



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Die Optimierung der Biosynthese von Beauvericin
und die Wirkung von Beauvericin und Enniatin auf
Osteoklasten

Angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Katharina Zink
Matrikel-Nummer:	0106423
Studienrichtung /Studienzweig	Ernährungswissenschaften, A474
Betreuerin / Betreuer:	Ao. Univ.-Prof. Doz. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Wien, im Februar 2009

Ich danke

an erster Stelle Frau Ao. Univ.-Prof. Doz. Mag. Dr. Rosa Lemmens-Gruber für die Bereitstellung und Betreuung meiner Diplomarbeit. Weiters gilt mein Dank Prof. Dr. Oskar Hoffmann, der mich ebenfalls tatkräftig beim Gelingen meiner Arbeit unterstützt hat, Herrn Peter Höflich, der immer mit guter Laune hilfsbereit zur Stelle war und Frau Sonja Prinz. Herrn o.Univ-Prof.Dr. Ibrahim Elmadfa danke ich für die Genehmigung meines Themas.

Stoffal, fürs Dasein – meistens. Danke an Anna und Caro, ohne die ich das alles nicht geschafft hätte und an Peter und Marliese die mich immer aus jeder Computerkrise gerettet haben.

Und meinen Eltern für mein ganzes Leben!

INHALTSVERZEICHNIS**ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....III****TABELLENVERZEICHNIS..... VI****ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS VII****1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG1****2. LITERATURÜBERSICHT.....4****2.1 Physiologie des Knochens..... 4****2.1.1 Osteoblasten 5****2.1.2 Osteocyten 6****2.1.3 Osteoklasten 7****2.1.4 Bone-Remodeling 10****2.2 Schimmelpilze 12****2.2.1 Fusarium..... 13****2.2.1.2 Morphologische Kennzeichen 14****2.2.1.3 Vorkommen..... 14****2.3 Mykotoxine 16****2.3.1 Beauvericin..... 17****2.3.1.1 Struktur 17****2.3.1.2 Charakterisierung und Wirkung..... 18****2.3.2 Enniatin..... 19****2.3.2.1 Struktur 19**

3. MATERIAL UND METHODEN.....	21
3.1 Verwendete Geräte und Materialien	21
3.2 Optimierungsversuch der Biosynthese von Beauvericin	24
3.2.1 Verwendete Fusariumarten	24
3.2.2 Verwendetes Nährmedium	25
3.2.3 Herstellung der Precursor-Lösung	26
3.2.4 Herstellung des <i>Fusarium</i> inokulum	26
3.2.5 Probenvorbereitung und Durchführung.....	27
3.2.5.1 Vorbereitung der Proben.....	27
3.2.5.2 Entkeimung.....	27
3.2.5.3 Inokulation und Bebrütung	27
3.3.6 Aufarbeitung	28
3.3.6.1 Ausschüttelung	28
3.2.6.2 MykoSep-Reinigung.....	29
3.2.6.3 Kieselgelreinigung.....	30
3.2.7 Quantitative Analyse	30
3.2.8 HPLC-Auswertung	33
3.2.9 Berechnung der BEA-Konzentration	34
3.2.10 Hefeprobenansätze	35
3.3 WIRKUNG VON BEAUVERICIN UND ENNIATIN AUF OSTEOKLASTEN	36
3.3.1 Substanzen	36
3.3.2 Verwendete Tiere.....	36
3.3.3 Lösungen	37
3.3.4 Kulturmedien und Kulturbedingungen.....	38
3.3.5 Methodik.....	39

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	44
4.1 Optimierung der Beauvericin-Biosynthese.....	44
4.1.1 Pilzwachstum	44
4.1.2 BEA-Konzentration	46
4.2 Wirkung von Beauvericin und Enniatin auf Osteoklasten	52
4.2.1 Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von Beauvericin und Enniatin auf die Knochenresorption	52
4.2.2 Austestung der Recovery von Osteoklasten nach einer Belastung mit Beauvericin und Enniatin.....	54
5. SCHLUSSBETRACHTUNG	61
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	63
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	65
8. ABBILDUNGSNACHWEIS.....	71
9. LEBENSLAUF.....	72

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1 Osteoblasten.....	5
Abb. 2 Osteoklast mit Howship'scher Lakune	7
Abb. 3 Arbeitsweise der Osteoklasten.....	8
Abb. 4 Die sechs Phasen im „bone remodeling“ Prozess	11
Abb. 5 <i>Fusarium moniliforme</i>	13
Abb. 6 Taxonomische Stellung der <i>Fusarien</i>	13
Abb. 7 Mikrokonidien eines <i>Fusariums</i>	14
Abb. 8 Makrokonidien eines <i>Fusariums</i>	14
Abb. 9 <i>Fusarium</i> head blight“ auf Weizen	15
Abb. 10 Strukturformel von BEA.....	17
Abb. 11 Strukturformel von ENN	19
Abb. 12 Strukturformeln von L-Phe, L-Met und D- α -HIV	26
Abb. 13 Probenansätze im Brutschrank	28
Abb. 14 Bebrüteter Kolben von unten	28
Abb. 15 Abtrennung der organischen Phase im Scheidetrichter und CH_2Cl_2 - Abdampfung am Rotavapor	29
Abb. 16 Kieselgel-reinigung in Pasteurpipette.....	30
Abb. 17 Analysenparameter der HPLC-Methode	31
Abb. 18 Angaben der HPLC-Parameter	31
Abb. 19 Kalibrationsgerade der Beauvericin-Lösungen nach HPLC-Messung bei 195 nm	32
Abb. 20 Kalibrationsgerade der Beauvericin-Lösungen nach HPLC-Messung bei 210 nm	32
Abb. 21 Chromatogramm einer Kalibrationslösung von 100 μg BEA/ml MeCN:H ₂ O	33
Abb. 22 UV-Spektrum einer Kalibrationslösung von 100 μg BEA/ml MeCN:H ₂ O	33
Abb. 23 Gefärbte Knochenplättchen in Well-Platte	42

Abb. 24 Mit Toluidinblau gefärbtes Knochenplättchen vor und nach der Auswertung der Resorptionslakunen mit dem Programm Cell [^] F.....	43
Abb. 25 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit <i>Fusarium</i> 183 und Maiskorn	47
Abb. 26 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit <i>Fusarium</i> 368 und Maiskorn	47
Abb. 27 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit <i>Fusarium</i> 313 und Maiskorn	48
Abb. 28 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit <i>Fusarium</i> 213 und Maiskorn	48
Abb. 39 BEA-Konzentrationen der verschiedenen <i>Fusarien</i> arten bei einer Hefebebrütungsdauer von einem Tag.....	49
Abb. 30 BEA-Konzentrationen der verschiedenen <i>Fusarien</i> arten bei einer Hefebebrütungsdauer von drei Tagen	50
Abb. 31 BEA-Konzentrationen der verschiedenen <i>Fusarien</i> arten bei einer Hefebebrütungsdauer von sechs Tagen	51
Abb. 32 Knochenresorption der unterschiedlichen Konzentrationen von BEA und Enniatin	53
Abb. 33 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μ M 1 μ M.....	56
Abb. 34 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μ M 1 μ M.....	58

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1 Zusammensetzung des SNA-Agar	24
Tab. 2 Zusammensetzung der CD-Lösung.....	25
Tab. 3 Herstellung der Precursor-Lösung.....	26
Tab. 4 Kalibrationslösungen	32
Tab. 5 Versuchsansätze der <i>Fusarien</i>	35
Tab. 6 Zusammensetzung des Enniatins.....	36
Tab. 7 Zusammensetzung der PBS.....	37
Tab. 8 Zusammensetzung der Toluidinblau-Lösung.....	38
Tab. 9 Zusammensetzung des Kulturmediums	39
Tab. 10 Pilzwachstum des Versuchsansatz <i>Fusarium</i> Nr. 183 und Maiskorn ..	44
Tab. 11 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit <i>Fusarium</i> Nr. 368 und Maiskorn	45
Tab. 12 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit <i>Fusarium</i> Nr. 313 und Maiskorn	45
Tab. 13 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit <i>Fusarium</i> Nr. 213 und Maiskorn	46
Tab. 14 BEA-Konzentration der <i>Fusarien</i> arten nach einer Hefebebrütungsdauer von einem Tag	49
Tab. 15 BEA-Konzentration der <i>Fusarien</i> arten nach einer Hefebebrütungsdauer von drei Tagen.....	50
Tab. 16 BEA-Konzentration der <i>Fusarien</i> arten nach einer Hefebebrütungsdauer von sechs Tagen	51
Tab. 17 Knochenresorption der unterschiedlichen Konzentrationen von BEA und Enniatin.....	53
Tab. 18 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μ M 1 μ M.....	55
Tab. 19 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μ M 1 μ M.....	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACAT	Acyl-CoA Cholesteryl Acyl Transferase
AcCN	Acetonitril
BEA	Beauvericin
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHCl ₃	Chloroform
CSF-1	Colony Stimulating Factor-1
Dest.	Destilliert
ENN	Enniatin
EtOAc	Ethylacetat
FCS	Fetal Calf Serum
FCS-hi	Fetal Calf Serum, hitzeinaktiviert
FeSO ₄	Eisen(II)sulfat
FGF	Fibroblast Growth Factors
FSD	Functional Secretory Domain
HIV	Hydroxyisovaleriansäure
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
K ₂ SO ₄	Kaliumsulfat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KNO ₃	Kaliumnitrat
MEM	Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
Met	Methionin
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	Magnesiumsulfatheptohydrat
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	Natrium-2-Hydrogenphosphat
NaNO ₃	Natriumnitrat
OPG	Osteoprotegerin
PGE	Prostaglandin

Phe	Phenylalanin
PS	Penicillin/Streptomycin
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
RunX	Runt-related Transcription Factors
SNA-Agar	Synthetischer nährstoffarmer Agar
TRAP	Telomeric Repeat Amplification Protocol

1. EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG

In meiner Arbeit werden aufbauend auf vorangegangene Diplomarbeiten folgende Themen behandelt:

- Optimierung der Biosynthese von Beauvericin (BEA)
- Wirkung von Beauvericin und Enniatin (ENN) auf Osteoklasten.

Sowohl bei Enniatin, als auch bei Beauvericin handelt es sich um zwei bioaktive Mykotoxine, die von *Fusarien* gebildet werden. Es sind Cyclohexadepsipeptide, die abwechselnd aus drei Molekülen N-Methyl-L-Phenylalaninresten und D- α -Hydroxyisovalerianresten aufgebaut und durch Ester- und Peptidbindungen verbunden sind.

Strukturell sind sie mit den Destruinen verwandt.

*Fusarien*stämme kommen in freier Natur sehr häufig auf Feldfrüchten (Mais, Weizen, Reis, Kartoffeln usw.) vor und stellen eine wichtige Gruppe der landwirtschaftlichen Phytopathogene auf der ganzen Welt dar. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen gelangen ihre Toxine auch in die Fütterungs- und Nahrungsmittelkette. Erkrankungen von Mensch und Tier werden häufig mit der Einnahme kontaminierter Lebens- oder Futtermittel in Verbindung gebracht. Es gibt jedoch keine eindeutigen Nachweise für Mykotoxikosen in Zusammenhang mit BEA und Enniatin (Logrieco, Moretti et al. 1998).

Die beiden Mykotoxine zeigen jedoch nicht nur negative Wirkungen als Giftstoffe, sondern sind durch ihre Bioaktivität auch von medizinischem Interesse.

BEA und Enniatin zeigen antibiotische und insektizide Wirkung. Untersuchungen von Chen et al. zeigten, dass BEA Zelltod bei Leukämiezellen auslösen kann (Chen et al. 2006). Beide Sekundärmetabolite inhibieren die ACAT-Aktivität und, wie vergangene Diplomarbeiten berichteten, die Knochenresorption (Tomoda et al. 1992).

Durch den möglichen Einsatz von BEA und Enniatin bei Knochenerkrankungen wurden diese Toxine in meiner Arbeit untersucht und getestet. Die Einsatzbereiche von Beauvericin, auch in anderen Bereichen der Medizin, könnten vielfältig sein (Chen, Tsai et al. 2006; Zhan, Burns et al. 2007). Deshalb könnte die Biosynthese des Toxins unter Laborbedingungen von Interesse sein.

Vorangegangene Diplomarbeiten zum Thema der Biosynthese von Beauvericin beschäftigten sich mit der Suche nach einem geeigneten Nährmedium für den Pilz, um eine optimale BEA-Ausbeute zu erzielen. Die Kultivierungsversuche wurden bereits auf Mais, natürlichen Nährmedien wie Polenta, Maizena, und CD-Hefelösungen, sowie auf synthetischen Nährböden wie synthetischem nährstoffarmen Agar (SNA-Agar), Czapek-Dox (CD) und Perlitt durchgeführt. Die Produktion von BEA unter Laborbedingungen mit den verwendeten Medien erwies sich als schwierig. Die BEA-Ausbeute lag in keinem Fall im wünschenswerten Bereich.

Die Wirkung von BEA und Enniatin wurde ebenfalls schon in einer vorangegangenen Diplomarbeit untersucht (Forsdahl 2005).

Beide Toxine zeigten anti-resorptive Aktivität. Weiters wurde gezeigt, dass die Substanzen den Aktinring beeinträchtigen und Apoptose induzieren könnten.

Die Aufgabenstellungen meiner Arbeit sind an die Ergebnisse der bereits durchgeführten Arbeiten geknüpft und stellen eine Weiterführung der Themen dar:

Optimierung der Biosynthese von Beauvericin

- Austestung verschiedener Vertreter der Gattung *Fusarium*
- Verbesserung der Ausbeute durch Verwendung des CD-Mediums mit Hefekulturen mit unterschiedlichen Hefewachstumszeiten
- Optimierung der BEA-Produktion durch Änderung der Prekursor-Konzentration

Wirkung von Enniatin und Beauvericin auf Osteoklasten

- Untersuchung der Wirkung verschiedener Konzentrationen auf die Knochenresorption
- Austestung der Reversibilität der Wirkung auf Osteoklasten nach der unterschiedlichen Toxinbelastungen hinsichtlich Konzentration und Dauer

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1 Physiologie des Knochens

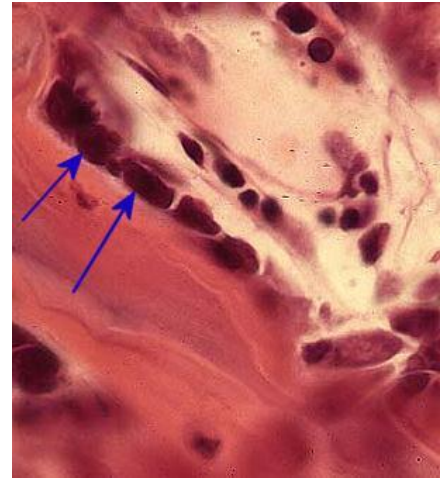
Knochen ist eine hochspezialisierte Form des Bindegewebes. Es handelt sich um ein komplexes Gewebe in dem die extrazelluläre Matrix mineralisiert vorliegt und dem Skelett sowohl die nötige Festigkeit, als auch Elastizität ermöglicht. Zusätzlich zur Schutz- und Stützfunktion des Knochens fungiert er als wichtiger Speicherplatz für anorganische Ionen und spielt somit eine wichtige Rolle für die Calcium-Homöostase im Körper.

Knochen besteht aus einer organischen Matrix, die durch Calcium-Einlagerungen stabilisiert ist. 95% der organischen Matrix besteht aus Kollagen Typ I. Die restlichen 5% entfallen auf Proteoglykane und nichtkollagene Proteine. Die eingelagerten Mineralien sind hauptsächlich Calcium und Phosphat in Form von Hydroxylapatit (Marks und Odgren 2002).

Die Knochensubstanz unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau (bone remodeling), der durch die Knochenzellen (Osteoblasten, Osteocyten, Osteoklasten) stattfindet. Im gesunden adulten Menschen herrscht ein Gleichgewicht zwischen den Aktivitäten der einzelnen Zellen, die durch zahlreiche Wachstumsfaktoren und zelluläre Botenstoffe reguliert werden (Bartel 2004).

