkten für AOH und AME erstellt (0,1 - 1000 µM), sowie mit sieben Punkten für ALT (0,1 - 1000 µM) und fünf Punkten für TeA (100 - 1000 µM), nachdem der TeA-Kupfersalz-Standard (Sigma) durch einen stark sauren Ionentauscher vom Kupfer befreit wurde (Solfrizzo et al. 2004). Für jedes Toxin wurden aus je drei Einwaagen Stammlösungen angesetzt und durch Verdünnung je drei Kalibrierlösungen pro Kalibrierpunkt erstellt und gemessen. Die Bestimmtheitsmaße der externen Kalibriergeraden (R^2) betrugen für AOH: 0,9997, für AME 0,9990, für ALT 0,9954 und für TeA 0,9987.

Die Erfassungsgrenzen und Bestimmungsgrenzen ("Limit of Detection" (LoD) und "Limit of Quantification" (LoQ)) für die einzelnen Toxine wurden anhand der Peakhöhe als 3-fache bzw. 10-fache Höhe des Grundrauschens der Baseline errechnen, und sind in Tabelle 4-1 angegeben.

Tab. 4-1: Erfassungsgrenzen (LoD), Bestimmungsgrenzen (LoQ) sowie Grenzen der Kalibrierbereiche für die untersuchten Toxine AOH, AME, ALT und TeA. LoD, LoQ sowie die niedrigste Kalibrierkonzentration sind berechnet als µg Toxin pro kg Reiskultur. (mittl. rel. SD: mittlere relative Standardabweichung der Kalibrierung)

	Kalibrierbereich		Kalibrier-punkte	R^2	mittl. rel. SD [%]	LoD [ng/ml bzw. µg/kg Reis]	LoQ [ng/ml bzw. µg/kg Reis]	niedrigste Kalbrierkonz. [ng/ml bzw. µg/kg Reis]
	[µM]	[µg/ml]						
AOH	1 - 10	0,26 - 2,6	5	0,9960	3,8	10 ± 0,4	33 ± 1,2	258 ± 10
	10 - 100	2,6 - 25,8	5	0,9992	3,0			
	100 - 1000	25,8 - 258,2	5	0,9994	2,8			
AME	1 - 10	0,27 - 2,7	5	0,9973	4,1	22 ± 0,9	72 ± 3,0	272 ± 11
	10 - 100	2,7 - 27,2	5	0,9983	3,4			
	100 - 1000	27,2 - 272,2	5	0,9994	4,2			
TeA	100 - 1000	19,7 - 197,2	5	0,9984	3,5	13 ± 0,4	43 ± 1,5	19700 ± 690
ALT	1 - 1000	0,29 - 292,3	7	0,9954	8,2	27 ± 2,2	89 ± 7,3	292 ± 24

Es wurden bewusst keine weiteren Schritte unternommen "sauberere" Extrakte zu gewinnen, da im Zuge einer solchen Aufreinigung möglicherweise auch unbekannte Extraktkomponenten mit genotoxischem Potential entfernt worden wären, die für diese Arbeit besonders interessant waren. Ebenfalls wurden relativ hohe Konzentrationsbereiche für die Kalibrierung ge-

wählt, da dies die Aufzeichnung deutlicher UV-Absorptionsspektren mit dem Diodenarraydetektor der HPLC-Anlage erlaubte, die für die korrekte Zuordnung der Peaks teilweise notwendig waren. Das Hauptziel der Analysen bestand nicht in einer möglichst empfindlichen Analyse der untersuchten Toxine, wie dies beispielsweise in der Lebensmittelanalytik angestrebt wird, sondern in der Quantifizierung der starken Toxinbildung durch die Reiskulturen der Alternariastämme. Trotz der geringen Probengröße von einigen Gramm verschimmeltem Reis machten die teilweise sehr hohen Toxinkonzentrationen vielfach ein Verdünnen der Extrakte erforderlich, bzw. waren aufgrund der stark unterschiedlichen Gehalte der einzelnen Toxine Messungen der gleichen Probe in unterschiedlichen Verdünnungen notwendig, um jeweils im Kalibrierbereich zu bleiben. Spätere Messungen, wie das Screening der gebildeten Toxinverhältnisse auf verschiedenen Agars, insbesondere aber die externe Kalibrierung für ATX II mit dem selbstisolierten Toxinstandard, wurden an einer anderen HPLC-Anlage durchgeführt (Agilent 1200). Die Bestimmtheitsmaße (R^2) der Kalibrierungen betrugen hierbei für AOH: 0,9993, für AME: 0,9996, für TeA: 0,9987 und für ATX II: 0,9973. Da zu dieser Zeit die Shimadzu Prominence-Anlage, mit der die Reisextrakte analysiert wurden nicht mehr zur Verfügung stand und die Extrakte nicht mehr vorhanden waren, konnten die ATX II und Stemphyltoxin III-Gehalte der Reiskulturen nur anhand der alten Chromatogramme näherungsweise ermittelt werden (siehe auch Absatz 4.11). Stemphyltoxin III wurde aufgrund seiner großen Ähnlichkeit in Molekülstruktur und UV-Spektrum näherungsweise als ATX II berechnet, da die Gewinnung der trockenen Reinsubstanz aufgrund geringer Stabilität bei der Trocknung nicht möglich war (siehe Abschnitt 4.11).

4.3 Toxinextrakte der Reiskulturen

Um möglichst toxinhaltige Alternariaextrakte für die toxikologischen Versuche zu gewinnen wurden verschiedene Alternariastämme auf autoklaviertem Reis kultiviert und eine geeignete Kulturdauer mit hoher Ausbeute ermittelt. Anhand ihres Toxinprofils wurden die Extrakte einzelner Stämme für die toxikologischen Untersuchungen ausgewählt.

4.3.1 Zeitverlauf der Toxinbildung auf autoklaviertem Reis.

Um einen Eindruck vom zeitlichen Verlauf der Toxinbildung der verschiedenen Stämme zu erhalten wurden alle zwei bis drei Tage Proben der jeweiligen Kulturkolben entnommen, mit Ethylacetat extrahiert und per HPLC auf ihre Gehalte an AOH, AME, ALT und TA analysiert. Wie in Abbildung 4-2 ersichtlich unterschieden sich die untersuchten Stämme deutlich im Bezug auf die Mengen und Verhältnisse der gebildeten Toxine. Um Vergleichbarkeit bei verschiedenen Probengrößen zu gewährleisten, wurden die Toxingehalte aller Proben als Toxinmenge in Mikrogramm pro Gramm Reis berechnet. Insbesondere fiel *A. alternata* DSM 12633 durch die starke Bildung an AOH, AME und TeA auf. Der Stamm *A. alternata* DSM 62010 bildete neben großen Mengen an TeA auch AOH und AME, jedoch nur etwa ein Zehntel der Menge von DSM 12633. Der Stamm *A. alternata* DSM 1102 bildete zwar große Mengen an TeA, hingegen keine quantifizierbaren Mengen der Polyketid-Toxine AOH, AME oder ALT. Die Stämme *A. alternata* DSM 62006 und *A. brassicicola* DSM 62008 zeigten hingegen nur geringe bis keine Toxinbildung unter den verwendeten Kulturbedingungen. Die Probengrößen von ca. 1-2 g verschimmelten Reises waren vergleichsweise gering, was die Schwankungen der Toxingehalte innerhalb des Zeitverlaufs erklären könnte. Das Ziel dieses Versuches war allerdings lediglich, einen ersten Eindruck von den gebildeten Toxinmengen der einzelnen Stämme zu gewinnen, was selbst im Hinblick auf die Schwankungen anhand der Ergebnisse möglich war. Einige der untersuchten Stämme waren folglich in der Lage unter den gewählten Kulturbedingungen erhebliche Mengen der untersuchten Toxine zu bilden. Es ließen sich Toxinkonzentrationen von einigen Milligramm pro Gramm bewachsenen Reises innerhalb weniger Wochen erzielen. Für spätere Versuche wurde eine Kulturdauer von 21 Tagen als geeignet ermittelt, da danach nur noch eine geringe Zunahme im Toxingehalt beobachtet wurde (DSM 1102, DSM 12633) bzw. sich bereits eine Abnahme einzelner, enthaltener Toxine andeutete (DSM 62010).

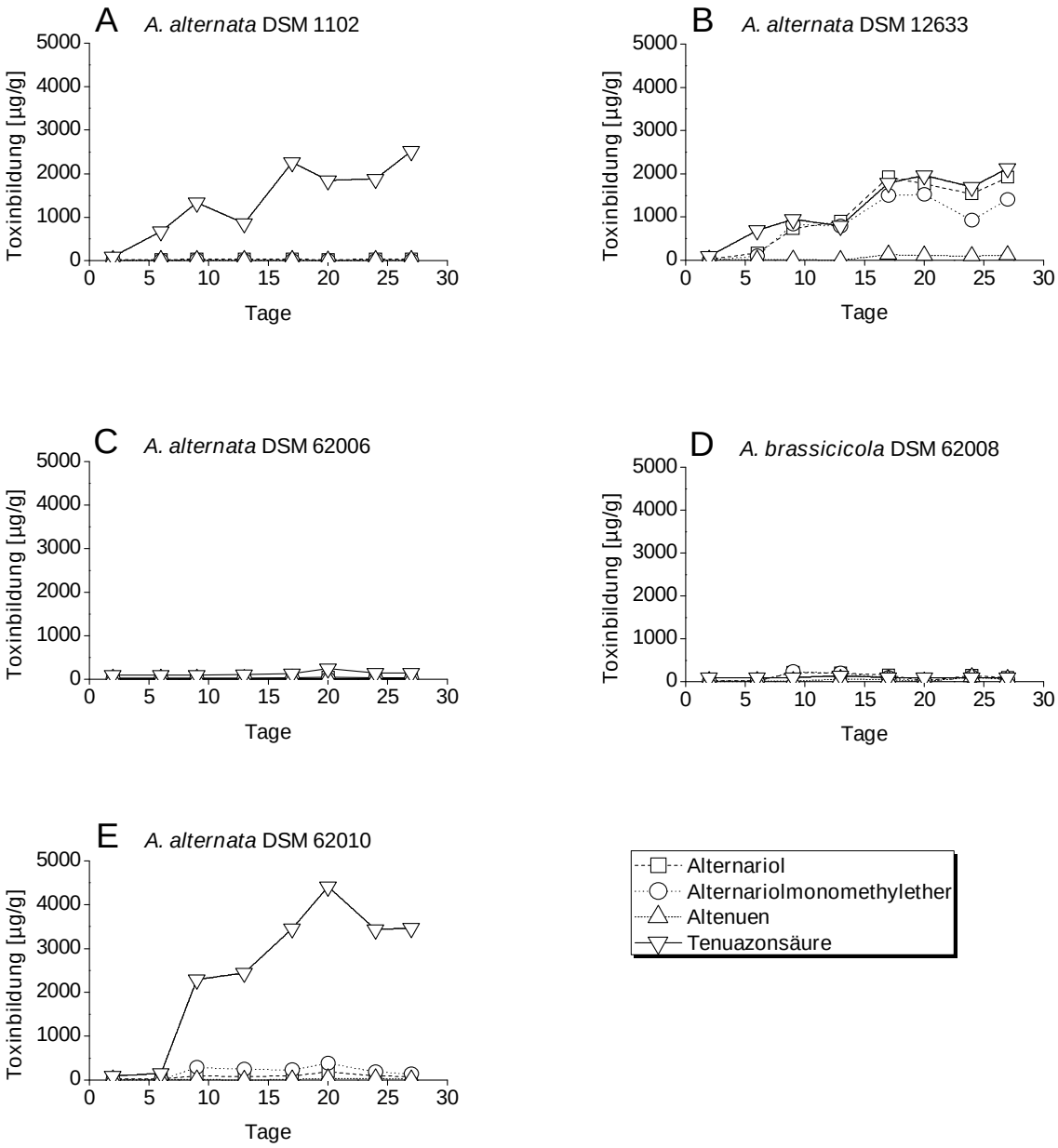


Abb. 4-2: Orientierende Messungen zur Bildung der Toxine AOH, AME, ALT und TeA durch verschiedene Alternariastämme über vier Wochen Kulturdauer auf autoklaviertem Reis in der Dunkelheit bei 24 °C (jeweils ein Kulturkolben pro Alternariastamm)

4.3.2 Reproduzierbarkeit der Toxinbildung auf autoklaviertem Reis

Bereits kleine Veränderungen der Kulturbedingungen können zu erheblichen Unterschieden bei der Toxinbildung durch *Alternaria* führen (Soderhall et al. 1978; Magan et al. 1984; Hasan 1995). Es wurde daher versucht möglichst viele Umweltfaktoren bei der Kultivierung zu kontrollieren, insbesondere Temperatur, Feuchtigkeit, Licht und Nährmedium. Als Kulturdauer wurden 21 Tage gewählt. Um zu ermitteln wie reproduzierbar die Toxinprofile der einzelnen Stämme unter den verwendeten Kulturbedingungen sind, wurden vier unabhängige Experimente der Kultivierung durchgeführt. Die Probengröße wurde dabei auf 10 g verschimmelten Reis erhöht, um mögliche Fehler bei der Probennahme zu minimieren. Die einzelnen Kultivierungen wurden dabei nicht parallel durchgeführt, sondern zu verschiedenen Zeitpunkten während eines Kalenderjahres und die Nährmedien jeweils pro Versuch neu angesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4-3 grafisch dargestellt und die genauen Werte in Tabelle 4-2 angegeben. Wenn auch die Mengen an gebildeten Toxinen sowie ihr Verhältnis zueinander bei den einzelnen Stämmen variierten, so waren dennoch typische Toxinprofile der Stämme erkennbar. *Alternaria alternata* DSM 12633 produzierte AOH, AME und TeA in vergleichbar großen Mengen neben geringeren Mengen an ALT. *A. alternata* DSM 62010 bildete durchschnittlich nur etwa ein Drittel der AME-Menge von DSM 12633, sowie ein Zehntel des AOH, aber über viermal so viel TeA. Der Stamm *A. alternata* DSM 1102 bildete reproduzierbar TeA neben sehr geringen Mengen AOH und AME. Die Toxinbildung durch *A. alternata* DSM 62006 zeigte die größten Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten; die Ergebnisse variierten zwischen mäßiger und ausbleibender Toxinbildung.

Insgesamt war die Toxinbildung durch die untersuchten Stämme bei einer Kulturdauer von 21 Tagen folglich reproduzierbar. Es fiel weiterhin auf, dass TeA zwar unter den hier verwendeten Kulturbedingungen von allen vier untersuchten Stämmen gebildet wurde, wobei das Mengenverhältnis gegenüber AOH oder AME jedoch nahezu ausgeglichen sein konnte (DSM 12633, DSM 62006), oder aber 10-fach bis 100-fach höher (DSM 62010) bis hin zum 1000-fachen der Menge an AOH oder AME (DSM 1102). Die TeA-Bildung durch einen Alternariastamm konnte folglich nicht als prädiktiver Parameter für die Bildung anderer Alternariatoxine dienen, was aufgrund ihres unterschiedlichen Biosytheseweges aber auch nicht erwartet wurde. Lebensmittel, die mit Alternariatoxinen belastet sind weisen üblicherweise Toxinkonzentrationen im Bereich bis zu 26 µg/kg AOH auf, bis zu 10 µg/kg AME, bzw. bis 350 µg/kg TeA (CONTAM 2011).

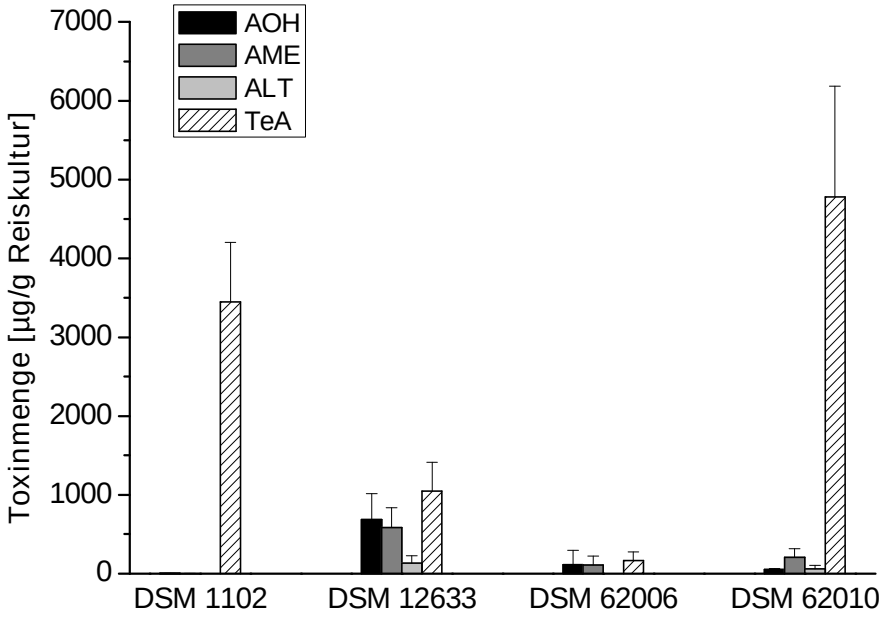


Abb. 4-3: Toxinprofile verschiedener *Alternaria alternata* Stämme nach 21 Tagen Kultur auf feuchtem, autoklaviertem Reis. Dargestellt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Kulturansätzen die im Verlauf eines Kalenderjahres angesetzt, kultiviert und analysiert wurden, sowie ihre Standardabweichung.

Tab. 4-2: Toxinprofile verschiedener *A. alternata* Stämme nach 21 Tagen Kultivierung auf feuchtem, autoklaviertem Reis bei 24 °C in der Dunkelheit. Angegeben sind die Toxinmengen in Mikrogramm pro Gramm Reis. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils vier unabhängigen Kulturansätzen, die im Verlauf eines Kalenderjahres angesetzt, kultiviert und analysiert wurden, sowie ihre Standardabweichung.

	DSM 1102		**DSM 12633**		**DSM 62006**		**DSM 62010**	
	MW	sd	MW	sd	MW	sd	MW	sd
AOH	**2**	1	**690**	327	**114**	183	**52**	13
AME	**2**	2	**587**	250	**107**	115	**206**	111
ALT	**n.d.**	-	**133**	93	**n.d.**	-	**61**	42
TeA	**3447**	757	**1049**	363	**165**	110	**4777**	1409

Die höchsten, in Lebensmitteln entdeckten Konzentrationen betrugen 290 µg/kg AOH bei einer Linsenprobe (Ostry et al. 2004) sowie 30 µg/kg AME in Leinsamen (Kralova et al. 2006). Insgesamt lagen die gebildeten Toxinmengen sehr hoch, bis hin zu mehreren Milligramm Toxin pro Gramm Reiskultur. Bei verarbeiteten Lebensmitteln, die aus kontaminierten Grundstoffen hergestellt wurden ist eine mögliche Belastung mit Alternariatoxinen oft nicht direkt zu erkennen. So wurden in Tomatenmark bereits Toxingehalte bis zu 1734 µg/kg AME und 4021 µg/kg TeA gemessen (Terminiello et al. 2006). Bei bestimmten Lebensmitteln wie z.B. Weizenkörnern ist ein möglicher Alternariabefall ebenso kaum auffällig, sodass bei einzelnen Proben bis zu 731 µg/kg AOH gemessen wurden (Li und Yoshizawa 2000a). Teilweise wurden auch deutlich höhere Gehalte an Alternariatoxinen in Lebensmitteln beschrieben, wie z.B. bis zu 58800 µg AOH/kg in einer Apfelprobe (Stinson et al. 1981) oder 174000 µg/kg TeA bei einer Mandarinenprobe (Logrieco et al. 1988). Diese Lebensmittel würden durch ihren offensichtlichen Schimmelbefall für den menschlichen Konsum ausscheiden, und sind deshalb gesondert von den übrigen Lebensmittelproben zu betrachten. Die Toxinbildung liegt jedoch in einem ähnlichen Bereich wie bei den hier beschriebenen Reiskulturen zur Gewinnung stark toxinhaltiger Extrakte.

4.4 Genotoxizität der komplexen Extrakte

Alternariol, als eines der mengenmäßig wichtigsten Alternariatoxine besitzt DNA-strangbrechende Wirkung in verschiedenen Testsystemen. Xu et al. (1996) berichten von DNA-Einzelstrangbrüchen durch AOH in ringförmiger, superspiralisierter DNA im zellfreien System. Eine Erhöhung der DNA-Strangbruchrate durch einstündige Inkubation mit AOH wurde für HT29, HepG2 und V79 Zellen mittels alkalischem Entwindungsassay (AU) gemessen (Pfeiffer et al. 2007). Mittels Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Assay) nach einstündiger Inkubation mit AOH wurden DNA-Strangbrüche in den Zelllinien HT29, A431, HCT116 und HEK293 beobachtet (Fehr et al. 2009; Fehr et al. 2010). Diese Wirkung ist konzentrationsabhängig und signifikant im mikromolaren Inkubationsbereich zwischen 10 - 50 µM. AME ist ebenfalls als DNA-strangbrechend im Comet-Assay beschrieben (Fehr et al. 2009), zu Comet-Assays mit Tenuazonsäure existieren bisher keine Literaturdaten.

Die DNA-strangbrechende Wirkung komplexer Alternariaextrakte wurde im Comet-Assay mit der Wirkung des jeweiligen Haupttoxins im komplexen Extrakt verglichen. Die beobachteten DNA-Schäden durch die Extrakte im Comet-Assay überstiegen dabei die erwarteten

Schäden aufgrund ihres Gehaltes am jeweiligen "Haupttoxin" bei Weitem (siehe Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2).

4.4.1 DNA-Strangbrüche durch AOH-haltigen DSM 12633-Extrakt

Um zu überprüfen welche Bedeutung die DNA-strangbrechende Wirkung von AOH für die Genotoxizität des AOH-haltigen Schimmelpilzextraktes hat, wurde im Comet-Assay reines AOH sowie ein komplexer, stark AOH haltiger Schimmelpilzextrakt parallel untersucht. Der *A. alternata* DSM 12633-Extrakt einer Reiskultur wurde ausgewählt, da er die größte Menge an AOH (2307 µg/ml) enthielt, sowie AME (999 µg/ml) und TeA (2866 µg/ml). Durch Einengen von 109 µl des rohen Ethylacetat-Extraktes und Aufnehmen in 100 µl DMSO wurde eine standardisierte Inkubationsstammlösung hergestellt, die 10 mM AOH enthielt (neben 4 mM AME und 16 mM TeA). Die eingesetzten Konzentrationen der Inkubationsmedien wurden durch die weitere Verdünnung der standardisierten Extraktstammlösung mit DMSO und Zellkulturmedium hergestellt. Die Inkubationslösung mit der höchsten verwendeten Extraktkonzentration enthielt also neben 50 µM AOH noch 20 µM AME und 80 µM TeA, die Inkubationslösung mit der niedrigsten Extraktkonzentration enthielt folglich neben 0,01 µM AOH noch 0,004 µM AME und 0,016 µM TeA. Wie in Abbildung 4-4 zu sehen lagen die Schweifintensitäten ("tail intensity", TI) der mit AOH inkubierten Zellen im Bereich von etwa 2% - 6%, was den erwarteten Werten für 0,1 - 50 µM AOH in HT29-Zellen entspricht (Fehr et al. 2009). Die Schweifintensitäten des AOH-haltigen Extraktes überstiegen diese Werte allerdings bei Weitem. Die Extraktinkubation mit 10 µM AOH-Gehalt lag mit 14% ± 3,6% Schweifintensität bereits höher, als für eine Inkubation mit 50 µM reinem AOH in HT29-Zellen erwartet würde (Fehr et al. 2009). Die Inkubation mit 50 µM AOH-Gehalt im Extrakt führte zu sehr hohen Schweifintensitäten von durchschnittlich 41% ± 1,4% , was den Effekt des reinen AOH der gleichen Konzentration um etwa das Zehnfache übersteigt. Von jeder Inkubation wurde jeweils ein Teil der Zellen zusätzlich einer Behandlung mit dem bakteriellen Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) unterzogen, um dadurch zusätzliche Hinweise auf eine mögliche oxidative Schädigung der DNA-Basen zu erhalten.

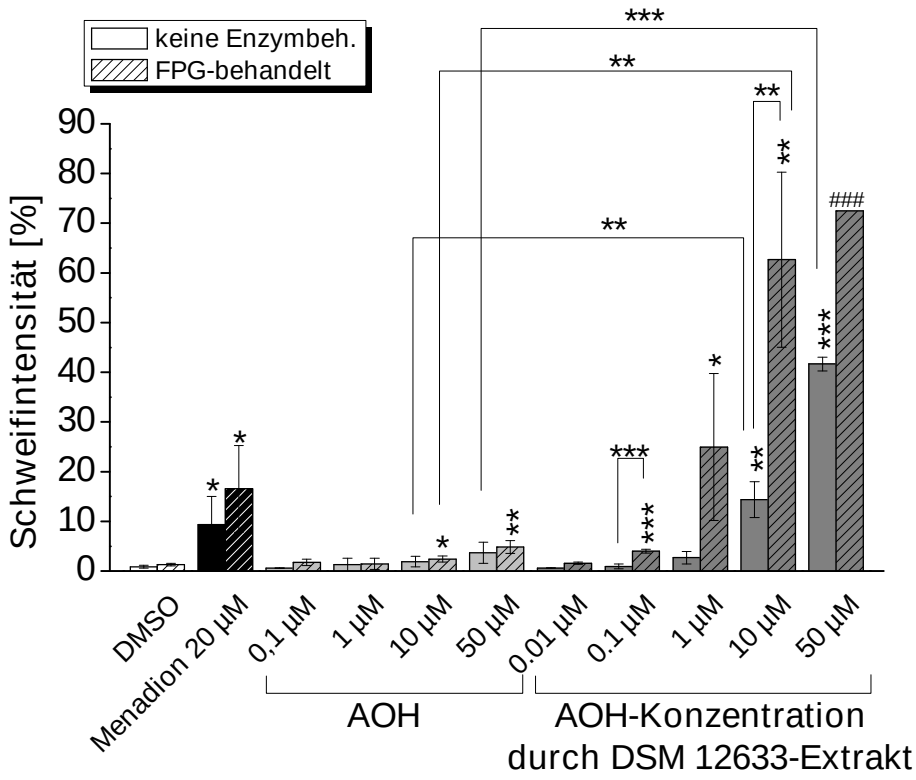


Abb. 4-4: DNA-Schäden im Comet-Assay durch AOH und *A. alternata* DSM 12633-Extrakt, der auf seinen AOH-Gehalt durch Verdünnung standardisiert wurde (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., Menadion als Positivkontrolle, DMSO als Negativkontrolle). Die höchstkonzentrierte Extrakt-Inkubationslösung enthielt neben 50 µM AOH noch 20 µM AME und 80 µM TeA, die Verdünnungen entsprechend weniger. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001). (###: Schweifintensität > 80%, daher nicht mehr zuverlässig quantifizierbar)

Bei Inkubation der Zellen mit reinem AOH führte die FPG-Behandlung zu keiner signifikanten zusätzlichen Erhöhung der Schweifintensität, was den bisherigen Erfahrungen aus der Literatur entspricht, sowohl für HT29 als auch die anderen untersuchten Zelllinien (Fehr et al. 2009; Fehr et al. 2010). Die FPG-Behandlung von HT29-Zellen, die mit den AOH-haltigem *A. alternata* DSM 12633-Extrakt inkubiert wurden führte hingegen zu signifikanter und konzentrationsabhängiger Erhöhung der Schweifintensitäten. Extraktinkubationen mit 1 µM bzw. 10 µM AOH-Gehalt führten nach FPG-Behandlung bereits zu Schweifintensitäten von 25% ± 14,7% bzw. 62% ± 17,6%. In Abbildung 4-5 sind beispielhaft ausgewertete, fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen für gemessene Schweifintensitäten nach Extraktinkubation abgebildet. Wie in der Abbildung erkennbar führt eine zunehmende Schädigung der Zell-DNA zu einer Verbreiterung des Fluoreszenzsignals und damit zu insgesamt geringerer messbarer In-

tensität des Signals. Eine Auswertung von sehr hohen Schweifintensitäten (über 80%) ist daher nicht mehr sinnvoll möglich. Dies war der Fall bei der höchsten Extraktkonzentration (50 µM AOH-Gehalt) mit FPG-Behandlung, die daher nur der Vollständigkeit halber aufgeführt ist.

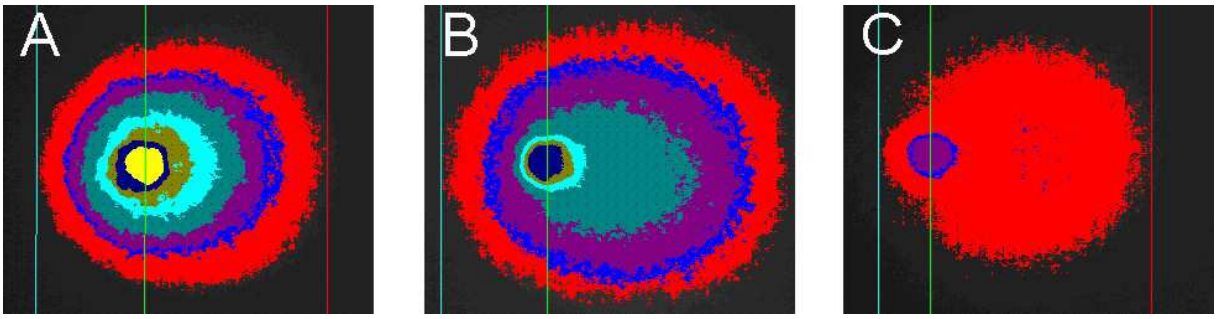


Abb. 4-5: Beispiele für unterschiedlich stark durch *A. alternata* DSM 12633 geschädigte DNA von HT29-Zellen im Comet Assay. (A) Deutliche DNA-Schädigung (10% TI) durch Inkubation mit der zweithöchsten Extraktkonzentration (10 µM AOH im Inkubationsmedium durch den AOH-Gehalt des Extraktes) ohne zusätzliche FPG-Behandlung. (B) Hohe Schweifintensität (40%) durch Inkubation mit der höchsten eingesetzten Extraktkonzentration (50 µM AOH im Inkubationsmedium durch den AOH-Gehalt des Extraktes) ohne zusätzliche FPG-Behandlung. (C) Extrem hohe Schweifintensität (74%) durch Inkubation mit der zweithöchsten Extraktkonzentration (10 µM AOH im Inkubationsmedium durch den AOH-Gehalt des Extraktes) und zusätzlicher FPG-Behandlung.

Als Ursache für die beobachtete Bildung einer diffusen Wolke ("halo") um den "Kometenkopf" wird ein hohes Maß an DNA-Strangbrüchen vermutet, die eine Entwindung von superspiralisierten DNA-Schleifen im "Kometenkopf" ermöglichen (Cook et al. 1976), was letztlich auch zur Schweifbildung bei der Elektrophorese führt (Collins et al. 1997). Neben der stark DNA-strangbrechenden Wirkung des *A. alternata* DSM 12633-Extrakts, der die erwarteten Effekte durch das enthaltene AOH bzw. AME weit überstieg, wurde zusätzlich eine signifikante Zunahme an FPG-sensitiven Stellen in der DNA beobachtet, die bei keinem der untersuchten Zelltypen für AOH oder AME in der Literatur beschrieben ist (Fehr et al. 2009). Das HPLC-Chromatogramm des Extraktes (Abb. 4-6) zeigte allerdings neben den Peaks von AOH, AME und TeA noch einen weiteren unbekannten Peak bei RT=25,5 min, sowie eine Vielzahl weiterer, kleiner, unbekannter Peaks.

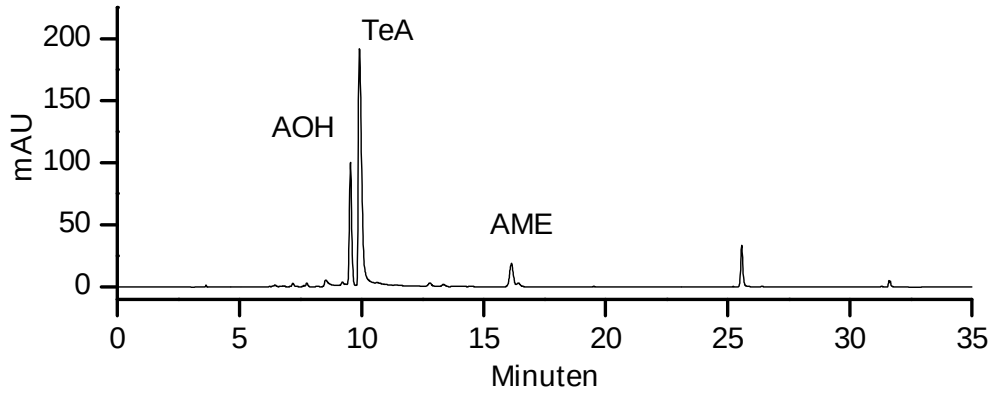


Abb. 4-6: HPLC-Chromatogramm des verwendeten *A. alternata* DSM 12633 Extraktes (Stufengradient Wasser : Acetonitril, UV-Detektion bei 278 nm, 10 µl Injektion, Verdünnung 1 : 100) . Neben AOH, AME und TeA befindet sich ein vergleichbar großer, unbekannter Peak bei RT=25 min.

4.4.2 DNA-Strangbrüche durch TeA-haltigen DSM 1102-Extrakt

Um einen möglichen Beitrag der TeA zur genotoxischen Wirkung von komplexem Alternariaextrakt zu untersuchen wurde in Analogie zum letztgenannten Beispiel reine TeA mit stark TeA-haltigem Alternariaextrakt im Comet-Assay parallel getestet. Der Extrakt von *A. alternata* DSM 1102 wurde als besonders geeignet ausgewählt, da außer TeA keine wesentlichen Peaks im HPLC-Chromatogramm zu erkennen waren (Abb. 4-7). Da der Ethylacetat-Extrakt von *A. alternata* DSM 1102 eine TeA-Konzentration von 8694 µg/ml aufwies, wurde durch Einengen von 113 µl des Ethylacetat-Extraktes zur Trockne und Aufnehmen des Rückstands in 100 µl DMSO eine auf TeA-Gehalt standardisierte Inkubationsstammlösung hergestellt (50 mM TeA). Diese wurde durch weitere Verdünnung mit DMSO und Kulturmedium zur Herstellung der Inkubationslösungen verwendet. Bei keiner der getesteten Konzentrationen bis 200 µM war für die reine TeA im Comet-Assay eine Erhöhung der Schweifintensität zu beobachten (Abb. 4-8). Ebenso führte die Behandlung mit FPG zu keiner signifikanten Erhöhung der Schweifintensität. TeA trägt folglich nicht zur Bildung FPG-sensitiver Stellen in der Zell-DNA bei. Die Inkubation mit dem, hinsichtlich seiner TeA-Konzentration standardisierten *A. alternata* DSM 1102-Extrakt führte jedoch in der höchsten getesteten Konzentration (200 µM TeA-Gehalt) zu einer signifikanten Erhöhung der Schweifintensität. Ebenso war durch die signifikante Erhöhung bei den FPG-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine deutliche Induktion FPG sensitiver Stellen in der DNA durch den Extrakt erkennbar (siehe Abbildung 4-8).

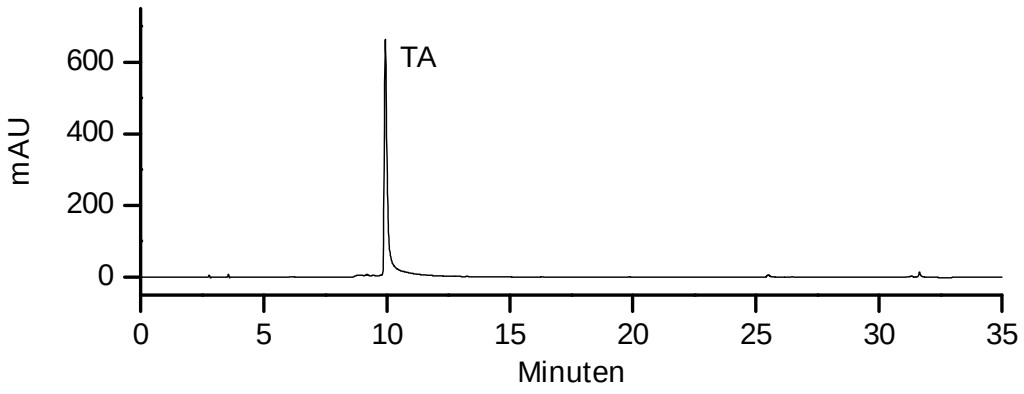


Abb. 4-7: HPLC-Chromatogramm des getesteten *A. alternata* DSM 1102-Extraktes. Auch bei anderen Wellenlängen waren außer TeA sind keine deutlichen Peaks erkennbar. (Stufengradient Wasser : Acetonitril, UV-Detektion bei 278 nm, 10 µl Injektion, Verdünnung 1 : 100)

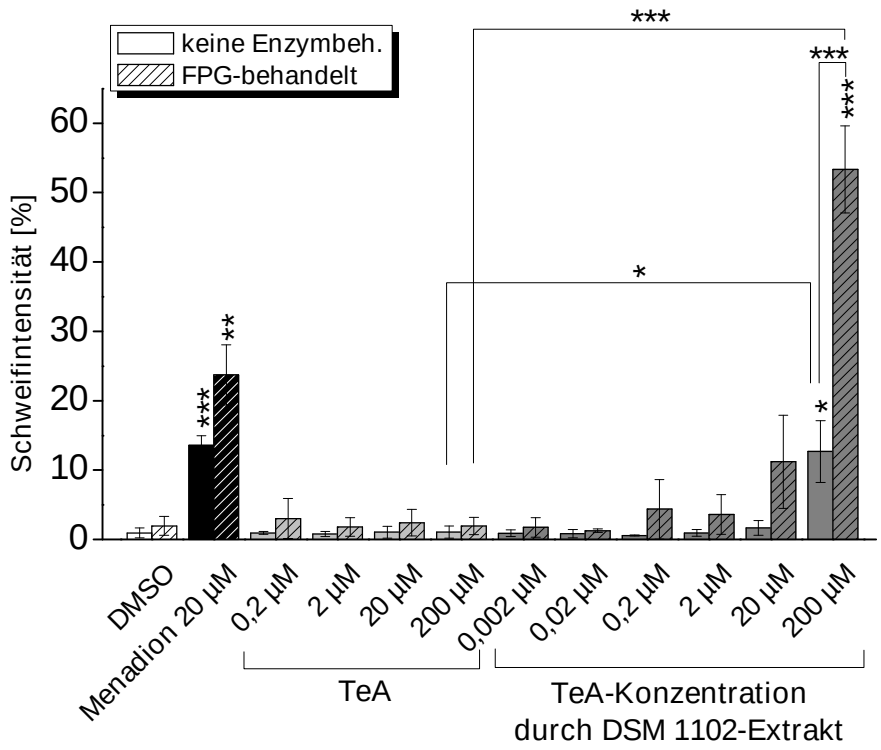


Abb. 4-8: DNA-Schäden im Comet-Assay durch TeA und *A. alternata* DSM 1102-Extrakt, der auf seinen TeA-Gehalt durch Verdünnung standardisiert wurde (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., Menadion als Positivkontrolle). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Diese DNA-schädigenden Effekte des Extraktes wurden folglich nicht durch die enthaltene TeA verursacht, sondern durch unbekannte Extraktkomponenten. Die höchsten, zur Inkubation eingesetzten Extraktkonzentrationen (200 µM TeA bei DSM 1102 bzw. 50 µM AOH bei DSM 12633) entsprachen rechnerisch 14,4 mg bzw. 19,7 mg verschimmeltem Reis pro Milliliter Inkubationsmedium. Die eingesetzten Mengen waren also vergleichbar. Der Unterschied im Ausmaß der beobachteten Effekte scheint demnach in einem ausgeprägteren genotoxischen Potential des *A. alternata* DSM 12633-Extraktes begründet zu sein. Dies wird besonders deutlich, wenn die durchschnittlichen Schweifintensitäten, die bei den Comet-Assays nach Extraktinkubation gemessen wurden, gegen die Mengen an verschimmeltem Reis aufgetragen werden, die der eingesetzten Extraktmenge entsprechen. In Abbildung 4-9 ist das potenter genotoxische Potential der *A. alternata* DSM 12633-Kultur direkt ersichtlich, sowohl bei den FPG-behandelten Proben (B) als auch ohne FPG-Behandlung (A).

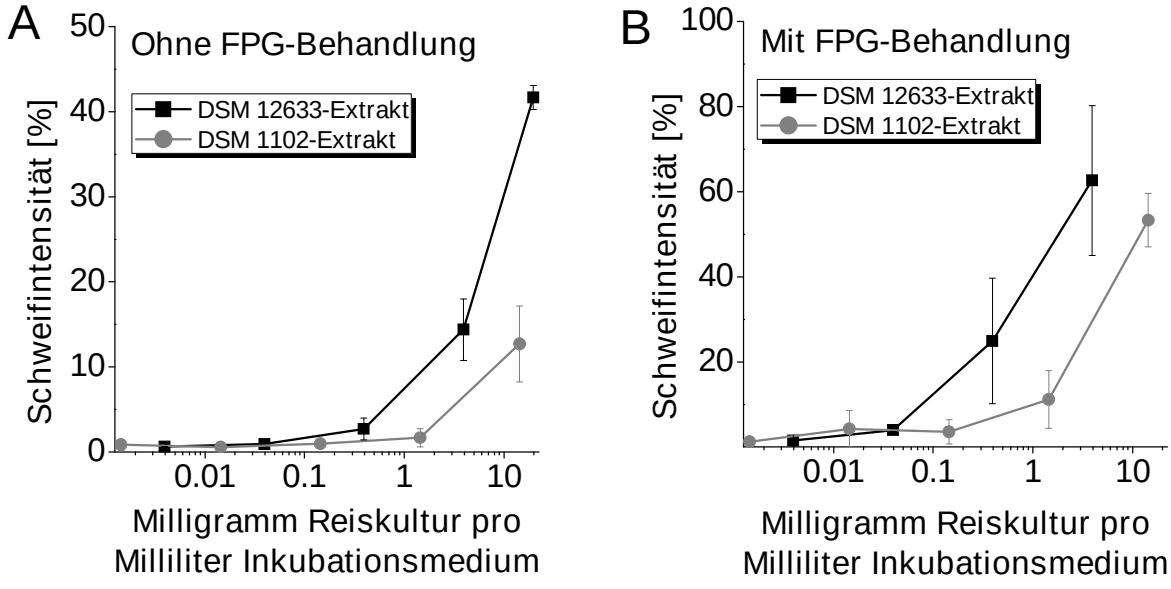


Abb. 4-9: Auftragung der Schweifintensitäten der Comet-Assays nach Inkubation mit *A. alternata* DSM 1102- bzw. DSM 12633-Extrakt (Abb. 4-4 und 4-8) gegen die rechnerische Menge an verschimmeltem Reis, die der jeweils eingesetzten Extraktmenge entspricht. Sowohl bei den Proben ohne zusätzliche FPG-Behandlung (A) als auch bei den FPG-behandelten Proben (B) ist das stärker genotoxische Potential der DSM 12633-Kultur direkt ersichtlich.

4.4.3 Kein Synergismus zwischen AOH, AME und TeA

Um zu überprüfen ob möglicherweise synergistische Effekte zwischen AOH, AME und TeA für die deutlich stärker genotoxische Wirkung des Extraktes verantwortlich sein könnten, wurde eine orientierende Messung durchgeführt, bei der Mischungen der drei Toxinstandards unter analogen Bedingungen im Comet-Assay untersucht wurden (Abb. 4-10).

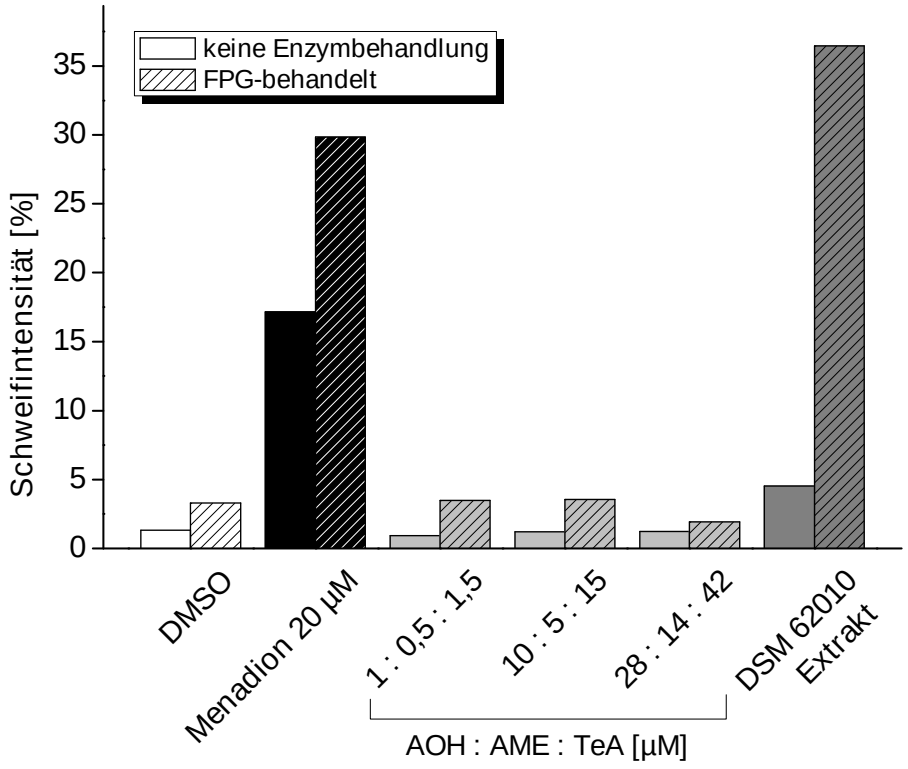


Abb. 4-10: Comet-Assay als orientierende Messung zur Überprüfung auf mögliche Synergieeffekte von AOH, AME und TeA (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., Menadion als Positivkontrolle). Die Konzentrationsverhältnisse und -bereiche entsprechen dem *A. alternata* DSM 12633-Extrakt, bei dem starke DNA-Schäden beobachtet wurden. Der mitgeführte *A. alternata* DSM 62010-Extrakt zeigte sich hingegen als stark genotoxisch, obwohl das Inkubationsmedium durch die eingesetzte Extraktmenge lediglich 0,09 µM AOH, 0,46 µM AME, 0,11 mM ALT und 5,7 µM TeA enthielt wodurch keine Erhöhung der Schweifintensität zu erwarten wäre.