2.1.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind sehr aktive einkernige Zellen. Sie sind verantwortlich für die Produktion der Matrixbestandteile. Sie entstehen aus mesenchymalen Stammzellen (z.B. Knochenmarkstammzellen) mit Hilfe von Wachstumsfaktoren wie „Fibroblast growth factor“ (FGF), „Bone morphogenetic protein“ (BMP), Wnt-Protein und benötigen die



Transkriptionsfaktoren Runx und Osterix.

Abb. 1: Osteoblasten (→)

Die Precursor werden durch Proliferation und Differenzierung vorerst zu Präosteoblasten und reifen schließlich zu vollständigen Osteoblasten heran. Aktive Zellen kommen meist in Anhäufungen an der Knochenoberfläche vor und zeichnen sich durch eine große Anzahl an ribosomalen endoplasmatischen Rediculum, einen stark entwickelten Golgi-Apparat sowie ein stark basophiles Cytoplasma aus. Die Zeit der Osteoidreifung beträgt beim Menschen circa zehn Tage. Osteoblasten lagern sich schichtweise an den Knochen an und bilden so neue Knochensubstanz. An der basalen Seite der ausgereiften Osteoblasten wird eine noch nicht mineralisierte Knochenmatrix (aus Kollagen) gebildet. Nach einer Phase der Reifung kommt es schließlich zur Kalzifizierung des Knochens.

Osteoblasten stehen in Kontakt mit Osteocyten und sind oft durch „gap junctions“ miteinander verbunden

Die Plasmamembran der Osteoblasten ist reich an alkalischer Phosphatase, deren Konzentration im Serum als Indikator für die Knochenformation gilt. Osteoblasten exprimieren Rezeptoren für Parathormon, Prostaglandin, Estrogen und Vitamin D3. CSF-1 und RANKL, die die Osteoblastogenese einleiten, sowie Osteoprotegerin, ein Antagonist zu RANKL, werden von Osteoblasten sezerniert (Baron 2002; Zaidi 2007).

2.1.2 Osteocyten

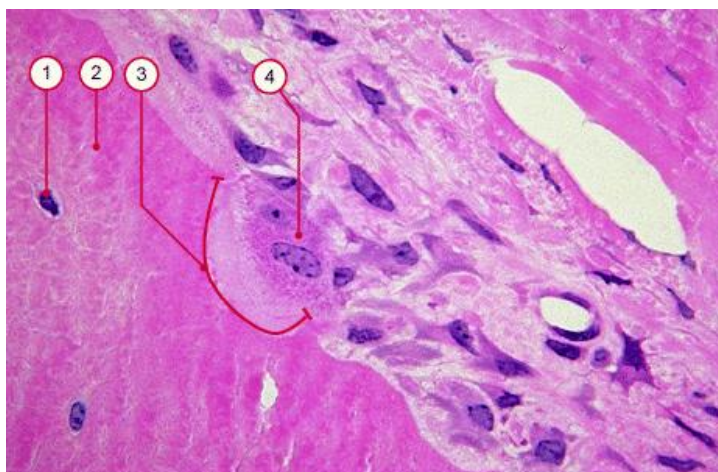
Die mineralisierte Knochenmatrix ist nicht metabolisch inert. Eingebettet in Lakunen liegen die Osteocyten. Sie sind frei von alkalischer Phosphatase, produzieren aber, so wie andere Knochenmatrix-Proteine, Osteopontin (Zaidi 2007). Diese ursprünglichen Osteoblasten werden durch die produzierte Knochenmatrix eingeschlossen und schließlich mineralisiert. Osteocyten bilden ein Netzwerk über „gap junctions“ durch dünne Canaliculi aus und stehen so untereinander, als auch mit Osteoblasten, „lining cells“ im Endothel und den Knochenmarkszellen in Verbindung. Die eingebetteten Zellen sind in der Lage Veränderungen der Extrazellulärflüssigkeit (ECF), die sich zwischen Osteocyten-Plasmamembran und Knochenmatrix befindet, wahrzunehmen und darauf zu reagieren. Auslöser einer solchen Veränderung können Stress, Druck oder Belastung sein. Die Morphologie der Osteocyten ist abhängig von deren Alter. Junge Osteocyten sind den Osteoblasten noch sehr ähnlich, während alte Osteocyten schon tief in der Knochenmatrix eingeschlossen sind und immer mehr ihre osteoblastären Eigenschaften verlieren.

In Folge des Knochenabbaus der Osteoklasten kommt es schließlich zu Phagozytose und Digestion der Osteocyten (Marks und Odgren 2002; Bartel 2004; Zaidi 2007).

2.1.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind jene Zellen, die für die Knochenresorption verantwortlich sind. Sie gehen aus den hämatopoetischen Stammzellen hervor. Es handelt sich um große, mehrkernige Zellen, die normalerweise an der mineralisierten Knochenoberfläche in so genannten Howship'schen Lakunen, die aus ihrer eigenen Resorptionstätigkeit resultieren, zu finden sind. Die Zellen zeichnen sich durch einen charakteristischen Golgi-Apparat rund um die Zellkerne, zahlreiche Mitochondrien und durch viele Transportvesikel mit lysosomalen Enzymen aus. Am charakteristischsten für Osteoklasten sind jedoch die tiefen Einbuchtungen der Plasmamembran an der knochenzugewandten Seite der Zelle.

Die „ruffled border“ ist von einem Aktinring umschlossen, der „sealing zone“, die die Zelle mit der Knochenoberfläche fest verankert und eine Resorptionslakune bildet.



1. Osteocyt
2. Knochenmatarix
3. Howship'sche Lakune
4. mehrkerniger Osteoklast

Abb. 2: Osteoklast mit Howship'scher Lakune

Die Anlagerung an die Matrix erfolgt durch Integrin-Rezeptoren, die an Matrixproteine binden. Die basolaterale Membran ist angereichert mit Na^+ , K^+ ATPase, $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Austauscher, Na^+/H^+ -Austauscher und enthält auch Ionenkanäle. Die Membran exprimiert RANK, den Rezeptor für RANKL, und M-

CSF, die zusammen mit Calcitonin, für die Osteoklastendifferenzierung zuständig sind.

Osteoklasten synthetisieren lysosomale Enzyme wie TRAP und Kathepsin K, die zusammen mit verschiedenen Metalloproteasen (Kollagenase, Gelatinase) durch die „ruffled border“ in die Resorptionslakune abgegeben werden.

Eingepumpte Protonen, sowie eine große Anzahl an Chloridkanälen in der „ruffled border“ führen zur Ansäuerung der extrazellulären Kompartimente und somit zur Senkung des pH-Werts. Die Hydroxylapatitkristalle lösen sich im sauren Milieu und die restlichen Kollagenfasern werden entweder durch Kollagenase oder durch Kathepsin abgebaut. Die organischen Abbauprodukte werden über Transzytose durch die Zelle befördert und zur „functional secretory domain“ (FSD) gebracht.

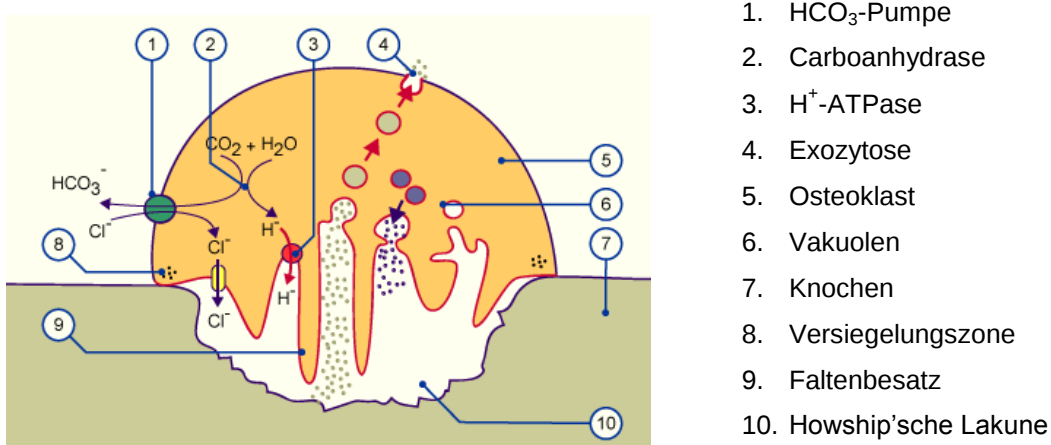


Abb. 3: Arbeitsweise der Osteoklasten

Osteoklasten stammen von der Monozyten-/Makrophagenlinie des Knochenmarks ab. Die Entwicklung zu unreifen, mehrkernigen Präosteoklasten ist abhängig von der Anwesenheit von M-CSF und RANKL. Durch Aktivierung mit IL-1 und RANKL differenzieren sie zu reifen Osteoklasten, die die Fähigkeit besitzen Knochen abzubauen. Die volle Lebensdauer eines ausgereiften Osteoklasten beträgt circa zwei Wochen.

Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Osteoklasten nach dem Resorptionszyklus Apoptose unterliegen. Der Einfluss von Östrogen auf den Resorptionszyklus könnte eine mögliche Erklärung für die erhöhte Knochenresorption nach der Menopause sein (Baron 2002). Im gesunden erwachsenen Menschen ist die Resorption durch die Osteoklasten den Bedürfnissen des „bone remodelings“ und der Knochenmorphogenese angepasst und steht im Gleichgewicht mit den Osteoblasten. Eine erhöhte Resorptionsrate führt zur Senkung der Knochendichte woraus Osteoporose, Morbus Paget, Parodontalerkrankungen und dergleichen resultieren.

2.1.4 Bone-Remodeling

Knochen ist ein hochaktives Gewebe. Er wird während des gesamten Lebens um-, auf- und abgebaut. Bis in die Pubertät und zum Ende der Wachstumsperiode kommt es vorwiegend zu einem Knochenaufbau, während im Erwachsenenalter der knochenerhaltende Austauschprozess, das Remodeling, im Vordergrund steht.

Im Jahr werden ungefähr 20% der Knochensubstanz ausgetauscht. Die Dauer eines Knochenumbauzyklus beträgt circa 120 Tage und lässt sich in sechs Phasen einteilen.

1. Ruhephase: „lining cells“ schützen und bedecken die Knochenoberfläche
2. Resorptionsphase: Osteoklasten werden vorbereitet
Resorption des alten Knochens und Bildung von Resorptionslakunen
3. Umschaltphase: Osteoblastenvorläuferzellen gelangen zur Resorptionsstelle
Oberfläche der Lakune wird für die Knochenproduktion vorbereitet
4. Frühe Anbauphase: aktive Osteoblasten produzieren Osteoid
5. Späte Anbauphase: primäre Mineralisierung des Osteoid
6. Ruhephase: Osteoblasten werden in Osteocyten oder „lining cells“ umgewandelt (Bartel 2004)

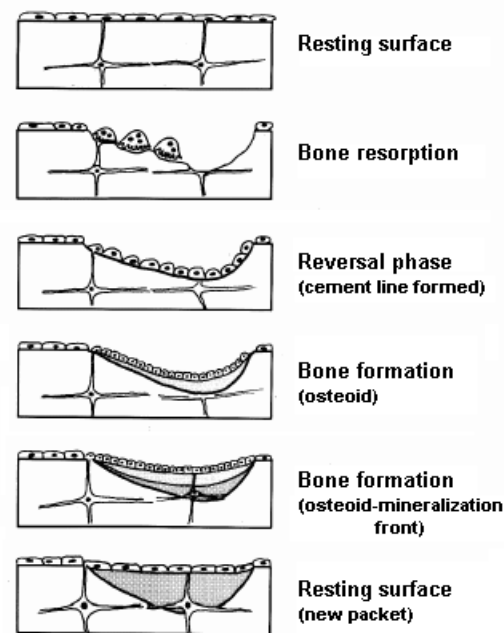


Abb. 4: Die sechs Phasen im „bone remodeling“ Prozess

Die Steuerung des Knochenumbaus geht von den Osteoblasten aus. Regulierende Wirkung zeigen jedoch auch Hormone, mechanische Beanspruchung des Knochens, lokale Zytokine und Signale, Vitamine und Mineralien sowie Transkriptionsfaktoren und Gene.

Zu den wichtigsten Hormonen im Knochenstoffwechsel zählen Parathormon, Calcitonin, Wachstumshormone sowie die Sexualhormone Östrogen und Testosteron. Östrogene regulieren insbesondere die Osteoklastenaktivität und somit die Knochenresorption. Parathormon und Vitamin D₃ sind Regulatoren für die Kalciomhomöostase. Calcitonin wirkt als Gegenspieler von Parathormon. Während der Immobilisation in der Knochenresorption spielen Prostaglandine eine wichtige Rolle. Osteoprotegerin (OPG), ein Mitglied der Tumornekrosefaktorrezeptorfamilie, blockiert die Differenzierung der Osteoklasten aus Vorläuferzellen. Für die Mineralisation des Osteoids sowie zur Bildung von Kollagen werden die Vitamine D, K, C, B₆ und A benötigt. Die transkriptionellen Faktoren RUNX und Osterix kontrollieren die Osteogenese und Differenzierung der Osteoblasten.

2.2 Schimmelpilze

Schimmelpilze stellen eine untergeordnete, jedoch nicht genau definierte, Gruppe der Pilze dar. Es handelt sich um Organismen, die einen Thallus besitzen und aufgrund des Fehlens von Photosynthesepigmenten darauf angewiesen sind, organisch gebundenen Kohlenstoff aus dem Boden zu assimilieren. Der Übergang zwischen saprobiotischer und parasitischer Lebensweise ist fließend. *Fusarium*arten können beispielsweise sowohl als Parasit auf Nutzpflanzen als auch auf abgestorbenen Pflanzenteilen existieren. In der vegetativen Phase des Pilzwachstums kommt es zur Ausbildung von Hyphen, die schließlich das Mycel bilden. Während der generativen Phase werden die Fortpflanzungszellen gebildet. Die meisten Schimmelpilze produzieren nur ungeschlechtliche Sporen und werden als Fungi Imperfecti bezeichnet.

Schimmelpilze sind ubiquitär und können als Nutz-, aber auch als Schadpilze fungieren. Voraussetzungen für ein Schimmelwachstum sind das Vorhandensein von Substrat, optimaler Temperatur, Wassergehalt, Licht und pH-Wert (Reiß 1998).

2.2.1 *Fusarium*



Abb. 5 *Fusarium moniliforme*

2.2.1.1 Taxonomische Stellung der *Fusarien*

Wie schon im Vorfeld erwähnt ist die Einordnung der Schimmelpilze nicht ganz eindeutig. Die folgende Einteilung richtet sich nach Reiß (1998).

Reich	Fungi					
Abteilung		Eu- mycota				
Klasse			Deutero- mycetes (Fungi Imperfecti)			
Ordnung				Moniliales		
Familie					Tuberculariaceae	
Gattung						<i>Fusarium</i>

Abb. 6 Taxonomische Stellung der *Fusarien*

2.2.1.2 Morphologische Kennzeichen

Das Mycel kann artenspezifisch verschiedenste Farben wie zum Beispiel weiss, lachsfarbig, gelb bis hin zu rot und violett ausprägen. Die Konidiophoren sind einfach, kurz und unregelmäßig verzweigt, oder mit einem Büschel von Phialiden. Die Makrokonidien zeigen sich vielzellig und gekrümmt. Die Mikrokonidien liegen einzellig, eiförmig, einzeln oder in Ketten gebildet vor (Reiß 1998).



Abb. 7 Makrokonidien eines *Fusariums*

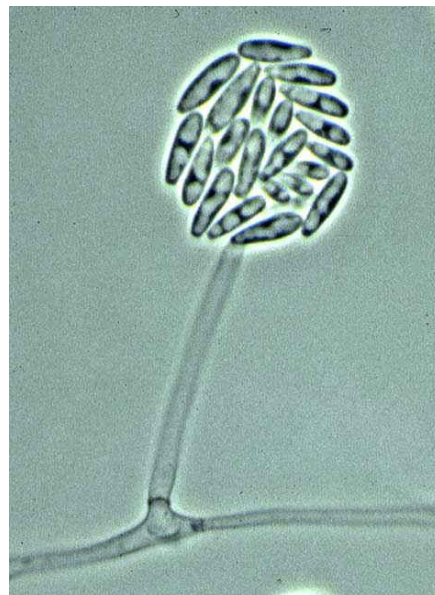


Abb. 8 Mikrokonidien eines *Fusariums*

2.2.1.3 Vorkommen

Fusarien kommen weltweit in den unterschiedlichsten Lebensräumen vor. Derzeit sind circa 70 verschiedene Arten bekannt, die unter anderem auch ökonomisch wichtige Pflanzen wie Weizen, Kaffee, Mais, Maniok, Kartoffel, und Reis befallen können.

Viele *Fusarien*-Arten bilden Mykotoxine. Zu den ökologisch Wichtigsten zählen Trichothecene, Fumonisine und Zearalenon. Beauvericin und Enniatin gehören zu einer weiteren Mykotoxingruppe, die von diesen Pilzen gebildet werden (Bhatnagar 2006). Das



Abb. 9 *Fusarium* head blight“ auf Weizen

Temperaturoptimum für den Pilz liegt zwischen 25 und 30°C. Für das Mycelwachstum ist ein pH-Wert zwischen 5 und 6 optimal. In den nördlichen Temperaturregionen zählen *Fusarien* zu den am häufigsten vorkommenden Mykotoxinbildnern (Reiß 1998). In den USA, Australien und Zentraleuropa wird *Fusarium graminearum* als Hauptverursacher von „*Fusarium* head blight“ angesehen (Uhlig et al. 2007). Andere international wichtige Stämme sind *F. culmorum*, *F. graminearum* und *F. avenaceum*. In Nord- und Mitteleuropa, sowie in Kanada ist *F. avenaceum* am weitesten verbreitet (Bottalico und Perrone 2002).

2.3 Mykotoxine

Schimmelpilze können auf vielen landwirtschaftlichen Erzeugnissen und verarbeiteten Lebensmitteln, während des Wachstums oder der Lagerung, Mykotoxine ausbilden. Mykotoxine sind sekundär gebildete Metabolite, die auch schon in geringen Dosen bei Mensch und Tier eine toxische Wirkung zeigen können. Viele Intoxikationen zeigen cytotoxische, kanzerogene, immunsuppressive oder mutagene Wirkung (Krska und Molinelli 2007). Es sind über 300 Substanzen mit unterschiedlichster chemischer Struktur bekannt (Sulyok et al. 2006). Der Grund für die Mykotoxinproduktion von Schimmelpilzen ist noch nicht eindeutig geklärt. Mögliche Gründe für die Synthese toxischer Substanzen können der Schutz vor anderen Pilzen oder vor Tieren sein. Die Mykotoxinbildung eines Pilzes hängt von vielen Faktoren wie Temperatur, pH-Wert, Wasseraktivität, chemische Zusammensetzung des Substrats usw. ab. Mykotoxine werden von lebenden Pilzen gebildet und unterliegen dadurch den Minimal- und Maximalbedingungen des Organismus (Reiß 1998). Ein Zusammenhang zwischen Mycelwachstum und Toxinproduktion ist jedoch nicht gegeben, da es nur unter spezifischen und häufig engen Umweltbedingungen zur Toxinbildung kommt. So kann man bei einem guten Mycelwachstum nicht von einer hohen Toxinbildung ausgehen und umgekehrt kann ein schwaches Mycelwachstum eine hohe Toxinbildung zur Folge haben (Engelhardt 2000). Die sekundären Stoffwechselprodukte sind, im Gegensatz zu den primären, die in allen Organismen zu finden sind, für ihren Produzenten typisch (Reiß 1998). Sie haben neben ihrer negativen Wirkung auch eine große Bedeutung in der Industrie und Pharmazie.

2.3.1 Beauvericin

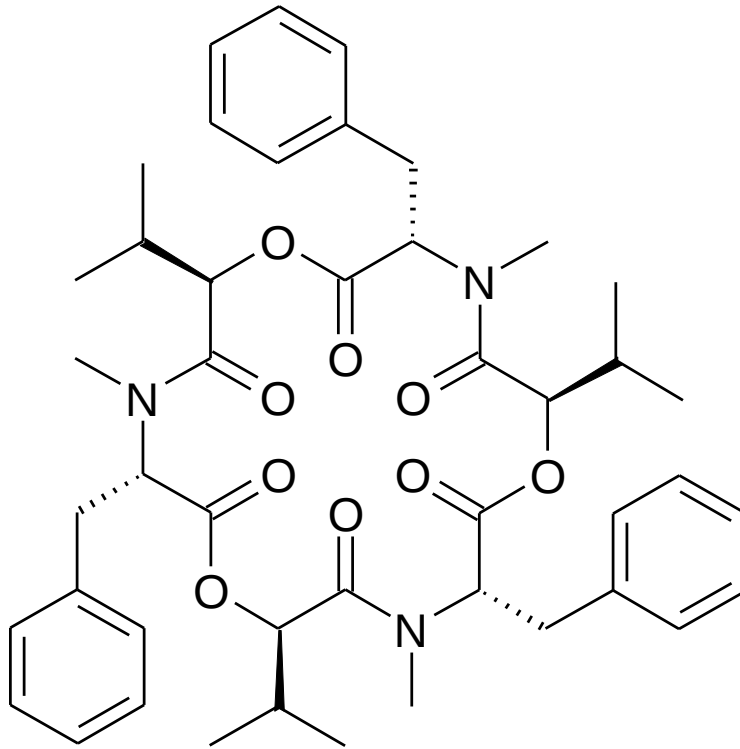


Abb. 10 Strukturformel von BEA

2.3.1.1 Struktur

Beauvericin ist ein bioaktives, zyklisches Hexadepsipeptid mit einem Molekulargewicht von 784 g/mol und der Strukturformel $\text{cyclo-[D-}\alpha\text{-Hydroxyisovaleryl-L-N-methyl-phenylalanyl]}_3$. Es ist abwechselnd aus N-Methyl-L-Phenylalaninresten und D- α -Hydroxyisovalerianresten, die durch Peptid- und Esterbindungen verbunden sind, aufgebaut und bildet eine Ringstruktur (Peeters et al. 1988). Bei diesem, meist in organischen Lösungsmitteln löslichen, Toxin liegen die nicht polaren Propyl- und Benzylgruppen an der Ringaußenseite. Die Sauerstoffatome sind in die Mitte des trimeren Lactonringes gerichtet (Krska et al. 1994; Moretti und Logrieco 1994).

2.3.1.2 Charakterisierung und Wirkung

Im Jahre 1969 wurde BEA erstmals von Hamill et al. (1969) aus *Beauveria bassiana* und *Paecilomyces fumosoroseus* isoliert, strukturell charakterisiert und auf seine insektizide und antibiotische Wirkung untersucht. Seither konnte BEA in verschiedenen *Fusarium*-arten wie z.B. *F. moniliforme* var. *subglutinans* und *F. semitectum*, als häufiger Kontaminant von Getreide nachgewiesen werden (Hamill et al. 1969; Gupta et al. 1991; Logrieco et al. 1998). Prince et al. (1974) führen die insektizide und antibiotische Wirkung von BEA auf die ionophore Wirkung zurück, die die Ionenpermeabilität einer Membran über Carrier-mechanismen bzw. durch Porenbildung verändern. BEA hemmt, vermutlich unter anderem aufgrund des ionophoren Charakters, die Synthese von Cholesterylesteren und Triglycerol, sowie die Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase, die eine wichtige Rolle im Cholesterinstoffwechsel spielt (Tomoda et al. 1992; Namatame et al. 2004; Ohshiro et al. 2007).

Kouri et al. beschrieben die kanalbildende Funktion von BEA in Zellmembranen und Liposomen (Kouri et al. 2003) sowie den daraus resultierenden Effekt auf die Zellhomöostase (Kouri et al. 2005). In isolierten glattmuskulären Präparaten und Herzmuskelpräparaten bewirkte BEA eine negativ ionotrope und chronotrope Wirkung. Die Amplitude des Aktionspotentials nimmt ab, das Membranruhepotential depolarisiert und die Aktionspotentialdauer wird verkürzt (Lemmens-Gruber et al. 2000).

Weitere Studien auf Säugetierpräparaten weisen darauf hin, dass BEA ein Ca^{2+} -Antagonist ist (Nakajyo et al. 1987; Wu et al. 2002).

BEA besitzt außerdem die Fähigkeit Apoptose in menschlichen Zelllinien auszulösen (Chen et al. 2006). In einer weiteren Studie konnte eine selektive Toxizität von BEA gegenüber unterschiedlichen Krebsarten festgestellt werden (Zhan et al. 2007).

2.3.2 Enniatin

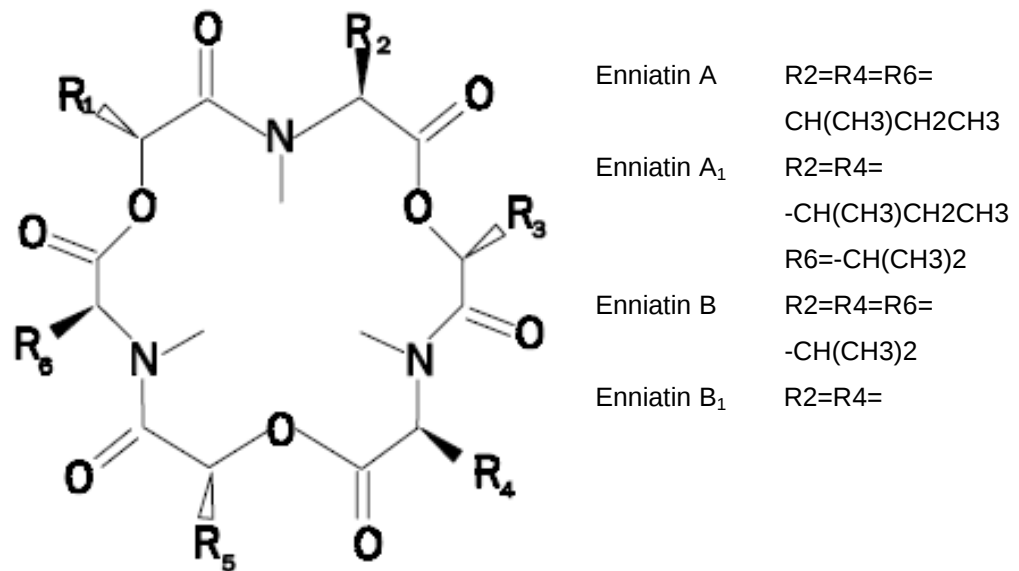


Abb. 11 Strukturformel von ENN

2.3.2.1 Struktur

Enniatin gehört wie das strukturverwandte Beauvericin zu den cyclischen Hexadepsipeptiden. Der 18-teilige Ring ist jeweils abwechselnd mit hydrophoben, verzweigtkettigen L-Aminosäuren und D-Hydroxyisovalerinsäureresten, über Peptid- und Esterbindungen verknüpft.

2.3.2.2 Charakterisierung und Wirkung

Es wurden mittlerweile über 15 verschiedene Enniatinderivate isoliert. Sie haben, wie BEA, einen ionophoren Charakter und können 1:1 und 2:1 Enniatin:Kation-Komplexe (Sandwich-Komplexe) bilden. Eine 3:2 Konfiguration ist ebenfalls möglich, aber wesentlich unwahrscheinlicher (Ovchinnikov et al. 1974). Die Bildung von Enniatin erfolgt nicht-ribosomal durch das Enzym Enniatin-synthetase (Zocher et al. 1982).

Enniatine zeigen antibakterielle Wirkung gegen einige gram-positive Bakterien, hemmen spezifisch Pdr5p und werden zur Behandlung von Atemwegsinfektionen eingesetzt (Levy et al. 1995; Hiraga et al. 2005). So wie BEA zeigen auch Enniatine antibiotische und insektizide Wirkung und inhibieren, jedoch schwächer, die ACAT-Aktivität (Tomoda et al. 1992). Ein cytotoxischer Effekt konnte ebenfalls für beide Toxine nachgewiesen werden (Ivanova et al. 2006), wobei diese zytotoxische Wirkung von Enniatin auf Apoptose über p53-abhängige und/oder –unabhängige Mechanismen beruht (Dornetshuber et al. 2007) und auch die von BEA induzierte Apoptose über mitochondriale Mechanismen verläuft (Jow et al. 2004). Jeschke et al. (2007) konnte eine anthelmintische Wirkung gegen parasitäre Nematoden bei Schafen nachweisen.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Geräte und Materialien

Geräte	Bezugsquelle
Autoklav	Inder Labortechnik, Österreich
Computer	Apple PowerMac
HPLC-Pumpe, Series 200	Perkin Elmer, USA
HPLC-Autosampler, Series 200	Perkin Elmer, USA
HPLC-Diode-Array-Detektor 235C	Perkin Elmer, USA
HPLC-Interface, Series 600	Perkin Elmer, USA
HPLC-Säule: LiChroCART® 250-4, LiChrospher® 100, RP-18 (5 µm)	Hewlett Packard, USA
HPLC-Vorsäule: LiChrospher® 100, RP-18 (5 µm), 4 x 4 mm	Hewlett Packard, USA
Inkubator Cytoperm	Heraseus Instruments, Deutschland
Kieselgel 60	Merck KG, Deutschland
Knochensäge Isomet low speed saw	Buehler, USA
Kulturplatten	Iwaki, Österreich Nunc A/S, Dänemark
Laminar-Airflow-Werkbank	Ehret, Österreich
Mikroskop, BX51	Olympus, Japan
MykoSep®224 Afla Zon Multifunctional Columns	Romer Labs Diagnostic GmbH, Österreich

Petrischalen	Sterilin Stone Staffs, England
Sägeblatt Diamond wafering blade/series 15 HC diamond	Buehler, USA
Schüttler	Edmund Bühler, Deutschland
Spritzen	Eurolab, Österreich
Ultra Turrax, Polytron PT 3000	KINEMATICA, Schweiz
Ultraschallbad Transsonic 570	Elma, Österreich
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Schweiz
Wasserbad GFL1066	Aigner, Österreich
Zentrifuge	Bartelt, Österreich
Zentrifugenröhrchen	Becton Dickinson, Österreich

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Riedel-de Haen, Österreich
CHCl ₃ , Laborqualität, dest.	Mallinckrodt Baker B. V., Niederlande
CH ₂ Cl ₂ , Laborqualität, dest.	Mallinckrodt Baker B. V., Niederlande
EtOAc, Laborqualität, dest.	Mallinckrodt Baker B. V., Niederlande
AcCN, Laborqualität, dest.	Mallinckrodt Baker B. V., Niederlande
Diethyl Ether	Riedel-de Haen, Österreich
Ethanol	Merck, Österreich
Isopropanol	Riedel-de Haen, Österreich
KCl	USB, USA
KH ₂ PO ₄	Merck, Österreich
MeOH	VWR International, Belgien
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck, Österreich
NaCl	Sigma, Österreich
n-Hexan	Merck KG, Deutschland
Pennicilin	Gibco BRL, Österreich
Sodium Borat	Sigma, Österreich
Streptomycin	Gibco, BRL, Österreich

Sonstiges	Bezugsquelle
1,25-(OH) ₂ -Vitamin D ₃	Hoffmann-La Roche, Österreich
BEA, B7510, Reinheit 97 %	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
CD modifiziert (CD III), CM0097	Oxoid, England
D-α-HIV L-Met L-Phe	Fluka Chemie GmbH, Deutschland Fluka Chemie GmbH, Deutschland Fluka Chemie GmbH, Deutschland
Enniatin	SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, Deutschland
Fetales Kälberserum	PAA, Österreich
<i>Fusarium proliferatum</i> , Nr. 183 <i>Fusarium acuminatum</i> , Nr. 313 <i>Fusarium subglutinans</i> , Nr. 368 <i>Fusarium subglutinans</i> , Nr. 213	IFA Tulln, Österreich IFA Tulln, Österreich IFA Tulln, Österreich IFA Tulln, Österreich
Hefe	Dr. Oetker, Deutschland
PGE ₂	Cayman, USA
Silikonfett	Wacker-Chemie, Österreich
Toluidinblau	Sigma, Österreich
α-MEM	Gibco BRL, Österreich

3.2 Optimierungsversuch der Biosynthese von Beauvericin

3.2.1 Verwendete Fusariumarten

Für den Versuch der Biosynthese von BEA wurden vier *Fusarium*arten verwendet. Aus vorangegangenen Studien ging hervor, dass *Fusarium sacchari* var. *subglutinans* einen Hauptproduzenten von BEA darstellt. Aus diesem Grund wurden für den Versuch zwei *Fusarium sacchari* var. *subglutinans* herangezogen. Das IFA Tulln stellte die verwendeten Pilzarten auf SNA-Agar zur Verfügung.