Der Konzentrationsbereich sowie die Verhältnisse der Toxine entsprechen dabei denen des DSM 12633-Extrakts, bei denen ein starker Anstieg der DNA-Strangbrüche sowie der FPG-sensitiven Stellen beobachtet wurde. Bei keiner Konzentration führte diese rekonstituierte Toxinmischung zu Effekten, die sich von der Negativkontrolle DMSO unterschieden. Daher sind Synergieeffekte zwischen diesen drei Toxinen wahrscheinlich nicht der Grund, für die

beobachteten, stark genotoxischen Effekte des DSM 12633-Extraktes. Hingegen führte die mitgeführte Probe eines *A. alternata* DSM 62010-Extraktes ebenfalls zu deutlicher Erhöhung der Schweifintensität, insbesondere nach FPG-Behandlung, obwohl das Inkubationsmedium durch diesen Extrakt nur 0,09 µM AOH, 0,46 µM AME, 0,11 µM ALT und 5,7 µM TeA enthielt (Abb. 4-10). Ein deutlich messbarer Anstieg aufgrund dieser Toxinmengen war folglich nicht zu erwarten. Da es sich hierbei lediglich um eine orientierende Messung handelt und sich überdies keinerlei Erhöhung der Schweifintensitäten im erwarteten Bereich von 20 - 50% Schweifintensität durch die rekonstituierte Toxinmischung andeutete, wurde auf die mehrfache Durchführung dieses Versuchs verzichtet.

Folglich ergab sich kein Hinweis, dass die beobachteten DNA-Strangbrüche und FPG-sensitiven Stellen bei der Extraktinkubation auf synergistische Effekte zwischen AOH, AME und TeA zurückzuführen wären.

4.5 Genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung

Um die Ursache für die beobachteten genotoxischen Effekte im Comet-Assay (Abschnitt 4.4) einzugrenzen, wurden genotoxizitätsgeleitete Fraktionierungen komplexer Extrakte von mit *A. alternata* befallenem Reis durchgeführt. Extraktproben wurden dazu per HPLC getrennt, das Eluat, unterteilt in Zeitfraktionen am Detektorausgang manuell aufgefangen und mit Ethylacetat extrahiert.

Tab. 4-3: Zeitschema der toxizitätsgeleiteten Fraktionierung

Fraktion	Retentionszeit	Enthaltene "Haupt"-Toxine
F 1	0 - 6 min	
F 2	6 - 10,3 min	ALT, AOH
F 3	10,3 - 12 min	TeA
F 4	12 - 15,8 min	
F 5	15,8 - 19 min	AME
F 6	19 - 25 min	
F 7	25 - 30 min	
F 8	30 - 38 min	

Nach Entfernung des Ethylacetats durch Evaporation im Vakuum wurde der Rückstand in 50 µl DMSO aufgenommen. Das Zeitschema der Fraktionierung ist in Tabelle 4-3 angegeben. Die Toxine AOH, AME, ALT und TeA befanden sich dabei in den Fraktionen F 2, F 3 und F 5. Da die maximale Extraktmenge, die pro HPLC-Lauf fraktioniert werden konnte, durch die Kapazität der analytischen HPLC-Säule stark begrenzt ist, eignet sich der Comet-Assay besonders gut als genotoxischer Endpunkt, da dabei nur geringe Probenmengen zur Inkubation benötigt werden. Für jedes Experiment wurden 30 µl Extrakt frisch fraktioniert und zur Inkubation der Petrischalen (je 5 ml Inkubationsmedium) jeweils die gesamte Fraktion (in 50 µl DMSO) eingesetzt.

4.5.1 Fraktionierung des *A. alternata* DSM 12633-Extraktes

Da starke DNA-Schäden durch komplexen *A. alternata* DSM 12633-Extrakt erkennbar waren, wurde dieser zur genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierung ausgewählt. Die eingesetzte Menge des verwendeten Extraktes (20 µl Injektion) entsprach dabei rechnerischen Konzentrationen von 19 µM AOH, 40 µM AME, 14 µM ALT bzw. 54µM TA in den Inkubationslösungen der jeweiligen Fraktionen. Die Comet-Assays mit den reinen Toxinen AOH, AME oder TeA lassen keine stark DNA-schädigenden Effekte durch diese Toxinmengen erwarten (Absatz 4.5.1 - 4.5.2 sowie Fehr et al. (2009)), die über etwa 3-4% Schweifintensität hinausgehen. Wie in Abbildung 4-11 ersichtlich, führen weder Fraktion 2 (AOH) noch Fraktion 3 (TeA) zu einer signifikanten Erhöhung der gemessenen Schweifintensität. Ebenso zeigt Fraktion 7, die einen größeren, unbekannten Peak bei RT = 26 min enthält (siehe Abb. 4-6) keinen Einfluss auf die Schweifintensität. Der DNA-strangbrechende Effekt des unfraktionierten Extraktes ist gänzlich in Fraktion 4 und 5 lokalisiert. Sowohl in Bezug auf die Höhe der Schäden als auch deren Art, insbesondere der starken Induktion FPG-empfindlicher Stellen in der DNA, entspricht die Wirkung damit dem unfraktionierten Extrakt. Der zusätzliche Verdünnungsschritt beim unfraktionierten Extrakt war nötig, um nicht den sinnvollen Messbereich der Schweifintensität zu verlassen. Die genauere Betrachtung des DSM 12633 Extraktes zeigt mehrere kleine, unbekannte Peaks in den genotoxisch wirksamen Fraktionen 4 und 5 (Abb. 4-12).

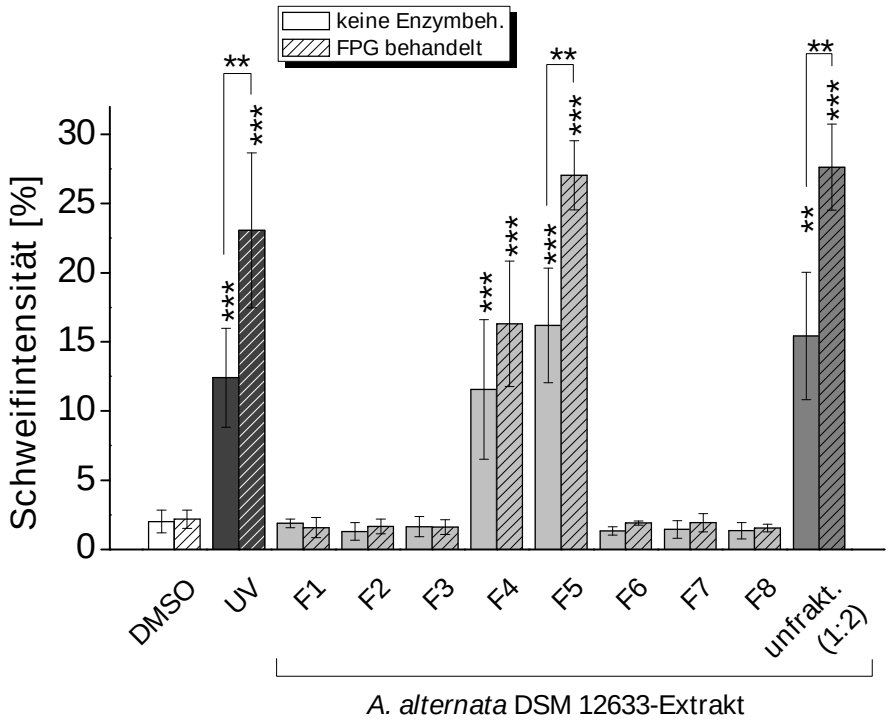


Abb. 4-11: Comet-Assay als Endpunkt genotoxizitätsgeleiteter Fraktionierung eines *A. alternata* DSM 12633-Extraktes (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz.; UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Die enthaltenen Toxinmengen betragen dabei etwa 19 µM AOH und 14 µM ALT in Fraktion 2, 54 µM TA in Fraktion 3 sowie 40 µM AME in Fraktion 5. Angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Inkubationen. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Sowohl die Höhe der Schäden durch Fraktion 5 als auch der signifikante Anstieg an FPG-sensitiven Stellen in der DNA ist nicht durch den enthaltenen Anteil an AME (40 µM) in Fraktion 5 zu erklären, sodass Peak 5.2 als Ursache für den beobachteten Anstieg naheliegt. Ebenso wurden die unbekannten Peaks in Fraktion 4 als Ursache für die beobachteten genotoxischen Effekte vermutet, da Fraktion 4 keines der untersuchten Toxine enthält.

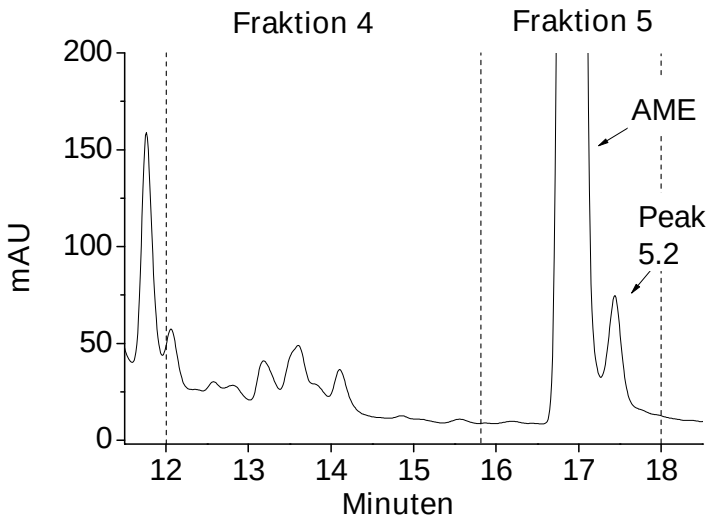


Abb. 4-12: Ausschnitt des HPLC-Chromatogrammes (λ = 278 nm) des zur Fraktionierung verwendeten *A. alternata* DSM 12633-Extrakts (Abb. 4-6) mit den genotoxisch wirksamen Fraktionen 4 und 5. Mehrere unbekannte Peaks (u. a. Peak 4.1 und 4.2) befinden sich in Fraktion 4, sowie ein weiterer unbekannter Peak direkt nach AME in Fraktion 5 (Peak 5.2).

4.5.2 Detailliertere Fraktionierung der Fraktionen 4 und 5

4.5.2.1 Verwendung des DSM 62010-Extraktes

Zur weiteren Eingrenzung der beobachteten genotoxischen Effekte des Alternariaextraktes wurden analog zusätzliche Fraktionierungsexperimente durchgeführt, wobei gezielt nur die unbekannten Peaks in Fraktion 4 und 5 sowie AME manuell am Detektorausgang aufgefangen wurden. Die saubere Abtrennung der einzelnen Peaks aus dem *A. alternata* DSM 12633-Extrakt wird durch einen starken Untergrund des komplexen Ethylacetat-Extraktes erschwert, wahrscheinlich aufgrund von Mitextraktion größerer Mengen an Lipiden, was die Trennleistung der HPLC-Säule verschlechtert. Eine denkbare Entfettung des Extraktes, z.B. durch Reextraktion mit Hexan oder THF (Harwig et al. 1979; Schade und King 1984) scheidet aus, da unbekannte lipophile Substanzen dabei ebenfalls entfernt werden können, wie dies auch für z.B. AME der Fall ist, wobei Verluste von etwa 30% der AME-Menge als Folge einer Entfettung beschrieben werden (Seitz et al. 1975; Seitz und Mohr 1976). Eigene Vorversuche zur Extraktentfettung führten ebenfalls zu deutlichen Verlusten der interessanten Peaks, insbesondere Peak 5.2, sodass davon abgesehen wurde. Es zeigte sich jedoch, dass der Extrakt von *A. alternata* DSM 62010 ebenfalls deutlich genotoxisch im Comet-Assay wirkte (siehe orientierende Messung in Abb. 4-10).

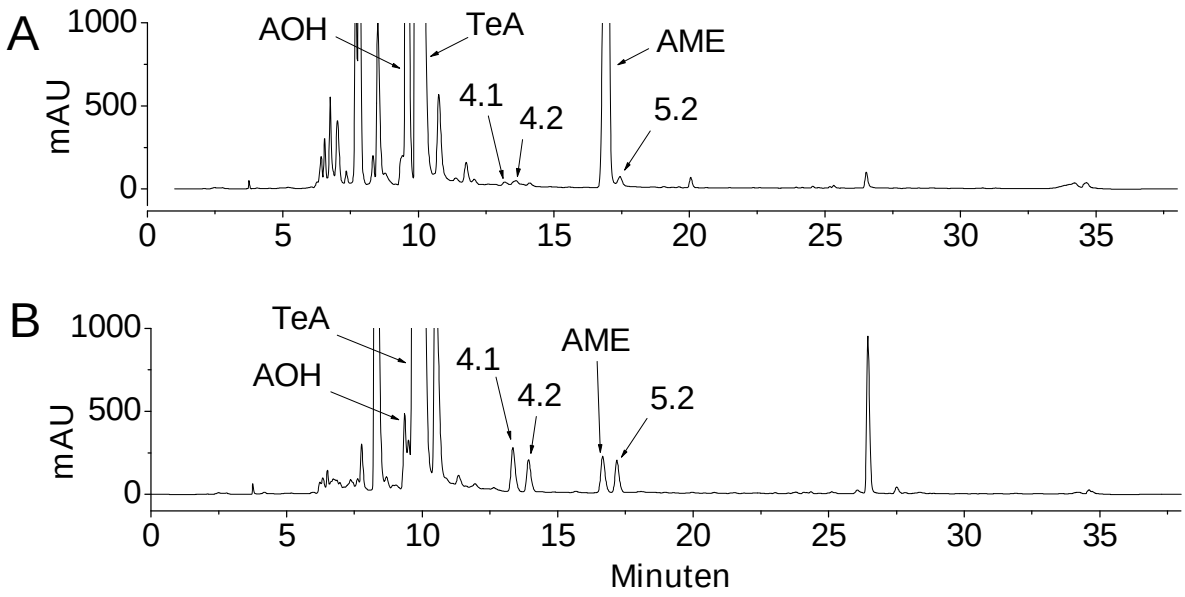


Abb. 4-13: Chromatogramme von HPLC-Trennläufen zur genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierung des (A) DSM 12633-Extraktes bzw. (B) DSM 62010-Extraktes (Injektion je 20 µl). Beim DSM 62010-Extrakt wird eine bessere Auftrennung der interessanten unbekannten Peaks 4.1, 4.2, und 5.2 sowie AME erreicht, insbesondere aufgrund des höheren Gehalts an diesen Peaks und des zugleich geringeren Anteils an AME.

Der *A. alternata* DSM 62010-Extrakt (Abb. 4-13 B) zeigte die gleichen unbekannten Peaks wie der DSM 12633-Extrakt (Abb. 4-13 A) in Bezug auf Retentionszeit und UV-Spektrum, allerdings in höherer Menge. Zusätzlich zum höheren Gehalt dieser unbekannten Peaks erlaubte der geringere Matrixhintergrund eine bessere HPLC-Trennung des Extraktes und damit sauberere Abtrennung dieser Peaks, weshalb der DSM 62010-Extrakt für die weiteren Fraktionierungsexperimente ausgewählt wurde. Analog zum DSM 12633-Extrakt ist die genotoxische Wirkung des DSM 62010-Extraktes ebenfalls in den Fraktionen 4 und 5 lokalisiert (Abb. 4-14 C). Wie aus der Überprüfung der Fraktionen 4 und 5 (Abb. 4-14 A bzw. B) ersichtlich, zeigten diese Fraktionen keine weiteren Peaks im UV-DAD. Auch beim DSM 62010-Extrakt zeigte im Comet-Assay keine der übrigen Fraktionen signifikant genotoxische Wirkung. Durch die enthaltenen Mengen an AOH (0,6 µM in Fraktion 2) bzw. TeA (128 µM in Fraktion 3) in den Inkubationsmedien wäre dies auch nicht zu erwarten. Analog zu allen bisherigen Beobachtungen war die Wirkung von Fraktion 5 bei weitem ausgeprägter als durch die enthaltene AME-Konzentration von 1,3 µM erklärt werden kann. Ebenso analog zur Fraktion 5 des DSM 12633-Extraktes war die signifikante Induktion FPG-sensitiver Stellen zu beobachten, die durch den AME-Gehalt nicht zu erwarten wäre.

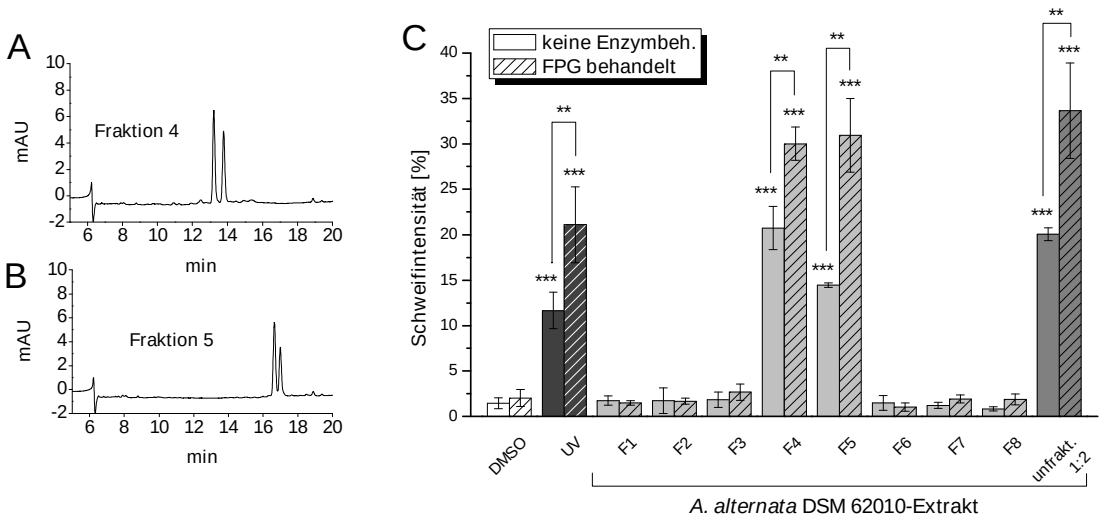


Abb. 4-14: Genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung eines *A. alternata* DSM 62010-Extraktes. HPLC-chromatogramme zur Kontrolle der genotoxisch aktiven Fraktionen (A) Peaks 4.1 und 4.2 in Fraktion 4 bzw. (B) AME und 5.2 in Fraktion 5. (C) Comet-Assay der einzelnen Fraktionen. Der unfraktionierte Extrakt wurde 1:2 verdünnt um im Messbereich zu bleiben. (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., 2 min UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.5.2.2 Einzelne Peaks in Fraktionen 4 und 5

Die detailliertere, genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung der Fraktionen 4 und 5, bei der selektiv nur die Peaks 4.1, 4.2, AME und 5.2 am Detektorausgang der HPLC aufgefangen wurden, bestätigte die Vermutung, dass diese unbekannten Peaks für die genotoxische Wirkung des Gesamtextraktes verantwortlich waren. Wie in Abbildung 4-15 dargestellt, führten alle drei unbekannten Peaks zu signifikanten DNA-Schäden im Comet-Assay, die denen des unfraktionierten Extraktes sowie denen der Fraktionen 4 bzw. 5 entsprachen. Insbesondere die signifikante Induktion FPG-sensitiver Stellen in der DNA wurde durch jeden der drei unbekannten Peaks verursacht. Der Beitrag des AME-Peaks (1,3 µM AME in der Inkubationslösung) zum Gesamteffekt von Fraktion 5 bestätigte sich als sehr gering und zeigte keinen Unterschied zwischen FPG-behandelten bzw. -unbehandelter Probe. Dies entspricht genau den bisherigen Beobachtungen (s.o.) sowie den Literaturwerten zu AME (Fehr et al. 2009). Bezüglich der Höhe der Schweifintensität in Prozent als Maß für die Höhe des genotoxischen Schadens an

der DNA soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Schweifintensität zwar mit dem Ausmaß der DNA-Schädigung zusammenhängt, dieser Zusammenhang jedoch schon definitionsgemäß nicht linear sein kann, insbesondere bei starker Schädigung mit Schweifintensitäten über 20% oder gar über 50%. Der signifikante Anstieg der Schweifintensität nach Behandlung der DNA mit dem Reparaturenzym FPG ist allerdings ein deutliches Zeichen für eine zusätzliche Schädigung von DNA-Basen neben den ohnehin detektierten DNA-Strangbrüchen (Collins et al. 1997).

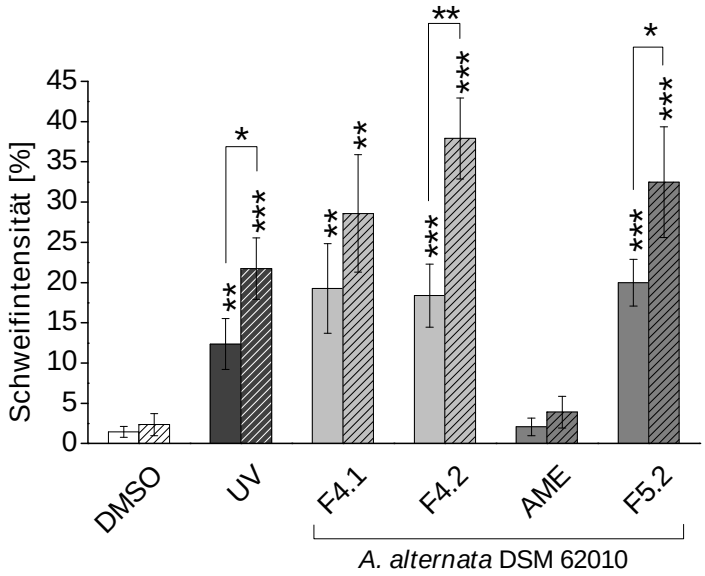


Abb. 4-15: Präzisere, genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung der Fraktionen 4 und 5 des *A. alternata* DSM 62010-Extraktes, bei denen gezielt nur die einzelnen, unbekannten Peaks und der AME-Peak (1,3 µM in der Inkubationslösung) getrennt aufgefangen wurden (1h Inkubation, HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., 2 min UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Bestimmungen. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.6 Isolierung und Identifizierung der unbekannten Peaks

Um eine eindeutige Identifizierung der unbekannten Peaksubstanzen zu ermöglichen und darüber hinaus ausreichende Mengen für toxikologische Versuche zu gewinnen, wurden größere Mengen Reiskultur von *Alternaria* extrahiert (200 g), wobei nach Evaporation des Extraktionsmittels Ethylacetat etwa 2 ml braunschwarzer, öliger Rückstand verblieben. Eine semipräparative HPLC-Methode wurde etabliert um die Substanzen der unbekannten Peaks aus diesem Rohextrakt zu gewinnen.

4.6.1 Vorreinigung des Rohextraktes mittels Festphasenextraktion (SPE)

Der Rohextrakt eignete sich nicht zur direkten Injektion in die semipräparative HPLC, da durch Verwendung von Ethylacetat als Extraktionsmittel ebenfalls größere Lipidmengen aus der Reiskultur mitextrahiert wurden. Der Rohextrakt von 200 g Reiskultur (stark bewachsen nach 21 Tagen Kulturdauer) bestand aus etwa 2 ml braunschwarzem Öl mit etwas braunschwarzem Feststoff. Ein einfacher Entfettungsschritt, beispielsweise durch Ausschütteln der Lipide aus wässrig-methanolischer Lösung des Extraktes mit z.B. Hexan (Harwig et al. 1979; Schade und King 1984) erwies sich als ungeeignet. Ein Großteil der Alternariatoxine, insbesondere aber der unbekannten Peaks, fanden sich aufgrund Ihrer Lipophilie dabei stets auf Seiten des Entfettungsmittels wieder.

Es wurde eine Methode zur Vorreinigung des öligen Rohextraktes mittels Festphasenextraktion erarbeitet. Problematisch war dabei stets der hohe Lipidgehalt des Extraktes, der die einsetzbare Menge an komplexem Extrakt pro Säule stark limitierte. Die besten Ergebnisse wurden mit Strata C18-E Gigatubes (60 ml, 10 g) erzielt, die mit wässrigem KH_2PO_4-Puffer (10 mM, pH 3,2 mit H_3PO_4 eingestellt) equilibriert wurden. Pro Säule wurden 200 µl des Extraktes in 1 ml Acetonitril (ACN) gelöst bzw. suspendiert, ultraschallbehandelt, mit 10 ml des Phosphatpuffers verdünnt, auf die Säule aufgebracht und mit weiteren 10 ml Phosphatpuffer das enthaltene ACN ausgespült. Mit je 10 ml Methanol : Phosphatpuffermischungen mit jeweils ansteigender Methanolkonzentration (10%, 20%, 30% ... 100%) wurde eluiert und aufgefangen bzw. verworfen. Die in den einzelnen Eluatfraktionen enthaltenen Toxine sind in Tabelle 4-3 angegeben. Die ersten 9 Fraktionen enthielten dabei keine der interessanten Toxine und wurden verworfen. Der Hauptteil der Peaks 4.1 und 4.2 war in Fraktion 10 (100% Methanol) enthalten. Während des anschließenden Trockensaugens fand sich vor allem AME im Eluat (Fraktion 11); Peak 5.2 eluierte mit reinem Methanol nach dem Trocknungsschritt, allerdings nur unvollständig. Selbst nach mehreren Elutionsschritten mit Methanol eluierte immer noch Peak 5.2. Aufgrund der sich daraus ergebenden Substanzverluste und großen Elutionsvolumina eignete sich diese Methode weniger gut zur Vorreinigung von Peak 5.2, eine Vorreinigung der Peaks 4.1 und 4.2 war allerdings möglich.

Tab. 4-4: Fraktionierungsschema der SPE-Methode zur Extraktvorreinigung.

Eluat-fraktion	Methanol	KH_2PO_4-Puffer	Enthaltene Toxine
1	10%	90%	verworfen
2	20%	70%	verworfen
...	...	...	verworfen (TeA)
8	80%	20%	verworfen
9	90%	10%	AOH (wenig Peak 4.1)
10	100%	0%	Peak 4.1, Peak 4.2
11	-	-	AME (wenig Peak 5.2)
12	100%	0%	Peak 5.2 (wenig AME)
13	100%	0%	Peak 5.2
14	100%	0%	Peak 5.2

Eine solche Vorreinigung durch SPE ist vorteilhaft für die semipräparative HPLC-Trennung, wenn beispielsweise hohe Extraktgehalte an TeA die Trennleistung stark verschlechtern würden, da die enthaltene TeA mit den verworfenen Eluatfraktionen abgetrennt wird. Die SPE-Vorreinigung ist jedoch kosten- und arbeitsintensiv und macht einen weiteren Einengungsschritt vor der Injektion in die HPLC notwendig. Daher wurde später eine einfachere Reextraktionsmethode erarbeitet, mit der ebenfalls gute Erfolge erzielt wurden (siehe Abschnitt 4.10.1).

4.6.2 Präparation der unbekannten Peaks mittels semipräparativer HPLC

Die durch SPE vorgereinigten Fraktionen eines *A. alternata* DSM 62010-Extraktes wurden auf einem Varian Dynamax HPLC-System mit PrepStar SD-1 Binärgradientenpumpen und Varian ProStar UV-Detektor auf einer Varian Microsorb 100-5 C18 Säule (250 x 21,4 mm) getrennt. Als Trennprogramm wurde ein Stufengradient zwischen Wasser (1% Ameisensäure) und Methanol verwendet, wobei die eigentliche Trennung der drei interessanten Peaks bei konstant 66% Methanol erfolgte. Die Retentionszeit von Peak 5.2 verschob sich dabei zwi-

schen die der Peaks 4.1 und 4.2. Diese veränderte Peakreihenfolge ließ sich durch keine Änderung des Trennprogramms aufheben, und zeigte sich auch bei der Verwendung anderen Säulenmaterials (Phenomenex Luna C18(2), s.u.) wenn Methanol-Wasser-Gemische als mobile Phase verwendet wurden. Da die eingesetzte SPE-Fraktion Nr. 10 nur einen sehr geringen Gehalt an Peak 5.2 aufwies, wurde eine gute Trennung der Peaks 4.1 und 4.2 dadurch zusätzlich erleichtert. Insgesamt wurden 1,6 ml (entspr. ca. 160 g Reiskultur) Rohextrakt mittels 8 SPE-Gigatubes vorgereinigt und die vereinigten SPE-Fraktionen Nr. 10 (Peak 4.1 und 4.2) bis auf etwa 1 ml eingeengt und in 10 ml Methanol aufgenommen. Dabei bildete sich etwas brauner Feststoff, der auch durch Ultraschallbehandlung nicht mehr völlig in Lösung gebracht werden konnte. Dieser wurde abzentrifugiert und die stark gelb gefärbte Lösung in die semipräparative HPLC-injiziert (2 ml pro Lauf).

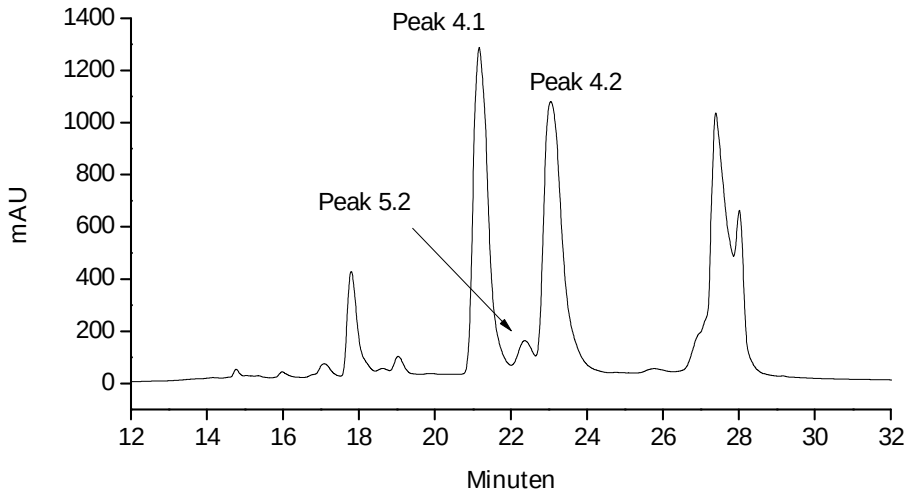


Abb. 4-16: Semipräparativer HPLC-Lauf zur Isolierung der Peaks 4.1 und 4.2 aus der SPE-Fraktion Nr. 10 (100% Methanol) eines DSM 62010-Extraktes. (Säule: Varian Microsorb 100-5 C18 (250 x 21,4 mm), Stufengradient Wasser : Methanol, eigentliche Trennung bei 66% Methanol, 2ml Injektionsvolumen (entspr. 32 g verschimmeltem Reis))

Die Fraktionen der einzelnen Peaks wurden manuell am Detektorausgang unter ständiger Kontrolle des Detektorsignals gesammelt. Abbildung 4-16 zeigt das Chromatogramm eines Trennlaufes der SPE-Fraktion Nr. 10 (v. A. Peaks 4.1 und 4.2). Analog wurden die vereinigten SPE-Fraktionen Nr. 12-14 eingeengt und in Methanol aufgenommen, wobei jedoch noch mehr brauner, unlöslicher Feststoff beobachtet wurde. Die vereinigten Peakfraktionen der HPLC-Trennläufe ergaben etwa 250 ml leicht gelb gefärbten Eluates für Peak 4.1, etwa 320 ml etwas intensiver gelben Eluats für Peak 4.2 und etwa 180 ml eines schwach gelben Eluates für Peak 5.2. Diese wurden nochmals über je eine SPE-Säule gegeben, Reste des Laufmittels mit des-

tilliertem Wasser ausgespült und die Säulen eine Stunde lang trockengesaugt. Nach Elution der Toxine mit Methanol wurde das Eluat gefriergetrocknet um eine anschließende Untersuchung der Struktur mittels NMR zu ermöglichen. Durch die Trocknung wurde eine kleine Menge (geschätzt etwa 3 - 5 mg) eines leuchtend gelben Feststoffes aus der Peak 4.1-Fraktion gewonnen, der gut in $CDCl_3$ löslich war. Bei den Eluaten der Peaks 4.2 bzw. 5.2 führte die Trocknung hingegen jeweils zu braunschwarzem Feststoff, von geringerer Menge, der unlöslich in $CDCl_3$ war; das Lösemittel zeigte überdies keine Gelbfärbung mehr. Spätere Experimente zur Präparation dieser Substanzpeaks bestätigten diese Beobachtungen, die eine Folge geringer Stabilität bei der Trocknung waren.

4.7 Identifikation von Peak 4.1 als Altertoxin II

4.7.1 UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.1 bzw. ATX II

Das UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.2 wurde mit dem UV-DAD des HPLC-Systems ermittelt. Massenspektrometrische Vorversuche (LC-MS der Eluatfraktionen während der Präparation) ließen eine Molekülmasse von 350 g/mol vermuten, was der Molekülmasse von Altertoxin II entsprach. Der Vergleich des UV-Absorptionsspektrums von Peak 4.1 in Methanol (Abb. 4-17), entsprach genau den Literaturwerten für ATX II in Methanol (Stack et al. 1986), sowohl bezüglich der Wellenlängen der Absorptionsmaxima als auch deren relativer Intensität (Tab. 4-5).

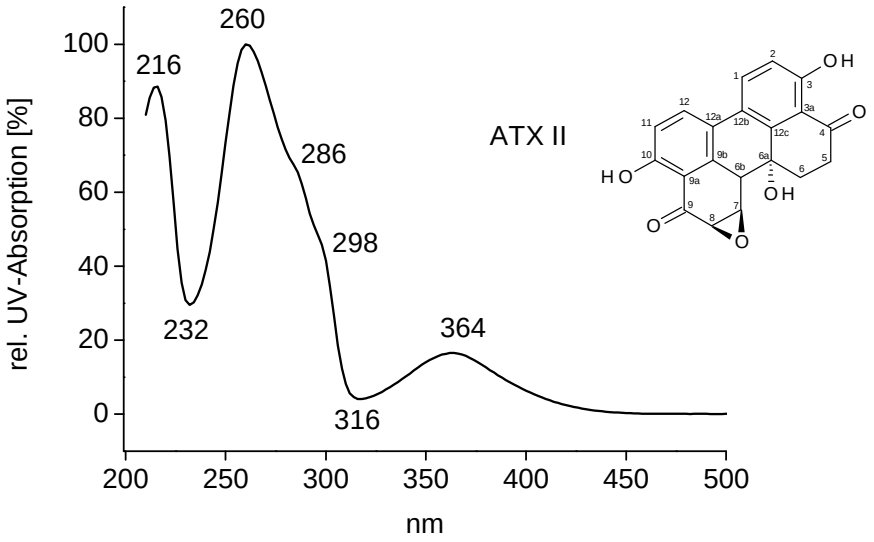


Abb. 4-17: UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.1 (ATX II) aufgenommen in Methanol : Wasser (60:40, v:v) mittels UV-DAD des HPLC-Systems. Die Signalhöhe des Spektrums wurde auf das höchste Maximum (100% bei 260 nm) normalisiert, um den Vergleich mit den Literaturwerten (Stack et al. 1986) zu erleichtern.

Tab. 4-5: Relative Intensitäten der Maxima des UV-Absorptionsspektrums von Peak 4.1 und Literaturwerte für ATX II (Stack et al. 1986). Die Intensitäten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das höchste Maximum bei 260 nm normalisiert. (sh: shoulder-Maximum).

	Relative Absorption [%]	
Wellenlänge [nm]	Peak 4.1	ATX II (Stack et al. 1986)
216	85	85
260	100	100
286 (sh)	64	54
298 (sh)	45	43
364	17	17

4.7.2 Ermittlung der akkuraten Masse mittels UHR-ESI-TOF-MS

Zur Ermittlung der Summenformel von Peak 4.1 wurde die akkurate Molekülmasse mittels ultrahochauflösender Flugzeitmassenspektrometrie mit Elektrosprayionisation (UHR-ESI-TOF-MS) auf einen MaXis clasic (Bruker) bestimmt. Die schonende Art der Ionisation eignete sich für diesen Zweck gut, da eine Fragmentierung der Moleküle möglichst verhindert werden sollte um das Masse/Ladungsverhältnis des Pseudomolekülions bestimmen zu können. Eine Ionisierungsspannung von 5 kV wurde verwendet und die präparierte Peaksubstanz 4.1 (gelöst in Methanol : ACN, 1 : 100, v : v) direkt injiziert. Im negativen Messmodus zeigen sich insbesondere die Massen 331,0599 m/z, 349,0703 m/z und 385,0469 (Abb. 4-18). Die gemessene Masse 349,0703 m/z entspricht dabei dem $[M-H]^-$-Ion des ATX II-Moleküls (349,0718 m/z berechnet). Die Masse 331,0599 entspricht dem $[M-H_2O-H]^-$-Ion des ATX II-Moleküls (331,0612 m/z berechnet). Bei der Masse 385,0469 m/z handelt es sich um ein Chloridaddukt $[M+Cl]^-$, das höchstwahrscheinlich eine Folge einer NaCl-Zugabe zur Verbesserung der Phasentrennung bei der Extraktion der Eluatfraktionen war. Diese Werte bestätigen die vermutete Summenformel $C_{20}H_{14}O_6$ (ATX II) für Peak 4.1.

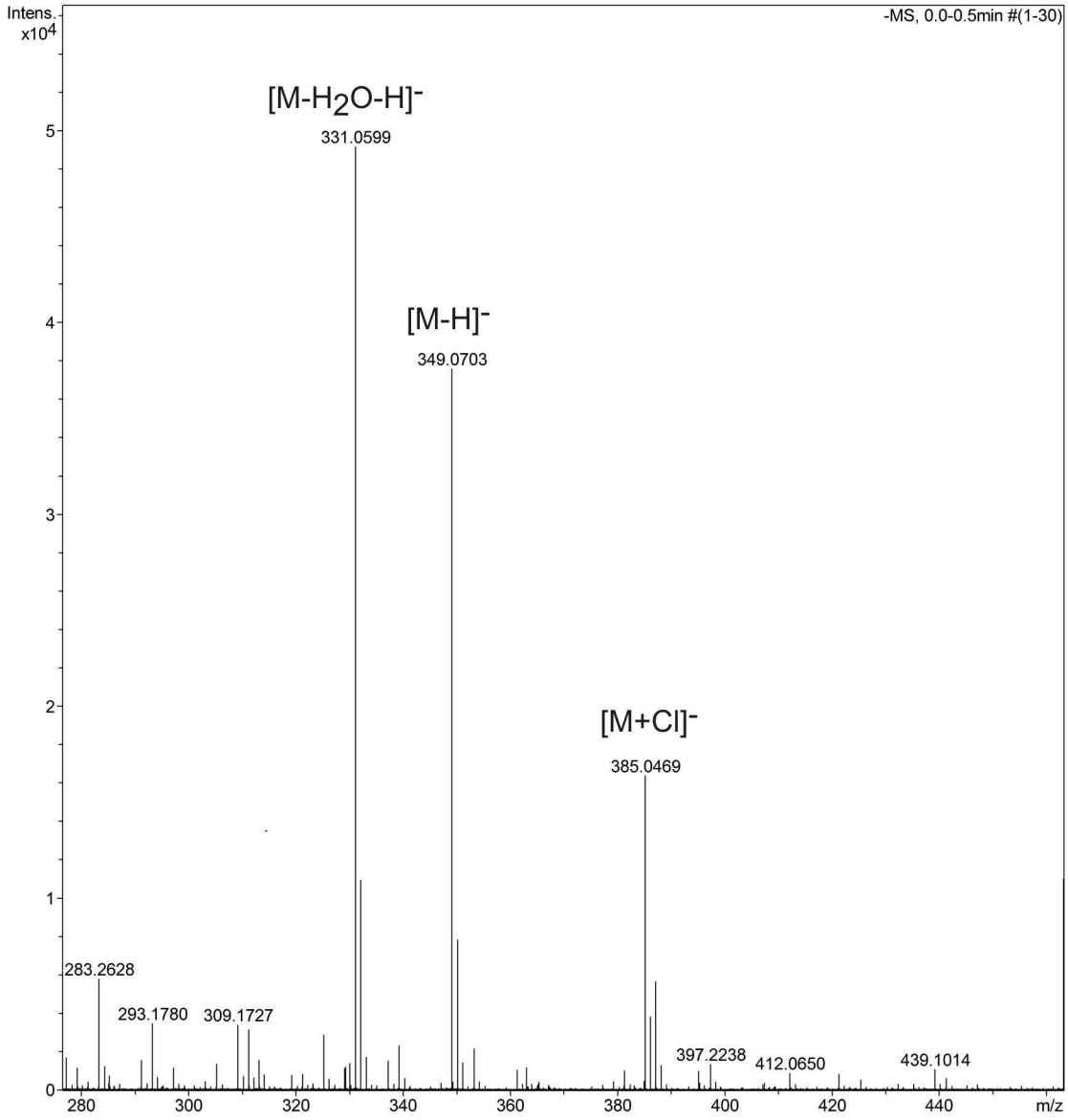


Abb. 4-18: Ermittlung der akkuraten Masse von Peak 4.1 (ATX II) mittels UHR-ESI-TOF-MS (Bruker MaXis classic). Direkteinspritzung mittels Spritzenpumpe (3 µl/min) des Toxins aus der HPLC-Präparation (gelöst in Methanol : Acetonitril, 1 : 100, v : v, ca. 1 µg/ml). Kapillarpannung: -5000 V.

4.7.3 Identifikation mittels NMR

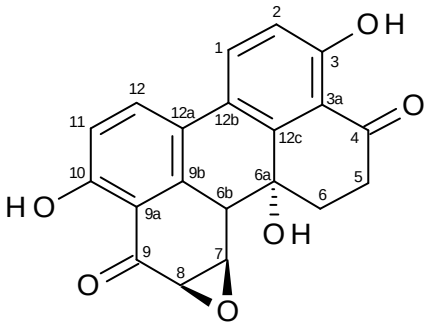
Anhand von 1- und 2-D NMR-Spektroskopie konnte die Substanz (Peak 4.1) eindeutig als Altertoxin II identifiziert werden. Die Werte der ^{1}H- und ^{13}C-Verschiebungen entsprachen genau den Literaturwerten für ATX II (Stack et al. 1986) und sind in Abbildung 4-19 dargestellt, wobei die Nummerierung der Kohlenstoffatome analog gewählt wurde. Die Verschiebungen der Kohlenstoffatome C(5) und C(6) sind dabei möglicherweise austauschbar. Die Kohlenstoffatome C(1) und C(2) sowie C(9b) und C(12c) wurden mittels 2D NMR Spektroskopie zugeordnet und sind invers zu den Literaturwerten (Stack et al. 1986), wobei sie nahezu gleiche, chemische Verschiebungen zeigten. Dies könnte eine Folge geringerer Auflösung der seinerzeit verwendeten Geräte sowie der Tatsache sein, dass keine "heteronuclear single quantum coherence" (gHSQC) sowie "heteronuclear multiple bond correlation" (gHMBC) Spektroskopiemessungen durchgeführt wurden. Allerdings würde selbst eine vertauschte Zuordnung der Kohlenstoffatome C(1) und C(12) beziehungsweise C(9b) und C(12c) keinen Einfluss auf die identifizierte Molekülstruktur haben.

Die NMR-Experimente und die Zuordnung der Signale wurden von Dr. Timo Stark aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Hofmann, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München durchgeführt.

Die Substanz von Peak 4.1 konnte somit anhand ihres UV-Spektrums, der Bestimmung der akkuraten Molekülmasse und der 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie eindeutig als Altertoxin II (ATX II) identifiziert werden. Ebenso war an den NMR-Spektren zu erkennen, dass das ATX II in guter Reinheit vorlag. Die beschriebene semipräparative HPLC-Methode erlaubte folglich eine gute Abtrennung von ATX II von den übrigen unbekannten Peaks 4.2 sowie 5.2.

A

C atom[a]	δ[b]	DEPT[c]	heteronuclear ^{1}H, ^{13}C connectivity[d] via ^{1}J (C,H)	via $^{2,3}J$ (C,H)
C(6) [e]	32.11	CH_2	6	5ax
C(5) [e]	33.27	CH_2	5	6ax, 6eq
C(6b)	45.06	CH	6b	7, 8, 12, 6ax
C(8)	52.78	CH	8	6b, 7
C(7)	55.73	CH	7	8, 6b
C(6a)	68.29	C	-	6eq, 5ax, 5eq, 6b, 1, 7
C(3a)	113.52	C	-	1, 2, 5eq
C(9a)	114.58	C	-	8, 6b, 11, 12
C(11)	118.01	CH	11	6b
C(2)	119.86	CH	2	-
C(12b)	122.41	C	-	12, 2
C(12a)	123.89	C	-	1, 11, 6b, 7, 2
C(1)	132.57	CH	1	-
C(12)	132.90	CH	12	6b
C(9b)	133.54	C	-	6b, 7, 12, 11
C(12c)	138.79	C	-	1, 2, 6b, 6eq
C(3)	162.65	C	-	1, 2
C(10)	163.33	C	-	6b, 11, 12
C(9)	196.62	C	-	6b, 7, 11
C(4)	204.16	C	-	2, 5, 6



B

H at relevant C atom[f]	δ[g]	I[h]	M[h]	J [Hz][h]	homonuclear ^{1}H, ^{1}H connectivity[i]
H-C(6ax)	2.41	1	dt	3.80, 13.60	6eq, 5ax, 5eq
H-C(5eq)	2.83	1	m	14.30	6ax, 6eq, 5ax
H-C(6eq)	2.89	1	m	13.45	6ax, 5eq, 5ax
H-C(5ax)	3.26	1	m	4.0, 4.80, 14.20	6ax, 6eq, 5eq
H-C(6b)	3.55	1	s	-	-
H-C(8)	3.71	1	d	3.26	7
H-C(7)	4.23	1	d	3.40	8
H-C(11)	7.06	1	d	8.74	12
H-C(2)	7.12	1	d	8.83	1
H-C(12)	7.86	1	d	8.79	11
H-C(1)	7.91	1	d	8.85	2

Abb. 4-19: (A) Zuordnung der ^{13}C-NMR Signale (125 MHz, $CDCl_3$, 25°C) von Peak 4.1. [a]Nummerierung der C-Atome ensprechend Stack et al. (1986). [b]Die ^{13}C Verschiebungen bezogen auf TMS. [c]DEPT-135 Spectroskopie. [d]Zuordnung basierend auf gHSQC (^{1}J) und gHMBC ($^{2,3}J$) Messungen. [e]Zuordnung möglicherweise invertierbar. (B) Zuornung der ^{1}H-NMR Signale (500 MHz, $CDCl_3$, 25°C) von Peak 4.1. [f]Nummerierung der C-Atome ensprechend Stack et al. (1986). [g]Die ^{1}H Verschiebungen bezogen auf TMS. [h]Anhand des 1D-Spektrums ermittelt. [i] homonukleäre ^{1}H,^{1}H Konnektivitäten mittels obeserved g-COSY Messung. Messung und Zuordnung wurden von Dr. Timo Stark aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thomas Hofmann, Lehrstuhl für Lebensmittelchemie und molekulare Sensorik, Technische Universität München durchgeführt.

4.8 Zuordnung von Peak 4.2 zu Stemphyltoxin III

Der Peak 4.2 zeigte ein UV-Absorptionsspektrum, das dem von ATX II ähnlich war (Abb. 4-20).