Verwendete *Fusarium*arten:

Fusarium proliferatum, Nr. 183

Fusarium acuminatum, Nr. 313

Fusarium subglutinans, Nr. 368

Fusarium subglutinans, Nr. 213

Zusammensetzung des SNA-Agar:

Substanz	g/l
KH ₂ PO ₄	1,0
KNO ₃	1,0
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5
KCl	0,5
Glucose	0,2
Saccharose	0,2

Tab. 1 Zusammensetzung des SNA-Agar

3.2.2 Verwendetes Nährmedium

Für die Versuche wurde Modifiziertes Czapek-Dox (CD) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Modifikation der CD-Lösungen nach der Vorschrift von Peeters. Magnesiumglyzerophosphat und K_2SO_4 ersetzen in der veränderten Version die Salze $MgSO_4 \times 7 H_2O$ und KH_2PO_4 .

Zusammensetzung der CD-Lösung:

Substanz	g/l Aqua dest.
$NaNO_3$	2,00
K_2SO_4	0,30
KCl	0,50
Magnesiumglyzerophosphat	0,50
$FeSO_4$	0,01
Saccharose	40,00

Tab. 2 Zusammensetzung der CD-Lösung

In bereits durchgeführten Arbeiten hat sich gezeigt, dass die Kultivierung von Fusarien in mit Bäckerhefe versetztem CD viel versprechend sein könnte. Weiters wurden Precursoren in die Hefelösung zugegeben, da angenommen wurde, dass die Hefe diese während des Wachstums aufnimmt und der *Fusarium* diese Bausteine für den Aufbau von BEA verwendet.

Als Precursoren wurde L-Methionin, L-Phenylalanin und D-Hydroxyisovaleriansäure verwendet und je nach Konzentration eingewogen und mit Aqua dest. im Ultraschallbad aufgelöst.

3.2.3 Herstellung der Precursor-Lösung

Precursor	in L-Met	L-Phe	D- α -HIV
g/l Aqua dest	(mg)	(mg)	(mg)
0,0	0	0	0
0,5	175	190	136

Tab. 3 Herstellung der Precursor-Lösung

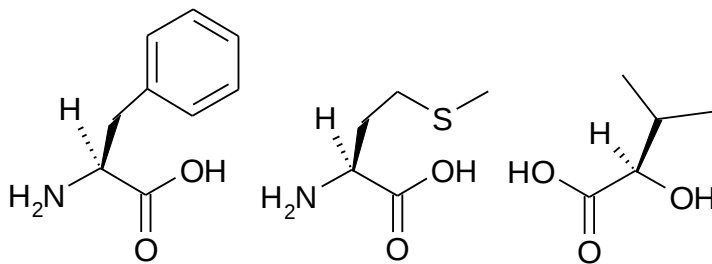


Abb. 12 Strukturformeln von L-Phe, L-Met und D- α -HIV

3.2.4 Herstellung des *Fusarium*inokulum

Unter sterilen Bedingungen wurde ein 50 ml Erlenmeyerkolben mit etwas autoklaviertem Wasser befüllt. Das Mycel und die Sporen des *Fusarium* befanden sich im SNA-Nährboden. Deshalb musste der Nährboden mit einer Impfnadel sehr fein zerkleinert werden und konnte dann so mit einer sterilen Pinzette in den Erlenmeyerkolben überführt werden. Die Konidien des *Fusariums* wurden anschließend durch kräftiges Schütteln des Kolbens aus dem Nährboden herausgelöst und anschließend mit der Bürker-Türk-Zählkammer abgezählt, um die Konidienkonzentration des Inokulums zu berechnen.

Um eine adäquate Beimpfung der Proben zu gewährleisten, sollte für die Beimpfung der Proben ein Inokulum mit einer Konzentration von über 10^7 Konidien pro ml Wasser verwendet werden (Munkvold et al. 1998). Bei den verwendeten Inokula lag die Konidienkonzentrationen zwischen $2,7 \times 10^7$ und $3,4 \times 10^7$ pro ml Wasser.

3.2.5 Probenvorbereitung und Durchführung

3.2.5.1 Vorbereitung der Proben

Alle Proben wurden im Doppelansatz durchgeführt.

Eine CD-Lösung wurde ohne Aminosäuren hergestellt. Die andere CD-Lösung wurde nach der Herstellung mit der benötigten Menge an Vorstufen versetzt und anschließend im Ultraschallbad vollständig gelöst.

50 ml der jeweiligen CD-Lösung wurden in die vorbereiteten und beschrifteten Kolben gefüllt und anschließend mit einem Zellulosestoppel verschlossen. Um einen weiteren Verdunstungsschutz zu bieten, wurden die Stoppeln zusätzlich mit Alufolie umwickelt.

3.2.5.2 Entkeimung

Die befüllten Kolben wurden zur Entkeimung zwei Mal für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert.

3.2.5.3 Inokulation und Bebrütung

Die autoklavierten CD-Lösungen wurden nach dem Abkühlen mit 5g Hefe/ l Wasser versetzt (entspricht 0,25g/Kolben). Zusätzlich wurde ein Maiskorn beigegeben.

Die Ansätze wurden anschließend für 1, 3 bzw. 6 Tage im Trockenschrank bei 35°C bebrütet und anschließend nochmals 2-mal für 20 Minuten bei 121°C autoklaviert, um das Abtöten der Hefestämme zu gewährleisten.

Die ausgekühlten Kolben wurden danach mit jeweils 1 ml *Fusarium*inokulum beimpft.

Die inokulierten Proben wurden nun drei Wochen lang im Trockenschrank bebrütet, wobei die Temperatur in der erste Woche bei 28°C gehalten wurde und für die weiteren zwei Wochen auf 20°C abgesenkt wurde. Während der gesamten Bebrütungsdauer wurden die Proben im diffusen Licht gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Kolben gut durchgeschwenkt und verstellt.



Abb. 13 Probenansätze im Brutschrank



Abb. 14 Bebrüteter Kolben von unten

3.3.6 Aufarbeitung

Vor Beginn der Aufarbeitung wurde das Pilzmycel über eine Nutsche abgesaugt und so von der Flüssigkeit abgetrennt.

Die Aufarbeitung der Proben wurde nach den Richtlinien von Josephs et al. durchgeführt (Josephs et al. 1999).

3.3.6.1 Ausschüttelung

Die Flüssigkeiten der Doppelansätze wurden zu einem Ansatz zusammengefügt. Diese 100 ml Lösung wurden in einen Scheidetrichter überführt und anschließend mit 60 ml CH_2Cl_2 drei Mal gut ausgeschüttelt. Bei nicht stattfindender Phasentrennung wurden nochmals mit 40 ml H_2O ausgeschüttelt. Fand wiederum keine Trennung statt, wurden die Phasen durch Zentrifugieren getrennt.

Die organische Phase im unteren Teil des Scheidetrichters bzw. im Zentrifugenröhrchen wurde in einen kleinen Rundkolben abgetrennt.

Die verbleibende Wasserphase wurde noch zweimal mit 40 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt und die organische Phase wiederum abgetrennt. Die vereinten organischen Phasen wurden mit je 80 ml Wasser zweimal gewaschen und anschließend am Rotavapor eingedampft.



Abb. 15 Abtrennung der organischen Phase im Scheidetrichter und CH_2Cl_2 -Abdampfung am Rotavapor

3.2.6.2 MykoSep-Reinigung

Die zur Trockene gebrachten Proben wurden mit 10 ml $\text{AcN}:\text{H}_2\text{O}$ 84:16 aus dem Rundkolben gelöst. Die Proben wurden danach in die MykoSep®224 AflaZon clean-up-column überführt und so gereinigt. Weiters wurden exakt 4 ml des Filtrats in einen 10 ml Spitzkolben pipettiert und dann bei 226 mbar am Rotavapor wiederum eingedampft. Die Spitzkolben wurden sowohl im leeren Zustand, also auch nach dem Eindampfen gewogen um einen Gewichtsanstieg durch die zur Trockene gebrachte Probe überprüfen zu können.

3.2.6.3 Kieselgelreinigung

Für die Kieselgelreinigung wurde zunächst eine Pasteurpipette mit Watte verstopft und mit 100 mg Kieselgel befüllt. Anschließend wurde das Kieselgel viermal mit je 1 ml CHCl_3 aufgeschwemmt.

Die trockene Probe wurde viermal mit je 250 μl CHCl_3 aus dem Spitzkolben gelöst und in die Pasteurpipette transferiert. Das vorhandene BEA wurde so auf das Kieselgel übertragen. Die Eluation aus dem Kieselgel erfolgte durch das Auftragen von 600 μl $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ 97:3 auf die Säule. Das Eluat wurde in einem 10 ml Spitzkolben aufgefangen und schließlich nochmals eingedampft.



Abb. 16
Kieselgel-
reinigung in
Pasteurpipette

3.2.7 Quantitative Analyse

Die Proben wurden für die HPLC-Messung mit 100 μl $\text{AcCN:H}_2\text{O}$ 9:1 aus dem Spitzkolben gelöst.

Die quantitative Analyse wurde auf einem HPLC-Gerät der Firma Perkin Elmer durchgeführt.

Ein Diode-Array-Detektor 235C, ein Autosampler der Serie 200, eine LC Pumpe und sein Interface (Serie 600) wurden für die Analyse verwendet. Weiters wurde das Computerprogramm Turbochrom Workstation (Version 6.2) angewendet.

Als Säule wurde von der Firma Hewlett Packard eine LiChroCART[®]250-4, LiChrospher[®] 100, RP-18e (5 μm), als Vorsäule eine LiChrospher[®]100, RP 18e (5 μm), 4 x 4 ausgewählt.

Die Verwendung einer RP-18 Säule als stationäre Phase wurde aufgrund der Apolarität von BEA ausgesucht. Also mobile Phase wurde $\text{AcCN:H}_2\text{O}$

verwendet. Die Analyse erfolgte über einen linearen Lösungsmittelanstieg, wobei die AcCN-Konzentration von 15% auf 85% kontinuierlich, innerhalb von 65 Minuten, gesteigert wurde. Die Durchflussrate während des Runs betrug 1,2 ml/min und das Injektionsvolumen der Probe wurde mit 20 µl festgelegt. Bei den Wellenlängen 195 nm und 210 nm erfolgte die Detektion über einen UV/Vis-Detektor.

Solvent A : AcCN	Step	Time	Flow	Solvent A	Solvent B	Curve
Solvent B : H2O	0	15.0	1.20	15	85	0.0
	1	65.0	1.20	85	15	1.0
	2	5.0	1.20	100	0	1.0
	3	5.0	1.20	100	0	0.0
	4	5.0	1.20	15	85	1.0

Abb. 17 Analysenparameter der HPLC-Methode

Instrument Name : LC235C	Injection : Series 200	Detector : LC135/235
Experiment Time : 80.00 min	Injection Volume : 20.0 µL	Wavelength A : 195 nm
Delay Time : 0.00 min	Sampling Rate : 4.88280 pts/s	Wavelength B : 210 nm
Run Time : 80.00 min	Channel : DUAL	Spectral Mode : Auto

Abb. 18 Angaben der HPLC-Parameter

3.2.7.1 Erstellung einer Kalibrationsgeraden

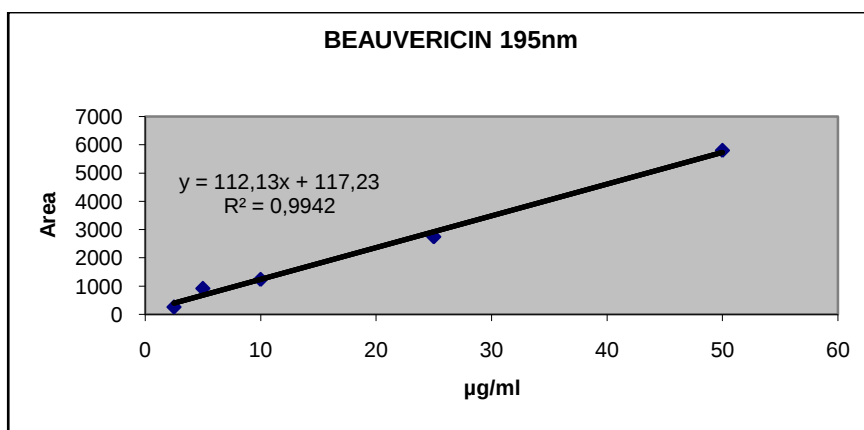
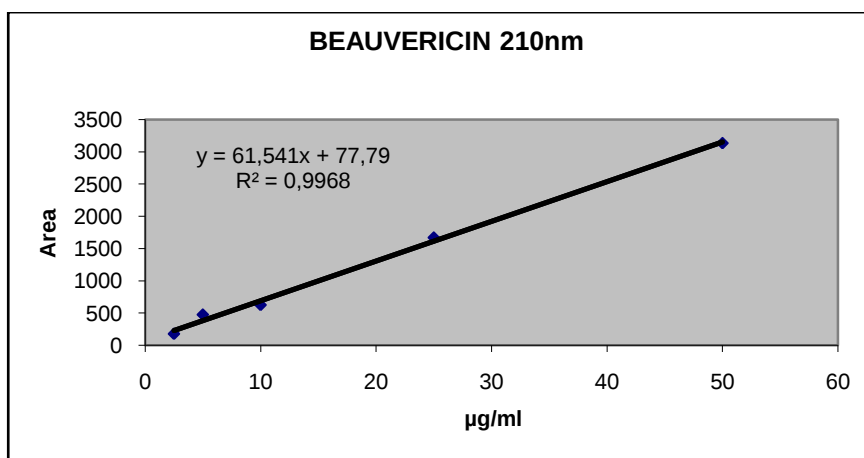
Eine Kalibrationsgerade wurde erstellt, um die HPLC-Messgenauigkeit festzustellen und um nicht bekannte Konzentrationen einer Substanz bestimmen zu können. Für die Kalibrationsgerade wurde zunächst eine Stammlösung aus 1 mg BEA in 1 ml MeOH hergestellt. Über eine Verdünnungsreihe wurden Lösungen im Konzentrationsbereich zwischen 2,5 µl/ml und 50 µl/ml gebildet. Tabelle 4 zeigt die verwendeten Kalibrationslösungen.

Kalibrationslösungen	µg BEA/ml MeOH
1	2,5
2	5
3	10
4	25
5	50

Tab. 4 Kalibrationslösungen

Die Kalibrationslösungen wurden zweimal unter den gleichen Bedingungen durch die HPLC bei 195 nm und 210 nm gemessen.

Danach wurden die Peakflächen ausgewertet und die Kalibrationsgerade erstellt.

**Abb. 19 Kalibrationsgerade der BEA-Lösungen nach HPLC-Messung bei 195 nm****Abb. 20 Kalibrationsgerade der BEA-Lösungen nach HPLC-Messung bei 210 nm**

3.2.8 HPLC-Auswertung

Die Messungen der Proben erfolgten mittels HPLC. Unter Anwesenheit von BEA zeigte das HPLC-Chromatogramm bei 195 nm und bei 210 nm bei circa 60 Minuten einen Peak.