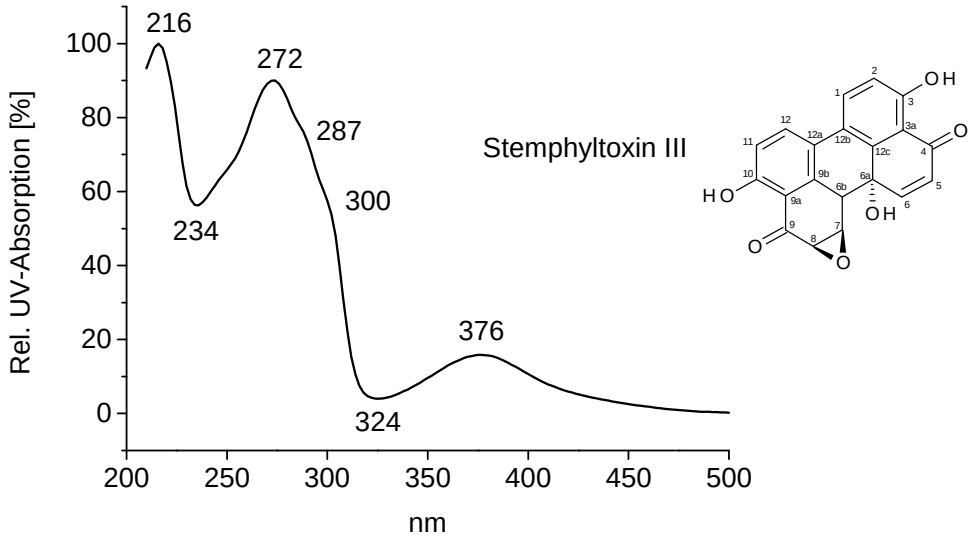


Abb. 4-20: UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.2 (Stemphyltoxin III) aufgenommen in Methanol : Wasser (60:40, v:v) mittels UV-DAD. Die Signalhöhe des Spektrums wurde auf die Wellenlänge des höchsten Maximums (100% bei 216 nm) normalisiert, um den Vergleich mit den Literaturwerten (Stack und Mazzola 1989) zu erleichtern.

Das Hauptmaximum lag allerdings bei 216 nm, das zweite Maximum lag mit 272 nm um 12 nm höher als bei ATX II. Ebenso lag das Maximum bei 376 nm um 12 nm höher als das entsprechende Maximum von ATX II, während die beiden schwach ausgeprägten Schulter-Maxima bei beiden Toxinen die nahezu gleichen Wellenlängen aufweisen. Das UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.2 entsprach somit sowohl bezüglich der Wellenlängen der Absorptionsmaxima als auch deren relativer Intensität den Literaturwerten für Stemphyltoxin III (Stack und Mazzola 1989), einem weiteren Perylenchinontoxin, das sich von Altertoxin II lediglich durch eine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6 unterscheidet.

Tab. 4-6: Relative Intensitäten der Maxima der UV-Absorptionsspektren von Peak 4.2 und den Literaturwerten für Stemphyltoxin III (Stack und Mazzola 1989). Die Intensitäten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf das höchste Maximum bei 216 nm normalisiert. (sh: shoulder-Maximum).

	Relative Absorption [%]	
Wellenlänge [nm]	Peak 4.2	Stemphyltoxin III (Stack und Mazzola 1989)
216	100	100
272	90	85
287 (sh)	77	69
300 (sh)	57	57
376	16	16

Die berechnete akkurate Masse des Stemphyltoxin III-Moleküls liegt daher um 2 Wasserstoffatome niedriger als die des ATX II-Moleküls, nämlich bei 348,063 g/mol. Aufgrund der beobachteten geringeren Stabilität der Substanz von Peak 4.2 bei der Trocknung, auf die im Abschnitt 4.10 näher eingegangen wird, war eine NMR-Untersuchung der Struktur nicht möglich. Aufgrund von Mangel an Probenmaterial konnte keine Bestimmung der akkuraten Molekulmasse von Peak 4.2 mehr durchgeführt werden, um die vermutete Summenformel $C_{20}H_{12}O_6$ zu bestätigen. Im Zuge der semipräparativen HPLC wurden jedoch orientierende MS-Messungen verschiedener Eluatfraktionen durchgeführt, wobei das verwendete Tripel-Quad-Gerät (TSQ Vantage, Thermo Scientific) jedoch keine Bestimmung der akkuraten Molekülmasse erlaubte. Das MS-Spektrum (Abb. 4-21) zeigte dabei die Masse 349 m/z, was dem $[M+H]^+$-Peak von Stemphyltoxin III entspricht, sowie die Masse 331 m/z, die ebenfalls für Stemphyltoxin III gefunden wird (Stack und Mazzola 1989) und vermutlich von einer Wasserabspaltung herrührt. Das stärkste Signal im Massenspektrum liegt allerdings bei 177 m/z, möglicherweise als Folge von Fragmentierung. Die gleiche Summenformel von $C_{20}H_{12}O_6$ besitzt neben Stemphyltoxin III allerdings auch das Perylenchinontoxin Altertoxin III, das keine Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen 5 und 6 besitzt, dafür jedoch eine Epoxyfunktion an den C-Atomen 1 und 2 (siehe Abb. 2-1). Da bei der HPLC Peak 4.2 sehr nah bei ATX II eluierte, die gesammelten Fraktionen ebenfalls gelbgefärbt waren, das UV-Absorptionsspektrum von Peak 4.2 genau mit den Literaturwerten für Stemphyltoxin III übereinstimmte und außerdem das deutlich verschiedene UV-Absorptionsspektrum von ATX III

dem Peak 5.2 zugeordnet werden konnte (s.u.) wird vermutet, dass es sich bei Peak 4.2 um Stemphyltoxin III handeln könnte.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die vermutete Identität von Peak 4.2 zu klären, beispielsweise mittels MS/MS oder NMR, die jedoch aufgrund von Materialmangel nicht mehr durchgeführt werden konnten.

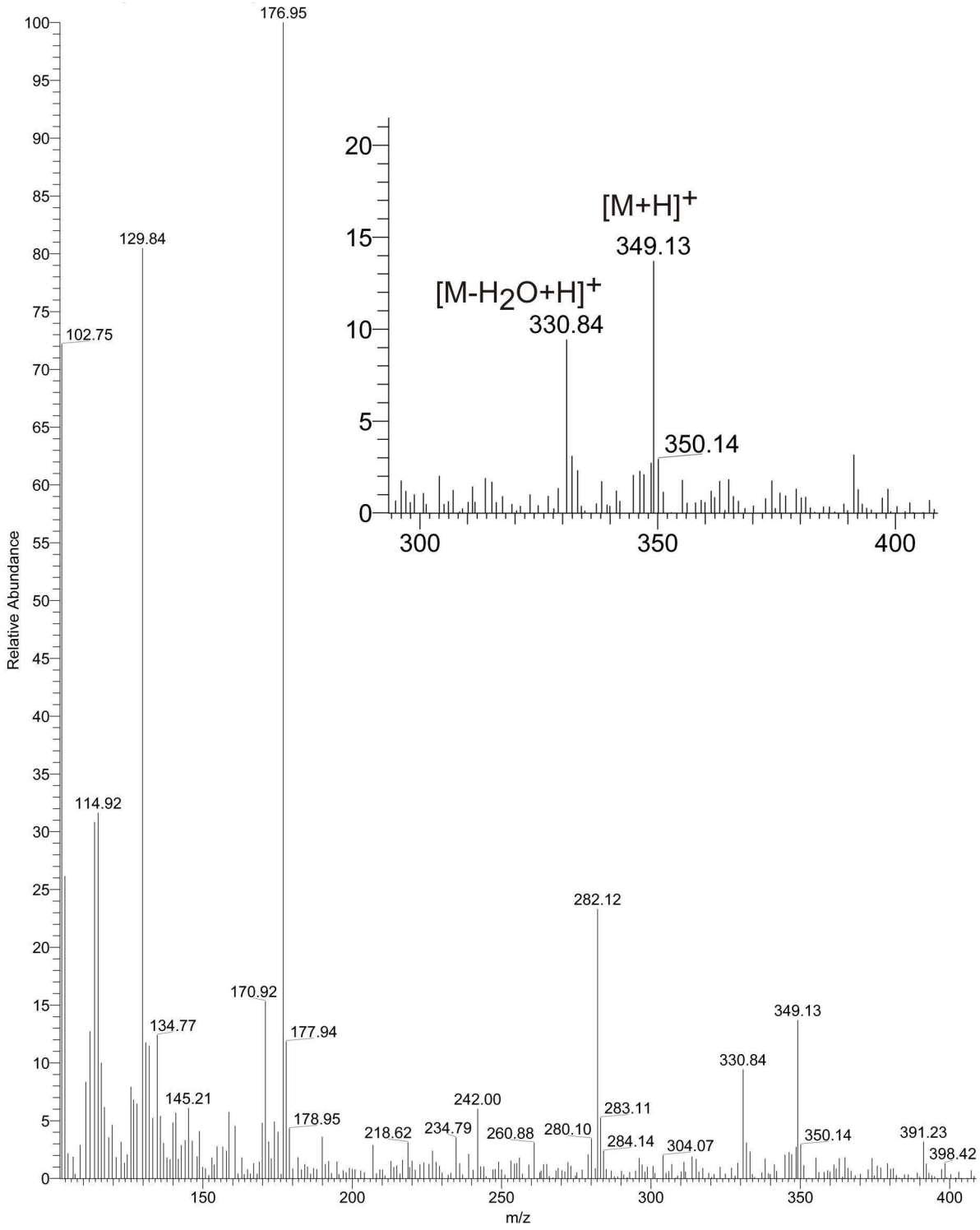


Abb. 4-21: Orientierende Messung: Massenspektrogramm des Peaks 4.2 (vermutlich Stemphyltoxin III) mit vergrößertem Ausschnitt des Bereiches um 300 - 400 m/z. (Aufgenommen mit TSQ Vantage, Thermo Scientific, Direkteinspritzung des präparierten Toxins in ACN)

4.9 Mögliche Zuordnung von Peak 5.2 zu Altertoxin III

Das UV-Absorptionsspektrum von Peak 5.2 legte nahe, das es sich dabei um Altertoxin III handeln könnte (Stack et al. 1986). Die Wellenlängen der Absorptionsmaxima sowie ihre relativen Verhältnisse zueinander entsprachen den Literaturwerten für ATX III (Abb. 4-22 und Tab. 4-7).

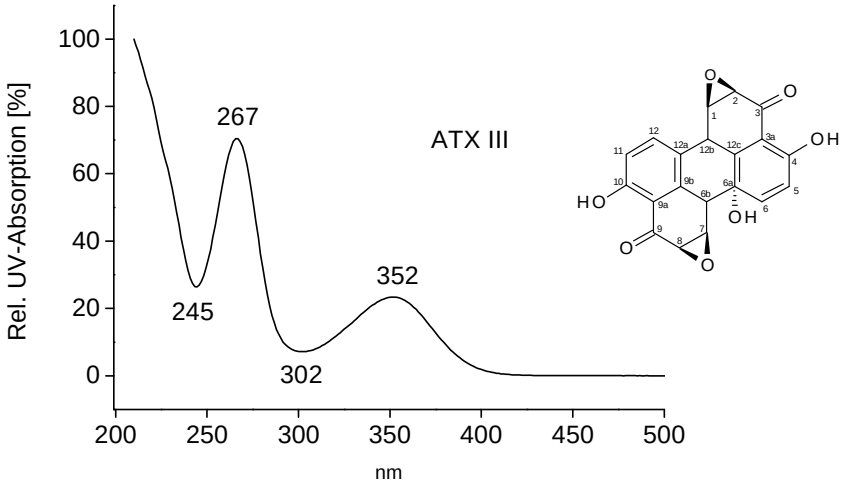


Abb. 4-22: UV-Absorptionsspektrum von Peak 5.2 (ATX III) aufgenommen in Methanol : Wasser (60:40, v:v) mittels UV-DAD des HPLC-Systems. Die Signalhöhe des Spektrums wurde auf das höchste Maximum normalisiert (100% bei 210 nm), um den Vergleich mit den Literaturwerten (Stack et al. 1986) zu erleichtern.

Tab. 4-7: Relative Intensitäten der Maxima der UV-Absorptionsspektren von Peak 5.2 und den Literaturwerten für ATX III (Stack und Mazzola 1989). Die Intensitäten wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf die UV-Absorption bei 210 nm normalisiert.

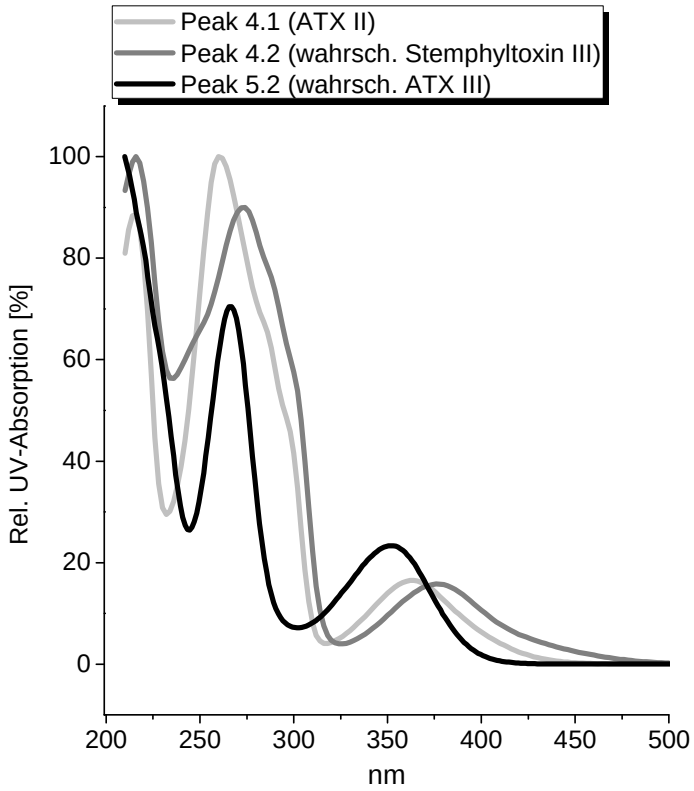
	Relative Absorption [%]	
Wellenlänge [nm]	Peak 5.2	ATX III (Stack et al. 1986)
210	100	100
267	70	70
352	23	27

Eine Untersuchung der Molekülstruktur mittels NMR zur Bestätigung der Identität als ATX III war im Fall von Peak 5.2 nicht möglich, da die zur Analyse notwendigen Mengen von einigen Milligramm aufgrund eines Stabilitätsproblems bei der Trocknung nicht präpariert wer-

den konnten (siehe Absatz 4.10). Weiterführende Untersuchungen, beispielsweise mittels LC-MS/MS, sind daher nötig um Peak 5.2 als ATX III identifizieren zu können.

Direkter Vergleich der UV-Absorptionsspektren

Insgesamt stimmten die UV-Absorptionsspektren von Peak 4.1, Peak 4.2 und Peak 5.2, die in 60% Methanol aufgezeichnet wurden mit den Literaturwerten für ATX II, Stemphyltoxin III und ATX III überein. ATX III und Stemphyltoxin III besitzen jedoch die gleiche Summenformel $C_{20}H_{12}O_6$, sodass eine Unterscheidung und Zuordnung nur anhand der akkuraten Molekülmassen nicht möglich ist. Die UV-Absorbtionsspektren dieser beiden Perylenchinontoxine sind in Bezug auf die Wellenlängen und Intensitätsverhältnisse ihrer jeweiligen Absorptionsmaxima jedoch deutlich verschieden. Der direkte Vergleich der UV-Spektren (Abb. 4-23) verdeutlicht deren Unterschiede die eine mögliche Zuordnung der Peaks 4.2 bzw. 5.2 zu Stemphyltoxin III bzw. ATX III erleichtern.



Wellenlänge [nm]	Relative Absorption [%] Peak 4.1	ATX II (Stack et al. 1986)
216	89	85
260	100	100
286 (sh)	65	54
298 (sh)	46	43
364	17	17

Wellenlänge [nm]	Peak 4.2	Stemphyltoxin III (Stack und Mazzola 1989)
216	100	100
272	90	85
287 (sh)	77	69
300 (sh)	58	57
376	16	16

Wellenlänge [nm]	Peak 5.2	ATX III (Stack et al. 1986)
210	100	100
267	70	70
352	23	27

Abb. 4-23: Direkter Vergleich der gemessenen UV-Absorptionsspektren der Peaks 4.1, 4.5 und 5.2, aufgenommen in Methanol mit den Literaturwerten für ATX II, ATX III (Stack et al. 1986) und Stemphyltoxin III (Stack und Mazzola 1989). (sh: shoulder-Maximum).

4.10 Präparation größerer Toxinmengen

Die Präparation von Milligrammmengen der drei Toxine ATX II, ATX III und Stemphyltoxin III aus Alternariaextrakt wurde angestrebt um insbesondere ausreichende Mengen für toxikologische Versuche zu gewinnen. Außerdem sollten die gewonnenen Mengen zur Bestätigung der Struktur von Peak 4.2 (vermutlich Stemphyltoxin III) sowie Peak 5.2 (möglicherweise ATX III) durch NMR-Analysen ausreichen. Dazu wurde ebenfalls eine semipräparative HPLC-Methode verwendet, die jedoch an das zu dieser Zeit zur Verfügung stehende semipräparative HPLC-System angepasst und optimiert wurde (Knauer Smartline 1000 Pumpe (LPG), Knauer Manager 5000 und Agilent G1315D UV/VIS-DAD mit ClarityChrom Steuerungssoftware). Die verwendete Säule war analog zur analytischen Säule eine Luna C18(2) von Phenomenex, jedoch im semipräparativen Format 250 x 21,2 mm. Aufgrund des hohen Laufmittelverbrauches war die Verwendung eines ACN-Gradienten zur Trennung aus Kostengründen nicht möglich, sodass eine Trennmethode mit Methanol erarbeitet wurde.

4.10.1 Vorreinigung des komplexen Extraktes durch Ausschütteln

Der komplexe Ethylacetatextrakt der Reiskulturen von *Alternaria* bestand nach Entfernung des Ethylacetats durch Evaporierung aus braunschwarzem Öl (etwa 1% der Menge an extrahiertem, verschimmeltem Reis), das nicht direkt zur Injektion genutzt werden konnte. Nach einer Entfettung des öligen Extraktes ließen sich die interessanten Peaks jedoch direkt mittels semipräparativer HPLC aus dem Toxingemisch abtrennen, weshalb auf die kosten- und arbeitsintensive Vorreinigung mittels SPE verzichtet werden konnte. Es wurde daher eine Methode erarbeitet, um schnell und kostengünstig vom öligen Rohextrakt zu einem entfetteten, toxinhaltigen Extrakt zu gelangen, der sich zur Injektion in die semipräparative HPLC eignete und die interessanten Toxine enthielt. Zur Ermittlung geeigneter Extraktionsbedingungen des öligen Rohextraktes wurden in einer orientierenden Messung 100 µl des Extrakts von *A. alternata* DSM 62010 mehrmals hintereinander mit jeweils 200 µl Methanol-Wasser-Gemischen ansteigender Konzentration extrahiert und die gewonnenen, wässrig-methanolischen Extrakte mittels HPLC hinsichtlich ihres Toxingehaltes untersucht. Wie in Abbildung 4-24 ersichtlich ließ sich der Hauptteil an AOH und TeA bereits mit Methanolkonzentrationen von etwa 30 - 40% aus dem öligen Extrakt extrahieren. Für ATX II und das vermutliche Stemphyltoxin III wurden dazu etwas höhere Konzentrationen benötigt, der Hauptteil dieser Toxine ließ sich mit einer Methanolkonzentration von 60% extrahieren.

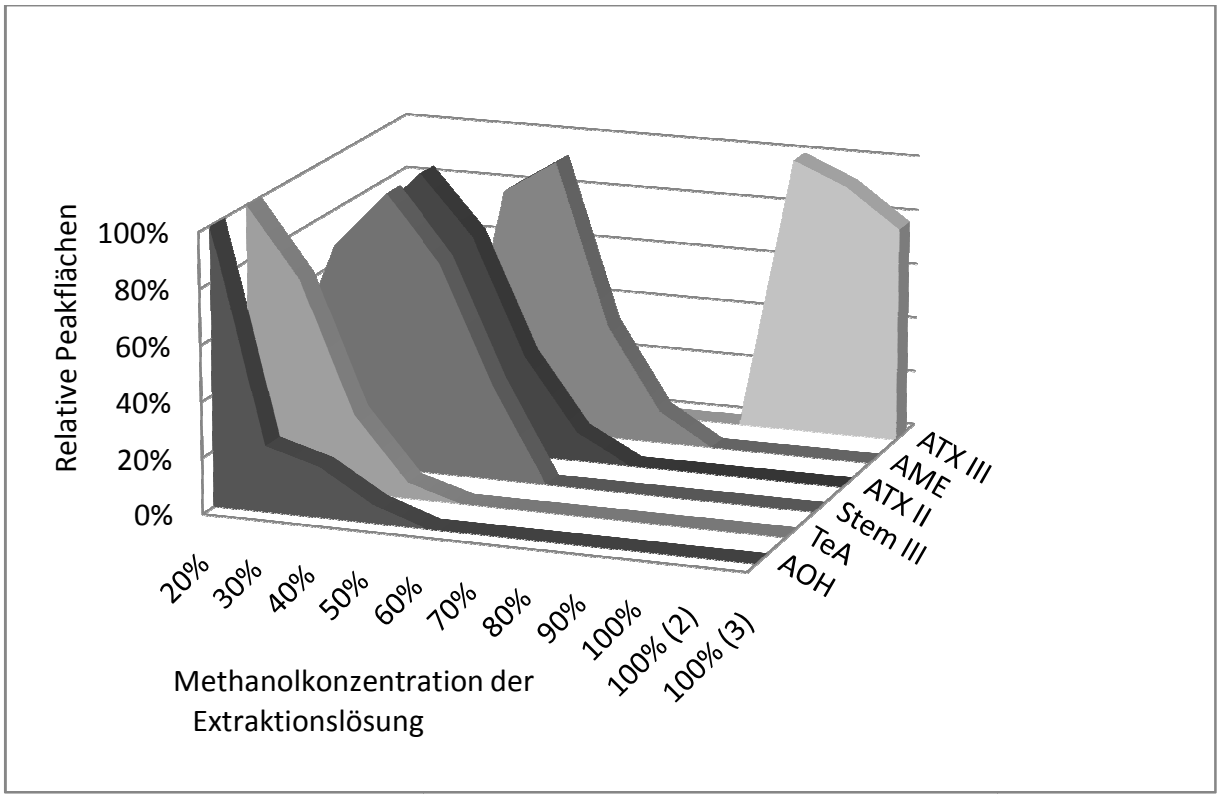


Abb. 4-24: Orientierende Messung zur Ermittlung geeigneter Extraktionsbedingungen für die Vorreinigung des öligen Rohextraktes. 100 µl roher, öliger *A. alternata* DSM 62010-Extrakt wurden mehrmals mit je 200 µl wässrig-methanolischen Extraktionslösungen ansteigender Konzentration extrahiert, und die einzelnen wässrig-methanolischen Extrakte mittels HPLC analysiert. Die gemessenen Peakflächen der einzelnen Toxine wurden normalisiert (jeweils größte Fläche = 100%), um trotz größenordnungsmäßiger Unterschiede der absoluten Toxinkonzentrationen eine übersichtliche, graphische Darstellung zu erlauben. (Stem III: Stemphyltoxin III)

Das stark lipophile AME löste sich erst ab ca. 50 - 60% Methanolkonzentration in größeren Mengen. Das mögliche Altertoxin III wurde im methanolischen Extrakt nur gefunden, wenn mit reinem Methanol extrahiert wurde. Dass selbst beim zweiten und dritten Ausschüttelungsschritt mit reinem Methanol die extrahierte Menge kaum abnahm, deutete darauf hin, dass mit jedem Schritt dabei nur geringe Mengen ATX III aus der Lipidphase in die Methanolphase übergingen.

Durch vierfaches Ausschütteln des öligen Rohextraktes von 200 g *A. alternata* DSM 62010-Reiskultur (ca. 2 ml) mit jeweils 5 ml eines Methanol : Wasser-Gemisches (60 : 40; v : v) wurden so 20 ml eines wässrig-methanolischen Toxinextraktes gewonnen. Die methanolische Phase war beim ersten Ausschütteln deutlich gelb-orange gefärbt, wobei die Farbintensität bei jedem weiteren Ausschütteln deutlich nachließ und sie schließlich im vierten Schritt völlig

farblos war. Die ölige Phase des Rohextraktes blieb dabei unverändert in ihrer braunschwarzen Farbe und ihrem Volumen von etwa 2 ml.

Die vereinigten, methanolisch-wässrigen Phasen enthielten TeA, AOH, AME sowie ATX II und Stemphyltoxin III. Nur sehr geringe Mengen ATX III wurden mit dieser Methode aus dem öligen Rohextrakt abgetrennt, da die Löslichkeit dieser Substanz bei 60% Methanol nur sehr gering war (siehe Abb. 4-24). Wie im folgenden Abschnitt dargestellt erleichterte sich zusätzlich die semipräparative Trennung von ATX II und Stemphyltoxin III erheblich durch die Abwesenheit von ATX III im methanolisch-wässrigen Extrakt, sodass diese schnelle und kostengünstige Methode zur Entfettung des öligen Rohextraktes genutzt werden kann, wenn die semipräparative HPLC-Trennung von ATX II und Stemphyltoxin III angestrebt wird. Zur Gewinnung von ATX III ist diese Methode der methanolisch-wässrigen Extraktion aufgrund der hohen Lipophilie von ATX III nicht geeignet. Selbst bei der Extraktion mit höheren Methanolgehalten, bis hin zum reinem Methanol würden nur geringe Mengen an ATX III pro Ausschüttelungsschritt in die Methanolphase übergehen, andererseits hätte dies auch die Lösung substanzieller Mengen an Lipiden zur Folge gehabt, was zur schnellen Verstopfung der semipräparativen HPLC geführt hätte.

Da im Rahmen dieser Arbeit insbesondere toxikologische Effekte von ATX II untersucht wurden, deren HPLC-Präparation aus dem wässrig-methanolischen Extrakt schnell und einfach möglich war wurde dieser Methode gegenüber der arbeits- und kostenintensiveren SPE-Vorreinigung der Vorzug gegeben.

4.10.2 HPLC-Präparation

Es wurde eine HPLC Methode erarbeitet, bei der Methanol anstatt Acetonitril (ACN) verwendet wurde, da zum Zeitpunkt der Arbeiten die Verwendung großer Mengen ACN aufgrund des hohen Preises nicht möglich war. Die beste Trennung der interessanten Peaks wurde isokratisch mit Methanol : Wasser (pH 3 mit Ameisensäure) (57 : 43, v : v) und 20 ml/min Flussrate erreicht. Die verwendete Säule war analog zur verwendeten analytischen Säule eine Luna C18(2) von Phenomenex, allerdings im semipräparativen Format (250 x 21,2 mm). Analog zur bereits beschriebenen Präparation aus den SPE-Fraktionen (Varian PrepStar-System mit Microsorb C18-Säule, siehe Abschnitt 4.6.2) änderte sich durch die Verwendung von Methanol auch hier die Peakreihenfolge. Der ATX III-Peak lag dabei stets zwischen dem ATX II- und dem Stemphyltoxin III-Peak. Die Zuordnung der Peaks erfolgte anhand ihrer unterschiedlichen UV-Spektren.

Pro Trennlauf wurden 1 - 3 ml des methanolisch-wässrigen Extraktes injiziert und die Eluate der Peaks am UV-Detektorausgang unter ständiger Beobachtung des Detektorsignals manuell aufgefangen. In Abb. 4-25 A ist das Chromatogramm eines semipräparativen Trennlaufes von *A. alternata* DSM 62010-Extrakt dargestellt. Da nur äußerst geringe Mengen an ATX III im injizierten Extrakt enthalten waren, war die Präparation von ATX II und Stemphyltoxin III bei guter Reinheit erleichtert. Limitierend für die Trennung war dabei der hohe TeA-Gehalt im Extrakt, der die Trennleistung der Säule verschlechterte und die injizierbare Menge auf 0,5 - 2 ml beschränkte. Größere Injektionen pro Trennlauf waren infolge der Peakverbreiterung problematisch. Analog wurden ATX II und Stemphyltoxin III aus einem *A. alternata* DSM 62006-Extrakt präpariert, der ebenfalls hohe Gehalte dieser Toxine aufwies. Der gleichzeitig niedrige Gehalt an TeA und die daraus resultierende bessere Trennung erlaubten dabei Injektionsvolumina von 3 - 4 ml Extrakt bei gleichzeitiger Erleichterung der manuellen Fraktionssammlung aufgrund der schmaleren Peakform. Aufgrund der besseren Trennung konnte die Methode überdies um 10 Minuten verkürzt werden, indem die Methanolkonzentration der mobilen Phase von 57% auf 60% erhöht wurde.

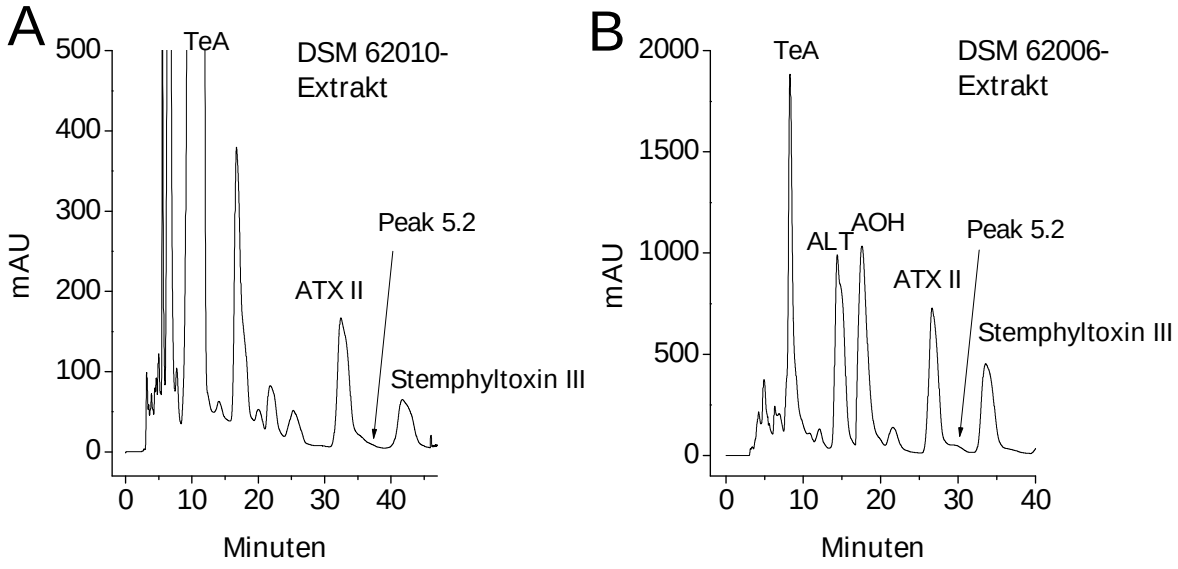


Abb. 4-25: (A) isokratischer HPLC-Trennlauf (Methanol : Wasser (pH 3 mit Ameisensäure), 57 : 43, v : v, Flussrate: 20 ml/min, Injektionsvolumen: 0,5 ml) zur Präparation vom ATX II und Stemphyltoxin III aus dem methanolisch-wässrigen Extrakt eines komplexen *A. alternata* DSM 62010-Extraktes. Die Abwesenheit eines deutlichen Peaks 5.2 (möglicherweise ATX III) erleichterte die Präparation. (B) Bei der Präparation aus *A. alternata* DSM 62006-Extrakt erlaubte die bessere Trennleistung aufgrund geringeren TeA-Gehaltes im Extrakt eine etwas schnellere Trennung (Methanol : Wasser, 60 : 40, v : v, Flussrate 20 ml/min) bei gleichzeitig höherer Einspritzmenge (3 ml).

4.10.2.1 Altertoxin II

Nach Entfernung des Hauptteils an Methanol aus den vereinigten Peakfraktionen im Rotationsverdampfer, Chloroformextraktion der wässrigen Phase und Einengen der Chloroformphase zur Trockne wurden 1,2 mg ATX II als leuchtend gelber Feststoff gewonnen. Die Menge an ATX II, die aus dem *A. alternata* DSM 62006-Extrakt präpariert wurde betrug 4,45 mg nach Trocknung im Vakuumexsiccator über Silicagel. Dies entspricht einer Ausbeute von 72% der im Extrakt enthaltenen Menge an ATX II (6,13 mg in 2 ml öligen Extrakt). Durch Aufnahme in 4,45 ml Methanol und Evaporation von Aliquoten dieser Lösung (1 ml bzw. 100 µl) wurden ATX II-Aliquote von 1 mg bzw. 100 µg hergestellt, die bei -80 °C gelagert und für die toxikologischen Experimente eingesetzt wurden.

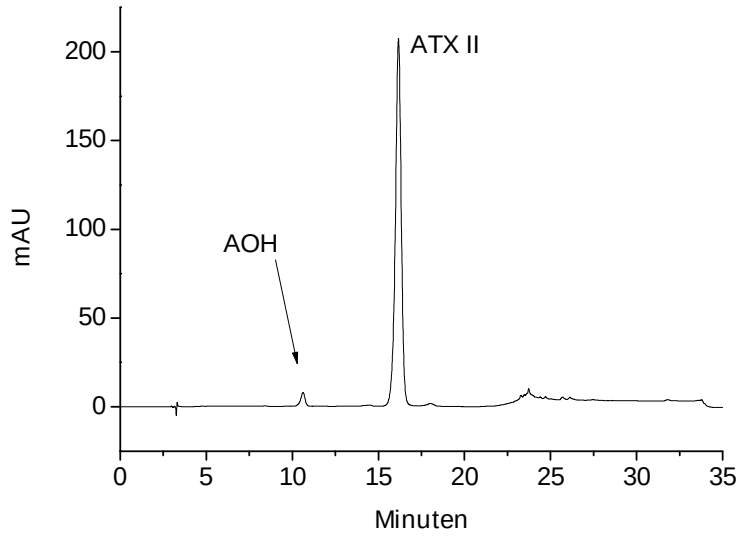


Abb. 4-26: Chromatogramm des präparierten ATX II aus *A. alternata* DSM 62006 zur Kontrolle der Reinheit (2 µg Injektion) bei 280 nm. (Analytische Luna C18(2) 5µ Säule, (250 x 4,5 mm), isokratische Trennung mit Methanol : Wasser (60 : 40) und Spülschritt ab RT = 20 min mit 100% MeOH zur Elution möglicher lipohilerer Substanzen. Neben dem Hauptpeak ist nur eine geringfügige Verunreinigung mit AOH erkennbar. Auch bei anderen Wellenlängen waren keine weiteren Peaks erkennbar.

Reinheit des präparierten ATX II

Wie in Abb. 4-26 zu erkennen wies das präparierte ATX II eine gute Reinheit auf. Lediglich ein kleiner Peak bei RT = 10,3 min deutete auf eine geringfügige Verunreinigung mit verschlepptem AOH hin. Der Anstieg des Baselineniveaus bei RT = 22 - 33 min wurde durch

einen Spülschritt mit reinem Methanol in der Methode verursacht, der zur Elution eventueller lipophilerer Verunreinigungen diente. Das Chromatogramm ist bei der Wellenlänge 280 nm aufgenommen worden, da so die meisten untersuchten Toxin- und Verunreinigungspeaks erkennbar waren. Auch bei anderen Wellenlängen zeigten sich keine weiteren Verunreinigungen.

4.10.2.2 Stemphyltoxin III

Die Peakfraktionen von Peak 4.2 (vermutlich Stemphyltoxin III), die mittels semipräparativer HPLC aus dem DSM 62010-Extrakt gesammelt wurden konnten nicht als reiner Feststoff gewonnen werden. Bei allen Extraktions- und Trennschritten behielt die Stemphyltoxin III-Lösung zwar ihre gelbe Farbe und gute Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln bei, sobald jedoch im letzten Schritt das organische Extraktionsmittel völlig evaporiert wurde verlor die Lösung schlagartig die gelb-orange Farbe und es bildete sich ein brauner Niederschlag, der weder in Chloroform, Ethylacetat, Hexan, Acetonitril oder Methanol löslich war. Dies entsprach den vorherigen Beobachtungen bei der Präparation von Stemphyltoxin III aus dem SPE-vorgereinigten Extrakt. Auch in jenem Fall verlor sich die gelbe Farbe und es bildete sich ein unlöslicher, dunkelbrauner Feststoff im Kolben als Folge der Gefriertrocknung (siehe Absatz 4.6.2). Ein Grund hierfür könnte eine mögliche Polymerisationsreaktion sein, insbesondere da die enthaltene Epoxygruppe eine erhöhte Reaktivität des Moleküls nahelegt. In der Literatur wurde ebenfalls auf die eingeschränkte Stabilität der Altertoxine verwiesen (Stack und Prival 1986; Scott und Kanhere 2001), was aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit auch für Stemphyltoxin III naheliegend ist. Davis und Stack (1991) beschrieben zudem eine geringe Stabilität von Stemphyltoxin III in DMSO, die bei längerem Stehen zur Braunfärbung der Lösung und zur Bildung eines braunen, unlöslichen Niederschlags führte, und nannten Reaktionen mit gelöstem Luftsauerstoff als mögliche Ursache. Stack und Mazzola (1989) beschrieben die Darstellung von Stemphyltoxin III durch Kristallisation aus Chloroform-Hexan-Gemisch. Da sowohl bei der Gefriertrocknung der Stemphyltoxin III-Lösung, als auch bei der Trocknung im Rotationsverdampfer die Toxinmoleküle einem deutlich größeren Oberflächenkontakt ausgesetzt waren als bei einer Kristallisation aus Chloroform-Hexan (Stack und Mazzola 1989) könnte somit der Verlust der Löslichkeit unter Bildung eines unlöslichen braunen Feststoffes eine Folge des hier gewählten Trocknungsverfahrens gewesen sein. Eine Kristallisation aus der Lösung war im vorliegenden Fall aufgrund der geringen Menge jedoch nicht möglich. Bei der Präparation von Stemphyltoxin III aus dem DSM 62006-Extrakt wurde daher dem in Chloroform gelösten Stemphyltoxin III noch vor Erreichen der Trockne 1 ml

DMSO zugesetzt und anschließend noch mehrere Stunden bei Raumtemperatur und maximalem Vakuum evaporiert, um das restliche Chloroform aus der Lösung zu entfernen. Die so erhaltene Lösung von Stemphyltoxin III in DMSO behielt ihre gelbe Farbe, zeigte keine Niederschlagsbildung und konnte für toxikologische Experimente eingesetzt werden. Da bis heute kein Stemphyltoxin III-Standard kommerziell erhältlich ist und eine Wägung des in DMSO gelösten Toxins zur Mengen- bzw. Konzentrationsbestimmung nicht möglich war konnte die Stemphyltoxin III-Konzentration der Lösung nicht genau ermittelt werden. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zu ATX II in Bezug auf Molekülstruktur und UV-Spektrum wurde die Konzentration daher näherungsweise anhand der externen ATX II-Kalibrierung mittels HPLC bestimmt. Die berechnete Konzentration an Stemphyltoxin III in der DMSO-Lösung betrug 2,25 mM. Diese Lösung wurde bei -80 °C gelagert und in entsprechenden Verdünnungen für toxikologische Versuche eingesetzt.

4.10.2.3 Altertoxin III

Analog zum Stemphyltoxin III bildete auch Peak 5.2 (möglicherweise Altertoxin III) bei Erreichen der Trockne einen braunen Feststoff, der in Methanol, ACN, Ethylacetat, Hexan und Chloroform unlöslich war. Da das ATX III-Molekül zwei Epoxygruppen besitzt, ist eine erhöhte Reaktivität bzw. geringere Stabilität umso naheliegender. In der Literatur wurde von der eingeschränkten Stabilität von ATX III in Anwesenheit von Säuren berichtet (Stack et al. 1986; Stack und Prival 1986). Im Falle der Präparation von Peak 5.2 (möglicherweise Altertoxin III) aus den SPE-vorgereinigten Extraktfraktionen wurde jedoch die im Eluat enthaltene Ameisensäure vor der Gefriertrocknung durch erneute SPE entfernt. Die Gefriertrocknung des Toxins fand in einem neutralen Gemisch aus Methanol und destilliertem Wasser statt, weshalb Instabilität aufgrund von saurem Milieu nicht erwartet werden konnte. Bei den toxikologischen Untersuchungen wurde der Fokus insbesondere auf ATX II gelegt, weshalb auch keine weiteren Versuche unternommen wurden die reine Peaksubstanz 5.2 zu präparieren.

4.11 ATX II- und Stemphyltoxin III-Gehalte der Reisextrakte

Durch die Präparation des reinen ATX II stand eine ausreichende Menge zur Verfügung um Extrakte mit externer HPLC-Kalibrierung hinsichtlich ihres ATX II-Gehalt zu untersuchen. Das vermutete Stemphyltoxin III wurde aufgrund seiner Ähnlichkeit in Struktur und UV-Spektrum näherungsweise als ATX II bestimmt, da eine direkte Einwaage des reinen Feststoffes aufgrund der geringen Stabilität nicht möglich war. Zu diesem Zeitpunkt waren die ver-

wendeten Extrakte jedoch nicht mehr vorhanden und das ursprünglich zur Analyse verwendete Shimadzu HPLC-System stand nicht mehr zur Verfügung. Eine nachträgliche Bestimmung der ATX II Gehalte durch externe Kalibrierung war somit nicht mehr möglich. Um dennoch eine näherungsweise Berechnung der enthaltenen Mengen an ATX II und Stemphyltoxin III in den verwendeten Extrakten zu ermöglichen wurden die damaligen Chromatogramme nochmals ausgewertet, insbesondere bezüglich der Peakflächen von ATX II und Stemphyltoxin III (Peak 4.1 und 4.2). Aus dem Vergleich des Detektor-Response (Steigung der Kalibriergeraden) für AOH und AME auf beiden Systemen wurde ein empirischer Umrechnungsfaktor für die gemessenen Peakflächen ermittelt (Agilent : Shimadzu ; 2.626 x 10^{-3} : 1). Um die bei 280 nm gemessenen Peakflächen näherungsweise mit der externen Kalibriergeraden des Agilent HPLC-Systems für ATX II berechnen zu können, die beim Absorptionsmaximum von 260 nm erstellt wurde, wurde zusätzlich ein Korrekturfaktor von 1,37 verwendet, der sich aus den Flächenverhältnissen bei 280nm : 260 nm ergab. Für Stemphyltoxin III ergab sich ein Faktor von 1,05 aus den Flächenverhältnissen bei 280 nm : 272 nm. Die so näherungsweise berechneten Werte für die einzelnen Reisextrakte erlaubten selbstverständlich nur eine größenordnungsmäßige Abschätzung der ATX II- bzw. Stemphyltoxin III-Bildung durch die einzelnen Stämme bzw. der enthaltenen Konzentrationen in den Extrakten. Es ermöglichte jedoch den Vergleich verschiedener Alternariastämme bzw. -extrakte untereinander in Bezug auf ihre ATX II- und Stemphyltoxin III-Bildung bzw. Konzentration. Die abgeschätzten Werte der ATX II- und Stemphyltoxin III-Bildung der einzelnen Stämme sind in Tab. 4-8 dargestellt.

Tab. 4-8: Näherungsweise Abschätzung der ATX II- und Stemphyltoxin III-Bildung durch die untersuchten Alternariastämme auf autoklaviertem Reis. Dargestellt sind die Mittelwerte der vier Kultivierungsexperimente, sowie die jeweils niedrigste und höchste gefundene Konzentration als Mikrogramm Toxin pro Gramm Reis nach 21 Tagen Kulturdauer (siehe auch Tab. 4-2)

	DSM 1102		**DSM 12633**		**DSM 62006**		**DSM 62010**	
	MW	(min. - max.)	MW	(min. - max.)	MW	(min. - max.)	MW	(min. - max.)
ATX II [µg/g]	**3**	(0 - 5)	**10**	(5 - 25)	**31**	(2 - 76)	**171**	(51 - 306)
Stemphyl-toxin III [µg/g]	**3**	(0 - 5)	**44**	(5 - 82)	**13**	(2 - 27)	**90**	(34 - 143)

Die beobachtete, etwa 5 - 10-fach stärkere Genotoxizität des DSM 12633-Extraktes im Vergleich zum DSM 1102-Extrakt im Comet Assay (siehe auch Abschnitt 4.4.2 und Abb. 4-9) entsprach dabei genau dem 5 - 10-fach höheren Gehalt an ATX II und vermutetem Stemphyltoxin III, die der DSM 12633-Extrakt enthielt. Auf den Zusammenhang zwischen Genotoxizi-

tät der komplexen Extrakte und ihren Gehalt an ATX II und Stemphyltoxin III wird im Abschnitt 4.13.5 näher eingegangen.

4.12 Screening der Toxinbildung auf verschiedenen Agars

Die Methoden zur semipräparativen Gewinnung von ATX II und Stemphyltoxin III, die im Rahmen dieser Arbeit erarbeitet wurden, wurden durch mehrere Faktoren erschwert. Die Kultivierung auf Reis war relativ arbeitsaufwändig und eine repräsentative Probennahme zur Kontrolle der Toxinbildung erforderte die Aufarbeitung vergleichsweise großer Probenmengen. Durch das Mycelwachstum verklumpte der Reis schnell, was ein häufiges Auflockern erforderlich machte um homogenes Wachstum zu gewährleisten. Die mitextrahierte Lipidmenge machte eine Vorreinigung des Rohextraktes notwendig. Ungünstige Mengenverhältnisse zwischen den interessierenden Toxinen ATX II bzw. dem vermutlichen Stemphyltoxin III und den übrigen Toxinen (insbesondere TeA) begrenzten die injizierbare Extraktmenge, wie im Fall des Reisextraktes von *A. alternata* DSM 62010. Um die Gewinnung von ATX II und Stemphyltoxin III für spätere Arbeiten zu vereinfachen und zu beschleunigen, wurden Vorversuche zur Toxinbildung verschiedener Alternariastämme auf unterschiedlichen Kulturagars durchgeführt. Die Kultivierung der Alternariastämme vereinfachte sich deutlich durch die Verwendung von Agarmedien in Petrischalen. Die gleichmäßige Inokulation der gesamten Oberfläche des Agars war mittels standardisierter Sporensuspension einfach möglich, ebenso die Probennahme durch Ausstechen eines Stückchens Agar mit einem sterilen Ausstecher ("biopsy punch" bzw. "cork borer"). Da die auf der Agaroberfläche gleichmäßig verteilten Sporen gleichzeitig auskeimten, war das Alter der Hyphen über die gesamte Oberfläche weitaus homogener als bei einem Ausstrichs mittels Impföse, bzw. als bei Inokulation mittels Stückchen aktiv wachsender Kulturen, wobei die Hyphen in Ausbreitungsrichtung immer "jünger" werden.