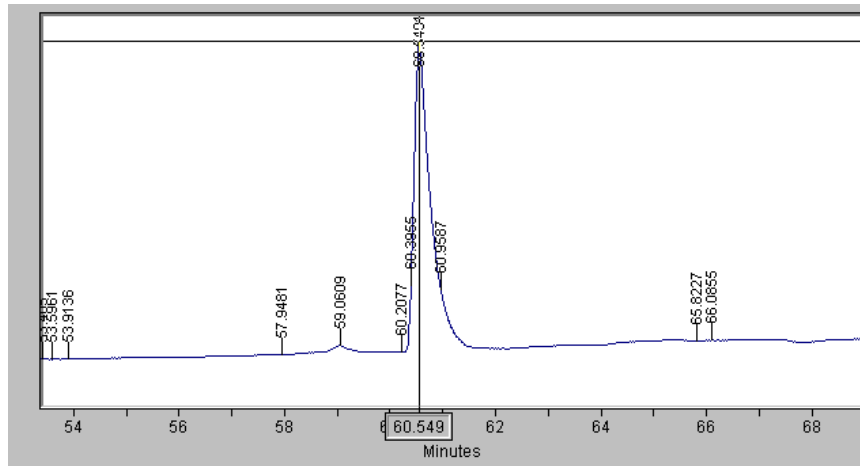


Abb. 21 Chromatogramm einer Kalibrationslösung von 100 µg BEA/ml MeCN:H₂O

Durch die Aufnahme eines UV-Spektrums bei 195 nm konnte die Anwesenheit von BEA bestätigt werden. BEA zeigt im Spektrum bei 206 nm eine Schulter.

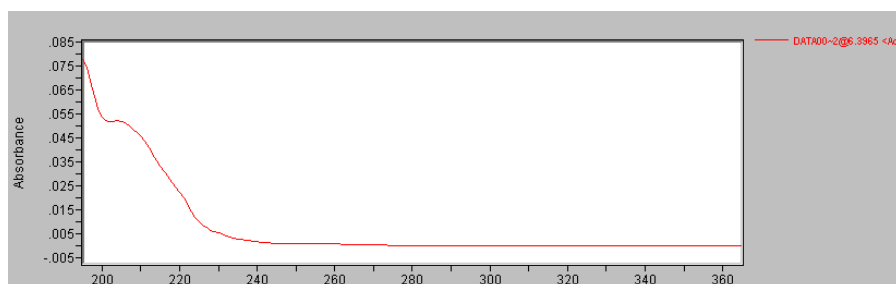


Abb. 22 UV-Spektrum einer Kalibrationslösung von 100 µg BEA/ml MeCN:H₂O

3.2.9 Berechnung der BEA-Konzentration

Durch die Erstellung der Kalibrationsgerade kann die BEA-Konzentration durch die externe Kalibration errechnet werden.

Die Berechnung erfolgt mit folgender Formel:

$$\% \text{ BEA} = \frac{EW_{ESTD} \times A_{Probe} \times 100}{A_{ESTD} \times EW_{Probe}}$$

% BEA..... Prozentgehalt BEA

A_{Probe} Peakfläche der Probe

A_{ESTD} Peakfläche des externen Standards

EW_{ESTD} Einwaage des externen Standards in mg

EW_{Probe} Menge des für die Aufarbeitung verwendeten Analyten

Das Volumen von EW_{ESTD} wurde auf das gleiche Volumen wie das der Analysenlösung berechnet.

3.2.10 Hefeprobenansätze

Die Hefeproben wurden unterschiedlich lange vor der Zugabe des Inokulums mit Hefe bebrütet. Jede Bebrütungsdauer wurde mit *Fusarium* Nr.183, Nr. 368, Nr. 213 und Nr. 313 und zwei unterschiedlichen Aminosäurekonzentrationen und einem Maiskorn durchgeführt.

3.2.10.1 Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr.183, Nr. 368, Nr. 213 und Nr. 313

Bebrütungsdauer der Hefe (Tage)	Precursor- Konzentration in g/l	Hefelösung in ml	Kolbenzahl
1	0,0	50	2
1	0,5	50	2
3	0,0	50	2
3	0,5	50	2
6	0,0	50	2
6	0,5	50	2

Tab. 5 Versuchsansätze der *Fusarien*

3.3 WIRKUNG VON BEAUVERICIN UND ENNIATIN AUF OSTEOKLASTEN

3.3.1 Substanzen

Beauvericin und Enniatin, zwei Cyclohexadepsipeptide, wurden als Testsubstanzen für die Versuche verwendet. Beide Substanzen stammen von der Firma Sigma Aldrich Chemie in Deutschland.

Das verwendete Beauvericin hatte einen Reinheitsgehalt von 99%, Enniatin wies einen Reinheitsgehalt von ca. 96% auf.

In folgender Tabelle ist die Zusammensetzung des Enniatins aufgestellt.

Enniatin	Prozent (%)
Enniatin A	3
Enniatin A ₁	20
Enniatin B	19
Enniatin B ₁	54

Tab. 6 Zusammensetzung des Enniatins

Für die Versuche wurden Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 10 µM beider Wirkstoffe verwendet.

3.3.2 Verwendete Tiere

Die Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur wurde auf Knochenplättchen durchgeführt. Dazu wurden getrocknete Rinderknochen verwendet. Die vom Knochenmark befreien und mit 100% Alkohol gereinigten Knochen wurden dafür für 24 Stunden bei 50°C getrocknet und anschließend kühl gelagert.

Für die Cokulturen wurden Mäuse verwendet. Osteoblasten wurden von der Calvaria neugeborener Mäuse isoliert und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Knochenmarkszellen stammten aus dem Oberschenkelknochen mindestens acht Wochen alter Mäuse.

3.3.3 Lösungen

3.3.3.1 Phosphat gepufferte salzhaltige Lösung (PBS)

PBS wurde im Zuge der Knochenmarksisolation zur kurzfristigen Lagerung des Mäuse-Oberschenkelknochens verwendet. Die einzelnen Bestandteile der Lösung wurden in 1000 ml bidestilliertem Wasser gelöst und 1:10 verdünnt. Schließlich erfolgte eine Sterilfiltration durch einen 0,2 µm Filter.

Zusammensetzung der PBS:

Substanz	Gramm
KCL	2,00
KH ₂ PO ₄	2,00
NaCl	80,00
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	27,02

Tab. 7 Zusammensetzung der PBS

3.3.3.2 Toluidinblau

Die resorbierten Knochenplättchen wurden am Ende des Versuchs mit Toluidinblau eingefärbt, um die Resorptionslakunen zu erkennen. Für die Versuche wurde eine 1%ige Lösung verwendet. Die Bestandteile wurden demnach in 100 ml bidestilliertem Wasser gelöst.

Zusammensetzung der Toluidinblau-Lösung:

Substanz	Gramm
Sodium Borat	1,00
Toluidinblau	1,00

Tab. 8 Zusammensetzung der Toluidinblau-Lösung

3.3.4 Kulturmedien und Kulturbedingungen

Als Nährmedium wurde Minimal Essential Medium, α -Modification (α -MEM) verwendet. Die in Pulverform erhältliche Nährsubstanz wurde unter Zugabe von 2,2 g Natrium Bicarbonat in 10 Liter Wasser gelöst. Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,1 eingestellt und durch einen 0,2 μ m Filter sterilfiltriert.

Um das Nährmedium mit den notwendigen Wachstumsfaktoren zu versorgen, wurde fetales Kälberserum (FCS) zugesetzt. Weiters wurde noch eine Penicillin-Streptomycin-Lösung (PS) als Kontaminationsschutz beigegeben.

Für die Vorinkubation der Knochenplättchen wurde hitzeinaktiviertes FCS (FCS hi) verwendet.

Zusammensetzung des Kulturmediums:

Substanz	Prozent (%)
α -MEM	89
FCS/FCS-hi	10
PS	1

Tab. 9 Zusammensetzung des Kulturmediums

Als Kulturbedingung wurden 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit festgelegt.

3.3.5 Methodik

3.3.5.1 Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur

Die Bestimmung der Osteoklastenaktivität erfolgte durch den Pit Assay. Die Osteoblasten und Knochenmarkszellen wurden auf Knochenplättchen kokultiviert. So sollten sie durch Differenzierung und Fusion von Precursorzellen zu reifen, aktiven Osteoklasten heranwachsen. Die Knochenzellen wurden anschließend mit den beiden zu testenden Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen und Einwirkzeiten behandelt. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Knochenplättchen mit Toluidinblau gefärbt, um eine bessere Sichtbarkeit der Resorptionslakunen zu gewährleisten. Anhand der Größe und Anzahl der Lakunen konnte schließlich die Resorptionsaktivität der Osteoklasten gemessen und statistische Aussagen über die Wirkung der Wirkstoffe getroffen werden.

Während des gesamten Versuchs wurde bis zur Beendigung des Pit Assay unter sterilen Bedingungen gearbeitet.

3.3.5.2 Durchführung der Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kultur

Vorbereitung der Knochenplättchen

Von einem getrockneten Rinderknochen wurden mit einer Knochensäge 300 µm dicke Scheiben abgeschnitten und anschließend mit einem Skalpell in ca. 3-5 mm große Quadrate geschnitten. Zur Reinigung der Knochenplättchen wurden diese zuerst dreimal für fünf Minuten mit destilliertem Wasser gewaschen und dann mit 70% Alkohol nochmals für fünf Minuten gespült und über Nacht in 96% Alkohol gelagert.

Unter der Laminar-Flow-Werkbank wurden sie zur Sterilisation für 15 Minuten pro Seite mit UV-Licht bestrahlt. Nach der Bestrahlung der ersten Seite wurde eine Markierung angebracht um die Unterseite des Knochenplättchens festzulegen.

Die sterilen Plättchen wurden dann mit sterilem Silikonfett zu jeweils vier Stück pro Well in eine 48er-Well-Mikrotiterplatte unter sterilen Bedingungen eingeklebt.

Vorinkubation

Für die Vorinkubation wurden 0,5 ml α-MEM + 10% FCS-hi + 1% PS pro Well auf die Knochenplättchen aufgetragen und im Inkubator bei den beschriebenen Kulturbedingungen für mindestens zwei Stunden bebrütet.

Osteoblastenaussaat

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Osteoblasten wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort mit α-MEM + 10% FCS-hi + 1% PS auf eine Verdünnung von ca. 170000 Zellen / 1 ml (= 85000 Zellen / cm²) Medium gebracht.

Das Vorinkubationsmedium wurde nun abgesaugt und durch die Osteoblastensuspension ersetzt. Eine weitere Inkubationsphase folgte für mindestens drei Stunden, sodass sich die Osteoblasten an der Knochenoberfläche absetzen konnten.

Knochenmarkszugabe

Das für die Co-Kultur notwendige Knochenmark wurde aus dem Oberschenkelknochen von Mäusen gewonnen.

Zuerst wurde der Knochen vom Muskelgewebe befreit und am Ende mit dem Skalpell abgeschnitten, um anschließend das Knochenmark mit α -MEM + 10% FCS + 1% PS auszuspülen. Das isolierte Knochenmark wurde dann zusammen mit dem Kulturmedium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das aufgeschüttelte Pellet mit 4,8 ml Medium pro verwendetem Oberschenkelknochen resuspendiert.

0,4 ml der Knochenmarkssuspension wurden, nach vorsichtigem Absaugen des alten Mediums, pro Well in die Mikrotiterplatte einpipettiert.

0,1 ml Medium wurden mit 1×10^{-5} M 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ und 1×10^{-9} M PGE₂ versetzt und zur Stimulierung der Osteoblastendifferenzierung ebenfalls in jedes Well zugegeben.

Substanzzugabe

Die beiden zu testenden Substanzen wurden laut Schema in den jeweiligen Konzentrationen in die vorgesehenen Wells pipettiert. Die verwendeten Konzentrationen lagen bei 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M Beauvericin und Enniatin.

Zusätzlich zu den Wells mit den Testsubstanzen, wurden auch zwei Wells ausschließlich mit dem verwendeten Medium und zwei Wells mit Medium und Ethanol und Knochenplättchen eingerichtet. Die Kontrolle mit Ethanol ist notwendig, da die Testsubstanzen ebenfalls mit Ethanol verdünnt sind und so der Einfluss des Lösungsmittels in den Versuch miteinbezogen wird.

Nach der Substanzzugabe erfolgte eine erste Inkubation unter den Kulturbedingungen für 48 Stunden.

Medientausch

Um die Co-Kultur mit ausreichend Nährstoffen zu versorgen, wurde jeden zweiten Tag ein Mediumtausch vorgenommen.

Hierzu wurde das inkubierte Medium abgesaugt und durch frisches α -MEM + 10% FCS + 1% PS ersetzt. Weiters folgte wiederum die Zugabe von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ und PGE₂ und schließlich der Substanzen laut Schema.

Insgesamt wurde die Kultur zweimal einem Mediumtausch unterzogen, bis am sechsten Tag das Ende der Inkubation erreicht war.

Die genaue Beschreibung der Substanzzugabe ist bei den jeweiligen Versuchen angeführt.

3.3.5.3 Toluidinblaufärbung

Die Färbung der Knochenplättchen mit Toluidinblau ermöglicht das Erkennen der Knochenresorption unter dem Mikroskop und ist somit für die Auswertung und Berechnung wichtig.

Pro Konzentration, Behandlungsart und Substanz wird je eine Eprovette mit etwas 70% Isopropanol befüllt, um darin die Knochenplättchen für 15 Minuten im Ultraschallbad zu reinigen. Danach sollten die Plättchen frei von Zellen, Silikonfettresten und Medium sein.

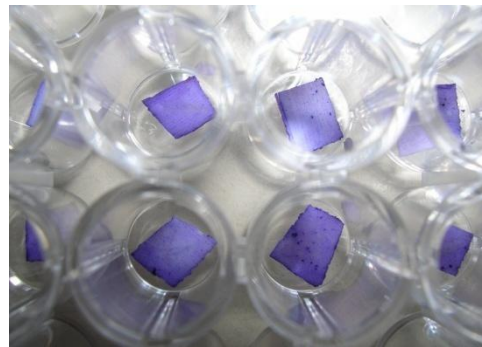


Abb. 23: Gefärbte Knochenplättchen

Die Färbung der Knochenplättchen erfolgt für vier Minuten am Schüttler. Danach wurden sie drei Mal im Wasserbad geschwemmt und getrocknet.

3.3.5.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem Olympus BX51 Mikroskop und der Imaging-Software Cell[^]F. Jedes Knochenplättchen wurde durch das Mikroskop und mit Color View^{III} Digitalkamera zwei Mal digitalisiert und mit dem Programm Cell[^]F zusammengefügt.

Danach erfolgte die Erkennung der Resorptionslakunen zuerst über ein Bildanalyse Software. Anschließend wurde nochmals händisch nachkorrigiert. Die gesamte Größe des fotografierten Knochenplättchens, sowie die Fläche des resorbierten Knochens wurden ermittelt.

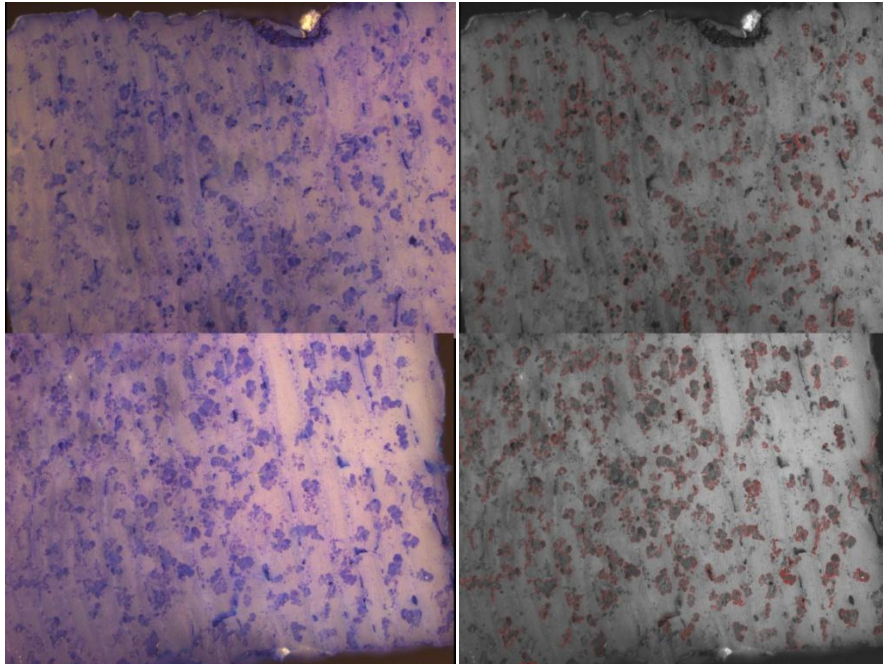


Abb. 24: Mit Toluidinblau gefärbtes Knochenplättchen vor und nach der Auswertung der Resorptionslakunen mit dem Programm Cell[^]F

Die ermittelten Daten wurden in eine Excel-Datei überführt, in der folgende Berechnungen durchgeführt wurden:

- Anzahl aller Pits jedes Knochenplättchens
- Summe der gesamten resorbierten Fläche
- durchschnittliche Pit-Größe
- Gesamte Resorption in Prozent
- Größe des Knochenplättchens

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Fisher LSD (last significant difference) Test über das Programm Stat View[®] II.