Als Nährmedien wurden V8-Agar, Tomatensaft-Agar sowie Hefeextrakt-Saccharose-Agar gewählt. Der V8-Agar auf Basis von Multivitamin-Obst/Gemüsesaft ist das Standardmedium, das von der DSMZ für die meisten Alternariastämme empfohlen wird. Durch die Verwendung von Tomatensaft anstelle des Gemüsesaftes wurde analog ein Tomaten-Agar hergestellt, da Tomaten und Tomatenprodukte eine der wichtigsten Lebensmittelgruppen bezüglich Alternariabefall und Alternariatoxinkontamination darstellen (Hasan 1995; Motta und Valente Soares 2001; Solfrizzo et al. 2005). Die Bestimmung der Toxinmenge per HPLC sollte nur einen größenordnungsmäßigen Eindruck von der Toxinbildung vermitteln und die Stämme mit der

stärksten Toxinbildung erkennen lassen, weshalb auf Mehrfachbestimmungen verzichtet wurde. Aus demselben Grund wurde der Konzentrationsbereich der externen Kalibrierungen mit 1 - 500 µg/ml recht hoch gewählt. Die Probengröße (0,5 g bewachsener Agar) erlaubte ebenfalls nicht die Toxinbestimmung bei sehr niedrigen Konzentrationen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4-9 zusammengefasst. Obwohl alle Petrischalen nahezu gleich gut von den jeweiligen Alternariastämmen bewachsen wurden, unterschieden sie sich sehr stark hinsichtlich ihrer Toxinproduktion.

Bei Kultivierung auf V8- und Tomatensaftmedium zeigte keiner der untersuchten Stämme starke Toxinbildung. Einzig *A. alternata* DSM 62010, der auch auf Reis einer der stärksten Toxinbildner war, zeigte auf V8-Agar und auf Tomatensaft-Agar Toxinkonzentrationen bis 10 µg/ml TeA im Extrakt. *A. alternata* DSM 1102, der auf Reis sehr viel TeA bildete zeigte auf V8-Agar lediglich eine sehr geringe TeA-Bildung. Die weitaus stärkste Toxinbildung wurde bei Kultivierung auf Hefeextrakt-Saccharose-Agar (YES) beobachtet. Analog zur Kultivierung auf Reis bildete *A. alternata* DSM 62010 die höchsten Mengen an ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III von etwa 170 µg bzw. 75 µg pro Gramm Agarkultur, was recht genau den durchschnittlichen Werten der Reiskultivierung entsprach (siehe Tab. 4-8). Die gebildete Menge an TeA war gleichzeitig um das etwa achtfache geringer, so dass sich ein Verhältnis von TeA : ATX II von 3,7 : 1 ergibt (verglichen mit ca. 30 : 1 beim Reisextrakt von DSM 62010), was eine verbesserte Trennung größerer Extraktmengen pro HPLC-Lauf erlauben würde. Auffällig war ebenfalls die erheblich gesteigerte Bildung von ATX II (ca. 40 µg/g Agar) durch *A. alternata* DSM 1102 , was der zehnfachen Menge im Vergleich zur Reiskultur entsprach (Tab. 4-8), während die gebildete Menge an TeA nur ca. 8% der auf Reis gebildeten Menge betrug. Während *A. alternata* DSM 12633 auf Reis die höchsten AOH- und AME-Mengen aller getesteten Alternariastämme bildete, zeigte sich keine deutliche Bildung auf YES-Agar. Die starke Abhängigkeit der Toxinbildung durch *Alternaria* vom jeweiligen Substrat (Burroughs et al. 1976) wird dadurch sehr deutlich. Für die Gewinnung von ATX II und Stemphyltoxin III durch Extraktion von Alternariakulturen und semipräparative HPLC im Rahmen Weiterführender Arbeiten verspricht daher die Kultivierung von *A. alternata* DSM 62010 auf YES-Agar die besten Ergebnisse.

Tab. 4-9: Screening der Toxinbildung verschiedener Alternariastämme auf unterschiedlichen Agar-Kulturmedien (Hefeextrakt-Saccharose-Agar (YES), V8-(Gemüsesaft)Agar und Tomatensaft-Agar) für insgesamt 27 Tage. Die Probenlösungen enthielten den Extraktrückstand von je 0,5 g extrahierter Agarprobe, aufgenommen in 0,2 ml Methanol. Größenordnung der Toxinkonzentrationen der Probenlösungen: kein Kreuz: Toxinkonzentration < 1µg/ml, +: 1-10 µg/ml, ++: 10-10^2 µg/ml, +++: 10^2-10^3 µg/ml, ++++: 10^3-10^4 µg/ml,. Für diese orientierenden Messungen wurde je ein Kulturansatz pro Stamm und Agar angefertigt und die Toxinkonzentrationen der Proben einmal per HPLC ermittelt, wobei teilweise Wiederholungsmessungen mit Verdünnungen erforderlich waren, um bei hohem Toxingehalt innerhalb der Kalibrierbereiche zu bleiben.

YES-Agar	TeA	AOH	AME	ATX II	Stemphyltoxin III
A. alternata DSM 1102	+++	++	++	+++	++
A. alternata DSM 12633	+++			+	+
A. alternata DSM 62006					
A. alternata DSM 62010	++++	++	++	+++	+++
A. brassicicola DSM 62008	+++			+++	++
A. tenuissima DSM 63360		++	++	++	++

V8-Agar					
A. alternata DSM 1102	+				
A. alternata DSM 12633					
A. alternata DSM 62006					
A. alternata DSM 62010	+	+		+	+
A. brassicicola DSM 62008					
A. tenuissima DSM 63360				+	

Tomatensaft-Agar					
A. alternata DSM 1102	+				
A. alternata DSM 12633					
A. alternata DSM 62006					
A. alternata DSM 62010	++				
A. brassicicola DSM 62008					
A. tenuissima DSM 63360					

Da die stärkste Toxinbildung bei allen untersuchten Alternariastämmen auf Reis bzw. stark saccharosehaltigem Agar (150 g Saccharose/l Agar) beobachtet wurde, lag ein Zusammenhang zwischen einem hohen Kohlenhydratgehalt des Substrates und starker Toxinbildung durch *Alternaria* nahe. Dennoch weisen laut Literaturdaten stark zuckerhaltige Früchte, bzw. verarbeitete Lebensmittel aus diesen, bei Analysen oft keine besonders hohen Gehalte an Alternariatoxinen auf. Es wird vermutet, dass *Alternaria spp.* aufgrund ihres vergleichsweise langsamen Wachstums von schneller wachsenden Konkurrenten wie *Botrytis cinerea* und *Rhizopus spp.* auf leicht verfügbaren Substraten verdrängt werden. So stellen *Alternaria spp.* einen hauptsächlichen Verderbniserreger für Tomaten dar (Motta und Valente Soares 2001) und spielen bei 46% der Fälle des Verderbs von Heidelbeeren eine Rolle, während sie nur in 8% der Fälle auf verschimmelten Erdbeeren gefunden werden und beim Verderb von Himbeeren und Brombeeren nahezu nicht anzutreffen sind (Tournas und Katsoudas 2005).

4.13 Toxikologische Charakterisierung von ATX II

Mit dem reinen, aus dem Extrakt von *A. alternata* DSM 62006 präparierten ATX II wurden toxikologische Experimente durchgeführt, um Erkenntnisse hinsichtlich dessen toxikologischen Potentials, sowie seiner Bedeutung für die Toxizität komplexer Alternariaextrakte zu gewinnen. Dazu wurden die *in vitro* Experimente mit der gleichen Zelllinie (HT29) durchgeführt, die im Comet-Assay und bei der toxizitätsgeleiteten Fraktionierung ausgeprägte genotoxische Effekte durch ATX II zeigte.

Um bei den mehrfachen Wiederholungen der Experimente möglichst hohe Unabhängigkeit der einzelnen Bestimmungen zu gewährleisten, wurden für jede Wiederholung Zellen einer anderen Passage und Kulturflasche verwendet. Die Inkubationslösungen der entsprechenden Konzentrationen wurden für jeden Versuch jeweils frisch angesetzt sowie aus den Zellen einer Inkubation nur ein Assay durchgeführt. Einzig das Altertoxin II bzw. vermutliche Stemphyltoxin III, welches zur Inkubation eingesetzt wurde, entstammt bei allen Experimenten der gleichen Präparation aus *A. alternata* DSM 62006-Extrakt, wobei jedoch nach Möglichkeit unterschiedliche Aliquote zur Erstellung der Konzentrationsreihen für die Inkubation verwendet wurden, um mögliche Fehlerquellen einzelner Aliquote zu erkennen.

4.13.1 Einfluss von ATX II auf die Zellviabilität

Die Viabilität der inkubierten HT29-Zellen wurde im Verlauf der Durchführung des Comet-Assays jedes Mal bestimmt, um mögliche Artefakte aufgrund möglicher zytotoxischer Effekte zu erkennen bzw. auszuschließen. Nach einstündiger Inkubation wurden die Zellviabilitäten mittels Trypanblau-Ausschluss ermittelt und lagen sämtlich zwischen 90 - 100%, mit durchschnittlich 97,8% viablen Zellen über den gesamten Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 µM ATX II (siehe Abb. 4-27 A). Durchschnittlich 97,6% wurden nach 24-stündiger ATX II-Inkubation durch Trypanblauauschluss ermittelt (Abb. 4-27 B).

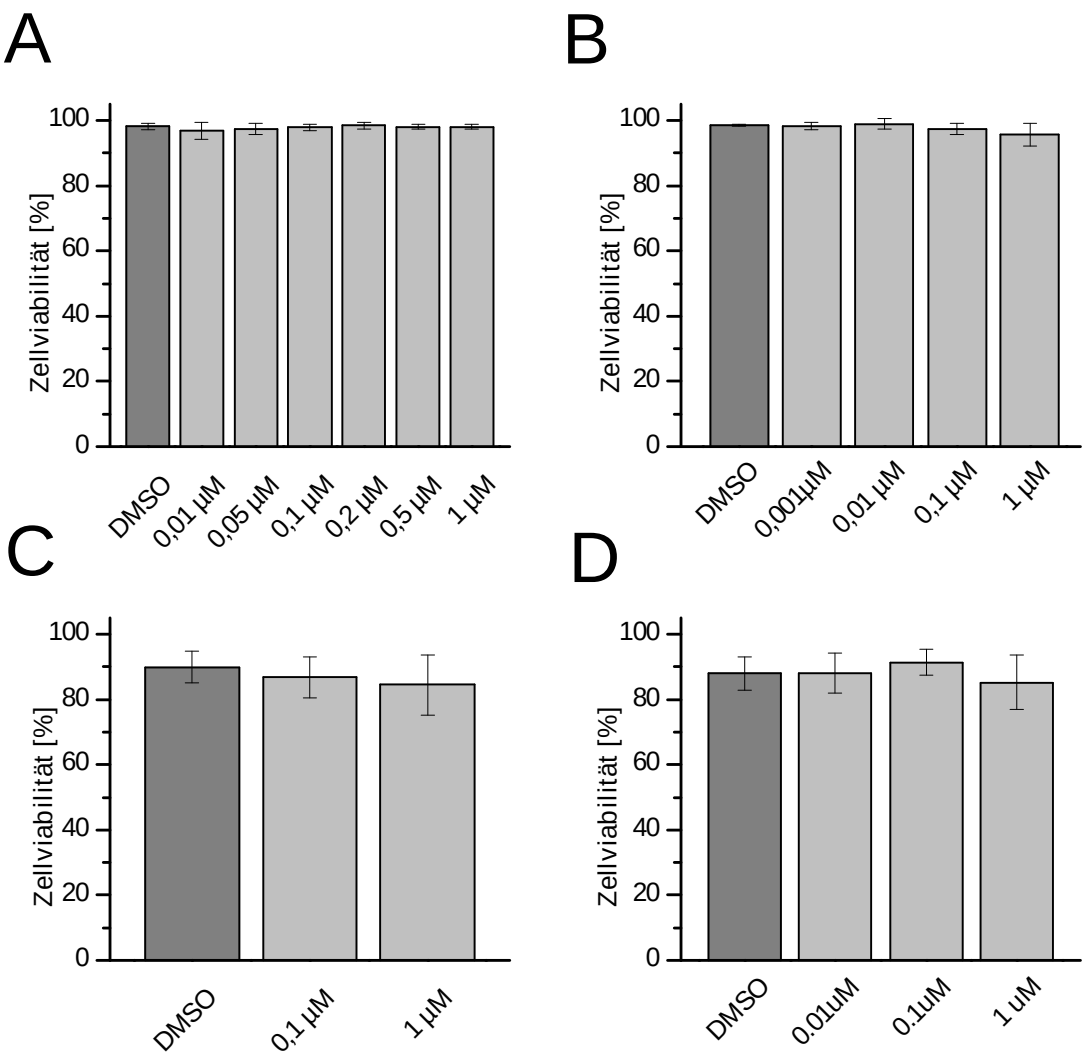


Abb. 4-27: Viabilität der HT29-Zellen nach Inkubation mit ATX II bzw. der Negativkontrolle DMSO (1% in der Endkonz.). (A) Bestimmung mittels Trypanblauauschlussmethode nach einstündiger ATX II-Inkubation bzw. nach (B) 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Inkubationen (pro Messpunkt ca. 80 - 200 Zellen am Mikroskop ausgezählt). (C) Durchflusszytometrische Viabilitätsbestimmung (ViaCount, Guava) nach 12-stündiger Inkubation bzw. (D) 24-stündiger Inkubation mit ATX II. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier unabhängigen Inkubationen (1000 Zellen pro Messpunkt). Mittels *Student's t*-Test waren keine Signifikanten Unterschiede zur jeweiligen Negativkontrolle DMSO erkennbar.

Nach zwölfstündiger Inkubation mit 0,01 - 1 µM ATX II wurden die Viabilitäten mittels Durchflusszytometrie (ViaCount, Guava) bestimmt und lagen im Bereich von 81 - 94% mit durchschnittlich 87,1% vitalen Zellen. Nach 24 stündiger Inkubation betrugen die Zellviabili-

täten 75 - 95,5% bei durchschnittlich 88,2%, was den Werten der jeweilgen Negativkontrolle DMSO entsprach. Im verwendeten Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 µM ATX II und für Inkubationszeiten zwischen einer und 24 Stunden wurden folglich keine augeprägten Effekte von ATX II auf die Viabilität von HT29-Zellen beobachtet. Das Auftreten zytotoxizitätsbedingter Artefakte, z.B. bei den Genotoxizitäts-Assays, ist unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Zur Zytotoxizität von ATX II gegenüber Säugerzellen existieren nur sehr wenige Literaturdaten. Pero et al. (1973) ermittelten einen ID_{50}-Wert von 0,5 µg/ml (entspr. 1,4 µM) für HeLa-Zellen. Da sich HT29-Zellen, verglichen mit anderen Zelllinien, oft als robuster gegenüber Alternariatoxinen zeigten (Fehr et al. 2009) entspricht dieser Wert größenordnungsmäßig den Beobachtungen. Boutin et al. (1989) nennen einen Konzentrationsbereich von 0,0008 - 0,02 µg/ml ATX II (entspr. 0,002 - 0,057 µM) innerhalb dessen die Viabilität von V79-Zellen im nutzbaren Bereich zwischen 74 - 94% liegt, was sich mit dem hier gewählten Konzentrationsbereich überschneidet, wenn auch V79-Zellen deutlich empfindlicher gegenüber ATX II zu sein scheinen als HT29-Zellen.

4.13.2 Genotoxizität von ATX II

Wie bereits aufgrund der Ergebnisse der genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierung erwartet wurde, führte eine einstündige Inkubation von HT29-Zellen mit ATX II zu potent genotoxischen Effekten im Comet-Assay (Abb. 4-28). Eine signifikante Erhöhung der DNA-Strangbruchrate wurde konzentrationsabhängig bei ≥ 0,1 µM ATX II beobachtet, eine Konzentration von 1 µM ATX II führte bereits zu Schweifintensitäten von 22% ± 7%. Bereits ab einer Konzentration ≥ 0,05 µM ATX II ist bei den FPG-behandelten Proben eine signifikante Zunahme der Schweifintensitäten zu beobachten. Diese Zunahme an FPG-sensitiven Stellen der DNA ist ein deutlicher Hinweis auf zusätzliche, meist oxidative Schädigung der DNA-Basen und wird im Verlauf dieser Arbeit noch eingehend behandelt. Die niedrigste getestete Konzentration von 0,01 µM ATX II zeigt keinen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle DMSO und repräsentiert somit das "no-observable-effect-level" für HT29-Zellen bei einstündiger Inkubationszeit.

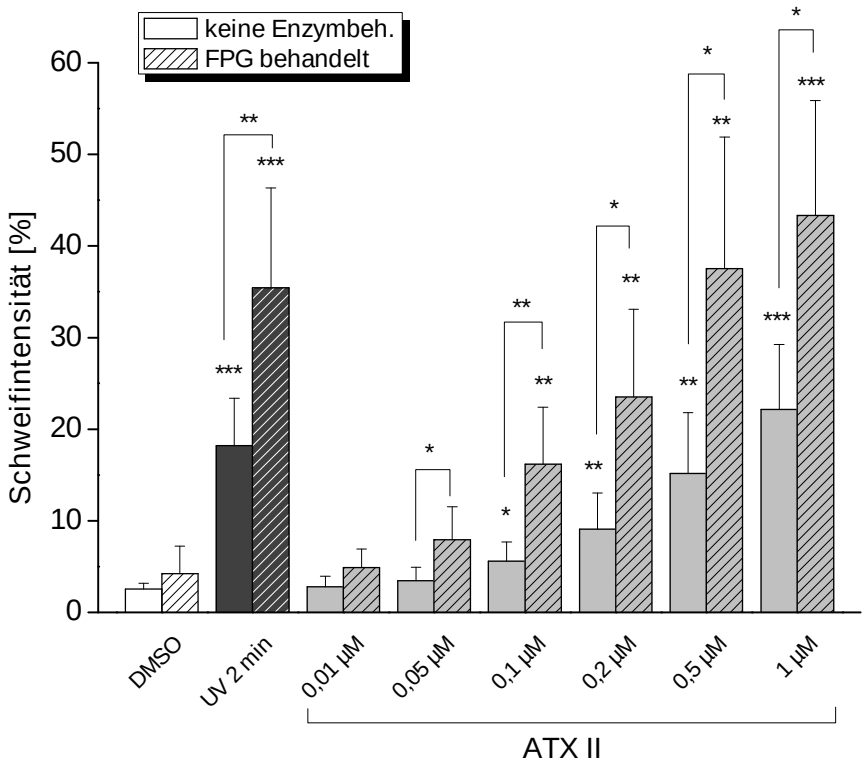


Abb. 4-28: Genotoxische Wirkung von ATX II im Comet-Assay in HT29-Zellen nach einstündiger Inkubation (HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., 2 min UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Das meistuntersuchte Alternariatoxin AOH führt in HT29-Zellen ab Konzentrationen von 10 - 50 µM zu signifikant DNA-strangbrechenden Effekten im Comet-Assay und im alkalischen Entwindungsassay (Pfeiffer et al. 2007; Fehr et al. 2009). Die signifikant DNA-strangbrechende Wirkung ab 0,1 µM ATX II bedeutet folglich eine genotoxische Wirkung gegenüber HT29-Zellen, die um etwa zwei Größenordnungen höher liegt. Das genotoxische Potential von Lebens- oder Futtermitteln die mit Alternariol belastet sind wäre folglich einem ATX II kontaminierten Lebensmittel vergleichbar, das nur 1% der entsprechenden Menge enthält. In der Literatur sind jedoch noch keine analytischen Daten zur Belastung von Lebensmitteln mit ATX II verfügbar. Für ATX I sind einige Methoden beschrieben, die jedoch um den Faktor 2 - 100 weniger empfindlich sind, als die analytischen Methoden zur Bestimmung von AOH und AME (CONTAM 2011).

4.13.3 Genotoxizität von ATX II bei 24 h-Inkubation

Im Falle von AOH und AME ist bekannt, dass einstündige Inkubation mit mikromolaren Konzentrationen zu einer signifikant erhöhten DNA-Stangbruchrate in HT29-Zellen führt (Pfeiffer et al. 2007; Fehr et al. 2009). Nach 24-stündiger Inkubation war diese Erhöhung jedoch nicht mehr messbar. Da die gesamte AOH- bzw. AME-Menge im Inkubationsmedium zu diesem Zeitpunkt in glucuronidierter Form vorlag, wird angenommen dass es sich dabei um einen Entgiftungsmechanismus der Zellen handelt (Pfeiffer et al. 2007). Zur Überprüfung, ob ein ähnlicher Effekt auch im Fall der stark genotoxischen Wirkung von ATX II von Bedeutung sein könnte, wurden Comet Assays in HT29-Zellen mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden durchgeführt (Abb. 4-29). Die Inkubation mit 1 µM ATX II führte zu mittleren Schweifintensitäten von 23% ± 11% (ohne FPG) bzw. 45% ± 7,7% (mit FPG), wobei auch nach 24 Stunden kein Unterschied zwischen der Inkubation mit 0,01 µM ATX II und der Negativkontrolle DMSO erkennbar war. Die beobachteten genotoxischen Effekte waren daher von gleicher Art und Intensität wie bei der einstündigen Inkubation; eine Entgiftung bzw. Reparatur der DNA-Schäden wie im Fall von AOH und AME wurde folglich auch nach 24 Stunden nicht beobachtet. Bemerkenswert war dabei auch die hohe Viabilität der Zellen, die trotz der sehr starken DNA-Schädigung auch nach 24 Stunden für alle Proben mittels Trypanblau-Ausschluss im Bereich von 90 - 100% vitaler Zellen gemessen wurde.

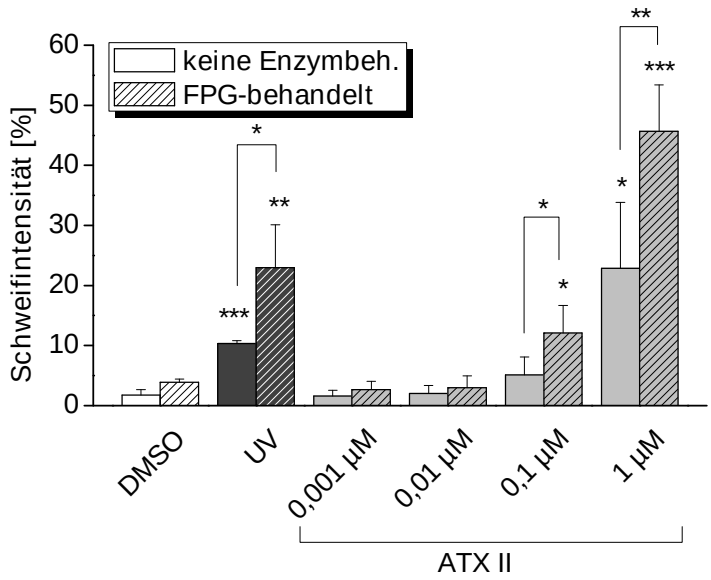


Abb. 4-29: Genotoxische Wirkung von ATX II im Comet-Assay nach 24 stündiger Inkubation (HT29-Zellen, 1% DMSO in der Endkonz., 2 min UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Bestimmungen. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.13.4 Genotoxizität von vermutlichem Stemphyltoxin III

Analog zur Untersuchung von ATX II wurde das vermutliche Stemphyltoxin III ebenfalls im Comet-Assay hinsichtlich seiner Genotoxizität untersucht, da die Ergebnisse der genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierungen ein vergleichbares genotoxisches Potential dieser Verbindung vermuten ließen. Da aufgrund von Stabilitätsproblemen bei der Trocknung kein Stemphyltoxin III als reiner Feststoff gewonnen werden konnte, wurde die Lösung von Peak 4.2 bzw. vermutlichem Stemphyltoxin III in DMSO eingesetzt, deren Gewinnung im Abschnitt 4.10.2.2 beschrieben ist. Die Inkubationslösungen der einzelnen Konzentrationen wurden durch entsprechende Verdünnung dieser 2,25 mM Stammlösung mit DMSO und Zellkulturmedium hergestellt und für jedes Experiment frisch angesetzt. Aliquote der Stemphyltoxin III-Stammlösung, die nicht bei -80 °C gelagert wurden, begannen sich nach wenigen Stunden zu einer dunkleren gelben Farbe hin zu verändern. Dieser Effekt wurde auch von Davis und Stack (1991) für Stemphyltoxin III berichtet. Es wird angenommen, dass Luftsauerstoff, der im DMSO bzw. im Inkubationsmedium gelöst ist, diese Reaktion hervorruft, die zum Verlust des Toxins führt. Während Davis und Stack (1991) eine zunehmende Verfärbung der Lösung hin zu braun und die Bildung eines braunen Feststoffes beschrieben, wurde dies im Rahmen dieser Arbeit nicht beobachtet. Es wurde jedoch auch konsequent auf die Lagerung der Stemphyltoxin III-Stammlösung bei -80 °C geachtet, die Inkubationslösungen immer kurz vor dem Experiment frisch hergestellt und die Bearbeitungs- und Standzeiten der Toxinlösungen so kurz wie möglich gehalten.

Wie in Abbildung 4-30 dargestellt ähneln die genotoxischen Effekte durch das vermutliche Stemphyltoxin III denen von ATX II, wenn auch etwas geringere Schweifintensitäten gemessen wurden. Wie an den Zellen der Positivkontrolle zu erkennen ist, lag das Grundniveau bei diesen Versuchen insgesamt etwas niedriger. Die Schweifintensitäten der Positivkontrolle entsprachen jedoch den Inkubationen mit 0,5 - 1 µM Stemphyltoxin III, analog zu ATX II. Bereits ab 0,1 µM Stemphyltoxin III war eine signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen zu beobachten. Die Inkubationen bis 0,05 µM führten zu keiner signifikanten Veränderung. Es besteht die Möglichkeit, dass die etwas geringeren Schweifintensitäten eine Folge von Substanzverlust im Inkubationsmedium waren. Die erhöhte Temperatur während der Inkubation im Brutschrank, sowie die große Oberfläche des Inkubationsmediums in den Petrischalen könnte einen Abbau durch Sauerstoff begünstigt haben, und dem System so einen Teil der eingesetzten Toxinmenge entzogen haben. Die Induktion FPG-sensitiver Stellen war, analog zu den Beobachtungen der toxizitätsgeleiteten Fraktionierungen, auch durch das präparierte, vermut-

liche Stemphyltoxin III zu beobachten. Der zusätzliche Anstieg der Schweifintensität entsprach ebenfalls etwa den Werten von ATX II.

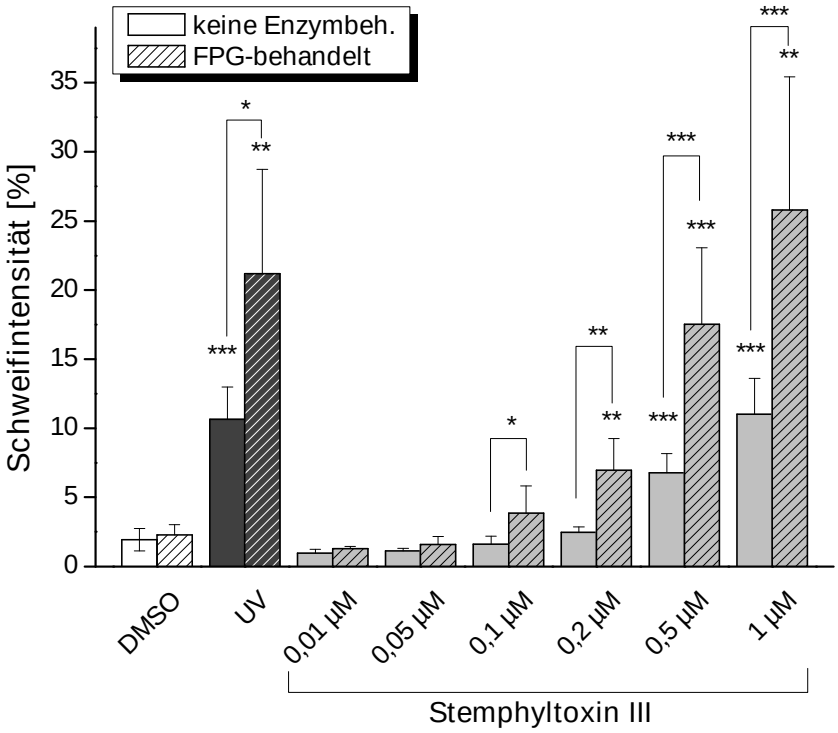


Abb.4-30: Genotoxische Wirkung durch das vermutete Stemphyltoxin III im Comet-Assay in HT29-Zellen (1 h Inkubationszeit, 1% DMSO in der Endkonz., 2 min UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von fünf unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.13.5 Genotoxizität von ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III im Extrakt

Die Comet-Assays der einzelnen Toxine ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III zeigten deutlich deren Bedeutung für die beobachteten Effekte des komplexen Alternariaextraktes. Bei den Comet-Assays, die im Zuge der genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierung des DSM 62010-Extraktes durchgeführt wurden, enthielt die Inkubationslösung der Fraktion 4.1 eine abgeschätzte Konzentration von 0,6 µM ATX II. Die dazu gemessenen, durchschnittlichen Schweifintensitäten betrugen 19% ± 5,6% / 29% ± 7,3% (mit FPG / ohne FPG). Sie lagen damit genau im dem Bereich, der für 0,5 µM reines ATX II gemessen wurde (15% ± 6,6% / 37% ± 14%). Die Inkubation mit Fraktion 4.2, die mit abgeschätzten 0,4 µM Stemphyltoxin

III in der gleichen Größenordnung lag, zeigte ebenfalls Schweifintensitäten im gleichen Bereich (18% ± 3,9% / 38% ± 5%). Der unfraktionierte und 1 : 2 verdünnte Gesamtextrakt von DSM 62010 führte zu Schweifintensitäten von 20% ± 0,7% / 34% ± 5,2% (ohne / mit FPG) die seinem abgeschätzten Gehalt an ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III entsprachen (0,3 µM und 0,2 µM), wobei dieser zusätzlich eine nicht quantifizierte Menge möglichen ATX III aus Fraktion 5.2 enthielt. Weiterhin stimmten die unterschiedlich stark genotoxischen Effekte, die für die komplexen Extrakte von *A. alternata* DSM 1102 und DSM 12633 beobachtet wurden (Abb. 4-4 und 4-8), sehr gut mit ihren abgeschätzten Gehalten an ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III überein. Im Falle des DSM 1102-Extraktes enthielt das Inkubationsmedium der höchsten eingesetzten Extraktkonzentration neben 200 µM TeA noch etwa 0,19 µM ATX II und 0,15 µM Stemphyltoxin III. Die gemessenen Schweifintensitäten von 12% ± 4,5% / 49% + 6,3% (ohne / mit FPG) (Abb. 4-8) entsprachen dabei den erwarteten Werten von etwa 10% / 30% durch die Summe des enthaltenen ATX II und Stemphyltoxin III, unter Berücksichtigung einer geschätzt ähnlich geringen Menge an ATX III. Der komplexe Gesamtextrakt von DSM 12633, der mit reinem AOH verglichen wurde (siehe Abb. 4-4), enthielt in der höchsten Inkubationskonzentration neben 50 µM AOH abgeschätzt etwa 1,3 µM ATX II und 0,6 µM Stemphyltoxin III. Die entsprach der etwa 5-fachen Menge an Perylenchinontoxinen, verglichen mit dem DSM 1102-Extrakt, was sich in entsprechend höheren Schweifintensitäten niederschlug (vgl. Abb. 4-4 , 4-8 und 4-9). Um direkt die Bedeutung des ATX II-Gehalts eines komplexen *A. alternata*-Extraktes für dessen Genotoxizität zu überprüfen, wurden ein hinsichtlich seines ATX II-Gehalts durch Verdünnung standardisierter DSM 62010-Extrakt im Comet-Assay parallel mit dem reinen ATX II verglichen. Mögliche Schwankungen in der Schweifintensität, bedingt durch beispielsweise das Schädigungsgrundniveau der Zellen, leichte Unterschiede des Agarosegels oder bei der Elektrophorese betrafen so alle Proben des Experiments gleichermaßen und erlaubten eine bessere Vergleichbarkeit. Wie in Abbildung 4-31 ersichtlich, entsprachen die DNA-Schäden die durch den Extrakt verursacht wurden, genau den Schäden, die auch durch die enthaltene Menge an ATX II beobachtet werden.

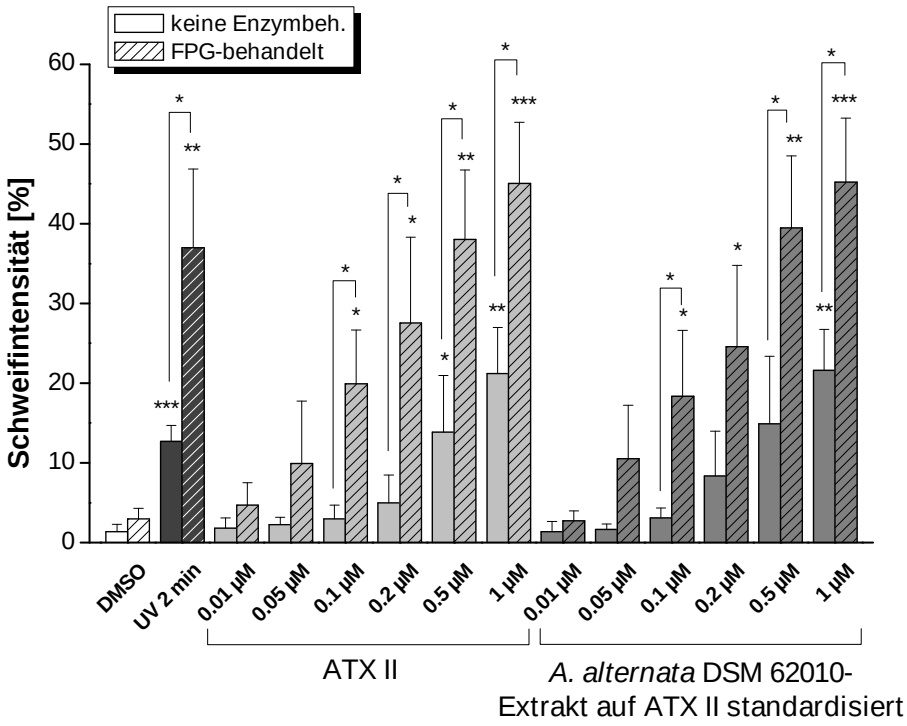


Abb. 4-31: Direkter Vergleich von *A. alternata* DSM 62010-Extrakt, der hinsichtlich ATX II-Gehalt durch Verdünnung standardisiert wurde mit reinem ATX II im Comet-Assay (HT29-Zellen, 1 h Inkubationszeit, 1% DMSO in der Endkonz., UV-Bestrahlung als Positivkontrolle). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Comet-Assays, bei denen der Extrakt und ATX II parallel untersucht wurden. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die jeweilige Kontrolle, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Die Konzentrationsabhängigkeit und Signifikanz der gemessenen Effekte zeigte deutlich, dass ATX II den maßgeblichen Teil der DNA-Schäden verursachte, die durch den Extrakt beobachtet wurden, eingeschlossen die signifikante Zunahme FPG-sensitiver Stellen, die nicht durch AOH, AME, TeA oder deren Kombination beobachtet werden (siehe auch Absatz 4.4.3).

4.13.6 Induktion FPG-sensitiver Stellen

Bei allen getesteten, komplexen Alternariaextrakten, sowie bei allen Extraktfraktionen und Einzeltoxinen die in Comet-Assays ausgeprägte genotoxische Wirkung zeigten, war ebenfalls eine signifikante Induktion an FPG-sensitiven Stellen zu erkennen. Die Schweifintensität wurde nach FPG-Behandlung durchschnittlich auf den doppelten Prozentwert erhöht. Die schwächer genotoxischen Alternariatoxine AOH und AME verursachen zwar ebenfalls DNA-Strangbrüche in HT29-, HCT116- und A431-Zellen (Fehr et al. 2009; Fehr et al. 2010) sowie in HepG2- und V79-Zellen (Pfeiffer et al. 2007), ein signifikanter Anstieg an FPG-sensitiven

Stellen wurde jedoch in keinem Fall beobachtet. Auch deutete sich in eigenen Vorversuchen kein solcher Effekt durch denkbare Synergieeffekte zwischen AOH, AME und TeA an (Absatz 4.4.3).

FPG spielt als bakterielles Reparaturenzym eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden, die fortwährend als Folge von oxidativem Stress durch exogene und endogene Faktoren entstehen. Die häufigste Schädigung stellt dabei das 8-Oxodeoxyguanin (8-OxodG) dar, sowie Guanin mit geöffnetem Imidazolring (FapydG). Physiologisch treten etwa 1000 8-OxodG Läsionen pro Zelle und Tag auf (Frosina 2004), die zum überwiegenden Teil erkannt und repariert werden. Neben 8-OxodG und FapydG werden von FPG zusätzlich eine Reihe weiterer oxidativer DNA-Schädigungen erfasst, wie N7-Methyl-FapydG, Adenosin mit geöffnetem Imidazolring (FapydA), Spiroiminodihydantoin, Guanidinohydantoin, 8-Oxodeoxyadenin (8-OxodA), Oxazolon, Dihydrouracil, 5-Hydroxycytosin (5-OHC), Guanosin mit geöffnetem Imidazolring und Phosphoramid-Mustard-Gruppe in N7-Position (N7-PM-FapydG), Guanosin mit geöffnetem Imidazolring und Aflatoxin B1-Gruppe in N7-Position (N7-AFB1-FapydG), letztere als Folge von DNA-Adduktbildung (Coste et al. 2004; Frosina 2006). Das 8-OxodG und N7-FapydG, die durch einen Oxidations- bzw. Reduktionsschritt nach Angriff eines $OH^{\cdot -}$-Radikals auf Guanin gebildet werden können, machen jedoch den überwiegenden Teil aller FPG-sensitiven Stellen aus (Bjelland und Seeberg 2003). Das seltener auftretende 8-Oxodeoxyadenin (8-OxodA) und Dihydrouracil (DHU) werden von FPG weniger effizient erkannt und ausgeschnitten. Modifikationen wie das Aflatoxin B1-Addukt des Guanins (N7-AFB1-FapydG) dienen FPG zwar als Substrat, werden jedoch aufgrund der sterischen Hinderung am aktiven Zentrum weniger effizient prozessiert (Coste et al. 2004).

FPG-sensitive Stellen der DNA werden überwiegend als Hinweis für eine oxidative Schädigung der DNA interpretiert und mit oxidativem Stress, z.B. durch erhöhte ROS-Konzentrationen in Verbindung gebracht. Die Vielzahl an möglichen DNA-Basenmodifikationen, die von FPG erfasst werden können, erfordern jedoch die Bestätigung durch andere Methoden, bevor oxidativer Stress als Ursache für die FPG-sensitiven Stellen angenommen werden kann.

4.13.7 Oxidativer Stress durch ATX II

Die potente Induktion FPG-sensitiver DNA-Stellen stellt meistens einen Hinweis auf oxidativen Stress dar. Hartmann et al. (1989) berichteten außerdem von der Fähigkeit der Altertoxine Superoxid zu bilden. Dies wurde unter breitbandiger Beleuchtung durch ATX I, II, und III beobachtet, wobei die Anwesenheit reduzierender Agenzien die Superoxidbildung noch deutlich erhöhte. Zur Überprüfung ob oxidativer Stress die Ursache für die beobachteten FPG-sensitiven Stellen sein könnte, wurden mit ATX II sowie vermutlichem Stemphyltoxin III inkubierte HT29-Zellen mit verschiedenen Methoden auf weitere Anzeichen für oxidativen Stress untersucht.

4.13.7.1 Einflüsse auf den zellulären Redoxstatus

Der Dichlorofluorescein-Assay (DCF-Assay) wird vielfach eingesetzt, um Änderungen des Redoxstatus in der Zelle zu bestimmen. Der Assay beruht auf dem Prinzip, dass das nicht fluoreszierende 2',7'-Dichlorofluorescin-diacetat (H_2DCF-DA) die Zellmembran relativ leicht passieren kann. In der Zelle wird das Molekül von Esterasen zum hydrophileren 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein (H_2DCF) und Acetat gespalten. Oxidierende Substanzen in der Zelle können dann das nicht fluoreszierende H_2DCF zum fluoreszierenden DCF oxidieren, sodass die Zunahme der Fluoreszenz im Fluoreszenzphotometer erfasst werden kann. In der Literatur wird häufig die Fluoreszenzintensität mit dem Gehalt bzw. der Bildung von ROS gleichgesetzt. Diese Definition greift jedoch zu kurz, da zwar Hydroxylradikale und organische Hydroperoxide H_2DCF direkt oxidieren können, das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot -}$) hingegen nur über die Disproportionierung zu O_2 und H_2O_2 (Wardman 2007). H_2O_2 benötigt weiterhin einen Katalysator um H_2DCF zu oxidieren. Ein solcher Katalysator kann z.B. Cytochrom C sein (Wardman et al. 2002), Häm, Fe^{2+} oder andere Metallionen (Ohashi et al. 2002).

Peroxynitrite und Stickoxide können H_2DCF ebenfalls direkt oxidieren, weshalb nicht nur oxidativer, sondern auch nitrosativer Stress durch den Assay erfasst wird (Jakubowski und Bartosz 2000). Rota et al. (1999) zeigten weiterhin, dass Horseradish-Peroxidase (HRP) in der Lage ist H_2DCF zu oxidieren, wobei $O_2^{\cdot -}$ gebildet wird. Durch Disproportionierung (spontan oder durch Superoxiddismutase (SOD)) wird H_2O_2 frei, welches seinerseits wiederum H_2DCF oxidieren kann und so zu einer Selbstverstärkung der Fluoreszenz führen kann. Wardman et al. (2002) zeigten, dass selbst eine Verzwanzigfachung der $O_2^{\cdot -}$-Bildung bei gleichem Cy-

tochrom C-Gehalt kaum die Fluoreszenz erhöht, während bei konstanter $O_2^{\cdot -}$ -Bildung die Fluoreszenz linear mit dem Cytochrom C-Gehalt (1 - 25 nm) steigt. Als eine Ursache für erhöhte Fluoreszenz im DCF-Assay sehen sie den höheren Cytochrom C-Gehalt im Cytosol präapoptotischer und apoptotischer Zellen.

Die Oxidation von H_2DCF steht dabei immer in Konkurrenz zu Radikalfängern wie GSH. Werden die Zellen, beispielsweise durch Redox-Cycling GSH-depletiert, steigt die Bildung an DCF an. Bei der verwendeten Positivkontrolle Menadion ist dies der Fall. Daher ist es bei erhöhter H_2DCF-Oxidation angemessener von erhöhtem oxidativen/nitrosativen Stress der Zellen zu sprechen als von höherer ROS-Bildung (Jakubowski und Bartosz 2000).

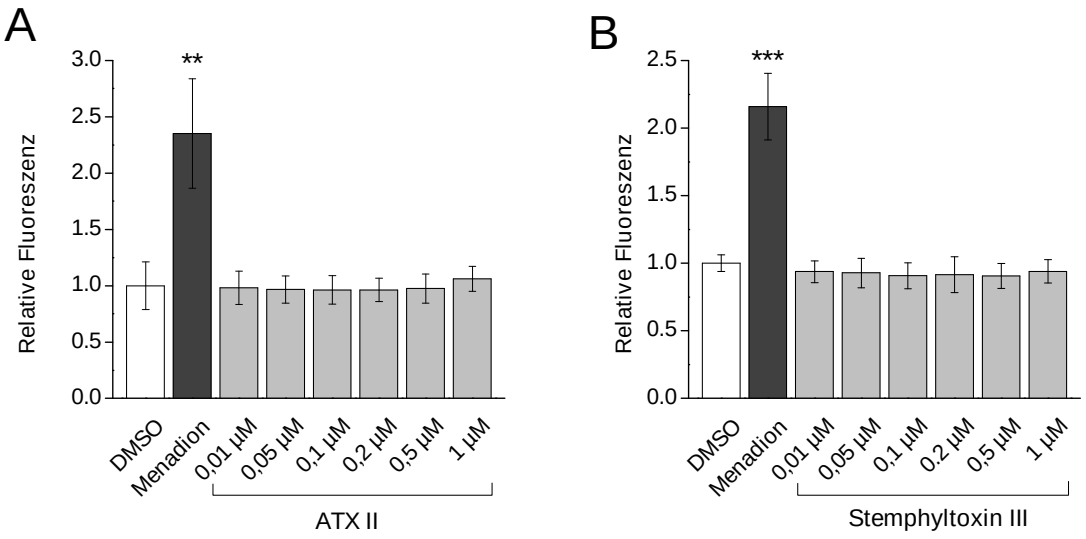


Abb. 4-32: Dichlorofluorescein-Assay von ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III im Konzentrationsbereich des Comet-Assays, in dem FPG-sensitive Stellen gefunden wurden. Die verwendete Zelllinie (HT29) und Inkubationszeit (1h) entsprechen ebenfalls den Bedingungen des Comet Assays. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils vier Experimenten, die je eine Sechsfachbestimmung enthalten. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden pro Experiment auf die Negativkontrolle DMSO normalisiert. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf DMSO, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Für die durchgeführten DCF-Assays wurde die gleiche Zelllinie HT29 verwendet, bei der im Comet-Assay ein starker Anstieg der FPG-sensitiven Stellen beobachtet wurde. Die einstündige Inkubationszeit sowie der verwendete Konzentrationsbereich entsprechen ebenfalls denen der Comet-Assays, um Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Wie in Abb. 4-

32 A zu erkennen, führte ATX II in keiner der eingesetzten Konzentrationen zu einem Anstieg der gemessenen Fluoreszenz, verglichen mit der Negativkontrolle DMSO. Lediglich der Redox-Cycler Menadion, der als Positivkontrolle mitgeführt wurde erhöhte das Fluoreszenzsignal auf das 2,3-fache der Negativkontrolle.

Die Inkubation mit dem vermuteten, strukturell sehr ähnlichen Stemphyltoxin III (Abb. 4-32 B) zeigte ebenfalls keine Erhöhung der Fluoreszenzsignale, abgesehen von der Positivkontrolle Menadion. Die gleiche Menadionkonzentration (20 µM) führte im Comet-Assay zu einer Verdopplung der Schweifintensität von etwa 10% auf 20% nach FPG-Behandlung (Abb. 4-4 und Abb. 4-8). Ähnliche Effekte in Bezug auf Zunahme der Schweifintensität bzw. Induktion FPG-sensitiver Stellen wurden ebenfalls durch 0,2 µM ATX II oder 1 µM Stemphyltoxin III im Comet-Assay beobachtet, die im DCF-Assay keinerlei Fluoreszenzzunahme bewirkten.

Wie erwähnt kann eine Reihe an Faktoren zu einem erhöhten Fluoreszenzsignal im DCF-Assay führen, ohne dass ein tatsächlicher Anstieg an intrazellulären ROS vorliegen muss, wie z.B. Photooxidation des H_2DCF oder eine direkte Reaktion des getesteten Moleküls mit H_2DCF. Ein Fluoreszenzanstieg durch erhöhte Abgabe von Cytochrom C ins Cytosol infolge beginnenden Zelltods wurde aufgrund der Viabilitätsdaten (Abschnitt 4.13.1) weder erwartet, noch wurde ein solcher beobachtet. Die Tatsache, dass gebildetes Superoxid nicht direkt das H_2DCF oxidieren kann (Wardman 2007), kann im zellfreien System dazu führen, dass es sich der Detektion entzieht. In der Zelle liegen jedoch genügend katalytische Substanzen sowie SOD vor, die über Disproportionierung des Superoxids zu einem messbaren Produkt führen würden.

Obwohl eine substanzielle Induktion FPG-sensitiver Stellen durch ATX II bzw. Stemphyltoxin III im Comet-Assay beobachtet wurde, ergab sich aus den DCF-Assays kein Hinweis auf oxidativen Stress durch die Toxine. Im Einklang mit den Messungen zur Zellviabilität bestätigten die unverändert niedrigen Fluoreszenzsignale außerdem, dass unter den gewählten Bedingungen keine Anzeichen für beginnenden Zelltod erkennbar waren.

4.13.7.2 Modulation des Glutathionspiegels durch ATX II

Die Konjugation von Fremdstoffen mit GSH stellt einen der wichtigsten Entgiftungswege der Zelle dar (Forman et al. 2009) und ist eng mit dem Nrf2/ARE-Signalweg verbunden. Fehr (2009) beobachtete eine signifikante Abnahme des Gesamtglutathiongehalts (tGSH) in HT29 Zellen nach einstündiger Inkubation mit 10 bzw. 50 µM AOH. Um zu überprüfen ob eine Ver-

änderung des tGSH-Spiegels durch ATX II eine Rolle für seine Genotoxizität spielen könnte, möglicherweise aufgrund von Redox-Cycling durch ATX II (Hartman et al. 1989), wurde der Einfluss einer einstündigen Inkubation von ATX II auf den tGSH-Gehalt von HT29-Zellen untersucht. Hierzu wurde die Methode von Tietze (1969) verwendet. Als Positivkontrolle wurde 2-Vinylpyrimidin (2VP) benutzt, das durch Reaktion mit GSH den tGSH-Spiegel schnell senkt, da eine Verwendung von Buthioninsulfoximin (BSO) zur Hemmung der GSH-Synthese aufgrund der kurzen Inkubationszeit ausschied.

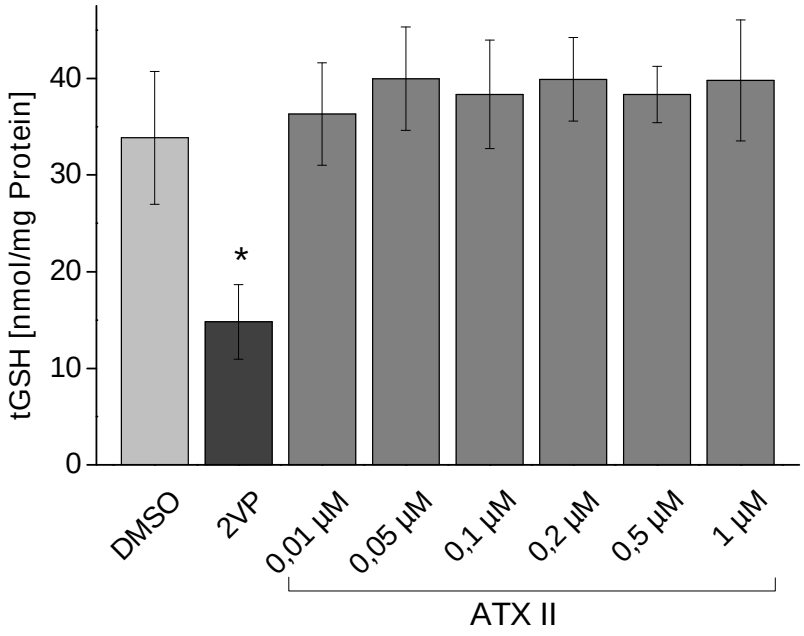


Abb. 4-33: tGSH-Bestimmung nach Tietze (1969) in HT29-Zellen nach einstündiger Inkubation mit ATX II. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf DMSO, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

Für keine der getesteten ATX II-Konzentrationen zeigte sich eine signifikante Veränderung gegenüber der Negativkontrolle DMSO. Lediglich die Positivkontrolle (0,01% 2-Vinylpyrimidin) senkte den tGSH-Gehalt der Zellen auf die Hälfte (Abb. 4-33). Dieses Ergebnis bestätigte das Ergebnis des DCF-Assays, bei dem ebenfalls keine prooxidative Veränderung durch ATX II in den Zellen festgestellt wurde.

4.13.7.3 Einfluss auf die Transkriptionsraten Nrf2/ARE-assoziierter Gene

Dem Transkriptionsfaktor Nrf2 kommt eine wichtige Bedeutung für die zelluläre Abwehr von oxidativem Stress zu. Die Entgiftung oxidativ schädigender Substanzen ist eng mit der Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalwegs verbunden, in Folge dessen die Zelle mit erhöhter Expression detoxifizierender Phase II-Enzyme und antioxidativer Proteine wie NAD(P)H:Chinonoxidoreduktase 1 (NQO1), Glutathion-S-Transferasen (GSTs) und Glutamat-Cysteinligase (GCL) reagiert (Lee und Johnson 2004). Glutathion-S-Transferasen sind Enzyme, die die Konjugation von Fremdstoffen mit GSH katalysieren und somit deren Entgiftung und Ausschleusung beschleunigen. Eine Erhöhung der Transkriptionsrate von Nrf2 bzw. nachgeschalteter Nrf2/ARE-regulierter Gene kann daher auf eine zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress hindeuten.

Das Nrf2-Gen wurde für die Untersuchung ausgewählt, da es ein zenrales Gen des Nrf2/ARE-Signalweges darstellt. Ebenso ist eine erhöhte Nrf2-Transkription über den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR)-Signalweg denkbar, da der AhR direkt an die Promotorregion des Nrf2-Gens binden kann (Miao et al. 2005), und eine Interaktion des AhR mit ATX II aufgrund dessen planarer, aromatischer Molekülstruktur denkbar wäre. Weiterhin wurden die Gene zweier Glutathion-S-Transferasen zur Untersuchung ausgewählt, da diese als Nrf2-nachgeschaltete Gene an der Entgiftung von Chinonen und α,β-ungesättigten Carbonylverbindungen beteiligt sind, und "antioxidant responsive elements" (ARE) sowohl in der Promotorregion des humanen GSTA2-Gens (Thimmulappa et al. 2002) , als auch des GSTA1-Gens bei Maus und Ratte (Rushmore et al. 1991) beschrieben wurden. Einflüsse auf die Transkriptionsraten dieser drei Gene (Nrf2, GSTA1, GSTA2) in HT29-Zellen wurden nach Inkubation mit ATX II sowie mit Stemphyltoxin III untersucht. Es wurde dazu real time-PCR eingesetzt, da dies die Detektion selbst geringer Mengen der untersuchten Transkripte ermöglicht. Eine Inkubationszeit von drei Stunden wurde gewählt, da vorangegangene Untersuchungen im Arbeitskreis nach dreistündiger Inkubation mit ≥ 10 µM AOH zu signifikanter Erhöhung der GSTA2-Transkriptmenge in HT29-Zellen führten, während bei 24-stündiger Inkubationszeit keine Erhöhung beobachtet wurde (Kropat 2008).

Nach Inkubation der HT29-Zellen mit ATX II bzw. Stemphyltoxin III wurde die mRNA der Zellen isoliert, zu cDNA umgeschrieben und zur real time-PCR eingesetzt. Da eine Signifikanzberechnung nach der Normalisierung auf die Negativkontrolle DMSO ($\Delta\Delta C_T$-Wert) nicht mehr möglich ist, wurde die Berechnung anhand der ΔC_T-Werte mittels *Student's t*-Test

durchgeführt (Karlen et al. 2007). Bei beiden untersuchten Toxinen überstiegen die ermittelten, durchschnittlichen mRNA-Transkriptionsraten ($\Delta\Delta C_T$) für Nrf2 und GSTA2 nicht das 1,3-fache der Negativkontrolle. Im Fall von GSTA1 wurden etwas höhere Werte, bis zur 1,6-fachen Transkriptmenge mit ATX II und Stemphyltoxin III gefunden, wobei allerdings die Schwankung bis zu 0,7 relative Transkriptionseinheiten betrug. Diese große Varianz zwischen den einzelnen Experimenten lag vor allem in der insgesamt geringen Menge an GSTA1-Transkripten in den Zellen begründet. Die durchschnittlichen C_T-Werte für GSTA1 betrugen 31,8. Ähnlich geringe Mengen an GSTA2-Transkripten (durchschnittlicher C_T-Wert von 30,6) führten auch im Fall von GSTA2 zu Schwankungen bis zu 0,4 relativen Transkriptionseinheiten. Der durchschnittliche C_T-Wert für Nrf2 betrug 21,8, was einer 500 - 1000 fach höheren Transkriptmenge entsprach und sich in einer deutlich geringeren Varianz zwischen den Experimenten niederschlug. Keines der untersuchten Gene zeigte eine signifikant veränderte Transkriptionsrate durch die ATX II- oder Stemphyltoxin III-Inkubation (Abb. 4-34A bzw. Abb. 4-34B). Die geringfügig erhöhten Werte im Fall von GSTA1 waren Folgen der relativ großen Schwankungen und der insgesamt niedrigen Transkriptmengen und zeigten keinerlei Konzentrationsabhängigkeit. Eine Aktivierung des Nrf2/ARE-Signalweges durch ATX II oder Stemphyltoxin III in den untersuchten Konzentrationen war daher nach dreistündiger Inkubation nicht zu beobachten. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass bei längeren Inkubationszeiten signifikant erhöhte Transkriptmengen dieser Gene gefunden werden könnten, da die hier verwendete Inkubationszeit von drei Stunden relativ kurz gewählt war. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Untersuchung auf Modulation des Gesamtglutathiongehaltes sowie des zellulären Redoxstatus (DCF-Assay) ließen die Ergebnisse oxidativen Stress durch ATX II und das vermutliche Stemphyltoxin III als Ursache für den beobachteten Anstieg an FPG-sensitiven Stellen jedoch als unwahrscheinlich erscheinen.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass es sich bei den beobachteten FPG-sensitiven Stellen um mögliche Addukte von DNA-Basen mit Toxinmolekülen handeln könnte, wie dies im Falle von Aflatoxin B1 bekannt ist (Coste et al. 2004). Solche DNA-Addukte können beim Ablesen der DNA durch Kollision mit dem Transkriptionskomplex zu DNA-Strangbrüchen führen, wie sie im Comet-Assay beobachtet wurden. DNA-Addukte, bei denen es nicht zum Strangbruch gekommen wäre, könnten dann bei der FPG-Behandlung durch Basenexzision in Strangbrüche überführt und als erhöhte Schweifintensität detektiert werden.

In weiterführenden Untersuchungen, beispielsweise mittels ^{32}P-Postlabeling, sollte daher der Frage nachegangen werden, ob die beobachteten FPG-sensitiven Stellen wie vermutet eine Folge möglicher Adduktbildung sind. Daraus könnten sich weitere wertvolle Erkenntnisse

hinsichtlich des toxikologischen Potentials der Perylenchinontoxine sowie den zugrundeliegenden toxikologischen Wirkmechanismen ergeben, die aktuell noch vergleichsweise wenig erforscht sind.

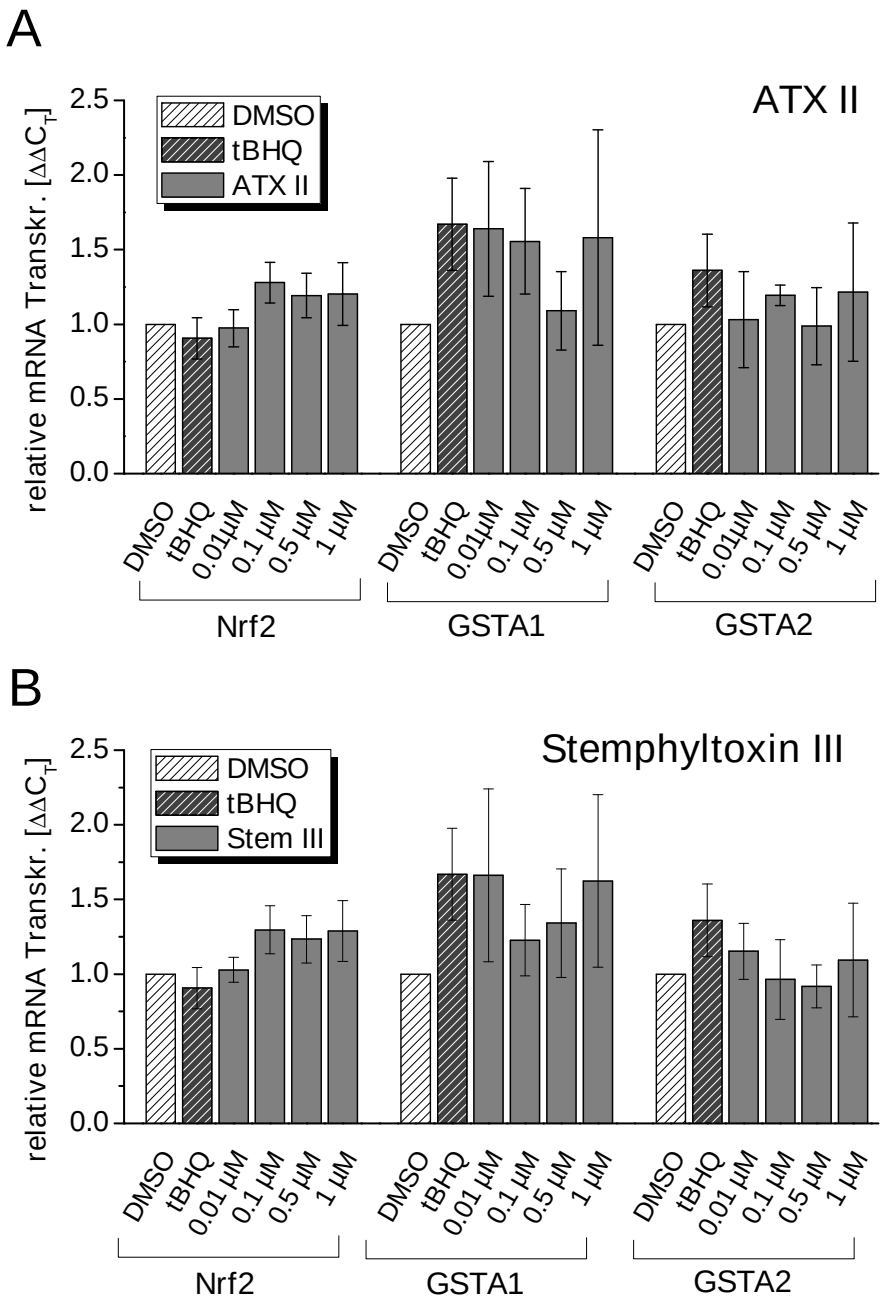


Abb. 4-34: Beeinflussung der Gentranskription von Nrf2, GSTA1 und GSTA2 durch Inkubation mit ATX II (A) sowie dem vermutlichen Stemphyltoxin III (Stem III) (B). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. Das reine Lösungsmittel DMSO (1% im Endansatz) diente als Negativkontrolle (rel. Transkription = 1), tBHQ (200 µM) als Positivkontrolle. Normalisiert wurde auf ß-Aktin als „housekeeping gene“. *Student's t*-Test, berechnet anhand der ΔC_T-Werte ergab keine signifikanten Unterschiede zur Negativkontrolle DMSO.

4.13.8 Einfluss von ATX II auf die Zellproliferation

Der Einfluss des reinen ATX II auf die Proliferation von HT29-Zellen wurde mittels Sulforhodamin B (SRB)-Assay untersucht. Der von Skehan et al. (1990) entwickelte Assay, der auf der Anfärbung des Lebendproteins kultivierter Zellen beruht, wurde nach der Modifikation von Vichai und Kirtikara (2006) durchgeführt, die auf das 96-Well-Format optimiert ist. Die Menge des gefärbten Lebendproteins korreliert dabei direkt mit der Zellzahl einer Kultur, sodass die photometrisch bestimmte Intensität der SRB-Lösung als Maß für die Proliferation der Zellen dienen kann. HT29-Zellen wurden in 96-Well-Platten angezüchtet und für 24 Stunden bzw. 72 Stunden mit ATX II im Konzentrationsbereich 0,01 - 10 µM inkubiert. Analog zu den übrigen toxikologischen Versuchen zeigte auch hier eine Konzentration von 0,01 µM ATX II keinen von der Negativkontrolle DMSO verschiedenen Effekt. Eine signifikante Hemmung der Zellproliferation wurde nach 72-stündiger Inkubation ab einer Konzentration ≥ 0,05 µM ATX II beobachtet (Abb. 4-35). Der Effekt war konzentrationsabhängig und konnte durch eine dreifaktorielle Potenzfunktion gut angenähert werden ($R^2 = 0,975$).

$$\textit{Relative Proliferation [\%]} = 103,32 - 20,96 * X^{0,356}$$

Daraus ließ sich eine halbmaximale Hemmkonzentration $IC_{50} = 0,8$ µM (= 280 ng/ml) für ATX II in HT29-Zellen berechnen. Im Fall der 24-stündigen Inkubation war dieser Effekt ebenfalls konzentrationsabhängig, jedoch weniger stark ausgeprägt. Eine signifikante Abnahme der Zellproliferation war ab 0,2 µM ATX II erkennbar. Da die höchste gemessene Konzentration noch 55% relative Proliferation zeigte, konnte der IC_{50}-Wert für 24 Stunden nicht durch Interpolation berechnet werden. Da die Messwerte sich jedoch sehr gut durch eine dreifaktorielle Potenzfunktion beschreiben ließen ($R^2 = 0,995$) und der Wert der höchsten gemessenen Konzentration sehr nah bei 50% lag, kann eine Extrapolation zur Abschätzung des IC_{50}-Wertes dienen. Für die errechnete Konzentration von $IC_{50} = 14$ µM (5 µg/ml) muss jedoch berücksichtigt werden, dass bei dieser Konzentration bereits deutlich zytotoxische Effekte des ATX II zu erwarten wären.

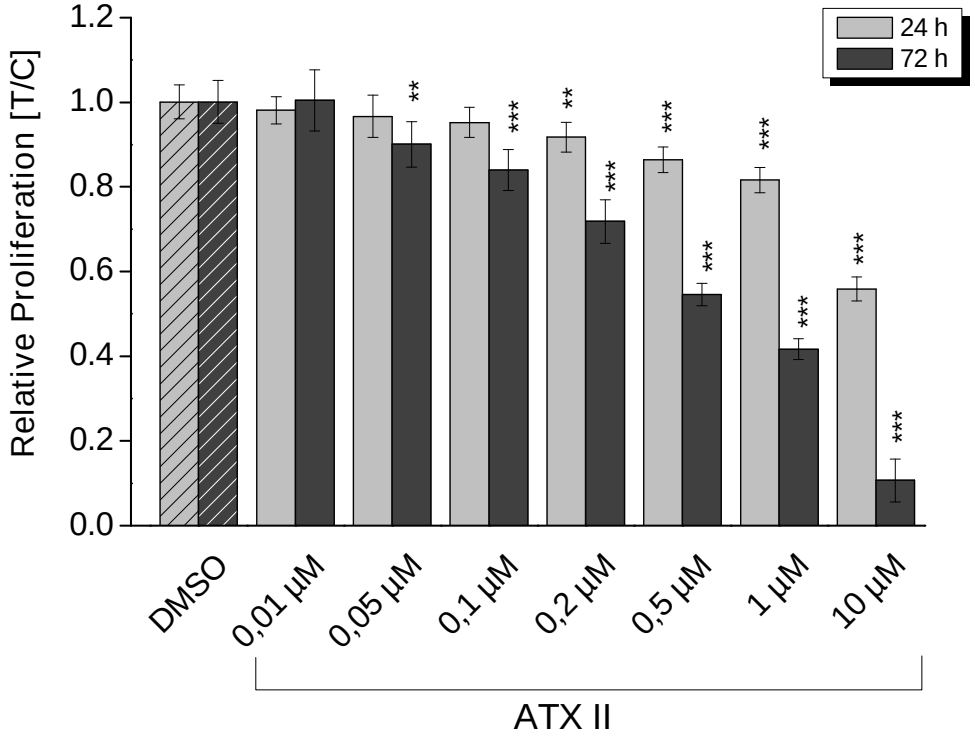


Abb. 4-35: Einfluss von ATX II auf die Proliferation von HT29-Zellen im SRB-Assay bei 24 h bzw. 72 h Inkubationszeit. Die gemessenen Extinktionen wurden auf die Negativkontrolle DMSO normalisiert. Angegeben sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten, die jeweils eine Sechsfachbestimmung beinhalten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf DMSO, wurden mittels *Student's t*-Test berechnet (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.13.9 Untersuchung zur Apoptoseinduktion

Apoptose tritt als physiologischer Vorgang bei Wachstum und Alterung von Zellen auf, und besitzt als Gegenstück zur Mitose eine zentrale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von Zellpopulationen in Geweben. Apoptose kann den Zellen auch als drastischer Abwehrmechanismus bei Immunreaktionen und Zellschäden durch verschiedene Noxen dienen. DNA-Schäden als Folge physiologischer oder pathologischer Reaktionen, sowie aufgrund von Bestrahlung oder Chemotherapeutika können über die Aktivierung des p53-Signalweges zur Apoptose der Zellen führen (Elmore 2007). Ebenso ist p53-unabhängige Apoptose DNA-geschädigter Zellen möglich, bei der die Höhe der DNA-Schädigung das Ausmaß der Apoptose beeinflusst, ohne dass der p53-Spiegel verändert wäre (Norbury und Hickson 2001). Aufgrund der starken DNA-Schädigung, die im Comet-Assay als Folge der Inkubation mit ATX II beobachtet wurde, wurden HT29-Zellen hinsichtlich möglicher Apop-

toseinduktion durch diese Toxine untersucht. Als Testsystem wurde ein Sandwich-ELISA gewählt, der die quantitative Bestimmung von Mono- und Oligonukleosomen erlaubt. Diese ca. 180 bp langen, an Histone assoziierten DNA-Fragmente (bzw. Vielfache davon) entstehen bei der Apoptose, da die Ca^{2+}- und Mg^{2+}-abhängige endogene Nuklease die hochkondensierte DNA an der zugänglichsten Stelle spaltet, also der internukleosomalen "linker"-Region. Im Fall einer Auftrennung durch Elektrophorese im Agarosegel ergeben diese Fragmente die typische "DNA-Leiter", die ein sicheres Indiz für Apoptose ist.

Um einen weiten Zeitraum für mögliche Apoptoseinduktion durch ATX II in HT29-Zellen abzudecken, wurden Inkubationen von 12 Stunden sowie 24 Stunden durchgeführt. Wie in Abbildung 4-36 ersichtlich, führte keine der untersuchten Konzentrationen von ATX II zu Extinktionsdifferenzen, die sich signifikant von denen der Negativkontrolle unterschieden, weder bei 12-stündiger noch bei 24-stündiger Inkubationszeit. Lediglich die Positivkontrolle (mitgelieferter DNA-Histon-Komplex) führte zu einer signifikant erhöhten Farbreaktion. Der Assay besitzt eine hohe Empfindlichkeit; der Hersteller nennt eine Sensitivität von 500 apoptotischen Zellen pro Milliliter Zelllysat. In den hier durchgeführten Experimenten wurde die empfohlene Menge von 50.000 Zellen pro Milliliter Zelllysat eingesetzt, sodass selbst ein Anteil von 1% apoptotischen Zellen an der Gesamtzellmenge noch detektierbar wäre. Selbst für den Fall einer nur geringfügigen Apoptoseinduktion durch ATX II hätte folglich ein geringer Effekt detektierbar sein sollen. Somit ergaben sich keinerlei Hinweise für eine Apoptoseinduktion durch ATX II im getesteten Konzentrationsbereich 0,01 - 1 µM, in dem potente genotoxische Effekte im Comet-Assay, sowohl nach einstündiger als auch nach 24 stündiger Inkubation beobachtet wurden, sowie signifikante Proliferationshemmung nach 24 bzw. 72 Stunden.

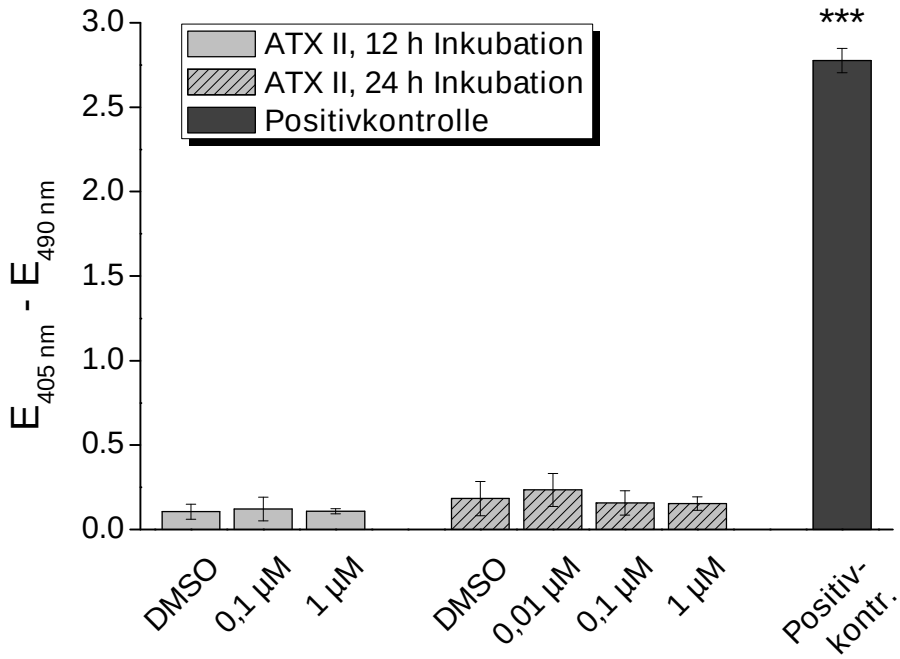


Abb. 4-36: Sandwich-Elisa zur Apoptosedetektion nach ATX II-Inkubation von HT29-Zellen (CellDeath Detection ELISA^{plus}, Roche). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Bestimmungen. Als Positivkontrolle diente der mitgelieferte DNA-Histon-Komplex. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Negativkontrolle DMSO wurden mittels *Student's t*-Test berechnet. (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

4.13.10 Einfluss von ATX II auf die Zellzyklusverteilung

Neben der Apoptose stellt das Anhalten des Zellzyklus eine wichtige Möglichkeit der Zelle dar, auf DNA-Schäden zu reagieren. Die bedeutendsten Checkpoints des Zellzyklus befinden sich am Übergang von der G_1 zur S-Phase sowie am Übergang von der G_2 zur M-Phase und können verhindern dass geschädigte DNA repliziert wird bzw. dass es bei DNA-Schäden zur Mitose kommt. Indem am Checkpoint das Weiterlaufen des Zellzyklus verhindert wird, können erkannte DNA-Schäden währenddessen repariert und der Zellzyklus anschließend fortgesetzt werden. G_1/S-Arreste sind in der Regel p53-vermittelt. Falls die DNA-Schädigung während der G_2-Phase auftritt kann ein G_2/M-Arrest aber auch unabhängig von p53 eingeleitet werden. Sind die DNA-Schäden zu schwer oder irreparabel, so kann am G_1/S-Checkpoint die Apoptose, oder aber ein stabiler G_1/S-Arrest eingeleitet werden, wobei beide Prozesse durch p53 vermittelt werden (Polyak et al. 1997).

Da ATX II im SRB-Assay zu einer signifikant gehemmten Proliferation von HT29-Zellen nach 24 Stunden führte, ohne dass dabei eine Veränderung der Zellviabilität im Vergleich zur Negativkontrolle DMSO beobachtet wurde, wurde untersucht, welchen Einfluss ATX II auf die Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach 12-stündiger bzw. 24-stündiger Inkubation hatte. Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch nach Anfärbung mit Propidiumiodid (PI) ermittelt, wobei die gemessene Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen ein Maß für ihren DNA-Gehalt darstellt, der abhängig von der Position im Zellzyklus ist. Verglichen mit Zellen in der G_0/G_1-Phase enthalten Zellen in der G_2-Phase, die sich kurz vor der Mitose befinden, die doppelte Menge an DNA. Der Gehalt der aktiv DNA-replizierenden Zellen in der S-Phase liegt dazwischen. Die in Abbildung 4-37 dargestellten Ergebnisse zeigten einen verringerten Anteil an Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit ATX II (siehe auch Abb. 4-38). Dieser Effekt deutet sich bereits bei der 12-stündigen Inkubationszeit an, erreicht jedoch dort keine statistische Signifikanz. Nach 24-stündiger Inkubation führt 1 µM ATX II zu einer signifikanten Erniedrigung des Anteils an Zellen in der S-Phase, während der Anteil in der G_0/G_1-Phase signifikant erhöht ist (Abb. 4-37). Bei Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der gemessenen Fluoreszenzsignale ist dieser Effekt noch deutlicher erkennbar. Der Anteil an Zellen in der S-Phase, die bei Zellen der Negativkontrolle DMSO gemessen werden (Abb. 4-38A) verschwindet nach 24 stündiger Inkubation mit 1 µM ATX II nahezu vollständig (Abb. 4-38B). Aufgrund von Überschneidungen der Phasen im Grenzbereich zwischen G_0/G_1- und S- bzw. S- und G_2/M-Phase fällt bei der Messung stets ein geringer Anteil an Zellen der einen Phase ins Messfenster der benachbarten Phase und umgekehrt. Selbst im Falle der völligen Abwesenheit von Zellen in der S-Phase sinkt der gemessene prozentuale Anteil dieser Phase daher nie auf null. Der signifikante Rückgang an Zellen in der S-Phase und der gleichzeitige signifikante Anstieg an Zellen in der G_0/G_1-Phase legen einen Zellzyklusarrest am G_1/S-Checkpoint nahe, wie er bei starken DNA-Schäden durch alkylierende Substanzen, DNA-quervernetzende Substanzen oder Klastogenen typisch ist (Johnson und Walker 1999). Im Rahmen weiterführender Untersuchungen könnte durch Bestimmung der p53-Aktivität bzw. deren Anstieg nach ATX II-Inkubation von HT29-Zellen die Vermutung eines G_1/S-Arrests durch ATX II weiter bestätigt werden (Gottlieb und Oren 1998), wobei eine erhöhte Expression des nachgeschalteten $p21^{WAF1/CIP1}$ typisch für einen G_1/S-Arrest in humanen Kolonkarzinomzellen ist (Waldman et al. 1995) und für die p53-vermittelte Apoptose nicht benötigt wird (Brugarolas et al. 1995; Gottlieb und Oren 1998).

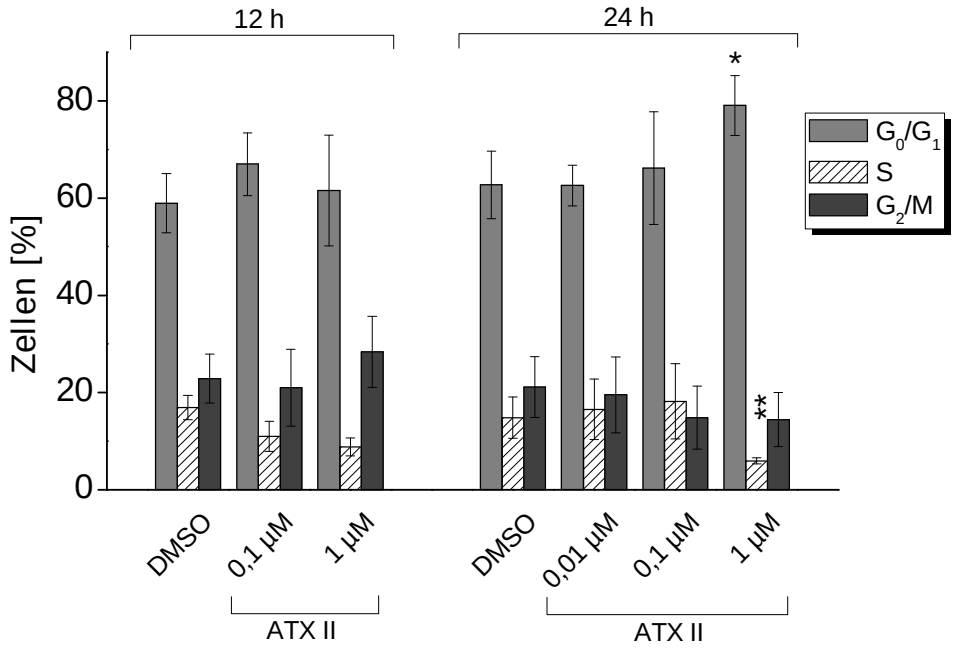


Abb. 4-37: Durchflusszytometrisch ermittelte Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Inkubation mit ATX II für 12 bzw. 24 Stunden (Fixierung mit Ethanol, Anfärbung mit Propidiumiodid, Negativkontrolle DMSO (1% in der Endkonz.)). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Negativkontrolle DMSO wurden mittels *Student's t*-Test berechnet. (*:p<0,05; **:p<0,01; ***:p<0,001).

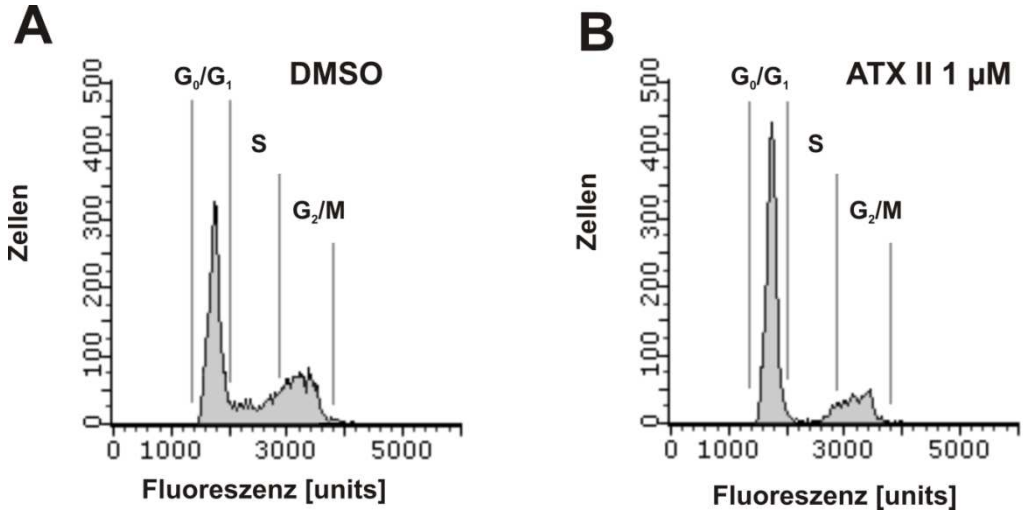


Abb. 4-38: Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzsignale von HT27-Zellen nach 24 stündiger Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO (A) bzw. mit 1 µM ATX II (B). Gemessen wurden je 5000 Ereignisse; Zelltrümmer ("debris") und agglomerierte Zellen wurden bei der Messung durch "gating" entfernt.

Weiterhin kann ein $p21^{WAF1/CIP1}$-vermittelter Zellzyklusarrest direkt mit einer unterdrückten Apoptose zusammenhängen (Canman et al. 1998), was bei Kolonkarzinomzellen häufiger beobachtet wird, als bei anderen Zelltypen. Dies wäre im Einklang mit der beobachteten Proliferationshemmung ohne Anzeichen für Apoptose.

Den hier beschriebenen Effekten auf Zellproliferation und Zellzyklusverteilung durch ATX II sollte daher weiter nachgegangen werden, beispielsweise durch Untersuchungen zur p53-Aktivität bzw. p21-Expression nach ATX II-Inkubation. Versuche mit längeren Inkubationszeiten könnten außerden wichtige Erkenntnisse liefern, ob der angehaltene Zellzyklus möglicherweise nach erfolgreicher DNA-Reparatur wieder aufgenommen wird oder als Folge irreparabler DNA-Schäden letztlich die Apoptose eingeleitet wird. Insbesondere im Hinblick auf das sich andeutende, potent genotoxische Potential der Perylenchinontoxine sind weitere Forschungsbemühungen zu dieser bisher wenig untersuchten Gruppe der Alternariatoxine nötig.

4.14 Bedeutung der Ergebnisse für Lebensmittel

Den Perylenchinontoxinen Altertoxin II und Stemphyltoxin III wurde bei der Analytik und der toxikologischen Untersuchung bisher weitaus weniger wissenschaftliche Aufmerksamkeit entgegengebracht, als den häufig als "Haupttoxinen" bezeichneten Alternariatoxinen AOH, AME, ALT und TeA. Dies könnte in der Tatsache begründet liegen, dass keine Toxinstandards der Altertoxine oder Stemphyltoxine kommerziell erhältlich sind, wodurch sowohl Analytik als auch toxikologische Untersuchungen erschwert werden. Infolgedessen existieren zur Zeit nur sehr wenige Arbeiten die sich mit diesen Toxinen befassen (die online-Datenbanksuche (PubMed) ergab nur 28 bzw. 2 Publikationen zu Altertoxinen bzw. Stemphyltoxinen, Chemical Abstracts (SciFinder) ergibt 29 Treffer zu Altertoxin II, von etwa 100 Publikationen, die Altertoxine im weitesten Sinne behandeln). Es existieren nur sehr wenige Studien, die die Toxikologie der Altertoxine thematisieren. Pero et al. (1973) ermittelten akut toxische Dosen für ATX I und ATX II von 100 - 200 mg/kg KG bei Mäusen. Panigrahi und Dallin (1994) errechneten einen LD_{50}-Wert von 200 µg/ml für Salinenkrebslarven (*Artemia salina* L). Eine Hemmung der Zellproliferation durch Altertoxine wurde für humane HeLa-Zellen (0,5 µg/ml, (Pero et al. 1973)) und V79 Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (> 0,02 µg/ml, (Boutin et al. 1989)) beschrieben, wobei ATX II in beiden Fällen die stärkste Hemmwirkung zeigte. Eine stark mutagene Wirkung der Altertoxine ist in *S. typhimurium* TA98, TA100 und TA1537 beobachtet worden, wobei die Mutagenität in der Reihenfolge ATX III > ATX II >

ATX I abnahm. Eine metabolische Aktivierung der Toxine war nicht erforderlich und ATX III zeigte etwa 10% der Mutagenität des stark mutagenen Leberkarzinogens Aflatoxin B1 (Stack und Prival 1986). Es existieren bisher keine Daten zur Toxikokinetik der Altertoxine oder zu ihrer Genotoxizität *in vivo* oder in Säugerzellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, geben Hinweise auf ein zytotoxisches und genotoxisches Potential dieser Toxine in Humanzellen, das die bekannten Effekte von AOH, AME, ALT und TeA um mehrere Größenordnungen übersteigt.

Während selbst 50 µM AOH bei einstündiger Inkubation keinen Einfluss auf die Viabilität von HT29-Zellen erkennen ließen (durchschnittlich 94,1% ± 0,6% Viabilität beim Trypanblauauschluss im Rahmen des Comet-Assays, Abschnitt 4.4.1) wurden bereits deutliche zytotoxische Effekte bei einstündiger Inkubation mit 10 µM ATX II beobachtet. Vergleichbare genotoxische Effekte wie 50 µM AOH wurden im Comet-Assay mit der gleichen Zelllinie schon bei 0,2 µM ATX II gemessen, wobei zusätzliche DNA-Basenschäden durch FPG detektiert wurden, die weder bei AOH, AME, TeA oder Mischungen daraus beobachtet wurden . Die FPG-sensitiven DNA-Schäden waren vermutlich nicht durch oxidativen Stress begründet, sondern legen eine substanzielle DNA-Adduktbildung nahe. Auch der beobachtete G_1/S-Zellzyklusarrest deutet auf ein hohes Ausmaß der DNA-Schädigung durch ATX II hin (Polyak et al. 1997; Johnson und Walker 1999).

Unter geeigneten Wachstumsbedingungen bildeten die meisten untersuchte Alternariastämme neben den "Haupttoxinen" ebenfalls deutliche Mengen an ATX II und Stemphyltoxin III, häufig im Bereich 30 - 170 µg/g Kulturmedium. Die Verhältnisse zwischen den gebildeten Perylenchinontoxinen ATX II bzw. vermutlichem Stemphyltoxin III und den Benzopyrontoxinen AOH, AME, ALT bzw. der Tetramsäure TeA waren unterschiedlich. Teilweise betrug die Menge an ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III weniger als 1% der Menge an "Haupttoxinen", teilweise überstiegen sie diese. Welche Mengen bzw. Verhältnisse der jeweiligen Toxine bei Alternariabefall von Lebensmitteln unter natürlichen Bedingungen auftreten, kann daraus selbstverständlich nicht abgeleitet werden. Für den Fall einer Alternariakontamination sollte jedoch stets berücksichtigt werden, dass bereits eine geringe ATX II- bzw. Stemphyltoxin III-Konzentration aufgrund der höheren Genotoxizität maßgeblicher für das toxikologische Potential der gesamten Kontamination sein kann, als die evtl. zehn- bis hundertfache Menge an AOH oder TeA.

Bei Lebens- und Futtermittelanalysen wurden in den meisten Fällen die Altertoxine und Stemphyltoxine bisher nicht analysiert, weshalb nur vergleichsweise wenige Daten zur Häu-

figkeit der Kontamination mit diesen Toxinen existieren. Seit einigen Jahren wird ATX I jedoch immer häufiger mit untersucht, wobei die Detektion geringer Mengen durch Verbesserungen der instrumentellen Analytik erleichtert wird. Zwischen 2008 und 2010 betrug die Fallzahl der positiv auf ATX I getesteten Lebensmittelproben in Deutschland durchschnittlich 76 - 91% der Fallzahlen für AOH, AME, ALT und TeA (CONTAM 2011); eine Kontamination mit ATX I kommt folglich nahezu genauso häufig vor. Es ist daher zu vermuten, dass Lebensmittel, die infolge von Alternariabefall AOH, AME oder TeA enthalten, ebenfalls mit ATX II, ATX III oder Stemphyltoxin III kontaminiert sein könnten, wobei die enthaltene Mengen an "Haupttoxinen" jedoch keineswegs prädiktiv für möglicherweise ebenfalls enthaltene Perylenchinontoxine sein müssen. Mehr Analysedaten zu Vorkommen und Menge der Altertoxine II und III sowie von Stemphyltoxin III in Lebensmitteln sind für die Bewertung von Gesundheitsrisiken durch Alternariatoxine daher dringend notwendig, insbesondere angesichts des deutlich stärker genotoxischen Potentials, verglichen mit AOH, AME, ALT oder TeA, aufgrund dessen bereits deutlich geringere Mengen toxikologisch relevant sein könnten.

5 Zusammenfassung

Im Fokus dieser Arbeit stand die Untersuchung komplexer Alternariaextrakte und ihrer enthaltenen Toxine sowie ihrer toxikologischen, insbesondere DNA-schädigenden Effekte. Ausgehend von stark genotoxischen Effekten der Extrakte jenseits der "Haupttoxine" AOH, AME, ALT und TeA wurde die DNA-schädigende Wirkung auf drei unbekannte Substanzpeaks eingegrenzt. Ein Peak wurde eindeutig als Altertoxin II identifiziert, bei einem weiteren handelt es sich vermutlich um Stemphyltoxin III. Als von zentraler Bedeutung erwies sich hierbei das Altertoxin II, das als bedeutende Ursache für die genotoxische Wirkung der untersuchten Alternariaextrakte identifiziert wurde. Zur Toxizität von Altertoxin II existieren bisher nur sehr wenige Arbeiten, die hauptsächlich die Mutagenität in Bakterienkulturen behandeln. Da keine Substanzstandards der Altertoxine kommerziell erhältlich sind, mussten Alternariastämme kultiviert, extrahiert und die genotoxischen Substanzen identifiziert und präpariert werden, um reinen Toxinstandard für die HPLC-Analysen und toxikologischen Experimente zur Verfügung zu haben.

Es wurden verschiedene Methoden der Kultivierung von *Alternaria* erprobt um möglichst toxinreiche Extrakte für die toxikologischen *in vitro* Assays zu gewinnen. Die Kultivierung auf autoklaviertem Reis bei 24 °C in der Dunkelheit führte nach 21 Tagen Kulturdauer zu reproduzierbar hohen Toxingehalten der Extrakte bis zu einigen Milligramm pro Milliliter Extrakt. Die Toxinbildung der einzelnen Alternariastämme untereinander variierte dabei um teilweise mehr als das Tausendfache, während die jeweiligen Stämme typische, reproduzierbare Toxinprofile zeigten. Die untersuchten Extrakte besaßen stark genotoxische Wirkung im Comet-Assay, die die Effekte der enthaltenen "Haupttoxine" AOH, AME und TeA weit überstiegen. TeA zeigte selbst bei einer Konzentration von 200 µM keine DNA-schädigende Wirkung.

Alle getesteten Alternariaextrakte führten außerdem zu einem signifikanten und konzentrationsabhängigem Anstieg an FPG-sensitiven Stellen in der DNA von HT29-Zellen, was auf zusätzliche oxidative Schädigung von DNA-Basen hinweist, oft in Verbindung mit oxidativem Stress. Durch genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung der Alternariaextrakte mit Comet-Assay als genotoxischem Endpunkt wurden sowohl die DNA-strangbrechende Wirkung als auch die Induktion FPG-sensitiver Stellen auf drei unbekannte Peaks eingegrenzt. Mittels semipräparativer HPLC wurden mehrere Milligramm dieser Peaksubstanzen gewonnen, die eine Identifizierung eines Peaks als Altertoxin II mittels NMR, anhand seiner exakten Masse

(UHR-ESI-TOF-MS) und über sein UV-Spektrum erlaubten. Bei einem weiteren Peak handelte es sich aufgrund seines UV-Spektrums und seiner Molekül- bzw. Fragmentmassen (ESI-MS) vermutlich um Stemphyltoxin III. Das UV-Spektrum des drittem Peaks deutete darauf hin, das es sich dabei um Altertoxin III handeln könnte; er wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht präpariert oder weiter untersucht.

Mehrere Milligramm reines ATX II wurden durch semipräparative HPLC gewonnen und für toxikologische Versuche *in vitro* eingesetzt. Das vermutliche Stemphyltoxin III wurde aufgrund geringer Stabilität bei der Trocknung als millimolare Stammlösung in DMSO gewonnen, die ebenfalls für toxikologische Versuche eingesetzt wurde.

Für alle Inkubationen mit ATX II bzw. vermutlichem Stemphyltoxin III wurde ein Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 µM gewählt, da höhere Konzentrationen bereits zytotoxische Effekte zeigten und zu Artefakten bei der Erfassung der genotoxischen Wirkung führen könnten. Konzentrationen bis 1 µM ATX II zeigten auch nach 24 Stunden Inkubation keine Verringerung der Viabilität von HT29-Zellen. Reines ATX II zeigte konzentrationsabhängige, signifikant DNA-strangbrechende Wirkung in HT29-Zellen ab 0,1 µM und konzentrationsabhängige, signifikante Erhöhung der Menge an FPG-sensitiven Stellen in der DNA.