4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Optimierung der BEA-Biosynthese

4.1.1 Pilzwachstum

Schon nach den ersten Tagen war bei vielen Kolben ein leichtes *Fusarium*wachstum zu erkennen. Meist ging das Wachstum vom zugegeben Maiskorn aus und bildete sich von dort aus weiter.

Versuchsansatz *Fusarium* Nr. 183 und Maiskorn

Bebrütungs- dauer der Hefe (Tage)	Precursor- Konzentration in g/l	Lösung
1	0,0	Oberflächliches weißes Mycelwachstum
1	0,5	Leicht rötliche Färbung des Mycels
3	0,0	Weißlich-rötlich punktuelleres Mycelwachstum
3	0,5	Dichtes, weißes Mycel
6	0,0	Leichtes Mycelwachstum
6	0,5	Dichtes, weißlich-rötliches Mycel

Tab. 10 Pilzwachstum des Versuchsansatz *Fusarium* Nr. 183 und Maiskorn

Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 368 und Maiskorn

Bebrütungs- dauer der Hefe (Tage)	Precursor- Konzentration in g/l	Lösung
1	0,0	Kaum Mycelwachstum
1	0,5	Leichter Flaum an der Oberfläche
3	0,0	Dichtes, weißes Mycel
3	0,5	Geringes Oberflächenwachstum
6	0,0	Rötliche Mycelschicht
6	0,5	Deutliches Mycelwachstum

Tab. 11 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 368 und MaiskornVersuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 313 und Maiskorn

Bebrütungs- dauer der Hefe (Tage)	Precursor- Konzentration in g/l	Lösung
1	0,0	Punktuelles Mycelwachstum
1	0,5	Mycelwachstum in der Lösung
3	0,0	Rote Färbung der Lösung, gutes Oberflächen-Wachstum
3	0,5	Sehr dünnes weißes Mycel
6	0,0	Dichtes, weißlich-beiges Mycel
6	0,5	Weißliche Flecken an der Oberfläche

Tab. 12 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 313 und Maiskorn

Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 213 und Maiskorn

Bebrütungs- dauer der Hefe (Tage)	Precursor- Konzentration in g/l	Lösung
1	0,0	Kein Mycelwachstum
1	0,5	Rötlich-weißes, deutliches Mycelwachstum
3	0,0	Moderates Oberflächenwachstum
3	0,5	Rötlich-weißer, dünner Mycelflaum
6	0,0	Sehr leichtes weißes Mycel
6	0,5	Oberflächliches weißes Mycelwachstum

Tab. 13 Pilzwachstum des Versuchsansatz mit *Fusarium* Nr. 213 und Maiskorn

4.1.2 BEA-Konzentration

Die BEA-Ausbeute der Versuche lag zwischen 0,00 und 1,40 µg BEA/100ml Hefelösung.

Anhand der durchgeführten Studien konnte die Tendenz erkannt werden, dass eine Bebrütungsdauer der Hefe von 6 Tagen sich besser auf die BEA-Ausbeute auswirkt, als kürzere Bebrütungszeiten. Eine Ausnahme stellt *Fusarium* Nr. 183 dar, bei dem die besten Ergebnisse bei einer Bebrütungsdauer von 3 Tagen erzielt wurden.

Fusarium Nr. 183 lieferte die besten Ergebnisse bei einer Bebrütungsdauer von 3 Tagen und einer Precursor-Konzentration von 0,5 g/l. Die geringste Ausbeute wurde bei einem Tag Bebrütung und 0,0 g/l Precursoren-Konzentration erreicht.

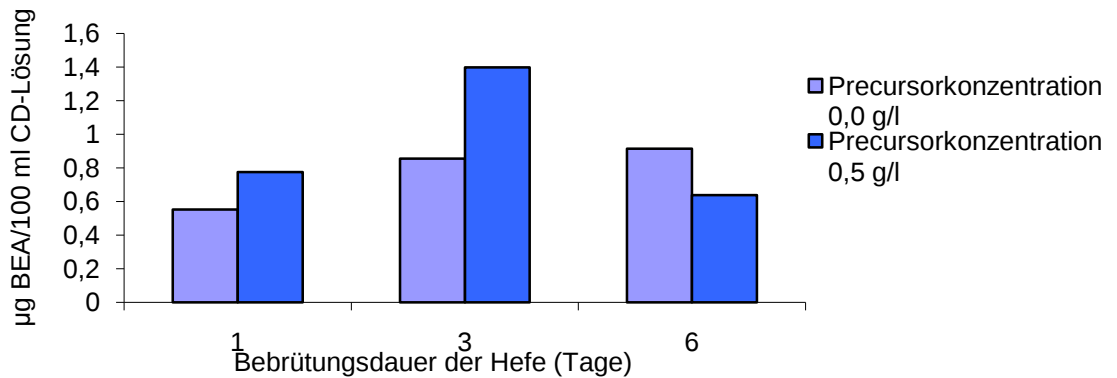


Abb. 23 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit *Fusarium* 183 und Maiskorn

Fusarium Nr. 368 erreichte die höchsten BEA-Werte bei 6 Tagen Hefebebrütung und einer Aminosäure-Konzentration von 0,0 g/l. Eine eintägige Bebrütung der Hefe mit einer Precursoren-Konzentration von 0,5 g/l wirkte sich am schlechtesten aus.

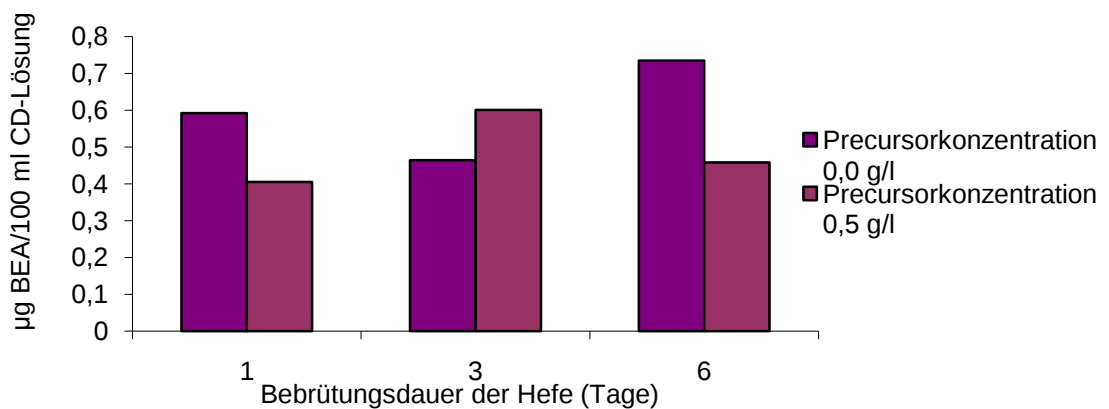


Abb. 24 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit *Fusarium* 368 und Maiskorn

Fusarium Nr. 313 kam bei 0,5 g/l Precursoren und 6 Tagen Hefebebrütung auf das höchste und bei einem Tag Hefebebrütung und 0,0 g/l Precursoren auf das schlechteste Ergebnis.

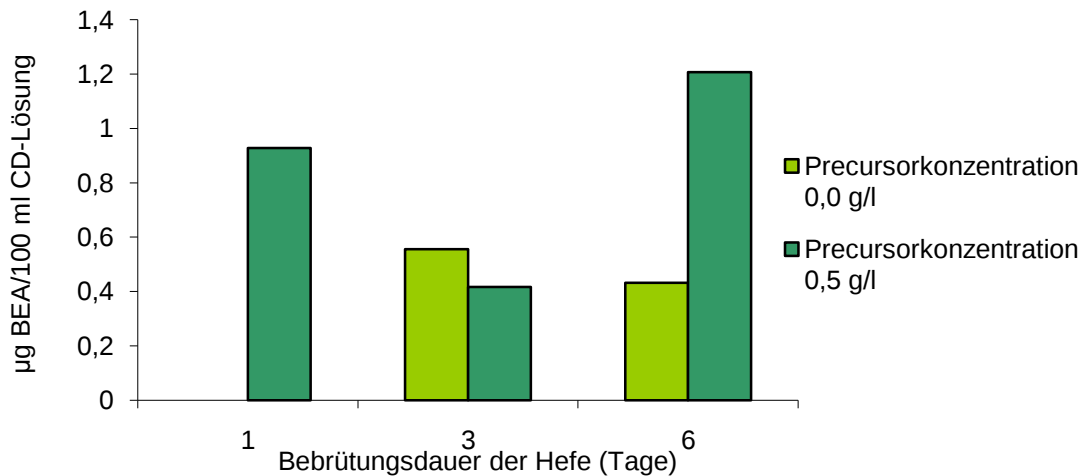


Abb. 25 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit *Fusarium* 313 und Maiskorn

Fusarium Nr. 213 erzielte bei der längsten Bebrütungsdauer und ohne Zusatz von Precursoren die meiste BEA-Ausbeute. Beim geringsten Hefewachstum und ebenfalls bei fehlenden Precursoren wurde die wenigste Ausbeute gemessen.

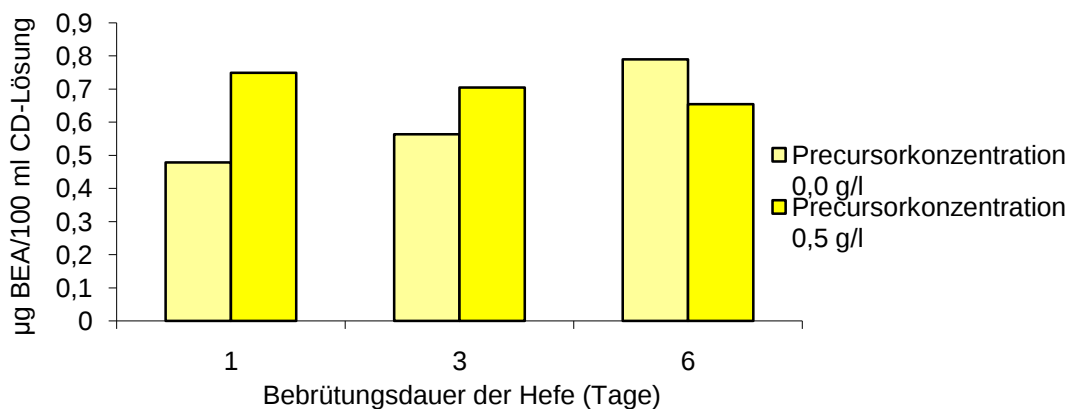


Abb. 26 BEA-Konzentrationen der Hefeproben mit *Fusarium* 213 und Maiskorn

Die höchste BEA-Ausbeute wurde mit 1,4 µg BEA/100ml Hefelösung bei *Fusarium* Nr. 183 (3 Tage, 0,5 g/l AS-Konz.) erreicht. Gefolgt wird diese von *Fusarium* Nr. 313, der bei 6 Tagen und 0,5 g/l AS-Konzentration 1,21 µg BEA/100ml Hefelösung und bei einem Tag und 0,5 g/l AS-Konzentration 0,93 µg BEA/100ml Hefelösung produzierte.

Die höchsten Mengen wurden also immer in Anwesenheit von Precursoren erreicht wie in den folgenden Diagrammen zu erkennen ist.

<i>Fusarium</i> Nr.	Bebrütungsdauer der Hefe (Tage)	AS-Konz (g/l)	BEA Konz µg/100ml Hefe-Lösung
183	1	0	0,55
		0,5	0,77
368	1	0	0,59
		0,5	0,41
213	1	0	0,48
		0,5	0,75
313	1	0	0,00
		0,5	0,93

Tab. 14 BEA-Konzentration der *Fusarien*arten nach einer Hefebebrütungsdauer von einem Tag

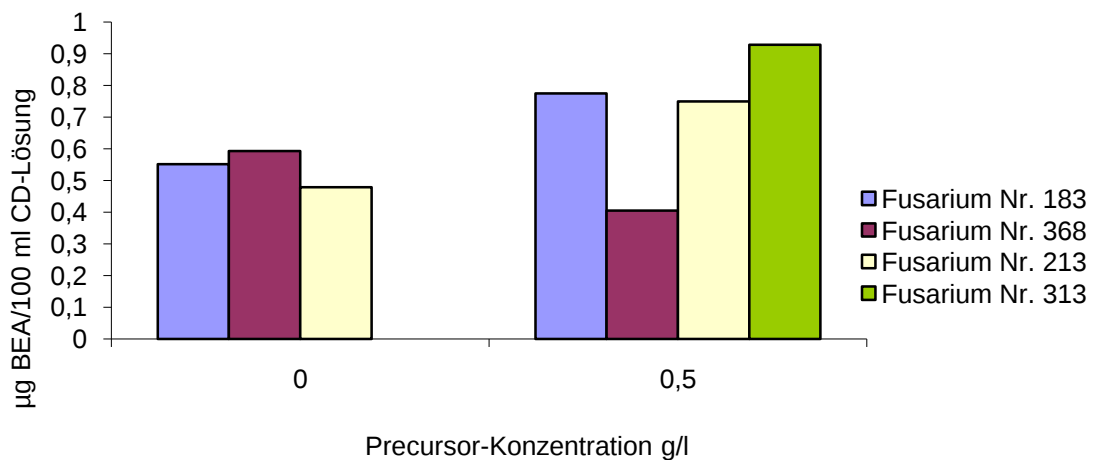


Abb. 27 BEA-Konzentrationen der verschiedenen *Fusarien*arten bei einer Hefebebrütungsdauer von einem Tag

<i>Fusarium</i> Nr.	Bebrütungsdauer der Hefe (Tage)	AS-Konz (g/l)	BEA Konz µg/100ml Hefe-Lösung
183	3	0	0,86
		5	1,40
368	3	0	0,46
		0,5	0,60
213	3	0	0,56
		0,5	0,70
313	3	0	0,56
		0,5	0,42

Tab. 15 BEA-Konzentration der *Fusarien*arten nach einer Hefebefrütungsdauer von drei Tagen

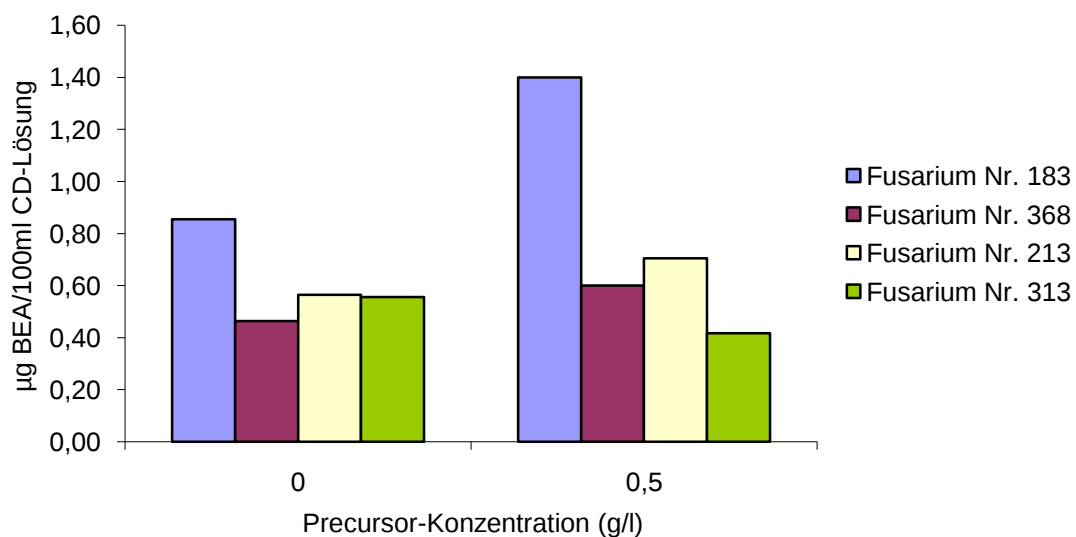


Abb. 28 BEA-Konzentrationen der verschiedenen *Fusarien*arten bei einer Hefebefrütungsdauer von drei Tagen