Das vermutete, strukturell sehr ähnliche Stemphyltoxin III zeigte analoge Effekte, jedoch in etwas geringerem Ausmaß. Der Vergleich zwischen der Inkubation mit reinem ATX II und komplexem Alternariaextrakt derselben ATX II-Konzentration zeigte im Comet-Assay, dass ATX II einen substanziellen Beitrag hinsichtlich Art und Ausmaß der DNA-Schäden leistet, die durch den komplexen Alternariaetrakt beobachtet wurden. Im Gegensatz zu AOH blieben die DNA Schäden auch bei 24 h Inkubation mit ATX II unverändert in den HT29-Zellen messbar, was gegen eine schnelle Entgiftung und DNA-Reparatur spricht.

Da die Induktion FPG-sensitiver Stellen in den meisten Fällen einen Hinweis auf oxidativen Stress in der Zelle darstellt und die Möglichkeit der Superoxid-Bildung durch ATX II in der Literatur beschrieben ist (Hartman et al. 1989), wurde überprüft, ob die beobachteten FPG-sensitiven Stellen eine Folge von oxidativem Stress durch ATX II waren. Im DCF-Assay wurde keine Veränderung des intrazellulären Redoxstatus durch ATX II oder das vermutliche Stemphyltoxin III festgestellt. Da der DCF-Assay Superoxid jedoch nicht direkt erfassen kann, sondern nur nach Disproportionierung zu O_2 und H_2O_2 und in Anwesenheit eines Katalysators wie z.B. Fe^{2+}, Häm oder Cytochrom C im Cytosol, ist die Empfindlichkeit des Assays für $O_2^{\cdot -}$ geringer als für andere ROS (Wardman et al. 2002). Die Untersuchung der Transkriptionsraten der Gene für Nrf2, und für die humanen Glutathion-S-Transferasen GSTA1 und

GSTA2, die eng mit der zellulären Reaktion auf oxidativen Stress assoziiert sind, zeigte keine signifikante Veränderung, wobei nicht auszuschließen ist, dass bei längerer Inkubationszeit entsprechende Veränderungen auftreten könnten. Hierzu sind weitere Untersuchungen erforderlich. Ebenso hatte die Inkubation mit ATX II keinen Einfluss auf den Gesamtglutathiongehalt der Zellen, sodass oxidative Schädigung als Ursache für den Anstieg an FPG-sensitiven Stellen der DNA ausgeschlossen wird. Die Möglichkeit von DNA-Toxin-Addukten erscheint als Ursache der FPG-sensitiven Stellen wahrscheinlich, wie dies für z. B. Aflatoxin B1-Guanin-Addukte (N7-AFB1-FapydG) beschrieben ist (Frosina 2004), und sollte im Rahmen weiterführender Arbeiten eingehend untersucht werden.

Trotz der stark DNA-schädigenden Wirkung von ATX II zeigten HT29-Zellen keine Anzeichen für Apoptose nach 12 bzw. 24 h Inkubationszeit. Nach 24-stündiger Inkubation zeigte sich ein Zellzyklusarrest am G_1/S-Checkpoint, was typisch für starke DNA-Schäden durch Alkylierung, Quervernetzung und Klastogene ist (Johnson und Walker 1999). Insbesondere bei Kolonkarzinomzellen kann dabei ein stabiler Zellzyklusarrest an die Stelle der Apoptose treten (Polyak et al. 1997). ATX II wirkte konzentrationsabhängig signifikant proliferationshemmend auf HT29-Zellen in Konzentrationen von 0,05 - 1 µM, bei denen kein signifikanter Einfluss auf die Viabilität von HT29-Zellen beobachtet wurde. Für 72 h Inkubationszeit wurde eine halbmaximale Hemmkonzentration IC_{50} = 0,8 µM (= 280 ng/ml) ermittelt. Diese proliferationshemmende Wirkung von ATX II ist vermutlich eine Folge des beobachteten Zellzyklusarrestes.

Um eine toxikologische Bewertung eines möglichen Gesundheitsrisikos aufgrund der Alternariakontamination von Lebensmitteln zu ermöglichen, werden deutlich mehr Daten zu Häufigkeit und Konzentrationen mit Altertoxin belasteter Lebensmittel benötigt. Insbesondere sind jedoch weitere toxikologische Daten bezüglich des Wirkmechanismus und der toxikologisch relevanten Konzentrationsbereiche von Altertoxinen in verschiedenen Testsystemen nötig.

Nach Wissen des Autors wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmals DNA-strangbrechende Wirkungen von Altertoxin II und Stemphyltoxin III in Humanzellen beschrieben, sowie die ausgeprägte Induktion FPG-sensitiver Stellen durch diese Toxine, die nicht durch oxidativen Stress bedingt sind. Der beobachtete Zellzyklusarrest von humanen Kolonkarzinomzellen ohne Anzeichen für Apoptose nach 24 stündiger Inkubation mit ATX II ist bisher ebenfalls nicht in der Literatur beschrieben worden. Altertoxin II und das vermutliche Stemphyltoxin III wurden als maßgebliche Faktoren für die beobachteten genotoxischen Effekte der untersuch-

ten komplexen Alternariaextrakte erkannt. Durch die erarbeiteten Methoden zur Gewinnung der kommerziell nicht erhältlichen Mykotoxine ATX II und Stemphyltoxin III aus öffentlich verfügbaren Alternariastämmen werden weitere, analytische und toxikologische Studien erleichtert, während gleichzeitig eine bessere Vergleichbarkeit gewährleistet ist, als bei der Kultivierung selbstisolierter Alternariastämme. Die vorliegende Arbeit zeigt leistet somit einen wichtigen Beitrag zur immer noch spärlichen Datenlage der Alternariatoxine, insbesondere deren genotoxischer Wirkung, und bietet einen Anknüpfungspunkt für notwendige, weiterführende Untersuchungen.

6 Material und Methoden

6.1 Die humane Zelllinie HT29

Die Zelllinie HT29 entstammt einem humanen Adenokarzinom, und wurde 1964 aus dem Primärtumor einer 44 Jahre alten, kaukasischen Frau etabliert. Die Zelllinie wurde als heterotransplantierbar beschrieben, und bildet gut differenzierte G1 Tumoren aus (Fogh 1975). Die Zellen sind hypertriploid mit 17,5 % Polyploidie. In Kultur zeigen die Zellen adhärentes, epitheloides Wachstum als Monolayer oder in großen Kolonien. Ihre Verdopplungszeit beträgt 40 - 60 Stunden (DSMZ, Braunschweig).

6.1.1 Kultivierung und Lagerung

Bei Kultivierung der Zellen *in vitro* muss sowohl die Zufuhr lebensnotwendiger Substanzen, als auch die Neutralisierung schädlicher Stoffwechselprodukte über das Zellkulturmedium geschehen. Als Kulturmedium diente Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FKS, hitzeinaktiviert bei 56 °C für 30 min) und 1% Antibiotika-Lösung (Penicillin (10.000 units) und Streptomycin (10.000 µg/ml). Alle Arbeitsschritte wurden an der Sterilbank durchgeführt, und alle verwendeten Lösungen zuvor im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

6.1.2 In Kulturnahme von Zellstocks

Zellstocks wurden bei -196 °C in einem Kryo-Behälter mit flüssigem Stickstoff gelagert, bzw. bei -80 °C in einem Biofreezer. Um Stocks wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in DMEM resuspendiert, das mit 20% fötalem Kälberserum supplementiert war. Der als Frostschutzmittel eingesetzte Anteil von 10% DMSO, der für Zellen bereits toxisch wirkt, wurde dabei auf einen unproblematischen Gehalt von 1% verringert. Die Zellsuspension wurde bei 130 x g für 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 5 ml frischem DMEM mit 20% FKS resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde zunächst in einer kleinen Zellkulturflasche (25 cm^2 Bodenfläche) bei 37 °C und 5% CO_2 anwachsen gelassen. Nach einigen Tagen, sobald die Zellen gut angewachsen waren und sich geteilt hatten, wurde wieder auf 10% FKS-Zusatz und größere Zellkulturflaschen (175 cm^2) umgestellt.

6.1.3 Herstellen von Zellstocks

Zur Lagerung wurden Zellen aktiv wachsender Zellkulturen abtrypsiniert, abzentrifugiert und in 70% DMEM : 20% FKS : 10% DMSO resuspendiert. Die Zellzahl sollte dabei bei ca. 1 Mio/ml liegen. Aliquote von je 1,5 ml wurden auf je 2 ml Kryo-Gefäße verteilt und sofort bei -20 °C eingefroren. Nach 24 Stunden wurden diese Stocks dann bei -80 °C im Biofreezer bzw. bei -196 °C in einem Kryo-Behälter mit flüssigem Stickstoff gelagert.

6.1.4 Medienwechsel

Durch den Stoffwechsel der Zellen werden dem Kulturmedium einerseits ständig Nährstoffe entzogen, andererseits reichern sich die Ausscheidungsprodukte der Zellen im Medium an. Das damit verbundene Absinken des pH Wertes führt zu einer Farbveränderung des enthaltenen pH-Indikators Phenolrot von rot nach orange (Lindl 2002). Um gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu gewährleisten ist es notwendig, regelmäßig das Kulturmedium zu ersetzen. Abhängig von der Zelldichte war dies alle 2 - 4 Tage nötig. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und die benötigte Menge an frischem Medium zugegeben.

6.1.5 Passagieren der Zellen

Sobald die Zellen eine Konfluenz von 70 - 80% erreichen ist es notwendig die Zelldichte zu verringern. Dies geschieht durch Subkultivierung bzw. Passagieren der Zellen (Lindl 2002). Dazu wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und das adhärente Zelllayer mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurden die Zellen mit 2-3 ml Trypsinlösung überschichtet und ca. 2 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Durch seitliches Klopfen an die Zellkulturflasche löst sich der Zellrasen vom Boden der Flasche ab. Durch sofortige Zugabe von serumhaltigem Medium wurde das Trypsin inaktiviert, da eine zu lange Trypsinbehandlung die Zellen schädigen kann (Lindl 2002).

6.1.6 Zellzahlbestimmung und Viabilität

6.1.6.1 mittels Neubauer Zählkammer

Die Bestimmung der Zellzahl ist besonders für Inkubationsansätze wichtig, die bei einer bestimmten Zellzahl durchgeführt werden sollen. Sie kann mit einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch ermittelt werden. Dazu wird die trockene Zählkammer angehaucht und vorsichtig das Deckgläschen mit etwas Druck aufgesetzt, bis am Rand Newton'sche Ringe (regenbogenfarbige Streifen) sichtbar sind. Der Kapillarraum ist dann genau 0,1 mm hoch. Ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension wird nun mit einer gewissen Menge Trypanblau-Lösung versetzt (typischerweise 20 µl + 20 µl; entspr. 1:2 Verdünnung).

Die Zell-Trypanblau-Suspension wird nun in den Kapillarraum pipettiert und die Zellen innerhalb der 4 Quadrate unter dem Mikroskop ausgezählt und gemittelt. Jedes Quadrat hat eine Fläche von 1 mm^2, die Höhe des Kapillarraumes beträgt 0,1 mm, das Volumen beträgt folglich 0,1 µl. Durch Multiplikation mit 10.000 und dem Verdünnungsfaktor ergibt sich die Zellzahl der Suspension pro ml.

6.1.6.2 Lebendzellzahl

Trypanblau ist ein Diazo-Farbstoff, der die intakte Zellmembran einer lebenden Zelle nicht passieren kann. Sie erscheinen daher unter dem Mikroskop farblos, wenn der Farbstoff zu einer Zellsuspension gegeben wird. Tote Zellen hingegen färben sich blau, wodurch eine Unterscheidung möglich wird. Zur Bestimmung der Lebendzellzahl werden nur die farblosen Zellen gezählt.

6.1.6.3 Viabilität

Die Viabilität bezeichnet den Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl.

$$Viabilität\ [\%] = \frac{lebende\ Zellen}{lebende + tote\ Zellen} * 100\%$$

Eine niedrige Viabilität nach der Inkubation deutet auf Zytotoxizität der getesteten Substanz hin, kann aber auch von Bearbeitungsfehlern herrühren (z.B. zu lange Trypsineinwirkung, zu hohe mechanische Belastung der Zellen, Austrocknen der Zellen etc.)

6.1.6.4 ViaCount (Durchflusszytometrie)

Die Bestimmung der Zellzahl wurde auch mithilfe des Guava EasyCyte Durchflusszytometers (Millipore, Hayward, USA) durchgeführt. Zur Fluoreszenzfärbung der Zellen wurde das empfohlene Guava ViaCount Reagenz verwendet. Das Prinzip der Messung beruht auf zwei Fluoreszenzfarbstoffen mit unterschiedlicher Membranpermeabilität und unterschiedlichen Emissionswellenlängen. Der erste Farbstoff durchdringt die Plasmamembran lebender sowie toter Zellen, bindet an die DNA und fluoresziert bei seiner charakteristischen Wellenlänge, wodurch Zellen von weiteren möglichen Messereignissen, insbesondere Luftbläschen unterschieden werden können, die nicht fluoreszieren. Der zweite enthaltene Fluoreszenzfarbstoff kann die Zellmembran lebender Zellen nicht passieren und bindet folglich nur die DNA toter Zellen. Dies erlaubt die Unterscheidung zwischen toten Zellen, die beide Emissionswellenlängen zeigen und lebenden Zellen, die nur eine Emissionswellenlänge aufweisen. Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurde die Zellsuspension mit der Färbelösung 1:20 verdünnt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt vor der Messung wurde das jeweilige Messröhrchen nochmals kurz auf mittlerer Stufe gevortext, um eine homogene Suspension zu gewährleisten. Die Auswertung erfolgte mittels Guava ViaCount-Software (Millipore, Hayward, USA), wobei pro Probe jeweils 1000 Zellen gemessen wurden. Die Zellzahl der verdünnten Probenlösungen lag stets im Bereich von ~80 x 10^3 - 200 x 10^3 und somit deutlich unterhalb des empfohlenen Maximalwertes von 500 x 10^3, jenseits dessen die Messung durch mögliche Überlagerungen von Zellen gestört sein kann. Die Viabilität in Prozent errechnet sich, analog zum Trypanblauausschluss, aus dem Anteil lebender Zellen zur Gesamtzellzahl.

Geräte und Chemikalien:

PBS 10 x Stammlösung	1710 mM NaCl 100 mM Na_2HPO_4 34 mM KCl 18 mM KH_2PO_4 pH 7,4; mit H_2O_{bidest} auf 1 l auffüllen
PBS	PBS 10 x Stammlösung 1:10 verdünnen und autoklavieren
Trypsin	500 mg Trypsin

	100 ml 10 x PBS mit H_2O_{bidest} auf 1 l auffüllen über Nacht auf Eis rühren pH-Wert überprüfen (7,0-7,4) steril filtrieren (Porengröße: 0,22 µm) Lagerung bei -20 °C
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, München
Durchflusszytometer	Guava EasyCyte, Millipore
Guava ViaCount Reagent	Millipore, Cat.No. 4000-0040

6.2 Kultivierung der Schimmelpilze

Alle Schimmelpilzkulturen wurden von der Deutschen Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen. Alle Arbeitsschritte werden, wenn nicht anders beschrieben, unter einer gesonderten Sterilbank durchgeführt. Durch die zusätzliche Filterung der abgesaugten Luft wird weiterhin sichergestellt, dass keine allergenen Sporen in die Raumluft gelangen.

6.2.1 Verwendete Schimmelpilzstämme

6.2.1.1 Alternaria alternata DSM 1102

Dieser Schimmelpilz *Alternaria alternata* (Fries : Fries) von Keissler wurde 1976 von Sawamura (1976) beschrieben. Synonym finden sich die Bezeichnungen *Alternaria mali* Roberts und *Alternaria tenuis* Nees**.** Er wurde von einem Apfelbaum des Kultivars Indo (*Prunus malus* cv. Indo) isoliert und ist ein wirtspezifischer Toxinbildner, der zur Bildung von Blattflecken führt ("leaf blotch"). Von der DSMZ wird als Kulturmedium V8-Agar empfohlen.

6.2.1.2 Alternaria alternata DSM 12633

Botanisch ebenfalls *Alternaria alternata* (Fries : Fries) von Keissler, bzw. *Alternaria mali* Roberts oder *Alternaria tenuis* Nees, wird für diesen Stamm von der DSMZ ein anderer Agar als Kulturmedium empfohlen (Chaetomium-Medium) das neben Hefeextrakt und Phosphat-

puffer noch Natriumnitrat, Magnesiumsulfat, Kaliumchlorid und Eisen(III)sulfat enthält. Es wurde hier allerdings V8-Medium verwendet, da dieses ebenfalls gutes Wachstum erlaubte.

6.2.1.3 Alternaria alternata DSM 62006

Dieser Stamm von *Alternaria alternata* (Fries : Fries) von Keissler **(***Alternaria mali* Roberts, *Alternaria tenuis* Nees) wurde ursprünglich von Blättern der Rübenpflanze (*Beta vulgaris*) isoliert. Als Kulturmedium wird V8-Agar empfohlen.

6.2.1.4 Alternaria brassicicola DSM 62008

Botanisch *Alternaria brassicicola* (Schw.) Wiltshire, wurde dieser Schimmelpilz ursprünglich von der Rapspflanze (*Brassica rapa*) isoliert. Da auch dieser Pilz gut auf den hier verwendeten Medien wächst, wurde nicht der von der DSMZ empfohlene Maismehl-Agar verwendet, sondern ebenfalls V8-Medium.

6.2.1.5 Alternaria alternata DSM 62010

Dieser Stamm von *Alternaria alternata* (Fries : Fries) von Keissler (*Alternaria mali* Roberts, *Alternaria tenuis* Nees) wurde von Blättern der Zinnie (*Zinnia elegans*) isoliert. Als Kulturmedium wird, wie von der DSMZ empfohlen, V8-Agar verwendet.

6.2.1.6 *Alternaria tenuissima* DSM 63360

Der Stamm *Alternaria tenuissima* (Kunze : Fries) Wiltshire wurde von Bodenproben in Nepal isoliert. Entsprechend der Empfehlung der DSMZ wird als Kulturmedium V8-Agar verwendet.

6.2.2 Reaktivierung der gefriergetrockneten Myzelien

Die von der DSMZ bezogenen Alternariastämme lagen als gefriergetrocknete Myzelien vor. Zur Reaktivierung wurden die Glasampullen unter der Sterilbank geöffnet, auf das trockene Mycelpellet 1 ml steriles V8-Flüssigmedium (ohne Agar) gegeben und zur Rehydratisierung 30 min stehen gelassen. Danach wurde das Pellet durch Pipettieren gut resuspendiert und auf einer Petrischale mit V8-Agar verteilt. Die Petrischale wurde am Rand mit Parafilm versiegelt

und bei 24 °C im Brutschrank inkubiert. Nach etwa zwei Tagen war das Myzelwachstum bereits mit bloßem Auge erkennbar.

6.2.3 Herstellen von Sporenstocks zur Lagerung

Um lagerfähige Stocks der einzelnen Kulturen herzustellen wurde die Agarschicht einer gut bewachsenen V8-Agar-Petrischale (ca. 14 Tage nach Inokulation) herausgelöst und in einem 50 ml Falcontube mit 15 ml sterilem PBS versetzt, verschlossen und 1 min gut geschüttelt, um die Sporen von der Oberfläche zu lösen. Die entstandene Suspension wurde über steril autoklavierte Watte filtriert und die Sporenzahl mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Suspension wurde bei 3.000 x g abzentrifugiert und in einer geeigneten Menge steril filtriertem PBS mit 20% Glycerolzusatz aufgenommen, sodass die Sporendichte mindestens 100.000 Sporen / ml entsprach, und Aliquote von 1 ml in Kryo-Röhrchen zunächst bei -80 °C, dann bei -196 °C eingefroren.

6.2.4 Kultivierung auf Reis

Zur Kultivierung auf Reis wurden pro Ansatz 150 g Langkornreis mit 80 ml destilliertem Wasser in einem 1 l Erlenmeyerkolben versetzt, mit einem Zellstoffstopfen verschlossen und autoklaviert (15 min bei 121 °C). Sobald sich der Autoklav öffnen ließ (bei ca. 80 °C Resttemperatur) wurden die Kolben herausgenommen, um ein Antrocknen der oberen Reisschichten zu vermeiden. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Kolben unter der Sterilbank geöffnet und der Reis mit einem sterilen Spatel aufgelockert. Eine Probe (ca. 5 g Reis) wurde entnommen und im Trockenschrank bei 60 °C über Nacht getrocknet. Durch Differenzwägung wurde der Wassergehalt bestimmt, und der Reis in den Kulturkolben, wenn nötig, durch Zugabe der entsprechenden Menge autoklavierten, destillierten Wassers auf 38% Wassergehalt ergänzt. Eine Inokulation mit Sporensuspension war aufgrund der geringen Sporenbildung (insbesondere von *A. alternata* DSM 1102 und *A. alternata* DSM 62006) teilweise problematisch. Zur Inokulation wurden deshalb 7 Stückchen (d = 7 mm) einer aktiv wachsenden V8-Agar-Kultur (Petrischale d = 10 cm) verwendet und die Kolben wieder mit einem Zellstoffstopfen verschlossen.

Kultiviert wurde im Brutschrank bei 24 °C und Dunkelheit. Jeden zweiten Tag wurde der Reis in den Kolben durch Schütteln aufgelockert, um ein Verklumpen zu vermeiden und ein homogenes Wachstum zu gewährleisten. Die Kolben wurden dem Licht so wenig wie möglich ausgesetzt, um eine mögliche Unterdrückung der Toxinproduktion durch Lichteinfluss möglichst

zu vermeiden (Soderhall et al. 1978; Haggblom und Unestam 1979; Haggblom und Niehaus 1986).

6.2.5 Kultivierung auf Agar

6.2.5.1 Kultivierung auf V8-Agar

Die Sporenstocksuspension wurde bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, und pro Petrischale (d = 10 cm, 10 ml V8-Agar) ein Aliquot, das 10^5 Sporen entsprach, verteilt. Die Petrischale wurde am Rand mit Parafilm verschlossen und bei 24 °C und Dunkelheit kultiviert. Nach etwa zwei Tagen war deutliches Mycelwachstum bereits mit bloßem Auge zu erkennen. Nach etwa 4 Tagen waren die Petrischalen komplett bewachsen.

6.2.5.2 Kultivierung auf Tomatensaft-Agar

Die Kultivierung auf Tomatensaft-Agar erfolgte analog zum V8-Agar (10 ml pro Petrischale d = 10 cm), wobei der Multivitamingemüsesaft durch Tomatensaft ersetzt wurde. Sowohl beim verwendeten Tomatensaft als auch beim Gemüsesaft für das V8-Medium wurde darauf geachtet, dass es sich um biologisch erzeugte Produkte ohne Zusatz von Konservierungsstoffen handelte, um denkbare Effekte auf das Wachstum durch mögliche Pestizid-/Fungizidrückstände oder Konservierungsmittel auszuschließen. Durch HPLC-Analyse nicht beimpfter Agar-Schalen (Leerwert) wurde sichergestellt, dass die beobachteten Toxinkonzentrationen keine Folge bereits bestehender Alternariatoxinkontamination des Nährmediums waren.

6.2.5.3 Kultivierung auf Hefeextrakt-Saccharose-Agar (YES)

Beim verwendeten Hefeextrakt-Saccharose-Agar handelt es sich um konventionellen Hefeextrakt- (YE-) Agar, der aus kommerziellem YE-Fertigagarpulver (Carl Roth) hergestellt, jedoch mit 150 g Saccharose pro Liter supplementiert wurde. Die eingesetzte Menge betrug ebenfalls 10 ml pro Petrischale (d = 10 cm)

Verwendete Geräte und Chemikalien:

Langkornreis, geschält — aus örtlichem Supermarkt

Hefeextrakt-Agar — DEV, EN ISO 6222:1999, für die Mikrobiologie, Carl Roth, Karlsruhe, enthaltend lt. Hersteller:

Trypton	6 g/l
Hefeextrakt 3 g/l	
Agar	15 g/l
pH-Wert	7,2 ±0,2

Agar-Agar, bakteriologisch — hochrein, für die Bakteriologie, Carl Roth, Karlsruhe

V8-Flüssigmedium
(Zur Reaktivierung der gefriergetrockneten Mycelien)

20 ml Multivitamin-Gemüsesaft
300 mg $CaCO_3$
mit H_2O_{dest} auf 100 ml auffüllen und autoklavieren.

V8-Agar

20 ml Multivitamin-Gemüsesaft
300 mg $CaCO_3$
1,5 g Agar-Agar

mit H_2O_{dest} auf 100 ml auffüllen und auf dem Heizrührer den Agar lösen, 15 min bei 121°C.

autoklavie ren, noch heiß 10 ml pro Petrischale (d = 10 cm) verteilen und erstarren lassen.

Tomatensaft-Agar

20 ml Tomatensaft
300 mg $CaCO_3$
1,5 g Agar-Agar

mit H_2O_{dest} auf 100 ml auffüllen und auf dem Heizrührer lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, noch heiß 10 ml pro Petrischale (d = 10 cm) verteilen und erstarren lassen.

YES-Agar

2,4 g Hefeextrakt-Agar-Pulver
15 g Saccharose

mit H_2O_{dest} auf 100 ml auffüllen und auf dem Heizrührer lösen, 15 min bei 121°C autoklavieren, noch heiß 10 ml pro Petrischale (d = 10 cm) verteilen und erstarren lassen.

Kühlinkubator — KB 115, Binder

6.3 Extraktion der Kulturen

Zur Probennahme wurde ca. 1 g bewachsener Reis in vorgewogene Kunstoffzentrifugenröhrchen gegeben, rückgewogen und auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 ml eiskalter Extraktionslösung wurde mechanisch homogenisiert und sofort zweimal mit je 5 ml Ethylacetat extrahiert (auf höchster Stufe 30 Sekunden vortexen und schütteln). Der enthaltene Anteil an KCl in der Extraktionslösung diente dabei der besseren Phasentrennung bei der Zentrifugation. Es wurde je 10 min bei 3.000 x g und 10 °C zentrifugiert, die vereinigten Extrakte im Evaporator zur Trockne eingeengt und der Rückstand in Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde zur HPLC-Untersuchung eingesetzt. Um die Rohextrakte in Zellkulturassays zur Inkubation nutzen zu können, wurden die trockenen Rückstände in DMSO statt in Methanol aufgenommen.

Bei den Agar-Kulturen wurden zur Probennahme pro Petrischale zwei Scheibchen ausgestochen (d = 12 mm, entsprechend 0,5 g Probe), mit 1 ml Extraktionslösung homogenisiert und zweimal mit je 2 ml Ethylacetat extrahiert. Zur besseren Phasentrennung wurde ebenfalls je 10 min bei 3.000 x g zentrifugiert. Die vereinigten Phasen wurden zur Trockne eingeengt und zur Analyse in 200 µl Methanol aufgenommen.

Stabhomogenisator	Ultra Turrax T25
Extraktionslösung	KCl 0,15 Mol/l in Wasser (mit HCl auf pH 3 eingestellt um TeA mit zu erfassen)
Ethylacetat	p.a., Carl Roth, Karlsruhe
Methanol	Rotisolv HPLC Ultra Gradient Grade, CarlRoth

6.4 HPLC-Untersuchung der Extrakte

6.4.1 Herstellen der Standards

AOH, AME und ALT lagen als reine Substanzstandards vor. Jeweils etwa 1-2 mg wurden auf einer Feinstwaage (0,001 mg Genauigkeit) eingewogen, in Methanol gelöst und zu 1 mM Lösungen verdünnt. Da der TeA-Standard als Kupfersalz vorlag, musste das Kupfer zunächst über einen stark sauren Ionentauscher abgetrennt werden. Dazu wurden ca. 1,7 mg des TeA-Kupfersalzes in 2 ml Methanol gelöst und über eine Chromatographiesäule mit 1,5 g Ionen-

tauscher vom Kupfer befreit. Die Säule wurde mit 4 ml Methanol nachgespült und die vereinigten Eluate im Zentrifugalevaporator zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 1,5 ml Methanol aufgenommen und davon eine 1:100 Verdünnung gegen reines Methanol bei 277 nm photometrisch bestimmt. Über die gemessene Extinktion und den Extinktionskoeffzienten der Tenuazonsäure wurde der TeA-Gehalt der Lösungen über das Lambert-Beer'sche Gesetz berechnet (Solfrizzo et al. 2004).

$$E = l * c * \mu \qquad bzw. \qquad c = \frac{E}{l * \mu}$$

E: Extinktion;
l: Küvettenlänge [cm]
c: Konzentration [mol/l]
μ: molarer Extinktionskoeffzient
($12980\ l * mol^{-1} * cm^{-1}$)

6.4.2 HPLC-Trennprogramm

Zur Trennung wurde ein Stufengradient gewählt und ein UV-Diodenarraydetektor zur Detektion verwendet. Dies ermöglichte eine gute Trennung der untersuchten Toxine untereinander sowie von unbekannten Extraktkomponenten im gleichen Trennlauf. Als Eluent A diente bidest. Wasser, das mit Ameisensäure auf pH 3 eingestellt wurde, als Eluent B wurde Acetonitril : Wasser (90 : 10, v : v) verwendet.

Trennprogramm:
1 min bei 19% B
in 1 min auf 50% B
in 10 min auf 55% B
in 10 min auf 100% B
5 min bei 100% B spülen
in 2 min zurück auf 19% B
6 min bei 19% B equilibrieren

6.4.3 Detektion und Quantifizierung

Es wurde mittels Diodenarray-Detektor (DAD) bei zwei verschiedenen Wellenlängen detektiert. AOH, AME und ALT wurden bei 340 nm gemessen, da sie bei dieser Wellenlänge gut

absorbieren, während die meisten unbekannten Extraktsubstanzen nicht erfasst werden. Das Signal ist daher sauberer als bei kürzeren Wellenlängen. TeA absorbiert bei 340 nm schlecht und wurde daher bei seinem Absorptionsmaximum von 280 nm gemessen, was jedoch auch zu einer höheren Anzahl unbekannter Peaks im Chromatogramm führt. Die Peaks werden anhand ihrer Retentionszeiten und UV-Absorptionsspektren im Vergleich mit den reinen Standards identifiziert. Die meisten Extraktproben erforderten die mehrmalige Messung in verschiedenen Verdünnungen, um die Peaks der untersuchten Toxine im jeweiligen Konzentrationsbereich der Kalibriergeraden zu messen. Die Toxingehalte der Proben wurden über die Regressionsgeraden der externen Kalibrierungen berechnet.

Geräte und Chemikalien:

HPLC-Anlage:	Shimadzu prominence Steuergerät CBM-20A Entgaser DGU-20A3 Pumpen, Binärgradient LC-20AT Autosampler SIL-20AC Säulenofen CTO-20AC (40°C) Diodenarraydetektor SPD-M20A Säule Phenomenex Luna 5u C18(2) 250 x 4,6 mm Auswertungssoftware LC-Solution real time analysis software
Acetonitril	for HPLC gradient analysis, Acros
Feinstwaagen	Sartorius, Mettler Toledo
Methanol	Rotisolv HPLC Ultra Gradient Grade, CarlRoth
Ionentauscher	Dowex 50WX8 100-200 mesh, CarlRoth
Chromatographiesäule	mit Hahn
TeA-Standard	((0,5 Cu)-TeA, Sigma, CAS 610-88-8)
AOH-, AME-, ALT -Standards	Sigma

6.5 Comet-Assay

Der Comet Assay ist eine Technik zur Einzelzell-Gelelektrophorese. Er ermöglicht es, DNA-Schädigungen in einzelnen Zellen nachzuweisen. In seiner ursprünglichen Form (Ostling und Johanson 1984) werden nur DNA-Doppelstrangbrüche erfasst, doch durch die Verwendung basischer Puffer (Singh et al., 1988) können auch DNA-Einzelstrangbrüche, Alkalisensitive Stellen (z.B. apurine Stellen), DNA-DNA- und DNA-Protein-Crosslinks erfasst werden. Mit diesem Test können selbst geringe DNA-Schäden nachgewiesen werden. Durch eine zusätzliche Enzymbehandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) lassen sich zusätzliche DNA-Schädigungen erfassen. Der Comet-Assay besteht aus den folgenden Einzelschritten:

Vorbereiten der Objektträger (OT)

Zweck der OT-Vorbereitung ist es, möglichst luftblasenfreie, homogene Agarosegele zu erhalten, die gut auswertbar sind und fest auf dem Objektträger haften. Dazu werden einseitig sandgestrahlte Objektträger verwendet. Auf die raue Seite werden 40 µl heiße, normalschmelzende Agarose (NMA) gegeben und mit einem anderen OT zu einem dünnen Film ausgezogen und trocknen gelassen. Pro OT werden in ca. 3 cm Abstand noch zweimal 60 µl NMA auf den OT pipettiert und mit je einem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Der OT wird zum Aushärten der Gelpads noch ca. 10 Minuten auf Eis gestellt und ist dann in einer feuchten Kammer ca. 2 Tage im Kühlschrank haltbar.

Inkubation der Zellen

In Kunststoff-Petrischalen (d = 50 mm) werden 300.000 Zellen in 5 ml serumhaltigem Kulturmedium 48 Stunden lang im Brutschrank anwachsen gelassen. Zur Inkubation wird das Medium unter der Sterilbank abgesaugt, und durch 5 ml serumhaltiges Inkubationsmedium ersetzt. Die Substanzen sind in DMSO gelöst, und die Konzentrationen so gewählt, dass das Inkubationsmedium stets 1% DMSO in der Endkonzentration enthält. Als Negativkontrolle dient reines DMSO (1% in der Endkonzentration). Inkubiert wird im Brutschrank (37 °C, 5% CO_2). Danach wird das Medium abgegossen, die Petrischalen mit 2 ml PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsinlösung 90 Sekunden lang im Brutschank inkubiert. Danach werden sofort 0,5 ml serumhaltiges Medium zugegeben um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen werden durch sorgfältiges Abspülen mittels Eppendorf-Pipette vom Boden der Petrischale gelöst, dabei durch mehrmaliges Aufziehen vereinzelt und in ein eisgekühltes Eppendorf-Gefäß (2 ml)

überführt. Die Petrischale wird nochmals mit 0,5 ml Medium gespült und die Suspensionen vereinigt. Lebendzellzahl und Viabilität werden mittels Trypanblau-Auschlussmethode mikroskopisch mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Absatz 6.1.6.2). Die Viabilität soll dabei stets über 80% liegen, um mögliche Artefakte aufgrund zytotoxischer, apoptotischer, etc. Effekte zu vermeiden. Um bei den weiteren Bearbeitungsschritten eine unbewusste Ungleichbehandlung zu vermeiden werden die einzelnen Proben mit Zahlen kodiert.

Einbetten der Zellen in Agarose

Bei zu hoher Zelldichte im Agarosegelpad wird das Auszählen der Schweife erschwert. Insbesondere bei hohen Schweifintensitäten können dann durch Überlappung einzelne Signale für die Messung unbrauchbar werden. Es werden deshalb je zwei Aliquote von nur 30.000 Zellen entnommen, in je einem neuen Eppendorf-Röhrchen 10 min lang bei 425 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert. Das Zellpellet ist mit bloßem Auge nicht zu erkennen. Alle Röhrchen werden ständig auf Eis gelagert.

Die 0,8%-ige LMA-Lösung wird bis zur völligen Klärung erhitzt (ca. 70 °C) und wieder auf ca. 40 °C abkühlen gelassen. Der vorbereitete OT wird mit der Kodierung beschriftet und die Deckgläschen entfernt. Das Zellpellet wird mit 60 µl der LMA in drei bis vier Pipettenhüben resuspendiert, auf das Gelpad pipettiert und sofort mit dem Deckgläschen luftblasenfrei abgedeckt. Somit befinden sich auf jedem OT jeweils zwei Gele der gleichen Inkubation. Zum Aushärten der LMA-Gele wird der OT 10 min auf Eis gelegt.

Lyse der Zellen

Die Deckgläschen werden entfernt und die OT in eine Kammer mit Lysepuffer-Gebrauchslösung über Nacht eingelegt. Die Zellwände und sonstigen Zellbestandteile der eingebetteten Zellen werden dabei fragmentiert und aufgelöst, sodass die DNA der Zelle sich frei im entstandenen Hohlraum im Agarosegel verteilen kann.

Enzymbehandlung

Die Behandlung mit Formamidopyrimidin-DNA-glykosylase (FPG) aus *Escherichia coli* dient der Überführung bestimmter DNA-Basenschäden in DNA-Einzelstrangbrüche (siehe Abschnitt 2.7.5). Dadurch können weitere, meist oxidative DNA-Schäden miterfasst werden. Die OT werden dazu dreimal je 5 min mit eiskaltem Enzympuffer gewaschen. Die FPG-

Stammlösung wird mit Enzympuffer auf eine geeignete Konzentration verdünnt (1:3000), 50 µl dieser FPG-Lösung werden auf das Gelpad gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Auf die nicht zu behandelnden OT werden pro Gelpad 50 µl Enzympuffer gegeben und mit einem Deckgläschen versehen. Alle OT werden 30 min lang im Brutschrank inkubiert.

Alkalisierung und Elektrophorese

Die Alkalisierung (pH > 13) beendet die FPG-Behandlung und führt zur Auftrennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge. So können die zusätzlich durch FPG verursachten DNA-Einzelstrangbrüche miterfasst werden. Die Deckgläschen werden hierzu entfernt, die Objektträger in die eisgekühlte Elektrophoresekammer gelegt und mit kaltem Elektrophoresepuffer 3 - 4 mm hoch überschichtet. Die Alkalisierung erfolgt 20 min lang im Dunkeln. Danach wird für 20 Minuten die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA durchgeführt. Die Stromstärke wird dazu durch vorsichtige Abnahme bzw. Zugabe an weiterem Elektrophoresepuffer eingestellt.

Anfärben und Auswertung

Nach der Elektrophorese werden die Objektträger dreimal je 5 Minuten mit kaltem Neutralisationspuffer gewaschen. Pro Gelpad werden 40 µl Ethidiumbromid-Färbelösung aufgetropft und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Anschließend sollten die OT möglichst bald ausgewertet werden, da die Fluoreszenzintensität ansonsten nachlässt. Sie sind jedoch in einer feuchten OT-Aufbewahrungskammer bei +7°C bis zu 24 Stunden haltbar. Ausgewertet wird am Fluoreszenzmikroskop bei 100-facher Vergrößerung und rechnergestützter Bildauswertung. Durch die Migration der DNA-Fragmente zur Anode bei der Elektrophorese erscheinen Zellen mit geschädigter DNA kometenförmig mit einem "DNA-Schweif". Je stärker die DNA fragmentiert ist, desto stärkere Schweifbildung ist zu beobachten. Die Software erfasst das Fluoreszenzbild der Zelle digital, integriert über das gesamte Signal und ermittelt den DNA-Anteil im Kopf und Schweif. Das Intensitätsverhältnis von DNA-Schweif zur Gesamtintensität wird als Schweifintensität bezeichnet und eignet sich als Messgröße für das Ausmaß der DNA-Schädigung. Pro Probe bzw. Objektträger werden 100 Signale ausgewertet (50 pro Gelpad) und der Mittelwert gebildet.

Geräte und Chemikalien:

Fluoreszenzmikroskop:	Axio Scope A1, Zeiss, Quecksilberdampflampe, CY-3-Filter (Ex: 512 nm / Em: > 590 nm)
Software:	Comet IV-System, Perceptive Instruments
UV-Kammer	BLX-312, 5 x 8 W, Vilber
Lysepuffer:	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 100 mM Tris in bidest. Wasser lösen, pH = 10 einstellen, 1% Laurylsarcosin zusetzen.
Lysepuffer Gebrauchslösung:	89% (v:v) Lysepuffer Stammlösung 10% (v:v) DMSO (techn.) 1% (v:v) Triton-X 100
Elektrophoresepuffer:	60 ml 10 M NaOH 10 ml 200 mM EDTA (pH = 10) mit bidest. Wasser auf 2 l auffüllen.
Neutralisationspuffer:	0,4 M Tris / HCl (pH = 7,5)
Phosphatpuffer für Agarose:	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH_2PO_4 8,1 mM Na_2PO_4 mit bidest. Wasser auf 1 l auffüllen.
Normal melting agarose (NMA)	0,5% NMA (BioRad) in Phosphatpuffer
Low melting agarose (LMA)	0,8% LMA (BioRad) in Phosphatpuffer

Die Agarose wird auf der Heizplatte bis zur völligen Klärung erhitzt. Die Verarbeitung der LMA erfolgt, wenn diese auf ca. 45°C abgekühlt ist, um die Zellen bei der Einbettung nicht thermisch zu beschädigen.

Ethidiumbromid (EtBr)-Färbelösung

EtBr-Stammlösung (10 mg/ml) mit bidest. Wasser auf 20 µg/ml verdünnen.

Enzympuffer:

40 mM HEPES

0,1 M KCl

0,5 mM EDTA

0,2 mg/ml BSA

Der pH wird mit KOH auf 8,0 eingestellt.

6.6 Sulforhodamin B (SRB)-Assay

Der Sulforhodamin B Assay ist ein einfacher und sensitiver Proliferations-Assay. Der Farbstoff Sulforhodamin B bindet in saurem Milieu an Zellproteine. Wird der Farbstoffüberschuss durch Waschen entfernt und das gebundene SRB durch die Zugabe von Tris-Base wieder gelöst, korreliert die messbare Extinktion sehr gut mit der Zellzahl (Perez et al., 1993). Antiproliferative, aber auch proliferative und zytotoxische Effekte der untersuchten Substanzen lassen sich somit durch einfache photometrische Messung bestimmen.

Durchführung:

Für den Test werden in 96-Well-Platten je 800 Zellen pro Well ausgesät und bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank 48 Stunden lang anwachsen gelassen. Anschließend wird 24 Stunden bzw. 72 Stunden lang mit verschiedenen Verdünnungen der Testsubstanz in serumhaltigem Zellkulturmedium inkubiert (100 µl/Well), wobei die DMSO-Konzentration im Endansatz stets 1% beträgt. Durch die Zugabe von 10 µl 50%-iger Trichloressigsäure (TCA) wird die Reaktion gestoppt. Die Platte wird 30 min bei 7 °C im Kühlschrank belassen, wodurch die Zellen am Boden fixiert werden. Durch vorsichtiges, viermaliges Waschen mit bidest. Wasser werden Zell- und Mediumreste entfernt, die Platten über Nacht luftgetrocknet und am nächsten Tag mit 25 µl 0,4%-igem SRB-Reagenz 30 min lang angefärbt. Der nicht an Zellproteine gebundene Farbstoffüberschuss wird durch zweimaliges Waschen mit bidest. Wasser und zweimaliges Spülen mit 1%-iger Essigsäure entfernt. Nach dem Trocknen werden pro Well 50 µl Tris-Base zugesetzt, der gebundene Farbstoff durch vorsichtiges Schwenken gelöst und die Platte im Plattenphotometer bei 570 nm photometrisch vermessen.

Zur Berechnung der relativen Proliferation der inkubierten Zellen werden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen jeweils auf die mittlere Extinktion der Negativkontrolle DMSO bezogen ("test-over-control"), die somit 100% darstellt. Zur Berechnung der halbmaximalen Hemmkonzentration IC_{50} wird eine dreifaktorielle Potenzfunktion der Form

$$y = a * b * x^c$$

verwendet, da diese den Zusammenhang zwischen eingesetzter Inkubationskonzentration und gemessener Extinktionsänderung gut beschreibt (im vorliegenden Fall R^2 = 0,975 bzw. 0,995). Auftragung der Werte und Kurvenfitting wurden mit Origin 8 (Origin-Labs) durchgeführt.

Geräte und Chemikalien:

96-Well-Mikrotiterplatten	Greiner
Mikrotiterplattenlesegerät:	Victor³V 1240, Perkin Elmer
Sulforhodamin B	0,4 g gelöst in 1%iger HAc, CarlRoth
Trichloressigsäure	50% (w : v) in dest. Wasser, CarlRoth
Tris-Base	10 mM (1,21 g/l) in dest. Wasser, CarlRoth

6.7 Dichlorofluorescein (DCF)-Assay

Der DCF-Assay erlaubt die empfindliche Detektion von Veränderungen des intrazellulären Redoxstatus. Der Assay beruht auf dem Prinzip, dass die Fluoreszenz-Sonde 2',7'-Dihydrodichlorofluoresceindiacetat (H_2DCF-DA) die Zellmembran relativ leicht passieren kann. In der Zelle wird das Molekül von zellulären Esterasen zum hydrophileren 2',7'-Dihydrodichlorouorescein (H_2DCF) und Acetat gespalten. Oxidierende Substanzen in der Zelle, wie z.B. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, können dann das nicht fluoreszierende H_2DCF zum fluoreszierenden DCF oxidieren. Ein Intensitätsanstieg des gemessenen Fluoreszenzsignals kann daher als Maß für eine prooxidative Beeinflussung des intrazellulären Redoxstatus dienen.

Durchführung:

In einer schwarzen 96-Well-Platte werden 40.000 Zellen pro Well ausgesät und 48 Stunden bei 37 °C und 5% CO_2 im Brutschrank anwachsen gelassen. Das Medium wird mit einer Kanüle abgesaugt und die Platte mit 100 µl PBS pro Well einmal gewaschen. Dann wird pro Well mit je 100 µl H_2DCF-DA-Lösung 30 min inkubiert und anschließend zweimal mit 100 µl PBS gewaschen, um extrazelluläre Reste des Farbstoffes zu entfernen. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgt in 100 µl farblosem DMEM Medium, da der üblicherweise enthaltene Indikator Phenolrot die Fluoreszenzmessung stören würde. Sobald alle Testsubstanzen aufgegeben sind, wird im Mikrotiterplattenlesegerät der Blindwert der Fluoreszenz gemessen (Ex: 485 nm / Em: 535 nm, 0,1 s). Die Platte wird im Brutschrank 60 min inkubiert und an-

schließend erneut die Fluoreszenz gemessen. Da H_2DCF-DA lichtempfindlich ist, werden alle Arbeitsschritte in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Als Negativkontrolle dient das Lösemittel DMSO (1% in der Endkonzentration), das in der gleichen Konzentration in allen übrigen Inkubationslösungen ebenfalls enthalten ist. Als Positivkontrolle wird der bekannte Redoxcycler Menadion eingesetzt (20 µM), der durch starke intrazelluläre ROS-Bildung den Redoxstatus der Zelle prooxidativ beeinflusst und die gemessene Fluoreszenz signifikant erhöht. Die äußersten Wells jeder Platte werden nicht ausgewertet, um mögliche Artefakte durch "Randeffekte" zu vermeiden. Jedes Einzelexperiment (96-Well-Platte) erlaubt somit eine Sechsfachmessung von bis zu acht Probenkonzentrationen neben Positiv- und Negativkontrolle.

Für jedes einzelne Well einer bestimmten Substanzkonzentration wird die Differenz der Fluoreszenz (vor und nach Inkubation) berechnet und der Mittelwert der sechs Einzelwerte gebildet. Die mittlere Fluoreszenzzunahme durch die Probeninkubation wird auf die mittlere Fluoreszenzzunahme durch die Negativkontrolle DMSO bezogen ("test-over-control").

$$Relative\ Fluoreszenz = \frac{Mittelwert(\Delta Fluoresz.\ Probe)}{Mittelwert(\Delta Fluoresz.\ DMSO)}$$

Geräte und Chemikalien:

schwarze 96-Well-Mikrotiterplatten	Corning
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor³V 1240, Perkin Elmer
2',7'-Dihydrodichlorouoresceindiacetat	Sigma
H_2DCF-DA-Lösung	(10 mM in DMSO, daraus 1:200 Verdünnung in PBS)
Farbloses DMEM-Medium:	Sigma
Multipette:	Eppendorf

6.8 Genotoxizitätsgeleitete Fraktionierung

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten, genotoxizitätsgeleiteten Fraktionierungen der komplexen Alternariaextrakte dienen der Erkennung und Eingrenzung von Extraktbestandteilen, die für die beobachteten DNA-schädigenden Effekte der Gesamtextrakte verantwortlich sind. Das Prinzip beruht auf der HPLC-Trennung des komplexen Extraktes in mehrere Fraktionen und die anschließende Prüfung der einzelnen Fraktionen auf ihr jeweiliges, genotoxisches Potential. Der Comet-Assay eignet sich hierbei besonders als genotoxikologischer Endpunkt, da er sehr empfindlich ist und nur geringe Probenmengen für die Inkubation erfordert. Zur Auftrennung wird das beschriebene, analytische HPLC-Trennprogramm mit Stufengradient zwischen Wasser und Acetonitril mit einer analytischen RP-Säule (Phenomenex Luna C18(2) 5u, 250 x 4,6 mm) verwendet. Am Detektorausgang wird das Eluat eines HPLC-Laufs dazu manuell, in Zeitfraktionen getrennt, aufgefangen. Die Fraktionsgrenzen wurden mit Abständen von einigen Minuten gewählt; die genauen Zeiten sind in Tab. 6-1 angegeben.

Tab. 6-1: Zeitschema der toxizitätsgeleiteten Fraktionierung

Fraktion	Retentionszeit	Enthaltene "Haupt"-Toxine
F 1	0 - 6 min	
F 2	6 - 10,3 min	ALT, AOH
F 3	10,3 - 12 min	TeA
F 4	12 - 15,8 min	
F 5	15,8 - 19 min	AME
F 6	19 - 25 min	
F 7	25 - 30 min	
F 8	30 - 38 min	

Die aufgefangenen Eluate von jeweils einigen Millilitern werden im Zentrifugalevaporator etwa eine Stunde bei 60 mbar Vakuum eingeengt, um den Hauptteil des enthaltenen Acetonitrils zu entfernen. Anschließend werden die wässrigen Lösungen zweimal mit dem jeweils Doppelten ihres Volumens an Ethylacetat (EtAc) extrahiert, beide EtAc-Phasen der einzelnen Fraktionen in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vereinigt und im Zentrifugalevaporator zur Trockne eingeengt. Die Rückstände werden in 50 µl DMSO aufgenommen und durch weitere

Zugabe von je 4,95 ml serumhaltigen Zellkulturmediums direkt die Inkubationslösungen hergestellt, die für den anschließenden Comet-Assay benötigt werden. Kann der Comet-Assay aus Zeitgründen nicht direkt im Anschluss an die Fraktionierung erfolgen, so empfiehlt es sich, die trockenen Rückstände der Fraktionen mitsamt der Zentrifugenröhrchen bis zum nächsten Tag bei -80°C zu lagern, und sie erst kurz vor der Inkubation in DMSO und Zellkulturmedium aufzunehmen. Somit wird möglichen Verlusten unbekannter Extraktbestandteile von geringer Stabilität entgegengewirkt.

Die Inkubation und weitere Bearbeitung der Zellen sowie die Auswertung der Schweifintensitäten erfolgte analog zu den in Abschnitt 6.5 beschriebenen Comet-Assays (3 x 10^5 HT29-Zellen in kleinen Petrischalen (d = 5 cm))

6.9 Semipräparative HPLC

Um größere Mengen der zunächst unbekannten, genotoxischen Substanzen ATX II, ATX III bzw. Stemphyltoxin III zu gewinnen, wurde semipräparative HPLC eingesetzt. Präparationen wurden an zwei verschiedenen Systemen durchgeführt, einem Varian-System mit Varian Microsorb 100-5 C18-Säule sowie an einem Knauer-System mit Phenomenex Luna C18(2)-Säule. Zur Vorreinigung der komplexen Schimmelextrakte wurde zunächst SPE eingesetzt, später eine erarbeitete Extraktionsmethode, mit der ebenfalls gute Ergebnisse erzielt wurden.

6.9.1 Vorreinigung mittels Festphasenextraktion (SPE)

Zur Abtrennung von Extraktbestandteilen, die bei der HPLC-Trennung des Schimmelpilzextraktes stören (insbesondere der hohe Lipidgehalt) wurde der komplexe Extrakt zunächst mittels SPE vorgereinigt. Der Rohextrakt von 200 g verschimmeltem Reis (*A. alternata* DSM 62010, 21 Tage nach Inokulation) bestand aus etwa 2 ml braunschwarzem Öl. Es werden dazu zunächst Strata C18-E Gigatubes (Phenomenex, 60 ml, 10 g) mit wässrigem KH_2PO_4-Puffer (10 mM, pH 3,2 eingestellt mit H_3PO_4) equilibriert. Pro Säule werden 200 µl des Extraktes in 1 ml ACN gelöst bzw. suspendiert, ultraschallbehandelt und mit 10 ml des Phosphatpuffers verdünnt, auf die Säule aufgebracht und das enthaltende ACN mit weiteren 10 ml Phosphatpuffer ausgespült. Mit je 10 ml Methanol : Phosphatpuffermischungen jeweils ansteigender Methanolkonzentration (10%, 20%, 30% ... 100%) wird eluiert und aufgefangen bzw. verworfen (Tabelle 6-2). Die ersten 9 Fraktionen enthalten dabei keine der interessanten Toxine und werden verworfen. Der Hauptteil der Peaks 4.1 (ATX II) und 4.2 (vermutlich Stemphyltoxin III) ist in Fraktion 10 (100% Methanol) enthalten. Die Säule wird anschließend 10 Minuten

trocken gesaugt, wobei sich vor allem AME im Eluat findet (Fraktion 11, die ebenfalls verworfen wurde); Peak 5.2 (möglicherweise ATX III) eluiert mit reinem Methanol nach dem Trocknungsschritt, allerdings nur unvollständig. Selbst nach mehreren Elutionsschritten mit Methanol eluiert immer noch Peak 5.2. Aufgrund der sich daraus ergebenden Substanzverluste und großen Elutionsvolumina eignet sich diese Methode weniger gut zur Vorreinigung von ATX III, eine Vorreinigung des enthaltenen ATX II und des vermutlichen Stemphyltoxin III ist allerdings möglich.

Tab. 6-2: Fraktionierungsschema der SPE-Methode zur Extraktvorreinigung.

Eluat-fraktion	Methanol	KH_2PO_4-Puffer	Enthaltene Toxine
1	10%	90%	verworfen
2	20%	70%	verworfen
...	...	...	verworfen (TeA)
8	80%	20%	verworfen
9	90%	10%	AOH (wenig Peak 4.1)
10	100%	0%	Peak 4.1, Peak 4.2
11 (Trocknung)	-	-	AME (wenig Peak 5.2)
12	100%	0%	Peak 5.2 (wenig AME)
13	100%	0%	Peak 5.2
14	100%	0%	Peak 5.2

Die vereinigten Eluatfraktionen 10 bzw. 12-14 der jeweiligen Säulen wurden im Rotationsverdampfer auf etwa 10 ml eingeengt. Die so gewonnene Lösung wurde zur Injektion in die semipräparative HPLC eingesetzt. Weitere Substanzen, die im rohen Schimmelpilzextrakt enthalten sind und die HPLC-Trennung bzw. -Präparation verschlechtern bzw. stören können (z.B. große Mengen TeA, AOH, AME ...) werden bei der Vorreinigung mittels SPE ebenfalls abgetrennt, was größere Injektionsmengen pro HPLC-Lauf ermöglicht und weiterhin die Verwendung schnellerer Trennprogramme erlaubt.

6.9.2 Vorreinigung mittels Extraktion

Der komplexe Ethylacetatextrakt der Reiskulturen von *Alternaria* bestand nach Entfernung des Ethylacetats durch Evaporierung aus braunschwarzem Öl (etwa 1% der Menge an extrahiertem, verschimmeltem Reis), das nicht direkt zur Injektion genutzt werden konnte. Um schneller, einfacher und kostengünstiger vom öligen Rohextrakt zu einer Toxinlösung zu gelangen, die sich zur Injektion in die semipräparative HPLC eignet, wurde eine Extraktionsmethode erarbeitet, bei der die interessierenden Toxine mit wässrig-methanolischer Lösung aus der braunschwarzen Ölphase extrahiert werden.

Durch vierfaches Ausschütteln des öligen Rohextraktes von 200 g *A. alternata* DSM 62010-Reiskultur (ca. 2 ml) mit jeweils 5 ml eines 60%-igen Methanol-Wasser-Gemisches wurden so 20 ml eines wässrig-methanolischen Reextraktes gewonnen. Zur besseren Phasentrennung wurde jeweils 10 Minuten bei 3.000 x g zentrifugiert. Die methanolische Phase war beim ersten Ausschütteln stark gelb-orange gefärbt, wobei die Farbintensität bei jedem weiteren Ausschütteln deutlich nachließ und sie schließlich im fünften Schritt völlig farblos war. Die ölige Phase des Rohextraktes blieb dabei unverändert in ihrer braunschwarzen Farbe und ihrem Volumen von etwa 2 ml. Die vereinigten, methanolisch-wässrigen Phasen enthielten TeA, AOH, AME sowie ATX II und das vermutliche Stemphyltoxin III. Nur sehr geringe Mengen ATX III wurden mit dieser Methode aus dem öligen Rohextrakt abgetrennt, da die Löslichkeit dieses Toxins bei 60% Methanol gering ist. Wie im folgenden Abschnitt dargestellt erleichtert sich zusätzlich die semipräparative Trennung von ATX II und vermutlichem Stemphyltoxin III erheblich durch die Abwesenheit von ATX III im Reextrakt, sodass diese schnelle und kostengünstige Methode zur Entfettung des öligen Rohextraktes genutzt werden kann, wenn die semipräparative HPLC-Trennung von ATX II und Stemphyltoxin III angestrebt wird. Zur Reextraktion von ATX III ist diese Methode der wässrig-methanolischen Reextraktion aufgrund der hohen Lipophilie von ATX III nicht geeignet. Selbst bei einer Reextraktion mit höheren Methanolgehalten, bis hin zum reinem Methanol würden nur geringe Mengen an ATX III pro Ausschüttelungsschritt in die Methanolphase übergehen, andererseits hat dies auch die Lösung größerer Mengen an Lipiden zur Folge, was zur schnellen Verstopfung der semipräparativen HPLC führt.

6.9.3 HPLC-Trennung der Toxine

6.9.3.1 Varian Dynamax-System

Die durch SPE vorgereinigte, altertoxinhaltige Extraktlösung wurde auf einem semipräparativen, binären Hochdruckgradienten-HPLC-System (Varian) getrennt. Als Programm wurde ein Stufengradient zwischen Wasser (A) und Methanol (B) eingesetzt, wobei die eigentliche Trennung der ATX II-, ATX III und Stemphyltoxin III-Peaks bei konstant 66% B erfolgte. Detektiert wurde mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 278 nm. Pro Trennlauf wurden 2 ml manuell injiziert und die Eluate der Substanzpeaks manuell am Detektorausgang aufgefangen, wobei ständig das Detektorsignal verfolgt wurde. Die Retentionszeiten lagen bei 21 - 21,8 min für Peak 4.1 (ATX II), bei 22 - 22,5 min für Peak 5.2 (ATX III) und bei 23 - 24 min für Peak 4.2 (vermutlich Stemphyltoxin III) Die vereinigten Eluate der Substanzpeaks aus den einzelnen Läufen wurden auf SPE-Säule aufgegeben (Strata C18-E Gigatubes, Phenomenex). Mit je 30 ml dest. Wasser wurden Reste des Laufmittels ausgespült und die Säulen eine Stunde lang trockengesaugt. Mit 30 ml Methanol wurden anschließend die präparierten Toxine in Erlenmeyerkolben mit Schliff eluiert. Aus den gelblichen Toxinlösungen wurden durch anschließende Gefriertrocknung einige Milligramm leuchtend gelben Feststoffes gewonnen (ATX II bzw. Peak 4.1). Bei den Lösungen des vermutlichen Stemphyltoxin III (Peak 4.2) und ATX III (Peak 5.2) führte deren geringe Stabilität bei der Trocknung zum Verlust ihrer gelben Farbe unter Bildung eines braunen Feststoffes, der unlöslich in Methanol, Chloroform oder Hexan war (siehe auch Abschnitt 4.6.1).

HPLC-System Varian Dynamax

Pumpen	PrepStar SD-1, Varian (2 x)
UV-Detektor	ProStar (Dual Wavelength), Varian (Detektion bei λ = 278 nm)
Säule	Microsorb 100-5 C18, 250 x 21,4 mm, Varian
Laufmittel A	dest.H_2O (1% Ameisensäure)
Laufmittel B	Methanol, HPLC gradient grade, Fluka
Flussrate	20 ml/min

Trennprogramm	0 min	10%B
	5 min	10% B
	10 min	66% B
	23 min	66% B
	24 min	100% B
	30 min	100% B (Spülschritt)
	32 min	10% B
	38 min	10% B (equilibrieren)

6.9.3.2 Knauer-System

Bei späteren Präparationen wurde ein semipräparatives HPLC-System von Knauer verwendet. Zur Injektion wurde der ölige Rohextrakt einer Reiskultur von *A. alternata* DSM 62010 dabei nicht mittels SPE vorgereinigt, sondern durch wässrig-methanolische Extraktion eine injizierbare Toxinlösung gewonnen (s.o.), von der pro Trennlauf 1 - 3 ml manuell injiziert wurden. Die beste Trennung der interessierenden Peaks wurde isokratisch bei 57 : 43 (v : v) Methanol : dest. H_2O erreicht. Das Signal des UV-Detektors (278 nm) wurde kontinuierlich beobachtet und die Eluate der Substanzpeaks manuell am Detektorausgang aufgefangen. Die Retentionszeiten betrugen 31 - 33 min für ATX II und 40 - 43 min für das vermutliche Stemphyltoxin III. Die Retentionszeit für Peak 5.2 liegt dazwischen bei etwa 36 min, wobei jedoch die injizierte Toxinlösung fast keinen Peak 5.2 enthielt und auch kein Versuch unternommen wurde diesen zu präparieren. Ein weiterer Extrakt, der für die Präparation verwendet wurde (*A. alternata* DSM 62006) enthielt nur sehr wenig TeA, sodass die resultierende, höhere Trennleistung eine etwas schnellere Trennung erlaubte (60 : 40, Methanol : Wasser). Die Retentionszeiten betrugen dabei 26 - 28 min für ATX II und 32 - 35 min für Stemphyltoxin III (siehe auch Abschnitt 4.10.2).

Die vereinigten Eluatfraktionen der einzelnen Trennläufe wurden bei Raumtemperatur im Rotationsevaporator eingeengt um den Hauptteil des enthaltenen Methanols zu entfernen. Anschließend wurde die Lösung zweimal mit dem doppelten Volumen an Chloroform extrahiert, wobei die gelbe Färbung in die Chloroformphase überging. Nach Entfernung des Chloroforms im Rotationsevaporator blieb ATX II als leuchtend gelber Feststoff im Kolben zurück, der mit etwa einem Milliliter Ethylacetat aufgenommen wurde. Die gelbe Lösung wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, das zuvor im Vakuumexsiccator getrocknet und vorgewogen wurde. Im Zentrifugalevaporator wurde das Ethylacetat entfernt und das Gefäß über Nacht im

Vakuumexsiccator getrocknet, gewogen und die Toxinmenge aus der Differenz berechnet. Mit Methanol wurde eine Stammlösung zu 1 mg ATX II pro Milliliter hergestellt, in Aliquote zu 1 ml und 100 µl (entsprechend 1 mg und 100 µg ATX II) aufgeteilt, das Methanol im Zentrifugalevaporator entfernt und die trockenen Aliquote bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Im Falle des vermutlichen Stemphyltoxin III bildete sich im Augenblick vollständiger Trocknung bzw. Entfernung des Lösemittels ein brauner Feststoff unter Verlust der gelben Farbe und der Löslichkeit in Methanol, Ethylacetat, Chloroform oder Hexan, analog zur Beobachtung bei der Gefriertrocknung (s.o.). Um dennoch das vermutliche Stemphyltoxin III für toxikologische Versuche einsetzen zu können, wurde bei der Evaporation der Stemphyltoxin III-Lösung noch vor Erreichen der Trockne 1 ml DMSO zugesetzt und die Lösung noch weitere fünf Stunden bei 60 mbar im Zentrifugalevaporator vom restlichen Chloroform befreit. Die somit erhaltene Lösung in DMSO behielt ihre gelbe Farbe und Löslichkeit, sodass sie für *in vitro*-Versuche einsetzbar war. Eine direkte Wägung des reinen Feststoffes war dadurch allerdings nicht mehr möglich. Aufgrund der großen Ähnlichkeit von Stemphyltoxin III zu ATX II bezüglich Struktur und UV-Spektrum wurde die Konzentration der Lösung jedoch näherungsweise als ATX II mittels HPLC ermittelt. Die Lösung enthielt demnach etwa 2,25 mM Stemphyltoxin III in DMSO (berechnet anhand der externen Kalibrierung für ATX II) und konnte in entsprechender Verdünnung für *in vitro*-Versuche eingesetzt werden. Um Substanzverlusten aufgrund der geringen Stabilität entgegenzuwirken, wurde die Lösung aliquotiert, bei -80°C gelagert und wiederholtes Auftauen und Einfrieren soweit wie möglich vermieden. Ebenso wurden alle Inkubationslösungen für *in vitro*-Versuche kurz vor der Inkubation frisch angesetzt.

HPLC-System Knauer

Pumpe	Knauer Smartline 1000 (LPG)
Steuergerät	Knauer Manager 5000
UV-Detektor	Agilent G1315D UV/VIS-DAD (mit preparative flow cell)
Steuerungssoftware	ClarityChrom, Knauer
Säule	Luna C18(2), 5u, 250 x 21,2 mm, Phenomenex

Laufmittel A	dest.H_2O (1% Ameisensäure)
Laufmittel B	Methanol, HPLC gradient grade beide Laufmittel wurden vor Gebrauch ca. 10 min durch Ultraschallbehandlung entgast.
Flussrate:	20 ml/min
Trennprogramm:	isokratisch, 57% B : 43% A, (bzw. 60% B : 40% A, schnelleres Programm bei *A. alternata* DSM 62006-Extrakt mit geringem TeA-Gehalt)
Rotationsevaporator:	Rotavapor R, Büchi
Zentrifugalevaporator:	BA-VC-300H, mit PU-HY-CH Membranbumpe, H.Saur

6.10 Bestimmung des Gesamtglutathiongehaltes (tGSH)

Einflüsse auf den Gesamtglutathiongehalt von HT29-Zellen wurden anhand einer Modifikation der von Tietze (1969) beschriebenen Methode untersucht, wie sie im Arbeitskreis durchgeführt wurde (Gehrke 2008). Die Methode beruht prinzipiell auf der Umsetzung von GSH mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), wobei stöchiometrisch ein gemischtes Disulfid und 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) entstehen, und letzteres anhand seiner Absorption bei 412 nm photometrisch bestimmt werden kann. Da die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) nicht mit DTNB reagiert, wird zuvor eine Reduktion mit Glutathionreduktase durchgeführt, bei der GSSG zu GSH umgesetzt wird. Die anschließende Umsetzung mit DTNB erfasst somit den Gesamtglutathiongehalt (tGSH) der Zellen. Die tGSH-Gehalte der Proben werden anhand einer mitgeführten Konzentrationsreihe von GSH-Standardlösungen errechnet.

Inkubation der Zellen

Es wurden je 1,6 x 10^6 HT29-Zellen in 10 ml DMEM-Kulturmedium (10% FKS, 1% P/S) pro Petrischale (d = 10 cm) ausgesät und 24 Stunden anwachsen gelassen. Zur Inkubation wurde das Zellkulturmedium abgesaugt und durch 10 ml des jeweiligen Inkubationsmediums (DMEM, 10% FKS, 1%P/S) ersetzt. Als Negativkontrolle diente das Lösungsmittel DMSO, das in allen Inkubationsmedien in der gleichen Endkonzentration (1%) enthalten war. Als Po-

sitivkontrolle wurde 0,01% 2-Vinylpyrimidin (2-VP) eingesetzt, das GSH abfängt und den tGSH-Gehalt dadurch senkt (Griffith 1980).

Aufarbeitung der Zellen

Nach der Inkubation der Zellen wurde das Medium abgegossen und die Zellen zweimal mit je 5 ml PBS gewaschen, 1 ml Trypsinlösung zugegeben und 2 min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml FKS-haltigem DMEM-Medium wurde das Trypsin sogleich inaktiviert, die Zellen durch gründliches Abspülen mit der Pipette gelöst und in ein eisgekühltes 15 ml Falcontube überführt. Verbliebene Zellen wurden durch zweimaliges Spülen der Petrischale mit je 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen und mit den übrigen Zellen vereinigt. Die Zellsuspensionen wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette vereinzelt, je ein Aliquot 20 µl mit 180 µl Trypanblau versetzt und die Zellviabilität mithilfe einer Neubauer Zählkammer mikroskopisch kontrolliert. Die beobachteten Viabilitäten nach einstündiger Inkubation betrugen, analog zur Inkubation der Comet-Assays, in keinem Fall unter 85%, sodass Artefakte aufgrund von zytotoxischen Effekten bei den durchgeführten tGSH-Bestimmungen ebenfalls unwahrscheinlich waren. Die Zellsuspensionen wurden 10 min bei 4°C und 400 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in 1 ml A/B-Puffer resuspendiert, das 15 ml Falcontube dreimal mit je 20 µl A/B-Puffer gespült und mit der übrigen Zellsuspension in einem 2 ml Eppendorfgefäß vereinigt. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 4 °C, 400 x g) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 370 µl frischem A/B-Puffer resuspendiert. Je zwei Aliquote (10 µl) wurden zur anschließenden Proteinbestimmung (s.u.) von dieser Zellsuspension entnommen und in Eppendorfgefäße mit je 90 µl eisgekühltem A/B-Puffer überführt.

Die verbliebenen 350 µl Zellsuspension wurden zur Denaturierung der Proteine mit 350 µl 10%-iger Sulfosalicylsäure (SSA) versetzt, gevortext, 10 min auf Eis stehen gelassen und die ausgefällten Proteine anschließend 10 min bei 20000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Aliquote dieses Überstands wurden sofort zur tGSH-Messung eingesetzt.

Messung des tGSH

In einer 96-Well Platte wurden pro Well 10 µl des Überstands gegeben. Daneben wurden von jeder mitgeführten Konzentration des GSH-Standards (acht Konzentrationen zwischen 20 und 200 µM GSH, gelöst in 5% SSA), sowie des Blindwertes (5% SSA) ebenfalls 10 µl in ein Well pipettiert. Da die enzymatische Reaktion unmittelbar nach Zugabe des Reaktionsmix

beginnt, wurde dieser zügig mittels einer Mehrkanalpipette aufgegeben und anschließend sofort die Messung im Plattenphotometer begonnen. Vor der Messung wurde die Platte zur Mischung 30 Sekunden lang geschüttelt und im Anschluss jedes Well 0,1 Sekunde lang bei 402 nm gemessen. Nach exakt 2 Minuten erfolgte eine zweite Messung, sodass aus der Differenz die Extinktionszunahme relativ zur Zeit ermittelt werden konnte. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur, wobei jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt wurden (je 2 Wells pro Probenlösung, GSH-Standardlösung bzw. Blindwert).

Auswertung

Die Werte der Doppelbestimmungen wurden gemittelt, die mittlere Extinktion der ersten Messung von der der zweiten Messung subtrahiert und durch die Minuten geteilt, wodurch sich die Extinktionszunahme pro Minute ergab. Aus der Extinktionszunahme der GSH-Standardlösungen wurde eine Regressionsgerade erstellt. Der tGSH-Gehalt der Proben wurde anhand dieser Regressionsgeraden aus der Extinktionszunahme der Proben errechnet. Um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Experimenten zu gewährleisten, wurde der tGSH-Gehalt auf die Proteinkonzentration der Probe bezogen und als nmol tGSH / mg Protein angegeben.

Bestimmung der Proteinmenge mittels Bichinchinoninsäure (BCA)

Das Prinzip der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bichinchinoninsäure (BCA) beruht auf der Bildung eines Cu^{2+}-Komplexes im Alkalischen mit anschließender Reduktion der Cu^{2+}-Ionen zu Cu^{+}-Ionen durch Proteine. Das Ausmaß dieser Reduktion ist dabei proportional zur vorliegenden Proteinmenge. Die gebildeten Cu^{+}-Ionen bilden mit BCA im alkalischen pH-Bereich einen stabilen, violett gefärbten Komplex, der bei 562 nm photometrisch gemessen werden kann. Durch Mitführung von Proteinstandardlösungen bekannter Konzentration kann eine Regressionsgerade erstellt werden, anhand derer die Proteinkonzentration der Probenlösungen aus der gemessenen Extinktion ermittelt wird.

Durchführung

Alle Messungen wurden als Doppelbestimmung in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt (je 2 Wells pro Standard- bzw. Probenlösung). Aus kommerziell erhältlicher Protein-Standardlösung (bovines Serumalbumin (BSA), 2 mg/ml)) wurden durch Verdünnung mit A/B-Puffer sieben Konzentrationen zwischen 0,1 - 2 mg/l hergestellt. Von diesen Lösungen wurden je 25 µl pro Well in die Mikrotiterplatte pipettiert, mit 175 µl BCA-Reaktionslösung versetzt und 30 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die höhere Viskosität der Probenlösungen, verglichen mit den Proteinstandardlösungen, erschwerte jedoch eine gleichmäßige Reaktion mit der BCA-Reagenzlösung, sodass die Inkubation in Eppendorfgefäßen im Heizrüttler durchgeführt wurde. Dazu wurden je 10 µl der Probenlösung zu 90 µl A/B-Puffer (vorgelegt in 1,5 ml Eppendorfgefäßen) pipettiert. Dieser 1:10-Verdünnungsschritt war notwendig, um den Konzentrationsbereich der Vergleichslösungen nicht zu überschreiten. Dazu wurde, analog zur Standardreihe, die 7-fache Menge an BCA-Reagenzlösung gegeben (700 µl) und sofort bei 37 °C im vorgeheizten Heizrüttler 30 min lang inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Eppendorfgefäße anschließend sofort auf Eis gestellt und zur Messung jeweils 200 µl der Lösungen neben der Standardgeraden in die Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend erfolgte sofort die Messung im Plattenphotometer bei 595 nm.

Aus den gemittelten Extinktionswerten der Proteinstandardlösungen wurde eine Regressionsgerade erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration der Probenlösungen aus ihren jeweils gemittelten Extinktionen ermittelt wurden. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors (10) wurden die Proteinkonzentrationen der Probenlösung in mg/ml errechnet.

Geräte und Chemikalien

Puffer A	4,25 g KH_2PO_4 0,585 g EDTA in bidest. Wasser lösen, auf 250 ml auffüllen, Lagerung bei 4 °C.
Puffer B	10,9 g K_2HPO_4 1,175 g EDTA in bidest. Wasser lösen, auf 500 ml auffüllen, Lagerung bei 4 °C.
A/B-Puffer	15 ml Puffer A 85 ml Puffer B für jedes Experiment frisch anzusetzen.

DTNB-Lösung (6 mM) 11,9 mg DTNB
in 5 ml A/B-Puffer lösen;
für jedes Experiment frisch anzusetzen.

Glutathionreduktase-lösung (GR) 50 U/ml für jedes Experiment frisch aus GR-Stammlösung (168 U/ml, Sigma) mit A/B-Puffer auf 50 U/ml verdünnt.

$NaHCO_3$-Lösung (0,5%) 125 mg $NaHCO_3$
in 25 ml bidest. Wasser lösen, Lagerung bei 4 °C

NADPH-Lösung (20 mM) 16,1 mg NADPH
in 1 ml 0,5%-iger $NaHCO_3$-Lösung lösen;
Lagerung bei -80 °C

tGSH-Reagenzmix (pro Well)

164 µl A/B-Puffer
20 µl DTNB-Lösung
4 µl NADPH-Lösung
2 µl GR-Lösung (50 U/ml)
unmittelbar vor der Messung anzusetzen.

BCA-Reagenzien zur Proteinbestimmung
(gebrauchsfertige Lösungen, Sigma)

Reagenz A BCA, Na_2CO_3, Na-Tartrat, $NaHCO_3$,
gelöst in 0,1 N NaOH, pH: 11,25

Reagenz B 4% (w : v) $CuSO_4$ * 5 H_2O-Lösung

BCA-Reagenzlösung A : B-Mischung, 50 : 1 (v :v)
unmittelbar vor der Messung anzusetzen.

Heizrüttler Thriller, 1,5 ml, Peqlab

6.11 Untersuchung der Gentranskription (Realtime PCR)

Einflüsse auf die Transkription bestimmter Gene wurden mittels Realtime PCR untersucht. Dazu wurden HT29-Zellen inkubiert, ihre mRNA isoliert und zunächst zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wurden ausgewählte Sequenzen dieser cDNA mittels PCR gezielt vervielfältigt, wobei der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Qiagen) die Verfolgung der Menge an PCR-Produkten in Echtzeit ermöglicht.

Inkubation der Zellen

Je 10^6 HT29-Zellen wurden pro Petrischale (d = 10 cm) in 10 ml serumhaltigem DMEM ausgesät und 48 h anwachsen gelassen. Zur Inkubation wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml serumhaltigen Inkubationsmediums ersetzt, das ATX II bzw. das vermutliche Stemphyltoxin III (gelöst in DMSO) enthielt, sodass alle Inkubationsmedien in der Endkonzentration 0,01 - 1 µM ATX II bzw. Stemphyltoxin III neben 1% DMSO enthielten. Die Negativkontrolle enthielt lediglich DMSO, als Positivkontrolle wurden 200 µM tert-Butylhydrochinon (tBHQ) mitgeführt.

Isolieren der mRNA

Die Isolierung der mRNA aus den inkubierten HT29-Zellen wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen durchgeführt, und alle Arbeitsschritte den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Die adhärenten Zellen wurden direkt in der Petrischale durch Zugabe des mitgelieferten Extraktionspuffers lysiert, der überdies RNAse-Inhibitoren enthält. Die enthaltene RNA wurde unter Ethanolzusatz an die "RNeasy silica Membran" der Mini-Spin-Säulen gebunden und nach mehreren Spülschritten mit verschiedenen Puffern schließlich die reine RNA mit RNAse-freiem Wasser von der Säule in ein RNAse-freies Eppendorfgefäß eluiert. Folgende, einzelne Arbeitsschritte wurden dazu durchgeführt.

Durchführung

- Absaugen des Inkubationsmediums.
- Spülen der Zellen auf der Petrischale mit 5 ml eiskaltem PBS.
- Absaugen eventueller PBS-Reste in der Petrischale.

- Zugabe von 600 µl RLT-Puffer (Lysepuffer), dem zuvor β-Mercaptoethanol zugesetzt wurde (10 µl / ml).
- Abschaben des Lysates mittels sterilem Gummischaber und Überführung in ein RNA-se-freies Eppendorfgefäß.
- Homogenisieren des Zelllysates durch 5-faches ziehen durch eine 0,9 mm Kanüle (20 gauge).
- Zugabe von 600 µl Ethanol (70%), durch Resuspendieren mischen und diese Suspension auf die Membran der Spin-Säule aufgeben und Deckel vorsichtig schließen.
- Zentrifugation (15 sek, 10000 x g, Raumtemperatur); Durchfluss verwerfen.
- 700 µl des RW1-Puffers auf die Membran geben und Deckel vorsichtig schließen.
- Zentrifugation (15 sek, 10000 x g, Raumtemperatur); Durchfluss verwerfen.
- 500 µl des RPE-Puffers auf die Membran geben und Deckel vorsichtig schließen.
- Zentrifugation (15 sek, 10000 x g, Raumtemperatur); Durchfluss verwerfen.
- 500 µl des RPE-Puffers auf die Membran geben und Deckel vorsichtig schließen.
- Zentrifugation (2 min, 10000 x g, Raumtemperatur); Durchfluss verwerfen.
- Spin-Säule vorsichtig in neues Eppendorfgefäß überführen und nochmals 1 min bei 20000 x g zentrifugieren, um die Membran vollständig zu trocken.
- Spin-Säule vorsichtig in neues Eppendorfgefäß überführen, 70 µl RNAse-freies Wasser auf die Membran aufgeben und 1 min bei 10000 x g zentrifugieren, um die RNA zu eluieren.
- Lagerung der mRNA-Lösung bei -80 °C .

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA-Lösung wurde spektralphotometrisch mit einem Nanodrop 2000c Spektralphotometer (Peqlab) bei 260 nm ermittelt. Anhand des Verhältnisses zwischen den gemessenen Extinktionswerten bei 260 nm bzw. 280 nm (A_{260}/A_{280}-Wert) wurde dabei zusätzlich die Reinheit der isolierten DNA überprüft, wobei die Proben stets im Bereich zwischen 1,8 - 2,3 lagen, was guter Reinheit der RNA entspricht (RNeasy Mini Handbuch, 09/2010). Vor der Messung wurde das Gerät jedes Mal auf das verwendete, RNAse-freie Wasser kalibriert.

Reverse Transkription

Da die Taq-DNA-Polymerase ausschließlich DNA vervielfältigen kann, musste die isolierte RNA zunächst zu komplementärer DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Dieser Schritt wurde vor der eigentlichen PCR mithilfe des viralen Enzyms Reverse Transkriptase durchgeführt.

Durchführung

- Verdünnen der isolierten RNA-Lösung auf 500 ng RNA pro 6 µl durch Zugabe von RNAse-freiem Wasser.
- Zugabe von 1 µl gDNA Wipe-out-Puffer (7x).
- 2 min bei 42 °C inkubieren.
- Zusatz von 3 µl RT-Mastermix (0,5 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 0,5 µl RT-Primermix, 2 µl Quantiscript RT-Puffer).
- 15 min Inkubation bei 42 °C.
- 3 min Inkubation bei 95 °C.

Die erhaltene cDNA-Lösung (10 µl) wurde mit weiteren 10 µl RNAse-freiem Wasser auf insgesamt 20 µl Volumen verdünnt, um die weitere Handhabung zu vereinfachen. Diese cDNA-Lösung kann bei -20 °C gelagert werden.

Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung definierter DNA-Sequenzen *in vitro*. Der gesamte Prozess umfasst üblicherweise 20 - 50 sich wiederholende Zyklen, wobei jeder Zyklus dabei in drei Schritte unterteilt ist. Im ersten, als Denaturierung ("melting") bezeichneten Schritt wird die DNA auf 94 - 96 °C erhitzt, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den DNA-Basen gelöst werden, die die DNA-Doppelstränge zusammenhalten. Sowohl die DNA als auch die im Reaktionsmix enthaltenen Primer liegen danach als Einzelstränge vor. Beim anschließenden Schritt der Primerhybridisierung ("primer annealing") wird ca. 30 Sekunden lang eine Temperatur eingestellt, die eine spezifische Anlagerung der eingesetzten Primer an die ihnen komplementären DNA-Stellen ermöglicht. Diese Temperatur liegt primerspezifisch meist im Bereich von 55 - 65 °C. Im drit-

ten Schritt, der Elongation, ergänzt die Taq-Polymerase den DNA-Einzelstrang mit freien Nukleotiden, die im Reaktionsmix enthalten sind, wieder zum Doppelstrang, beginnend am 3'-Ende des angelagerten Primers. Die Elongation verläuft dabei stets in Richtung 5'→3' des neu gebildeten Strangs und bis zum Ende des DNA-Stranges, der als Vorlage dient. Die dabei verwendete Temperatur ist abhängig vom Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase (meist 68 - 72 °C). Mit jedem Zyklus wird somit die untersuchte DNA-Sequenz (zwischen den eingesetzten Primern) verdoppelt.

Durchführung

Jede Probe wurde doppelt pipettiert.

- Pro Well der PCR-Platte wurden 19 µl PCR-Mastermix (10 µl SYBR-Green Mastermix (2x), 2 ml Primer-Mix (10x), 7 µl RNAse-freies Wasser) vorgelegt.
- Je 1 µl cDNA-Lösung als Vorlage zugegeben (entspricht 25 ng cDNA). 1 µl RNAse-freies Wasser als Blindwert ("no template control").
- Die PCR-Platte mit einer Klebefolie versiegelt.
- Zentrifugieren der PCR-Platte bei 1000 x g.
- Reaktion und Messung im Thermocycler mit folgendem Programm:
    - Inkubation bei 94 °C für 15 sek (Schmelzen).
    - Inkubation bei 55 °C für 30 sek (Primerhybridisierung).
    - Inkubation bei 72 °C für 30 sek (Elongation).
    - Fluoreszenzmessung (Ex. 488 nm / Em. 524 nm).

Insgesamt wurden 40 Zyklen durchgeführt, wobei im ersten Zyklus die Schmelzphase länger war (15 min, um die Polymerase zu aktivieren). Anschließend wurden die Schmelzkurven zwischen 60 °C (1 min) - 95 °C (15 s) in 0,3 °C Schritten bestimmt, um eventuelle unspezifische PCR-Produkte ausschließen zu können.

Der enthaltene Farbstoff interkaliert in DNA-Doppelstränge, wobei der gebildete Komplex im blauen Spektralbereich absorbiert (λ_{max} = 488 nm) und im grünen Bereich emittiert (λ_{max} = 524 nm). Die gemessene Fluoreszenzintensität ist somit ein Maß für die im Reaktionsansatz enthaltene DNA.

Auswertung

Um mögliche Effekte der Inkubationssubstanzen auf die Transkriptionsrate der untersuchten Gene erkennen zu können, wurde die relative Transkription dieser Gene berechnet. Dazu wurde ein unreguliertes Kontrollgen mitgeführt (hier das "housekeeping gene" β-Aktin) und die Transkriptmenge der untersuchten Gene auf die Transkriptmenge dieses Kontrollgens bezogen. Zur Berechnung der relativen Transkription wurde die $\Delta\Delta C_T$-Methode verwendet. Der C_T-Wert ("threshold cycle") bezeichnet dabei die rechnerische Anzahl an Thermocyclerzyklen, ab der das gemessene Fluoreszenzsignal die Hintergrundfluoreszenz der Probe signifikant übersteigt. Der C_T-Wert ist somit ein Maß für die ursprüngliche Menge der untersuchten DNA-Sequenz im Reaktionsansatz bzw. in den inkubierten Zellen.

$$\Delta C_T = C_{T\,(Zielgen)} - C_{T\,(Kontrollgen)}$$

$$\Delta\Delta C_T = C_{T\,(Probe)} - C_{T\,(Kontrolle)}$$

$$\text{rel. Transkription} = 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Zielgene: Nrf2, GSTA1, GSTA2
Kontrollgen: β-Aktin
Kontrolle: DMSO

Anhand der relativen Transkriptionswerte ist eine Signifikanzberechnung zwischen der Negativkontrolle DMSO und den Testsubstanzen nicht mehr möglich, da die relativen Transkriptionswerte der Substanzinkubationen bereits eine Normalisierung auf die Negativkontrolle enthalten. Die Signifikanzberechnung wurde daher anhand der ΔC_T-Werte mittels *Student's t*-Test durchgeführt, was eine sinnvolle statistische Interpretation der Messdaten erlaubt (Karlen et al. 2007).

Verwendete Kits

RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

Quantitect Primer Assays

Hs_ACTB_1_SG, QT00095431	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTA2_1_SG, QT00015960	QIAGEN GmbH, Hilden

Hs_GSTA1_1_SG, QT00060739	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_NFE2L2_1_SG, QT00027384	QIAGEN GmbH, Hilden

6.12 Apoptoseinduktion (Cell Death Detection ELISA^{PLUS})

Um auf mögliche Apoptoseinduktion nach Inkubation von HT29-Zellen mit ATX II zu untersuchen, wurde das kommerziell erhältliche Cell Death Detection ELISA^{PLUS} -Kit der Firma Roche eingesetzt, das alle benötigten Lösungen sowie Kontrollen enthält. Die Versuche wurden den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht auf einem quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassay mit monoklonalen Antikörpern der Maus, die gegen Mono- und Oligonukleosomen gerichtet sind. Diese ca. 180 bp langen, an Histone assoziierten DNA-Fragmente (bzw. Vielfache davon) entstehen, wenn im Rahmen der Apoptose die Ca^{2+}- und Mg^{2+}-abhängige endogene Nuklease die hochkondensierte DNA an der zugänglichsten Stelle spaltet (der internukleosomalen "linker"-Region) und sind ein typisches Indiz für Apoptoseinduktion der Zelle.

In die Wells einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte wird Zelllysat inkubierter Zellen pipettiert und eine mitgelieferte Mischung von Anti-Histon-Biotin und peroxidasemarkierten (POD) Anti-DNA-Antikörpern zugegeben. Während einer zweistündigen Inkubationszeit binden die biotinmarkierten Anti-Histon-Antikörper an den Histonteil von Nukleosomen und an die streptavidinbeschichtete Mikrotiterplatte. Die peroxidasemarkierten Anti-DNA-Antikörper binden an den DNA-Teil der Nukleosomen. Nach Entfernung der ungebundenen Antikörper durch Spülschritte werden die gebundenen Nukleosomen photometrisch bestimmt, indem die Peroxidaseaktivität mit ABTS (2,2'-Azino-di[3-ethyl-benz-thiazolin-sulfonat]) als Substrat gemessen wird (Handbuch Cell Death Detection ELISA^{PLUS} , Roche).

Durchführung

- 6 x 10^5 HT29-Zellen in 5 ml serumhaltigem DMEM in Petrischalen ausgesät und 48 h anwachsen gelassen.
- Zellkulturmedium durch Inkubationsmedium (5 ml serumhaltiges DMEM, 0,01 - 1 µM ATX II, 1% DMSO in Endkonz.) ersetzt und 12 h bzw. 24 h im Brutschrank inkubiert. Reines DMSO in der gleichen Konzentration diente als Negativkontrolle.

- Inkubationsmedium von der Petrischale abgenommen und in 15 ml Falcontube auf Eis überführt, Petrischale zweimal mit je 1 ml PBS gespült und das PBS mit dem Inkubationsmedium vereinigt.
- Zellen mit 0,5 ml Trypsinlösung abtrypsiniert, das Trypsin durch Zugabe von 0,5 ml serumhaltigem DMEM inaktiviert. Zellsuspension im Falcontube mit dem Inkubationsmedium und PBS vereinigt. Petrischale nochmals mit 0,5 ml serumhaltigem DMEM nachgespült und ebenfalls ins Falcontube pipettiert.
- Zentrifugation bei 450 x g und 4 °C für 5 min.
- Überstand vorsichtig abgenommen, 10 ml frisches, eiskaltes PBS zugesetzt und Zellen resuspendiert.
- Zentrifugation bei 450 x g und 4 °C für 5 min.
- 9,5 ml PBS abgenommen; Zellpellet in den verbleibenden 0,5 ml PBS gut resuspendiert.
- Zellzahl- und Viabilitätsbestimmung mittels Durchflusszytometrie (ViaCount, Guava, s.o.). Dabei wurde kontrolliert, dass die Zellviabilität stets im gleichen Bereich wie die jeweilige Negativkontrolle lag, um zytotoxische Artefakte auszuschließen.
- 200 µl Lysepuffer (im Kit enthalten) in 96-Well Mikrotiterplatte vorgelegt; Aliquot der Zellsuspension dazu pipettiert, das 10^5 Zellen entspricht und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Zentrifugation der Platte bei 200 x g und Raumtemperatur für 10 min.
- Vom Überstand dieses Zelllysates der inkubierten Zellen vorsichtig 20 µl ins Well der streptavidinbeschichteten 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert (bzw. 20 µl mitgelieferten Positivkontrolle sowie 20 µl des reinen "Incubation buffer" zur Kontrolle des Hintergrunds). 80 µl des frisch gemischten Immunoreagens ("Incubation buffer" und Antikörper) dazu pipettiert. Für jede Probe wurden zwei Wells pipettiert (Doppelbestimmung).
- Mit Klebefolie abgedeckt und 2 Stunden bei Raumtemperatur im Schüttelinkubator inkubiert (300 rpm).
- Die Wells gründlich abgesaugt und dreimal mit je 250 µl "Incubation buffer" gespült.

- 100 µl ABTS-Lösung ins Well pipettiert, mit Klebefolie verschlossen und im Schüttelinkubator (250 rpm) 15 min lang entwickelt (reines ABTS als Blindwert ebenfalls mitgeführt).
- Sofortige photometrische Messung im Plattenphotometer bei 405 nm und 490 nm.

Auswertung

Nach Vorgabe des Herstellers wurden die Extinktionswerte der Doppelbestimmung jeweils gemittelt und die mittlere Extinktion bei der Referenzwellenlänge (λ = 490 nm) von der mittleren Extinktion bei λ = 405 nm subtrahiert. Von dieser Extinktionsdifferenz wurde zusätzlich die Extinktionsdifferenz des Blindwertes (reines ABTS) abgezogen.

Geräte und Kits

Cell Death Detection ELISA^{Plus}	Roche Applied Science
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor^{3}V 1240 Multilable Counter, Perkin Elmer
Zentrifuge	Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus
Schüttelinkubator	SM30A control, Edmund Bühler

6.13 Untersuchung des Zellzyklus

Einflüsse auf die Zellzyklusverteilung von HT29-Zellen nach Inkubation mit 0,01 - 1 µM ATX II wurden durchflusszytometrisch untersucht. Das Prinzip der Messung beruht auf der Fluoreszenzmessung inkubierter, fixierter Zellen nach Anfärbung mit dem DNA-Interkalationsfarbstoff Propidiumiodid (PI), wobei die Fluoreszenzintensität einzelner Zellen ein Maß für deren DNA-Gehalt und somit für ihre aktuelle Position im Zellzyklus darstellt. Verglichen mit Zellen in der G_0/G_1-Phase enthalten Zellen in der G_2-Phase, die sich kurz vor der Mitose befinden, die doppelte Menge an DNA. Der Gehalt der aktiv DNA-replizierenden Zellen in der S-Phase liegt dazwischen. Als Negativkontrolle, diente reines DMSO (1% in der Endkonzentration in serumhaltigem DMEM) das in der gleichen Konzentration ebenfalls in allen Inkubationsmedien enthalten war.

Durchführung

Die Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen ausgesät, inkubiert, trypsiniert und gewaschen wie im Fall des Apoptose-ELISA (s.o.). Ebenso wurde durchflusszytometrisch kontrolliert, dass die Zellviabilität im Bereich der jeweiligen Negativkontrolle (DMSO) lag. Zur Fixierung wurden die Zellen (suspendiert in 0,5 ml PBS) tropfenweise in ein 15 ml Falcontube mit eiskaltem Ethanol (65%) gegeben während das Falcontube auf mittlerer Stufe gevortext wurde. Zur vollständigen Fixierung wurde diese ethanolische Zellsuspension über Nacht im Kühlschrank belassen (7 °C).