<i>Fusarium</i> Nr.	Bebrütungsdauer der Hefe (Tage)	AS-Konz (g/l)	BEA Konz µg/100ml Hefe-Lösung
183	6	0	0,91
		0,5	0,64
368	6	0	0,73
		0,5	0,46
213	6	0	0,79
		0,5	0,65
313	6	0	0,43
		0,5	1,21

Tab. 16 BEA-Konzentration der *Fusarien*arten nach einer Hefebebrütungsdauer von sechs Tagen

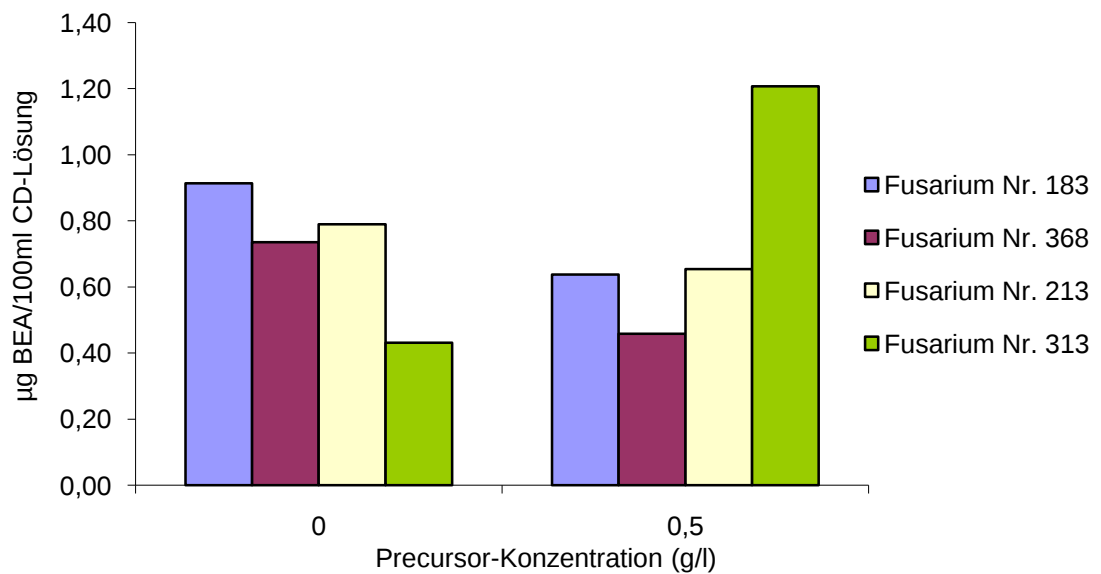


Abb. 29 BEA-Konzentrationen der verschiedenen *Fusarien*arten bei einer Hefebebrütungsdauer von sechs Tagen

4.2 Wirkung von BEA und Enniatin auf Osteoklasten

4.2.1 Untersuchung der dosisabhängigen Wirkung von BEA und Enniatin auf die Knochenresorption

In diesem Versuch wurde die Wirkung von BEA und Enniatin auf die Knochenresorption getestet.

Die Konzentrationen für beide Substanzen lagen bei 10 μM , 1 μM und 0,1 μM . Die Einwirkdauer der Toxine war für alle Substanzklassen gleich. Das Experiment wurde am Tag 0 gestartet und endete nach einer Bebrütungsphase, die nur durch zweimaligen Medientausch unterbrochen wurde, am Tag 6.

Zwischen Kontrolle und Ethanol-Kontrolle konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Sowohl BEA als auch Enniatin zeigten inhibitorische Effekte. Bei beiden Substanzen bewirkte die Konzentration von 10 μM einen starken Abfall der Knochenresorption.

Weiters war eine Steigerung der Resorption bei schwächer werdenden Konzentrationen zu erkennen.

Zwischen BEA 10 μM und BEA 0,1 μM lag eine signifikante Steigerung der Knochenresorption von $p < 0,05$ vor. Im Vergleich dazu, lag die Signifikanz bei Enniatin 10 μM und 0,1 μM bei $p < 0,001$. Enniatin zeigte auch einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen 1 μM und 0,1 μM .

Die Konzentration von 10 μM verhinderte bei beiden Toxinen fast vollständig die Knochenresorption. Die Resorption wurde hier bei Enniatin gegenüber der Kontrollgruppe um 100 %, bei BEA um 97,1% gehemmt. Die Konzentration 0,1 μM zeigte hingegen weder bei BEA noch bei Enniatin signifikant inhibitorische Effekte.

	% Resorption	SEM
Kontrolle	1,62	±0,491
EtOH	1,36	±0,334
BEA 10µM	0,047	±0,024
BEA 1µM	0,245	±0,145
BEA 0,1µM	1,361	±0,577
ENN 10µM	0	±0
ENN 1µM	0,57	±0,249
ENN 0,1µM	2,191	±0,856

Tab. 17 Knochenresorption der unterschiedlichen Konzentrationen von BEA und Enniatin

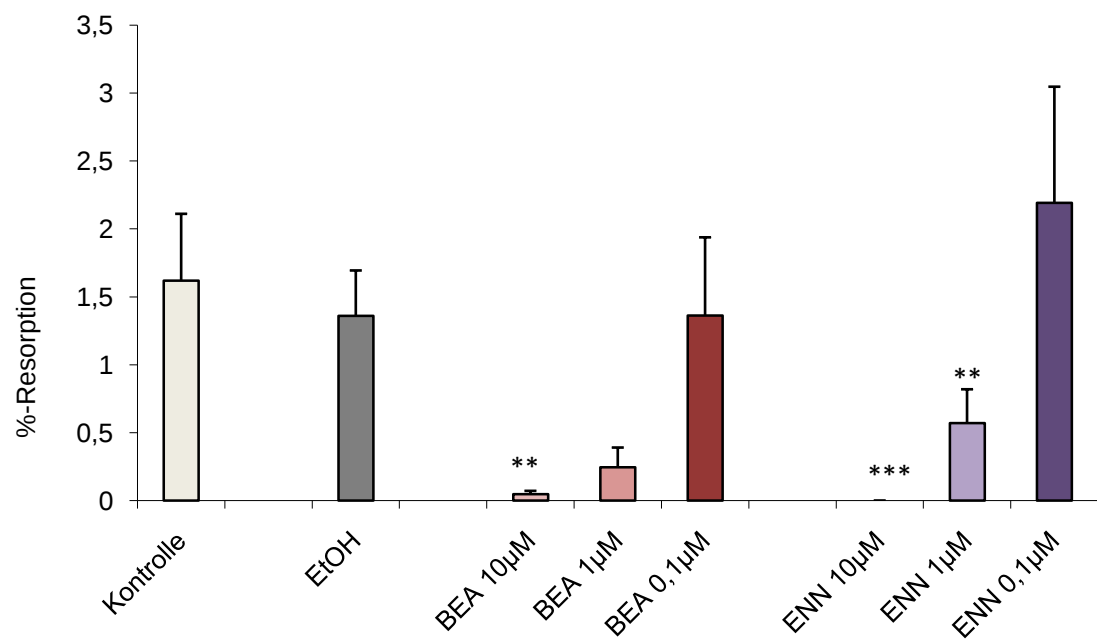


Abb. 32 Knochenresorption der unterschiedlichen Konzentrationen von BEA und Enniatin

*** (p<0,001)

** (p<0,05)

4.2.2 Austestung der Recovery von Osteoklasten nach einer Behandlung mit Beauvericin und Enniatin

Im folgenden Versuch wurden für Beauvericin und Enniatin die Konzentrationen 1 μ M und 0,1 μ M verwendet.

Die Einwirkdauer der Toxine auf die Knochenzellen wurde in drei Gruppen eingeteilt:

1. Gruppe A: Einwirkdauer von 0-48 Stunden
2. Gruppe B: Einwirkdauer von 0-96 Stunden
3. Gruppe C: Einwirkdauer von 0-144 Stunden

Die erste Substanzzugabe erfolgte für alle drei Gruppen am Tag 0.

Gruppe A wurde im Zuge des Mediumtausches nach 0-48 Stunden nicht mehr mit dem Toxin belastet, und bis zum Ende der Versuchsreihe nur mit Nährmedium versorgt.

Gruppe B wurde einer Toxinbelastung von 0-96 Stunden ausgesetzt und die verbleibende Zeit ebenfalls nur mit Nährmedium versetzt.

Bei Gruppe C wurde bei jedem Mediumwechsel die vorgeschriebene Toxinkonzentration zusätzlich zum Nährmedium zugesetzt.

Kontrolle und Ethanol-Kontrolle zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich ihrer Resorption.

Sowohl Enniatin, also auch BEA zeigten bei einer Konzentration von 1 μ M in allen Gruppe eine signifikante Hemmung von $p < 0,01$ gegenüber der Kontrolle. 0,1 μ M konnte praktisch keinen inhibitorischen Effekt aufweisen. Die Werte lagen alle im Bereich der Kontrollgruppe.

4.2.2.1 Vergleich der Wirkung bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μM und 1 μM

Im Vergleich zu Gruppe A (48 h) war die Knochenresorption in Gruppe B (96 h) um 51,4 %, in Gruppe C (144 h) um 57,4 % verringert.

Der Unterschied zwischen Gruppe B und C lag bei 12,3 %. Durch die 6-tägige Bebrütung (Gruppe C) wurde somit die stärkste Hemmung erzielt. BEA zeigte bei einer Konzentration von 1 μM in allen 3 Gruppen eine starke signifikante Hemmung ($p < 0,001$) der Resorption verglichen mit der Kontrollgruppe.

Zwischen den einzelnen Gruppen liegt keine lineare Resorptionsverringern vor.

Gruppe	Treatment	%-Resorption	SEM
	Kontrolle	11,551	$\pm 2,081$
	EtOH-Kontrolle	8,769	$\pm 2,056$
Gruppe A 0-48 Stunden	BEA 1 μM	2,989	$\pm 0,716$
	BEA 0,1 μM	7,281	$\pm 2,251$
Gruppe B 0-96 Stunden	BEA 1 μM	1,452	$\pm 0,685$
	BEA 0,1 μM	9,856	$\pm 1,717$
Gruppe C 0-144 Stunden	BEA 1 μM	1,274	$\pm 0,417$
	BEA 0,1 μM	11,129	$\pm 2,674$

Tab. 18 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μM und 1 μM

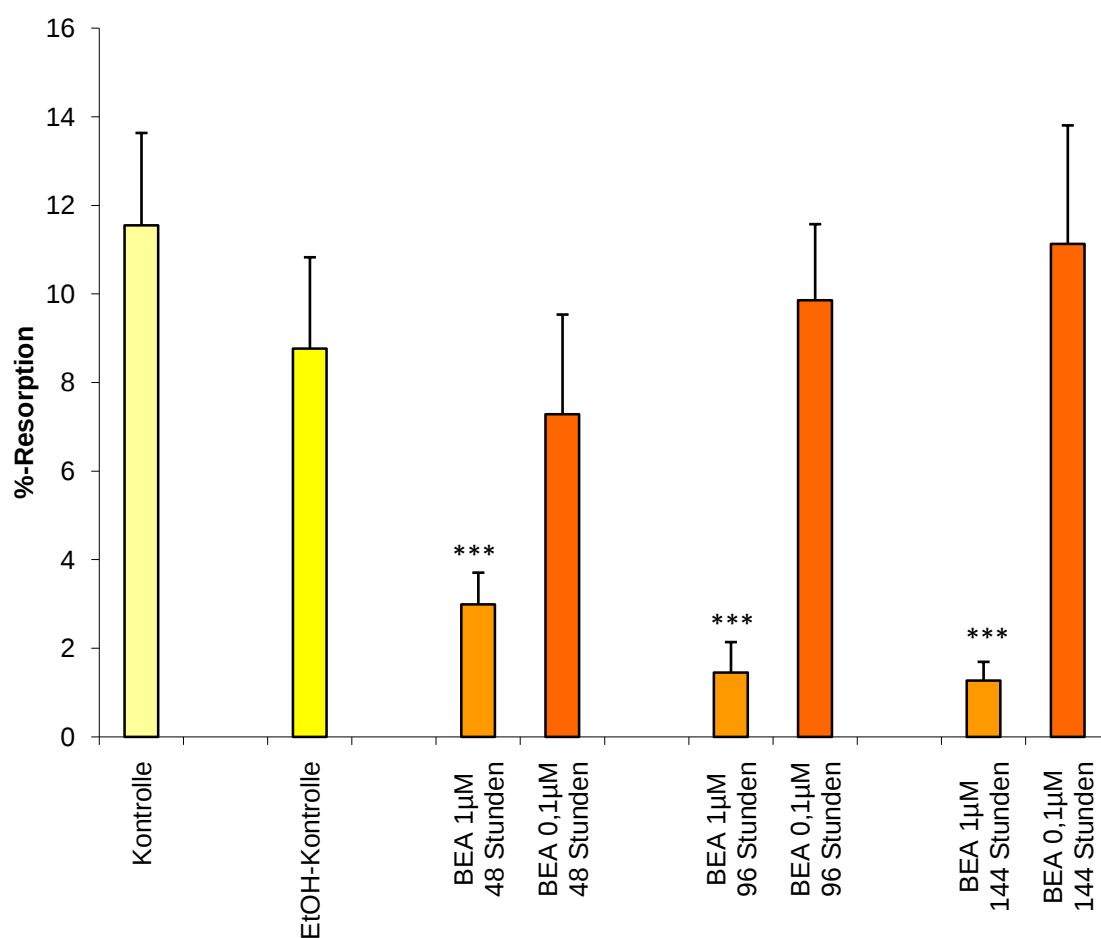


Abb. 33 Knochenerosion bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 µM und 1 µM

*** ($p < 0,001$)

4.2.2.2 Vergleich der Wirkung bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von ENN bei einer Konzentration von 0,1 μM 1 μM

Die Gegenüberstellung von Gruppe A und Gruppe B zeigt eine geringfügige Verringerung der Knochenresorption um 1,1 %.

In Gruppe B haben die Osteoklasten um 18 % weniger Knochen resorbiert, als in der Vergleichsgruppe C.

Zwischen den Gruppe B und C ergab sich eine Resorptionsverringerung um 17 %. Enniatin zeigte bei einer Konzentration von 1 μM in allen 3 Gruppen eine starke signifikante Hemmung ($p < 0,001$) der Resorption verglichen mit der Kontrollgruppe. Auch hier liegt keine lineare Resorptionsverringerung in Bezug auf die Bebrütungsdauer vor.