- Ein Aliquot der fixierten Zellen in Ethanol (ca. 2 x 10^5 Zellen) wurde in einem 15 ml Falcontube abzentrifugiert (450 x g, 5 min, Rotorbremse ausgeschaltet, da die fixierten Zellen ein weniger stabiles Pellet bilden).
- Vorsichtiges Abnehmen des Überstands.
- Gründliches Resuspendieren der Zellen in 1 ml PBS und Inkubation (1 min).
- Zentrifugation bei 450 x g (5 min) und ausgeschalteter Rotorbremse.
- vorsichtiges Abnehmen des Überstands, gründliches Resuspendieren der Zellen in 200 µl "Guava Cell Cycle Reagent". 30 min Inkubation bei Raumtemperatur in der Dunkelheit.
- Überführen der Zellsuspension in 1,5 ml Eppendorfgefäß, resuspendieren durch kurzes Vortexen auf mittlerer Stufe, um homogene Verteilung der Zellen zu gewährleisten.
- Messung am Guava easyCyte Durchflusszytometer (Millipore). Messung von 5000 Zellen pro Probe, wobei Zelltrümmer ("debris") sowie Zellagglomerate durch "gating" entfernt wurden. Auswertung mit Guava inCyte-Software.

Geräte und Reagenzien

Guava CellCycle Reagent	Millipore, Hayward, USA
Guava ViaCount Reagent	Millipore, Hayward, USA

Durchflusszytometer	Guava EasyCyte, Millipore, Hayward, USA mit Auswertunssoftware Viacount bzw. InCyte
Vortexer	Vortex MS Minishaker IKA, VWR; Vortex Genie 2TM, Bender und Hobein AG;
Zentrifuge	Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus

6.14 Materialverzeichnis

Chemikalien und Lösungen

Acetonitril, HPLC gradient grade	Acros Organics, Geel, Belgien
Low melting agarose (LMA)	Bio-Rad
Normal melting agarose (NMA)	Bio-Rad
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bovine Serum Albumin-Standard	Pierce Biotechnologie, Rockford, USA
2', 7'-Dichlorofluorescin-Diacetat (DCFH-DA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Essigsäure (HAc) 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol (EtOH) p. a.	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutathion (GSH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Glutathionreduktase (GR)	168 U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ionentauscher Dowex 50WX8 100-200 mesh	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2HPO_4)	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze

Menadion (MEN)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
β-Mercaptoethanol	Fluka, München
Methanol (MeOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natrium-Lauroylsarcosinat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nikotinamidadenindinukleotid-phosphat (NADPH), reduziert	Fluka, München
Salzsäure (HCl) 37 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sulfosalicylsäure (SSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
tert -Butylhydrochinon (tBHQ)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan (TRIS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
2-Vinylpyridin (2-VP)	Fluka, München

Kits

Cell Death Detection ELISA^{Plus}	Roche Applied Science
Guava CellCycle Reagent	Millipore, Hayward, USA
Guava ViaCount Reagent	Millipore, Hayward, USA
RNeasy Mini Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QuantiTect® Reverse Transcription	QIAGEN GmbH, Hilden

QuantiTect® SYBR Green PCR-Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Quantitect Primer Assays	
Hs_ACTB_1_SG, QT00095431	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTA2_1_SG, QT00015960	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_GSTA1_1_SG, QT00060739	QIAGEN GmbH, Hilden
Hs_NFE2L2_1_SG, QT00027384	QIAGEN GmbH, Hilden

Toxinstandards

Alternariol (AOH)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; bzw. Dr. Merz, Universität Kaiserslautern
Alternariolmonomethylether (AME)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; bzw. Dr. Merz, Universität Kaiserslautern
Altenuen (ALT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München; bzw. Dr. Merz, Universität Kaiserslautern
Tenuazonsäure (TeA) (als Cu^{2+}-Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Verbrauchsmaterial

Cryo-Röhrchen sterilNUNC	VWR
Deckgläser	Menzel-Gläser
Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Falcontubes / Zentrifugenröhrchen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Färbetröge / Coplinbecher	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanülen 0,9 x 40 mm	VWR
Kulturflaschen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Objektträger	Menzel-Gläser / Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pasteurpipetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Petrischalen, d = 5, 10 cm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (2,5 - 1000 µl)	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5 ml)	VWR
SPE-Gigatubes	Strata C18-E, 60 ml, 10 g, Phenomenex
TC-Platten, 96-Loch, steril, schwarz	Corning, N.Y., USA
TC-Platten, 96-Loch, steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, steril	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Zell- und Schimmelpilzkultur

Agar, bakteriologisch	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Calciumcarbonat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (HT29)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (farblos)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Carlsbad, USA
Gemüsesaft, pasteurisiert (Bio)	Örtlicher Supermarkt
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Reis, Langkorn, geschält	Örtlicher Supermarkt
Tomatensaft, pasteurisiert (Bio)	Örtlicher Supermarkt
Trypanblau-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypsin	(Rinderpankreas 3,6 U/ mg) Serva GmbH, Heidelberg
YE-(Hefeextrakt-) Fertigagarpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Geräte

Analysenwaagen	CP124 S, Sartorius AG, Göppingen; New Classic MF, ML204/01, Mettler Toledo
Autoklav	Systec D-150, Systec GmbH, Weitenberg
Biofreezer (-80 °C),	EUBiofreezer, Modell U725-86, New Brunswick VIP-Series Ultra Low MDF U535, Sanyo
Brutschränke	BD115, Binder KB115, Binder Heracell 240 i, CO_2 Incubator, Thermo Fisher
Comet-System	Comet-Assay IV-System, Perceptive Instruments, UK
Durchflusszytometer	Guava EasyCyte, Millipore, Hayward, USA mit Auswertunssoftware Viacount bzw. InCyte
Elektrophoresekammer	Mod. 41-2025, PeqLab
Fluoreszenzmikroskop	Axio Scope A1, Zeiss, Quecksilberdampflampe, CY-3-Filter (Ex: 512 nm / Em: > 590 nm)
Electrophorese Power Station	EV231, Peqlab
Grobwaagen:	1574 MP8-2, Sartorius AG, Göppingen; New Classic MF, ML6001/01
Heiz-Magnetrührer	IKA® RH basic 2, IKA®-Werke, Staufen
HPLC-System Shimadzu prominence	Steuergerät CBM-20A Entgaser DGU-20A3 Pumpen LC-20AT Autosampler SIL-20AC Säulenofen CTO-20AC (40°C) Diodenarraydetektor SPD-M20A

	Säule Phenomenex Luna 5u C18(2), 250 x 4,6 mm
	Auswertungssoftware LC-Solution
HPLC-System Agilent 1200	Entgaser G1322A
	Quatern.Pumpe G1311A
	Autosampler G1329A
	Säulenofen G1316A
	Diodenarraydetektor G1315D
	Auswertungssoftware ChemStation
HPLC-System Knauer (semiprep)	Steuergerät Knauer Manager 5000
	Pumpe Knauer Smartline 1000
	Diodenarraydetektor G1315D (Agilent)
	Säule Luna C18(2), 250 x 21,2 mm,
	Phenomenex
	Steuerungssoftware ClarityChrom, Knauer
HPLC-System Varian Dynamax	Pumpen PrepStar SD-1, Varian UV-Detektor ProStar (Dual Wavelength), Varian Säule Microsorb 100-5 C18, 250 x 21,4 mm, Varian
Inversmikroskop	Axiovert 40C, Zeiss Objektive: A-Plan,
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor³V 1240 Multilable Counter, Perkin
	Elmer
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
pH-Meter	pH 211 Microprocessor pH Meter,
	Elektrode: 1420-040, HANNA instruments
	Messkette: Mettler Toledo, Inlab 408/120
Elektrophorese Power Supply	EV-231, Biotec-Fisher
Rotationsevaporator	Rotavapor R-114, Büchi
	mit Wasserbad B-480, Büchi
Schüttelinkubator	SM30A control, Edmund Bühler
Spektralphotometer	Nanodrop 2000c Spectrofotometer, Peqlab
	Biotechnology GmbH
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific
	Hera Safe KSP, Thermo Fisher Scientific

Thermocycler	StepOne real-time PCR, Applied Biosystems
Tischzentrifugen:	5415 Eppendorf AG, Hamburg; 5415C Eppendorf AG, Hamburg; 5417R, Eppendorf AG,Hamburg; Mikro 220R, Hettich Zentrifugen; Mikro 200, Hettich Zentrifugen; Rotina 420R, Hettich Zentrifugen; Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg
Ultraschallbad	Ultraconic Cleaner, VWR
UV-B-Bestrahlungskammer	BLX-312, Vilber
Vortexer	Vortex MS Minishaker IKA, VWR; Vortex Genie 2TM, Bender und Hobein AG;
Wasserbad	SW-2004, VWR; GD 100, Grant
Zentrifugalevaporator	BA-VC-300H, mit PU-HY-CH Membranbumpe, H.Saur
Zentrifuge	Zytofuge, Megafuge 1.0R, Heraeus

7 Literaturverzeichnis

Altemoller, M., Podlech, J. und Fenske, D. (2006). "Total Synthesis of Altenuene and Isoaltenuene." Eur. J. Org. Chem.: 1678-1684.

Andersen, B. und Frisvad, J. C. (2004). "Natural occurrence of fungi and fungal metabolites in moldy tomatoes." J Agr Food Chem **52**(25): 7507-7513.

Arenz, B. E., Held, B. W., Jurgens, J. A., Farrell, R. L. und Blanchette, R. A. (2006). "Fungal diversity in soils and historic wood from the Ross Sea Region of Antarctica." Soil Biol Biochem **38**(10): 3057-3064.

Arrigo, A. P. (1999). "Gene expression and the thiol redox state." Free Radic Biol Med **27**(9-10): 936-944.

Baltes, W. und Matissek, R. (2011). Lebensmittelchemie. Berlin Heidelberg, Springer.

Barkai-Golan, R. (2001). Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control. Amsterdam, Elsevier.

Barkai-Golan, R. (2008). Alternaria mycotoxins. Mycotoxins in fruits and vegetables. R. Barkai-Golan und N. Paster, Academic Press, Elsevier. **1:** 185-203.

Benchimol, S. (2001). "p53-dependent pathways of apoptosis." Cell Death Differ **8**(11): 1049-1051.

Berger, M. und Rapp, M. (2011). Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen, Kommentar des bayer. Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit.

Bjelland, S. und Seeberg, E. (2003). "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation." Mutat Res **531**(1-2): 37-80.

Blagosklonny, M. V. (2011). "Cell cycle arrest is not senescence." Aging (Albany NY) **3**(2): 94-101.

Bottalico, A. und Logrieco, A. (1998). Toxigenic Alternaria species of economic importance. Mycotoxins in Agriculture and Safety. K. K. Sinha und D. Bhatnagar. New York, Marcel Dekker**:** 65-108.

Boutin, B. K., Peeler, J. T. und Twedt, R. M. (1989). "Effects of purified altertoxins I, II, and III in the metabolic communication V79 system." J Toxicol Environ Health **26**(1): 75-81.

Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. und Hannon, G. J. (1995). "Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency." Nature **377**(6549): 552-557.

Brugger, E. M., Wagner, J., Schumacher, D. M., Koch, K., Podlech, J., Metzler, M. und Lehmann, L. (2006). "Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells." Toxicology Letters **164**(3): 221-230.

Burroughs, R., Seitz, L. M., Sauer, D. B. und Mohr, H. E. (1976). "Effect of Substrate on Metabolite Production by Alternaria-Alternata." Appl Environ Microb **31**(5): 685-690.

Caimi, G., Carollo, C. und Lo Presti, R. (2004). "Chronic renal failure: oxidative stress, endothelial dysfunction and wine." Clin Nephrol **62**(5): 331-335.

Canman, C. E., Lim, D. S., Cimprich, K. A., Taya, Y., Tamai, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Kastan, M. B. und Siliciano, J. D. (1998). "Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53." Science **281**(5383): 1677-1679.

Collins, A. R., Dobson, V. L., Dusinska, M., Kennedy, G. und Stetina, R. (1997). "The comet assay: what can it really tell us?" Mutat Res **375**(2): 183-193.

CONTAM (2011). Scientific oppinion on the risks for amimal and pubic health related to the presence of Alternaria toxins in feed and food (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM)). Parma, Italien, EFSA Journal. **9(10):2407**.

Cook, P. R., Brazell, I. A. und Jost, E. (1976). "Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA." J Cell Sci **22**(2): 303-324.

Coste, F., Ober, M., Carell, T., Boiteux, S., Zelwer, C. und Castaing, B. (2004). "Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase." J Biol Chem **279**(42): 44074-44083.

Davis, V. M. und Stack, M. E. (1991). "Mutagenicity of stemphyltoxin III, a metabolite of Alternaria alternata." Appl Environ Microbiol **57**(1): 180-182.

Davis, V. M. und Stack, M. E. (1994). "Evaluation of alternariol and alternariol methyl ether for mutagenic activity in Salmonella typhimurium." Appl Environ Microbiol **60**(10): 3901-3902.

Di Leonardo, A., Linke, S. P., Clarkin, K. und Wahl, G. M. (1994). "DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts." Genes Dev **8**(21): 2540-2551.

Dickinson, D. A. und Forman, H. J. (2002). "Cellular glutathione and thiols metabolism." Biochem Pharmacol **64**(5-6): 1019-1026.

Dong, Z. G., Liu, G. T., Dong, Z. M., Qian, Y. Z., An, Y. H., Miao, J. A. und Zhen, Y. Z. (1987). "Induction of mutagenesis and transformation by the extract of Alternaria alternata isolated from grains in Linxian, China." Carcinogenesis **8**(7): 989-991.

Eisenbrand, G., Metzler, M. und Hennecke, F. J. (2005). Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner. Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Heidelberg, Wiley-VCH.

Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A review of programmed cell death." Toxicologic Pathology **35**(4): 495-516.

Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. und Grodsky, G. M. (2003). "Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction?" Diabetes **52**(1): 1-8.

Fehr, M. (2009). Mechanismen der genotoxischen Wirkung von Alternaria-Toxinen. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften. Karlsruhe, Universität Karlsruhe. **Dissertation**.

Fehr, M., Baechler, S., Kropat, C., Mielke, C., Boege, F., Pahlke, G. und Marko, D. (2010). "Repair of DNA damage by the mycotoxin alternariol involves tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1." Mycotoxin Research **26**: 247-256.

Fehr, M., Pahlke, G., Fritz, J., Christensen, M. O., Boege, F., Altemoller, M., Podlech, J. und Marko, D. (2009). "Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the II alpha isoform." Mol Nutr Food Res **53**(4): 441-451.

Fogh, J. (1975). Human tumor cells in vitro. J. Fogh. New York, Plenum Press**:** 115-159.

Forman, H. J., Zhang, H. Q. und Rinna, A. (2009). "Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis." Mol Aspects Med **30**(1-2): 1-12.

Fremy, J. M. und Quillardet, P. (1985). "The 'carry-over' of aflatoxin into milk of cows fed ammoniated rations: use of an HPLC method and a genotoxicity test for determining milk safety." Food Addit Contam **2**(3): 201-207.

Frosina, G. (2004). "Commentary: DNA base excision repair defects in human pathologies." Free Radic Res **38**(10): 1037-1054.

Frosina, G. (2006). "Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine-DNA glycosylase." Int J Cancer **119**(1): 1-7.

Garrido, N., Meseguer, M., Simon, C., Pellicer, A. und Remohi, J. (2004). "Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility." Asian J Androl **6**(1): 59-65.

Gehrke, H. (2008). Biologische Wirkungen von metallischen Platinnanopartikeln auf menschliche Kolonkarzinomzellen. Inst. für Angewandte Biowissenschaften, Abt. Lebensmitteltoxikologie. Karlsruhe, Universität Karlsruhe (TH). **Diplomarbeit**.

Gilboa, R., Zharkov, D. O., Golan, G., Fernandes, A. S., Gerchman, S. E., Matz, E., Kycia, J. H., Grollman, A. P. und Shoham, G. (2002). "Structure of formamidopyrimidine-DNA glycosylase covalently complexed to DNA." J Biol Chem **277**(22): 19811-19816.

Gottlieb, T. M. und Oren, M. (1998). "p53 and apoptosis." Semin Cancer Biol **8**(5): 359-368.

Griffin, G. F. und Chu, F. S. (1983). "Toxicity of the Alternaria metabolites alternariol, alternariol methyl ether, altenuene, and tenuazonic acid in the chicken embryo assay." Appl Environ Microbiol **46**(6): 1420-1422.

Griffith, O. W. (1980). "Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine." Anal Biochem **106**(1): 207-212.

Guetens, G., De Boeck, G., Highley, M., van Oosterom, A. T. und de Bruijn, E. A. (2002). "Oxidative DNA damage: biological significance and methods of analysis." Crit Rev Clin Lab Sci **39**(4-5): 331-457.

Haggblom, P. und Niehaus, W. G. (1986). "Light Effects on Polyketide Metabolism in Alternaria-Alternata." Exp Mycol **10**(3): 252-255.

Haggblom, P. und Unestam, T. (1979). "Blue light inhibits mycotoxin production and increases total lipids and pigmentation in Alternaria alternata." Appl Environ Microbiol **38**(6): 1074-1077.

Halliwell, B. (2006). "Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life." Plant Physiol **141**(2): 312-322.

Hartman, P. E., Suzuki, C. K. und Stack, M. E. (1989). "Photodynamic production of superoxide in vitro by altertoxins in the presence of reducing agents." Appl Environ Microbiol **55**(1): 7-10.

Harwig, J., Scott, P. M., Stoltz, D. R. und Blanchfield, B. J. (1979). "Toxins of molds from decaying tomato fruit." Appl Environ Microbiol **38**(2): 267-274.

Hasan, H. A. H. (1995). "Alternaria Mycotoxins in Black Rot Lesion of Tomato Fruit - Conditions and Regulation of Their Production." Mycopathologia **130**(3): 171-177.

Hayes, J. D., Flanagan, J. U. und Jowsey, I. R. (2005). "Glutathione transferases." Annu Rev Pharmacol **45**: 51-88.

Hoeijmakers, J. H. (1993). "Nucleotide excision repair. II: From yeast to mammals." Trends Genet **9**(6): 211-217.

Hu, J. P., de Souza-Pinto, N. C., Haraguchi, K., Hogue, B. A., Jaruga, P., Greenberg, M. M., Dizdaroglu, M. und Bohr, V. A. (2005). "Repair of formamidopyrimidines in DNA involves different glycosylases - Role of the OGG1, NTH1, and NEIL1 enzymes." J Biol Chem **280**(49): 40544-40551.

Jakubowski, W. und Bartosz, G. (2000). "2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: what does it measure?" Cell Biol Int **24**(10): 757-760.

Jiricny, J. (2006). "The multifaceted mismatch-repair system." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(5): 335-346.

Johnson, D. G. und Walker, C. L. (1999). "Cyclins and cell cycle checkpoints." Annu Rev Pharmacol Toxicol **39**: 295-312.

Josephy, P. D. (2010). "Genetic variations in human glutathione transferase enzymes: significance for pharmacology and toxicology." Hum Genomics Proteomics **2010**: 876940.

Josephy, P. D. und Mannervik, B. (2006). Molecular Toxicology. New York, Oxford University Press.

Kada, T., Sadaie, Y. und Sakamoto, Y. I. (1984). Bacillus subtilis repair test. Handbook of Mutagenicity test procedures. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols und C. Ramel. Amsterdam, Elsevier**:** 13-31.

Kamiya, H. (2003). "Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides." Nucleic Acids Research **31**(2): 517-531.

Kapoor, M. und Lozano, G. (1998). "Functional activation of p53 via phosphorylation following DNA damage by UV but not gamma radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2834-2837.

Karlen, Y., McNair, A., Perseguers, S., Mazza, C. und Mermod, N. (2007). "Statistical significance of quantitative PCR." Bmc Bioinformatics **8**.

Kensler, T. W. und Wakabayashi, N. (2010). "Nrf2: friend or foe for chemoprevention?" Carcinogenesis **31**(1): 90-99.

Koch, K., Podlech, J., Pfeiffer, E. und Metzler, M. (2005). "Total synthesis of alternariol." J Org Chem **70**(8): 3275-3276.

Kralova, J., Hajslova, J., Poustka, J., Hochmann, M., Bjelkova, M. und Odstrcilova, L. (2006). "Occurrence of Alternaria toxins in fibre flax, linseed and peas grown in organic and conventional farms: monitoring pilot study." Czech Journal of Food Science **24**: 288-296.

Kropat, C. (2008). Wirkmechanistische Untersuchungen zur Genotoxizität von Alternariol (Wissenschaftliche Abschlussarbeit). Institut für Angewandte Biowissenschaften, Lehrstuhl für Lebensmitteltoxikologie. Karlsruhe, Universität Karlsruhe, TH.

Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B. und Engh, I. (2009). Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. Berlin Heidelberg, Springer-Verlag.

Lee, J. M. und Johnson, J. A. (2004). "An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism." J Biochem Mol Biol **37**(2): 139-143.

Lehmann, L., Wagner, J. und Metzler, M. (2006). "Estrogenic and clastogenic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells." Food Chem Toxicol **44**(3): 398-408.

Li, F. und Yoshizawa, T. (2000a). "Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China." J Agric Food Chem **48**(7): 2920-2924.

Li, F. Q. und Yoshizawa, T. (2000b). "Alternaria mycotoxins in weathered wheat from China." J Agr Food Chem **48**(7): 2920-2924.

Li, W. G. und Kong, A. N. (2009). "Molecular Mechanisms of Nrf2-Mediated Antioxidant Response." Mol Carcinogen **48**(2): 91-104.

Lindl, T. (2002). Zell- und Gewebekultur. Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, W. H., Qi, Y. M. und Guo, H. T. (1992). "Etiologic Role of Alternaria-Alternata in Human Esophageal Cancer." Chinese Med J-Peking **105**(5): 394-400.

Liu, G. T., Qian, Y. Z., Zhang, P., Dong, Z. M., Shi, Z. Y., Zhen, Y. Z., Miao, J. und Xu, Y. M. (1991). "Relationships between Alternaria alternata and oesophageal cancer." IARC Sci Publ(105): 258-262.

Logrieco, A., Bottalico, A., Visconti, A. und Vurro, M. (1988). "Natural occurrence of Alternaria-mycotoxins in some plant products." Microbiologie Aliments Nutrition **6**(1): 13-17.

Magan, N., Cayley, G. R. und Lacey, J. (1984). "Effect of Water Activity and Temperature on Mycotoxin Production by Alternaria-Alternata in Culture and on Wheat-Grain." Appl Environ Microb **47**(5): 1113-1117.

Maynard, S., Schurman, S. H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N. C. und Bohr, V. A. (2009). "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging." Carcinogenesis **30**(1): 2-10.

McKinnon, P. J. und Caldecott, K. W. (2007). "DNA strand break repair and human genetic disease." Annu Rev Genomics Hum Genet **8**: 37-55.

Meronuck, R. A., Steele, J. A., Christen.Cm und Mirocha, C. J. (1972). "Tenuazonic Acid, a Toxin Produced by Alternaria-Alternata." Appl Microbiol **23**(3): 613-&.

Miao, W., Hu, L., Scrivens, P. J. und Batist, G. (2005). "Transcriptional regulation of NF-E2 p45-related factor (NRF2) expression by the aryl hydrocarbon receptor-xenobiotic response element signaling pathway: direct cross-talk between phase I and II drug-metabolizing enzymes." J Biol Chem **280**(21): 20340-20348.

Motta, S. D. und Valente Soares, L. M. (2001). "Survey of Brazilian tomato products for alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid and cyclopiazonic acid." Food Addit Contam **18**(7): 630-634.

Müller, M. (1991). "[Alternaria infestation of corn silage and hay]." Zentralbl Mikrobiol **146**(7-8): 481-488.

Norbury, C. J. und Hickson, I. D. (2001). "Cellular responses to DNA damage." Annu Rev Pharmacol **41**: 367-401.

Norbury, C. J. und Zhivotovsky, B. (2004). "DNA damage-induced apoptosis." Oncogene **23**(16): 2797-2808.

Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Ishii, T. und Taketani, S. (2002). "Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescin with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species." FEBS Lett **511**(1-3): 21-27.

Ostling, O. und Johanson, K. J. (1984). "Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells." Biochem Biophys Res Commun **123**(1): 291-298.

Ostry, V. (2008). "Alternaria mycotoxins: an overview of chemical characterization, producers, toxicity, analysis and occurrence in foodstuffs." World Mycotoxin Journal **1**(2): 175-188.

Ostry, V., Skarkova, J. und Ruprich, J. (2004). Occurrence of Alternaria mycotoxins and Alternaria spp. in lentils and himan health. Abstract of the 26. Mycotoxin-Workshop 2004, Herrsching am Ammersee.

Panigrahi, S. (1997). *Alternaria* toxins. Handbook of Plant and Fungal Toxicants. J. P. F. D'Mello. Boca Raton, NY, CRC Press (Elsevier)**:** 319-337.

Panigrahi, S. und Dallin, S. (1994). "Toxicity of the Alternaria Spp Metabolites, Tenuazonic Acid, Alternariol, Altertoxin-I, and Alternariol Monomethyl Ether to Brine Shrimp (Artemia-Salina L) Larvae." J Sci Food Agr **66**(4): 493-496.

Pero, R. W., Posner, H., Blois, M., Harvan, D. und Spalding, J. W. (1973). "Toxicity of metabolites produced by the "Alternaria"." Environ Health Perspect **4**: 87-94.

Pfeiffer, E., Eschbach, S. und Metzler, M. (2007). "*Alternaria* toxins: DNA strand-breaking activity in mammalian cells *in vitro*." Mycotoxin Research **23**(3): 152-157.

Pietri, A., Gualla, A., Rastelli, S. und Bertuzzi, T. (2011). "Enzyme-assisted extraction for the HPLC determination of ochratoxin A in pork and dry-cured ham." Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess **28**(12): 1717-1723.

Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1997). "A model for p53-induced apoptosis." Nature **389**(6648): 300-305.

Powis, G., Briehl, M. und Oblong, J. (1995). "Redox Signaling and the Control of Cell-Growth and Death." Pharmacol Therapeut **68**(1): 149-173.

Prestera, T., Holtzclaw, W. D., Zhang, Y. S. und Talalay, P. (1993). "Chemical and Molecular Regulation of Enzymes That Detoxify Carcinogens." P Natl Acad Sci USA **90**(7): 2965-2969.

Ramm, K., Ramm, M., Liebermann, B. und Reuter, G. (1994). "Studies of the biosynthesis of tentoxin by Alternaria alternata." Microbiology **140 (Pt 12)**: 3257-3266.

Robiglio, A. L. und Lopez, S. E. (1995). "Mycotoxin Production by Alternaria-Alternata Strains Isolated from Red-Delicious Apples in Argentina." Int J Food Microbiol **24**(3): 413-417.

Rota, C., Chignell, C. F. und Mason, R. P. (1999). "Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescin to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: possible implications for oxidative stress measurements." Free Radic Biol Med **27**(7-8): 873-881.

Rushmore, T. H., King, R. G., Paulson, K. E. und Pickett, C. B. (1990). "Regulation of Glutathione S-Transferase Ya Subunit Gene-Expression - Identification of a Unique Xenobiotic-Responsive Element Controlling Inducible Expression by Planar Aromatic-Compounds." P Natl Acad Sci USA **87**(10): 3826-3830.

Rushmore, T. H., Morton, M. R. und Pickett, C. B. (1991). "The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity." J Biol Chem **266**(18): 11632-11639.

Sauer, D. B., Seitz, L. M., Burroughs, R., Mohr, H. E., West, J. L., Milleret, R. J. und Anthony, H. D. (1978). "Toxicity of Alternaria metabolites found in weathered sorghum grain at harvest." J Agric Food Chem **26**(6): 1380-1393.

Sawamura, K. (1976). "Studies on apple *Alternaria* blotch caused by *Alternaria mali* Roberts." Ann Phytopathol Soc Jpn **42**(42): 228-231.

Schade, J. E. und King, D. (1984). "Analysis of the Major Alternaria Toxins." Journal of Food Protection **47**(12): 978-995.

Schrader, T. J., Cherry, W., Soper, K. und Langlois, I. (2006). "Further examination of the effects of nitrosylation on Alternaria alternata mycotoxin mutagenicity in vitro." Mutat Res **606**(1-2): 61-71.

Scott, P. M. und Kanhere, S. R. (2001). "Stability of *Alternaria* toxins in fruit juices and wine." Mycotoxin Research **17**: 9-14.

Scott, P. M. und Stoltz, D. R. (1980). "Mutagens produced by Alternaria alternata." Mutat Res **78**(1): 33-40.

Seitz, L. M. und Mohr, H. E. (1976). "Analysis of Alternaria metabolites by high-pressure liquid chromatography." Anal Biochem **70**(1): 224-230.

Seitz, L. M., Sauer, D. B., Monr, H. E., Burroughs, R. und Paukstelis, J. V. (1975). "Metabolites of Alternaria in grain sorghum. Compounds which could be mistaken for zearalenone and aflatoxin." J Agric Food Chem **23**(1): 1-4.

Siegel, D., Rasenko, T., Koch, M. und Nehis, I. (2009). "Determination of the Alternaria mycotoxin tenuazonic acid in cereals by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion-trap multistage mass spectrometry after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine." Journal of Chromatography A **1216**(21): 4582-4588.

Sitte, P., Weiler, E.W., Kadereit, J.W., Bresinsky, A. Körner, C. (2002). Strasburger. Lehrbuch der Botanik, Spektrum, akademischer Verlag.

Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., Mcmahon, J., Vistica, D., Warren, J. T., Bokesch, H., Kenney, S. und Boyd, M. R. (1990). "New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening." J Natl Cancer I **82**(13): 1107-1112.

Soderhall, K., Svensson, E. und Unestam, T. (1978). "Light Inhibits Production of Alternariol and Alternariol Monomethyl Ether in Alternaria-Alternata." Appl Environ Microb **36**(5): 655-657.

Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., Szopinska, D. und Dorna, H. (2005). "Toxigenic profile of Alternaria alternata and Alternaria radicina occurring on umbelliferous plants." Food Addit Contam **22**(4): 302-308.

Solfrizzo, M., De Girolamo, A., Vitti, C., Visconti, A. und van den Bulk, R. (2004). "Liquid chromatographic determination of Alternaria toxins in carrots." J AOAC Int **87**(1): 101-106.

Sommer, N. F. (1985). "Role of controlled environments in suppression of postharvest diseases." Can. J. Plant Pathol. **7**: 331-339.

Song, K., Kelso, C., de los Santos, C., Grollman, A. P. und Simmerling, C. (2007). "Molecular Simulations reveal a common binding mode for glycosylase binding of oxidatively damaged DNA lesions." J Am Chem Soc **129**(47): 14536-+.

Stack, M. E. und Mazzola, E. P. (1989). "Stemphyltoxin III from Alternaria alternata." J Nat Prod **52**(2): 426-427.

Stack, M. E., Mazzola, E. P., Page, S. W., Pohland, A. E., Highet, R. J., Tempesta, M. S. und Corley, D. G. (1986). "Mutagenic perylenequinone metabolites of Alternaria alternata: altertoxins I, II, and III." J Nat Prod **49**(5): 866-871.

Stack, M. E. und Prival, M. J. (1986). "Mutagenicity of the Alternaria metabolites altertoxins I, II, and III." Appl Environ Microbiol **52**(4): 718-722.

Stinson, E. E., Osman, S. F., Heisler, E. G., Siciliano, J. und Bills, D. D. (1981). "Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons." J Agric Food Chem **29**(4): 790-792.

Stinson, E. E., Wise, W. B., Moreau, R. A., Jurewicz, A. J. und Pfeffer, P. E. (1986). "Alternariol: evidence for biosynthesis via norlichexanthone." CAN J CHEM **64**(8): 1590-1594.

Terminiello, L., Patriarca, A., Pose, G. und Fernandez-Pinto, V. (2006). "Occurrence of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid in Argeninean tomato puree." Mycotoxin Research **22**: 236-240.

Thimmulappa, R. K., Mai, K. H., Srisuma, S., Kensler, T. W., Yamamoto, M. und Biswal, S. (2002). "Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray." Cancer Res **62**(18): 5196-5203.

Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." Anal Biochem **27**(3): 502-522.

Tournas, V. H. und Katsoudas, E. (2005). "Mould and yeast flora in fresh berries, grapes and citrus fruits." Int J Food Microbiol **105**(1): 11-17.

Tudek, B. (2003). "Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance." Journal of Biochemistry and Molecular Biology **36**(1): 12-19.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R. und Berneman, Z. N. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.

Vichai, V. und Kirtikara, K. (2006). "Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening." Nat Protoc **1**(3): 1112-1116.

Vinas, I., Palma, J., Garza, S., Sibilia, A., Sanchis, V. und Visconti, A. (1994). "Natural Occurrence of Aflatoxin and Alternaria Mycotoxins in Oilseed Rape from Catalonia (Spain) - Incidence of Toxigenic Strains." Mycopathologia **128**(3): 175-179.

Visconti, A., Logrieco, A. und Bottalico, A. (1986). "Natural Occurrence of Alternaria Mycotoxins in Olives - Their Production and Possible Transfer into the Oil." Food Addit Contam **3**(4): 323-330.

Waldman, T., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1995). "p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells." Cancer Res **55**(22): 5187-5190.

Wang, J. Y. (2001). "DNA damage and apoptosis." Cell Death Differ **8**(11): 1047-1048.

Wardman, P. (2007). "Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects." Free Radical Bio Med **43**(7): 995-1022.

Wardman, P., Burkitt, M. J., Patel, K. B., Lawrence, A., Jones, C. M., Everett, S. A. und Vojnovic, B. (2002). "Pitfalls in the use of common luminescent probes for oxidative and nitrosative stress." J Fluoresc **12**(1): 65-68.

West, S. C. (2003). "Molecular views of recombination proteins and their control." Nat Rev Mol Cell Bio **4**(6): 435-445.

Winterbourn, C. C. (1993). "Superoxide as an Intracellular Radical Sink." Free Radical Bio Med **14**(1): 85-90.

Wittkowski (1984). Beitrag zur Analytik von Patulin und Alternaria-Toxinen in Obst- und Gemüseprodukten. Berlin, Max-von-Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes.

Woodey, M. A. und Chu, F. S. (1992). Toxicology of Alternaria mycotoxins. Alternaria Biology, plant diseases and Metabolites. J. Chelkowski und A. Visconti. Ansterdam, Elsevier**:** 409-434.

Wyman, C. und Kanaar, R. (2006). "DNA double-strand break repair: All's well that ends well." Annu Rev Genet **40**: 363-383.

Xu, D. S., Kong, T. Q. und Ma, J. Q. (1996). "The inhibitory effect of extracts from Fructus lycii and Rhizoma polygonati on in vitro DNA breakage by alternariol." Biomed Environ Sci **9**(1): 67-70.

Yekeler, H., Bitmis, K., Ozcelik, N., Doymaz, M. Z. und Calta, M. (2001). "Analysis of toxic effects of Alternaria toxins on esophagus of mice by light and electron microscopy." Toxicologic Pathology **29**(4): 492-497.

Zhang, H. H., Mizumachi, T., Carcel-Trullols, J., Li, L. W., Naito, A., Spencer, H. J., Spring, P. M., Smoller, B. R., Watson, A. J., Margison, G. P., Higuchi, M. und Fan, C. Y.

(2007). "Targeting human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOGG1) to mitochondria enhances cisplatin cytotoxicity in hepatoma cells." Carcinogenesis **28**(8): 1629-1637.

Zhang, Y. S. und Gordon, G. B. (2004). "A strategy for cancer prevention: Stimulation of the Nrf2-ARE signaling pathway." Molecular Cancer Therapeutics **3**(7): 885-893.

Zharkov, D. O. (2008). "Base excision DNA repair." Cell Mol Life Sci **65**(10): 1544-1565.

Zharkov, D. O., Rieger, R. A., Iden, C. R. und Grollman, A. P. (1997). "NH2-terminal proline acts as a nucleophile in the glycosylase/AP-lyase reaction catalyzed by Escherichia coli formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) protein." J Biol Chem **272**(8): 5335-5341.

Zhen, Y. Z., Xu, Y. M., Liu, G. T., Miao, J., Xing, Y. D., Zheng, Q. L., Ma, Y. F., Su, T., Wang, X. L. und Ruan, L. R. (1991). "Mutagenicity of Alternaria alternata and Penicillium cyclopium isolated from grains in an area of high incidence of oesophageal cancer--Linxian, China." IARC Sci Publ(105): 253-257.

8 Abstracts

8.1 Abstract Deutsch

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Gewinnung und toxikologische Charakterisierung komplexer Extrakte von Schimmelpilzkulturen ausgewählter *Alternaria spp*.. Durch Kultivierung verschiedener Alternariastämme auf Reis wurden Extrakte mit Konzentrationen bis zu einigen Milligramm der "Haupttoxine" Alternariol (AOH), Alternariolmonomethylether (AME) und Tenuazonsäure (TeA) gewonnen. Die Stämme zeigten dabei reproduzierbare, charakteristische Toxinbildungsprofile. In humanen Kolonkarzinomzellen (HT29) vermittelten die untersuchten Extrakte deutlich stärkere DNA-strangbrechende Wirkung (Comet-Assay), als anhand der enthaltenen Menge von AOH (≤ 50 µM) und TeA (≤ 200 µM) zu erwarten wäre. Mittels genotoxizitätsgeleiteter Fraktionierung wurde diese Wirkung auf drei unbekannte HPLC-Peaks eingegrenzt, von denen einer anhand seiner akkuraten Molekülmasse (ESI-TOF-MS) und seiner Struktur (NMR) eindeutig als Altertoxin II identifiziert wurde. Bei den übrigen beiden Peaks handelt es sich wahrscheinlich um Stemphyltoxin III und Altertoxin III (ATX III). Es konnten Milligrammmengen des reinen ATX II isoliert werden; Stemphyltoxin III wurde als millimolare Stammlösung in DMSO gewonnen. Reines ATX II erwies sich als potent DNA-schädigend im Comet-Assay (≥ 0,1 µM), sowohl bei 1 h als auch bei 24 h Inkubation, und trug maßgeblich zur Genotoxizität des Gesamtextraktes bei. Das vermutliche Stemphyltoxin III zeigte vergleichbare Wirkung. Die Inkubation mit ATX II (≥ 0,05 µM) erhöhte die Menge an FPG-sensitiven DNA-Basenschäden signifikant, ohne jedoch Einfluss auf das intrazelluläre Redoxgleichgewicht (DCF-Assay), die Transkriptionsrate von verschiedenen Genen der ROS-Abwehr (real time PCR) oder den Gesamtglutathiongehalt zu nehmen. ROS sind als Ursache für diese Basenschäden daher unwahrscheinlich. ATX II wirkte proliferationshemmend ab 0,05 µM in HT29-Zellen und führte zu einem G_0/G_1-Zellzyklusarrest (1 µM) nach 24 h, jedoch ohne Anzeichen von Apoptose und ohne Veränderung der Zellviabilität im gleichen Zeitraum. Da bis heute nur wenige Daten zur Toxikologie und zum Vorkommen dieser Toxine existieren, sind weitere Untersuchungen dringend nötig, um mögliche Gesundheitsrisiken durch diese Toxine der *Alternaria spp.* zu erfassen.

8.2 Abstract Englisch

The production and analysis of complex fungal extracts of *Altenaria spp*. was in the focus of this work. Fungal extracts, containing up to several milligrams per milliliter of the major toxins alternariol (AOH), alternariol momomethyl ether (AME) and tenuazonic acid (TeA) were

obtained by cultivating various *Alternaria* strains on rice. The strains showed reproducible, characteristic profiles of toxin formation. The extracts exhibited considerably stronger DNA-damaging properties (comet assay), than to be expected from their concentration in AOH or TeA. By genotoxicity guided fractionation these effects were narrowed down to three unknown HPLC peaks. One peak was identified as altertoxin II (ATX II) by its accurate mass (ESI-TOF-MS) and its molecular structure (NMR), while the other peaks presumably consisted of stemphyltoxin III and altertoxin III (ATX III). Several milligrams of pure ATX II were prepared by semipreparative HPLC; stemphyltoxin III was obtained as millimolar stock solution in DMSO. Purified ATX II was potently DNA-damaging in the comet assay ($\geq$ 0.1 µM) after 1 h or 24 h of incubation, thus substantially contributing to the genotoxic effects of the complex extract. Incubation with ATX II significantly increased the amount of FPG-sensitive damages to DNA bases, however, without influencing the intracellular redox state (DCF assay), the transcription rate of several genes associated with oxidative DNA damage (real time PCR) or the total glutathione level of the cell. Reactive oxygen species were therefore unlikely as probable cause for the DNA base damages. ATX II ($\geq$ 0.05 µM) inhibited the proliferation of HT29-cells and led to G_0/G_1 cell cycle arrest (1 µM) after 24 h, without showing indications of apoptosis in that timeframe. To date, very few toxicological and analytical data exist for these toxins, rendering further studies necessary, in order to detect and prevent possible health risks by *Alternaria* contamination.

9 Formeln

Lineare Regression: y = A + B * x (berechnet mit Origin 7.0 bzw. Excel 2003)

y-Achsenabschnitt (A):

$$A = \frac{\left(\sum_i y_i\right)\left(\sum_i x_i^2\right) - \left(\sum_i x_i\right)\left(\sum(x_i * y_i)\right)}{N}$$

Steigung (B):

$$B = \frac{n\sum_i(x_i * y_i) - \left(\sum_i x_i\right)\left(\sum_i y_i\right)}{N}$$

Nenner (N):

$$N = n\sum_i x_i^2 - \left(\sum_i x_i\right)^2$$

Fehler der Steigung (m_B):

$$m_B = \sqrt{\frac{nS}{(n-2)N}}$$

Fehler des y-Achsenabschnitts (m_A):

$$m_A = \sqrt{\frac{S\sum_i x_i^2}{(n-2)N}}$$

Fehlerquadratsumme (S):

$$S = \sum_{i=1}^{n} (y_i - Bx_i - A)^2$$

Standardabweichung (σ_{n-1}):

$$\sigma_{n-1} = \pm\sqrt{\frac{1}{n-1}} * \sum_{i=1}^{n} (x_i - \bar{x})^2$$

10 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Schwarz, Christoph Reinhold Henri
Akademischer Grad	Diplom-Lebensmittelchemiker
Geburtsdatum und -Ort	07.10.1979 in Mannheim-Neckarau
Anschrift	Wipplingerstraße 15 / 8A 1010 Wien
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulische Ausbildung

09/1986 – 06/1990	Alfred-Delp-Grundschule, Mannheim-Gartenstadt
09/1990 – 06/1999	Lessing-Gymnasium, Mannheim Abschluss: Abitur
09/1999 – 06/2000	Ableistung Grundwehrdienst, Horb am Neckar

Berufliche Ausbildung

09/2000 – 07/2002	Ausbildung zum Konditor Konditorei und Kaffee Herrdegen, Mannheim

Studienverlauf

10/2002 – 02/2008	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH) Abschluss: Erstes Staatsexamen und Diplom

03/2008 - 07/2012	Promotion zum Thema: "Charakterisierung genotoxischer Impactkomponenten komplexer Alternariaextrakte" (seit 01.08.2009 an der Universität Wien)
Seit 2009	Ausbildung zum Fachtoxikologen (DGPT) begonnen

Wissenschaftliche Tätigkeiten

Publikationen	Christoph Schwarz, Martin Kreutzer und Doris Marko "Minor contribution of alternariol, alternariol monomethyl ether and tenuazonic acid to the genotoxic properties of extracts from *Alternaria alternata* infested rice" Toxicology Letters 214 (2012) 46 – 52
	Nadine Volz, Ute Böttler, Swantje Winkler, Nicole Teller, Christoph Schwarz, Tamara Bakuradze, Gerhard Eisenbrand, Larissa Haupt, Lyn R. Gri ffi ths, Herbert Stiebitz, Gerhard Bytof, Ingo Lantz, Roman Lang, Thomas Hofmann, Veronika Somoza und Doris Marko „Effect of coffee combining green coffee bean constituents with typical roasting products on the Nrf2/ARE pathway in vitro and in vivo. Journal of Agricultural and Food Chemistry, PMID: 22946519 (online-Veröffentlichung vor Drucklegung, 04.09.2012)

Konferenzbeiträge

07/2008	Toxikologie-Netzwerk Baden-Württemberg, Symposium 2008, Tübingen, Deutschland Posterbeitrag: "DNA damaging properties of complex *Alternaria* extracts in HT29 cells"
09/2008	37. Deutscher Lebenmittelchemikertag, Technische Universität Kaiserslautern, Deutschland Posterbeitrag: "Induktion von DNA-Strangbrüchen durch komplexe *Alternaria alternata* Extrakte in humanen Kolonkarzinomzellen."
03/2009	51. Jahrestagung der DGPT, Johannes Gutenberg Universität Mainz, Deutschland Posterbeitrag: "DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells."
06/2009	31. Jahrestagung der Gesellschaft für Mycotoxinforschung, Münster, Deutschland Posterbeitrag: "DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells."
09/2009	38. Deutscher Lebenmittelchemikertag, Technische Universität Kaiserslautern, Deutschland Posterbeitrag: "Induktion von DNA-Strangbrüchen durch komplexe *Alternaria alternata* Extrakte in humanen Kolonkarzinomzellen."

02/2010	6. Wissenschaftliches Syposium der Österreichischen Gesellschaft für Toxikologie (ASTOX), Wien, Österreich Posterbeitrag: " DNA damaging properties of complex *Alternaria alternata* extracts in HT29 cells."
05/2010	Österreichische Lebensmittelchemikertage 2010, Seggau, Österreich Posterbeitrag: "Toxicity guided fractionation of complex *Alternaria alternata* extract."
06/2010	32. Jahrestagung der Gesellschaft für Mycotoxinforschung, Lyngby, Dänemark Posterbeitrag: "Toxicity guided fractionation of complex *Alternaria alternata* extract."
08/2011	47. Jahrestagung der Europäischen Gesellschaft für Toxikologie (EUROTOX), Paris, Frankreich Posterbeitrag: " Impact of crude *Alternaria* extract and ATX-II on colon carcinoma cells"

11 Dank

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben

- Frau Prof. Dr. Doris Marko, für die Überlassung des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Arbeit
- Herrn Prof. Dr. Thomas Hofmann und seinen MitarbeiterInnen, insbesondere Herrn Dr. Timo Stark, für die Unterstützung bei der Strukturaufklärung
- Herrn Prof Dr. Christoph Syldatk und seinen MitarbeiterInnen, insbesondere Frau Sandra Baumann und Frau Katrin Brzonkalik, für die Unterstützung bei der Schimmelpilzkultivierung
- Meinem Diplomanden Herrn Martin Kreutzer, für die nette und konstruktive Zusammenarbeit
- Meinen Kollegen Helge, Simone, Volker, Christopher, Swantje, Joanna, Ute, Nadine, Nicole, Christine und Gudrun für die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre
- Meiner Familie und insbesondere Maike

Danke!

Hiermit bestätige ich, die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie die wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche kenntlich gemacht und die Satzung der Universität Wien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis in der jeweils gültigen Fassung beachtet zu haben.

Wien, den 30.8.2012