Gruppe	Treatment	%-Resorption	SEM
Gruppe A 0-48 Stunden	Kontrolle	11,551	$\pm 2,081$
	EtOH-Kontrolle	8,769	$\pm 2,056$
	ENN 1 μM	2,682	$\pm 0,863$
	ENN 0,1 μM	8,156	$\pm 1,79$
	ENN 1 μM	2,654	$\pm 1,172$
	ENN 0,1 μM	9,153	$\pm 2,597$
Gruppe C 0-144 Stunden	ENN 1 μM	2,197	$\pm 0,825$
	ENN 0,1 μM	10,62	$\pm 1,897$

Tab. 19 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von BEA bei einer Konzentration von 0,1 μM und 1 μM

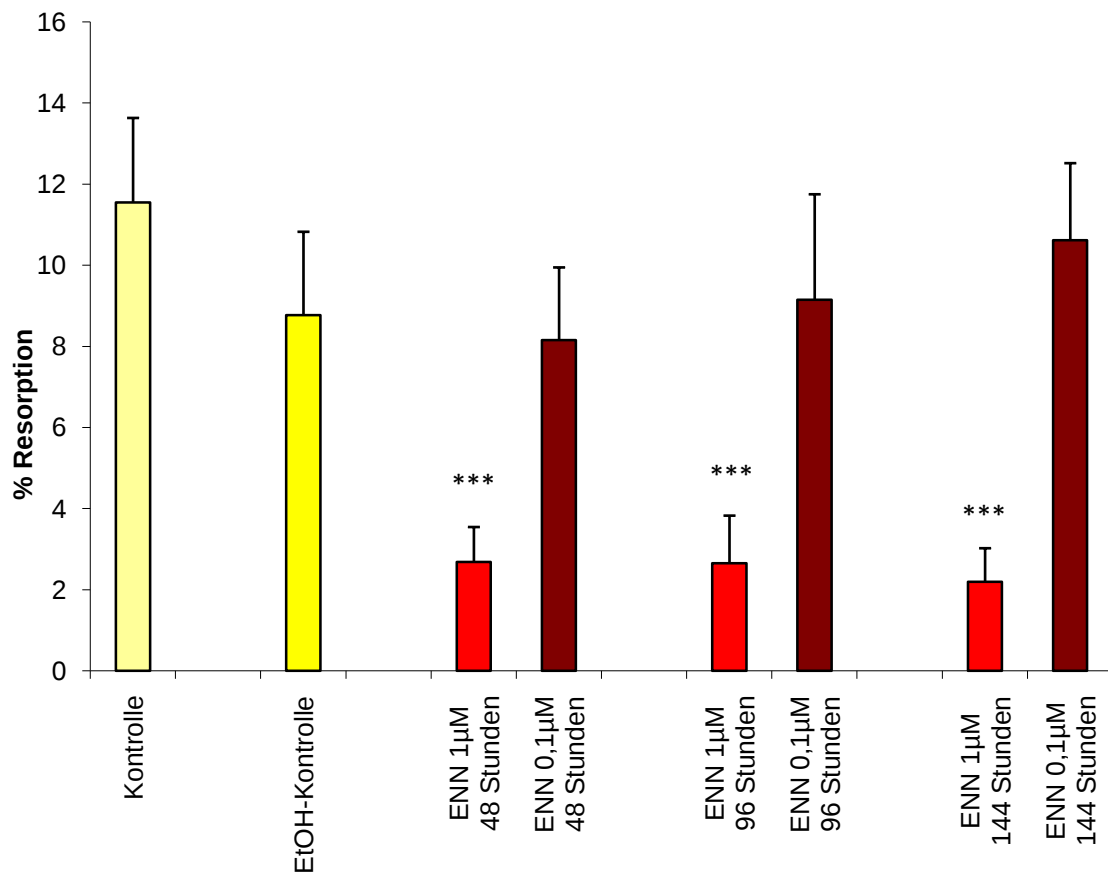


Abb. 34 Knochenresorption bei verschiedenen Einwirkzeiten (Gruppen A, B und C) von ENN bei einer Konzentration von 0,1 µM und 1 µM

*** ($p < 0,001$)

Aufgrund der durchgeführten Versuche bezüglich der Biosynthese von Beauvericin ist deutlich zu erkennen, dass das gewählte Nährmedium, CD-Lösung mit einem Hefezusatz, nicht optimal ist. Die Ergebnisse vorangegangener Arbeiten konnten in keinem Fall erreicht werden. Prinzipiell ist zu sagen, dass sich die BEA-Produktion auf synthetischen Nährmedien als schwierig erweist.

Die maximale Ausbeute von BEA lag bei 1,4 µg/100 ml CD-Hefelösung und wurde mit *Fusarium* Nr. 183 erzielt. In vorangegangenen Arbeiten lag die höchste BEA-Produktion jedoch bei 16 µg /100 ml Lösung bei einer vorangegangenen Beimpfung der CD-Lösung mit Hefestämmen. Die verwendeten *Fusarien* Nr. 213, Nr. 313, Nr. 183 und Nr. 368 dürften sich nicht optimal als BEA-Produzenten unter Laborbedingungen eignen.

In jedem Fall war deutlich zu erkennen, dass das Mycelwachstum nicht in Zusammenhang mit der BEA-Produktion steht.

Die Anwesenheit von Precursoren scheint einen leicht positiven Effekt auf die Biosynthese von BEA auszuüben, da die höchsten Ergebnisse bei einer Precursor-Konzentration von 0,5 g/l erzielt wurden.

Frühere Versuche zeigten, dass das beste Nährmedium für die BEA-Produktion Mais darstellt. Der Übergang von natürlichem auf künstlichen Nährboden stellte sich als schwierig heraus.

Die Versuche hinsichtlich der Wirkung von BEA und Enniatin auf Osteoklasten zeigten einen deutlichen, dosisabhängigen inhibitorischen Effekt. (Abb. 31)

BEA scheint eine stärkere Wirkung auf Osteoklasten zu haben als Enniatin.

Frühere Versuche mit BEA und Enniatin zeigen, dass beide Substanzen dosisabhängig inhibierend auf die Osteoklastenaktivität wirken könnten und so die Anzahl der Osteoklasten reduziert werden. Weiteres wird berichtet, dass BEA und Enniatin morphologische Veränderungen am Aktinring der Osteoklasten hervorrufen (Forsdahl 2005). Ein funktionierender Aktinring ist für die Knochenresorption unabdinglich, da dieser notwendig ist, um den Osteoklasten an die Knochenoberfläche zu binden. So könnten die

inhibitorischen Effekte einerseits auf die verringerte Anzahl von Osteoklasten und andererseits auf die Beeinflussung des Aktinrings zurückgeführt werden.

Eine Beeinflussung des Aktinrings der Osteoklasten zeigt auch das strukturverwandte Destruxin (Nakagawa et al. 2003). Die morphologischen Veränderungen zeigen sich hier auch in der „clear zone“ und an der „ruffled border“.

Im Gegensatz zu BEA und Enniatin, inhibiert Destruxin die Knochenresorption, ohne bei der wirksamen Konzentration die Lebensfähigkeit der Zellen und die Osteoklastogenese zu beeinträchtigen. Weiters zeigte sich, dass die morphologischen Veränderungen, sowie die verminderte Knochenresorption unter Einfluss von Destruxin, reversibel sind (Nakagawa et al. 2003).

Eine komplette Regenerierung der Knochenzellen ist bezüglich BEA und Enniatin vermutlich nicht möglich, da diese eventuell toxische Wirkung auf Osteoklasten haben. In Abb.32 ist jedoch zu erkennen, dass die Knochenresorption bei BEA, mit einer Konzentration von 1 μM , mit längeren Bebrütungszeiten abnimmt. Die Toxinbehandlung schon am Beginn des Experiments könnte einen hemmenden Effekt auf die Differenzierung der Osteoklasten-Vorstufen haben, was die Zahl der Osteoklasten an sich verringern würde. In weiterer Folge wirken die Toxine vermutlich als Hemmstoff. Weitere Experimente sind von Nöten, um herauszufinden, ob die Hemmung der Osteoklasten nach Behandlung mit BEA und Enniatin reversibel ist.

5. SCHLUSSBETRACHTUNG

Die Biosynthese von BEA unter Laborbedingungen stellte sich als sehr schwierig heraus. Die produzierten BEA-Konzentrationen liegen in keinem der durchgeführten Probenansätze im wünschenswerten Bereich. Die besten Ergebnisse wurden mit *Fusarium* Nr. 183, einer Hefebebrütungsdauer von 3 Tagen und einer Prekursorenkonzentration von 0,5 g/l erreicht. Die Ausbeute bei diesem Versuchsansatz lag jedoch mit 1,4 µg/100 ml CD-Hefelösung weit unter schon zuvor erreichten Ergebnissen und weit unter einer wünschenswerten BEA-Produktionsmenge.

Die im Durchschnitt schlechteste Ausbeute von BEA erzielte *Fusarium* Nr. 368. Hier lag der Mittelwert der BEA-Konzentration in den Proben bei 0,54 µg/100 ml CD-Hefelösung.

Generell ist zu sagen, dass die Auswahl der *Fusarien*stämme nicht optimal war, da alle verwendeten Pilzgattungen sehr geringe BEA-Ausbeute lieferten.

Die Versuche mit einer Hefewachstumszeit von 3 und 6 Tagen lieferten bessere Ergebnisse als jene mit einer Hefewachstumszeit von 1 Tag.

Weiters zeigte sich die Tendenz, dass sich eine Prekursorenkonzentration von 0,5 g/l besser auf die BEA-Synthese auswirkt, als der vollkommene Verzicht auf die Zugabe von Vorstufen.

Die erreichten Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die Biosynthese von BEA auf synthetischen Nährmedien noch vieler weiteren Versuche bedarf, bis eine gewünschte Produktionsmenge an BEA erreicht werden wird.

Zum einen muss ein geeigneter *Fusarium*stamm gefunden werden, der auch unter Laborbedingungen und auf synthetischem Nährmedium eine gute Ausbeute an BEA zeigt, zum anderen müssen die Versuchsbedingungen optimiert werden.

Unter Austestung anderer *Fusarium*arten wäre es eventuell sinnvoll die Hefeansätze zwischen 3 und 6 Tagen reifen zu lassen und die Prekursorenkonzentration geringfügig anzuheben.

Die Wirkung von BEA und Enniatin auf Osteoklasten wurde in verschiedenen Konzentrationen getestet. Sowohl Beauvericin also auch Enniatin zeigten in der Co-Kultur dosisabhängige inhibitorische Effekte. Die Konzentration 0,1 μM zeigte sich bei beiden Toxinen als zu schwache Dosierung um eine Wirkung auf die Osteoklasten auszuüben. Bei einer Konzentration von 10 μM wurde die Knochenresorption durch BEA und Enniatin fast vollständig gehemmt. Eine Konzentration von 1 μM BEA und Enniatin hatte eine Hemmung der Knochenresorption zur Folge, unterdrückte diese jedoch nicht vollkommen.

Generell hat sich gezeigt, dass BEA ein höheres inhibitorisches Potential aufweist, als Enniatin und dass beide Substanzen die Fähigkeit besitzen, die Knochenresorption zu vermindern.

Die Frage nach der Reversibilität der Wirkung von BEA und Enniatin scheint nicht vollständig geklärt zu sein. Bei einer Konzentration von 0,1 μM konnte keine signifikante Knochenresorption festgestellt werden. Die Versuche mit einer Konzentration von 1 μM BEA bzw. Enniatin zeigten, vor allem bei BEA, die Tendenz, dass sich die Osteoklasten nach einer kurzen Einwirkdauer des Toxins von 48 Stunden langsam wieder erholen und die Knochenresorption dadurch, im Vergleich zu längeren Belastungszeiten (96 Stunden/144 Stunden), wieder vermehrt stattfindet.

Weitere Versuche sind notwendig um die Frage nach der Regenerierung der Osteoklasten nach der Belastung mit BEA und Enniatin zu klären.

Bei einem neuen Versuchsansatz sollte bei beiden Toxinen mit Konzentrationen rund um 1 μM gearbeitet werden, da diese Konzentration in den durchgeführten Versuchen die besten Vergleichswerte bezüglich der Knochenresorption lieferte. Eine Konzentration von 10 μM führte zu einer so starken Hemmung, dass die Knochenresorption fast vollständig unterdrückt wurde. Eine Konzentration von 0,1 μM hingegen wirkte sich bei beiden Toxinen, verglichen mit der Kontrollgruppe, fast gar nicht auf die Knochenresorption aus. Die

Konzentration von 1 μM BEA bzw. ENN könnte eventuell leicht angehoben werden. Weiters sollten weitere Versuche in Hinblick auf die Reversibilität der Wirkung durchgeführt werden, um deren Mechanismus vollständig zu klären.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Biosynthese von Beauvericin wurden CD-Lösungen mit Hefekulturen beimpft und nach Zugabe eines Maiskorns mit den *Fusarium*-stämmen *Fusarium subglutinans* Nr. 213 und Nr. 368, *Fusarium acuminatum* Nr. 313 und *Fusarium proliferatum* Nr. 183 inokuliert. Ein Teil der Proben wurden mit einer Precursorlösung von L-Methionin, L-Phenylalanin und D- α -Hydroxyisovaleriansäure mit einer Konzentration von 0,5 g Precursor/l Aqua dest. versetzt, während der andere Teil der Proben ohne Vorstufen ausgetestet wurde. Nach zweimaligem Autoklavieren (20 min 121°C) erfolgte die Zugabe der Hefekulturen (5 g Hefe/ l Wasser), die für 1, 3 bzw. 6 Tage im Trockenschrank bei 35°C bebrütet und anschließend wieder 2-mal autoklaviert wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe des *Fusarium*-inokulums. Die Konidienkonzentrationen lagen zwischen $2,7 \times 10^7$ und $3,4 \times 10^7$ pro ml Wasser. Die inokulierten Proben wurden eine Woche bei 28°C und anschließend zwei Wochen bei 20°C im Trockenschrank bei diffusem Licht bebrütet. Nach Aufarbeitung der Proben durch Ausschüttelung mit CH₂Cl₂, MykoSep-Reinigung und Kieselgelreinigung erfolgte die Messung der BEA-Konzentration mittels HPLC.

Die BEA-Ausbeute der Versuche lag zwischen 0,0 und 1,40 µg BEA/100ml Hefelösung. Die höchste Ausbeute wurde mit *Fusarium* Nr. 183 bei dreitägiger Hefebebrütungsdauer und einer Precursorkonzentration von 0,5 g/l erreicht.

Für die Versuche zur Wirkung von BEA und Enniatin auf Osteoklasten wurde einerseits die dosisabhängige Wirkung von BEA und Enniatin auf die Knochenresorption und andererseits die Austestung der Recovery von Osteoklasten nach einer Belastung mit BEA und Enniatin untersucht. Es wurden Osteoblasten-Knochenmark-Co-Kulturen verwendet. Hierfür wurden zugeschnittene Rinderknochen mit α -MEM + 10 % FCS-hi + 1 % PS vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Osteoblastenaussaat, die

Knochenmarkszugabe sowie die Zugabe von 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ und PGE₂. Die Zugabe von Beauvericin und Enniatin erfolgte in den Konzentrationen 0,1 µM, 1 µM und 10 µM. Die Einwirkzeiten der Toxine lagen bei der Austestung der Recovery zwischen 48 und 144 Stunden, bei den Untersuchungen zur dosisabhängigen Wirkung einheitlich bei 144 Stunden. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% O₂ und 90% Luftfeuchtigkeit und wurde durch zweimaligen Medientausch unterbrochen. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Knochenplättchen mit Toluidinblau gefärbt und mit Olympus/Cell[^]F bezüglich der Knochenresorption ausgewertet. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Fisher LSD Test über das Programm Stat View[®]II.

Die Versuchsergebnisse zeigen einen deutlichen, dosisabhängigen inhibitorischen Effekt, wobei BEA eine stärkere Wirkung auf Osteoklasten zu haben scheint, als Enniatin. Die Recovery der Osteoklasten nach einer Toxinbehandlung mit Beauvericin und Enniatin scheint nicht vollständig möglich zu sein. Es ergaben sich jedoch Hinweise darauf, dass die Hemmung der Osteoklasten nach Behandlung mit den beiden Toxinen eventuell reversibel sein könnte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- BARON R. General Principles of Bone Biology In: Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorders of Mineral Metabolism. (Favus M.J., Hrsg). Lippincott-Raven, Philadelphia, 2003; 1-8.
- BARTL, R. Osteoporose Manual, (Springer Wien), Springer Verlag 2004; 5-22
- BHATNAGAR D, PROCTOR R, PAYNE G. A, WILKINSON J, YU J, CLEVELAND T. E, NIERMAN W. C. The mycotocin factbook, food & feed topic (Barug, D. Hrsg.). Wageningen Academic Publishers, Niederlande, 2006; 167.
- BOTTALICO A. PERRONE G. Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. European Journal of Plant Pathology 2002 108; 611-624.
- CHEN B, TSAI M, JOW G. Induction of calcium influx from extracellular fluid by beauvericin in human leukemia cells. Biochem Biophys Res Commun 2006; 340(1): 134-9
- DORNETSHUBER R, JEFFETER P, KAMYAR M, PETERBAUER T, BERGER W, LEMMENS-GRUBER R. Enniatin exerts p53-dependent cytostatic and p53-independent cytotoxic activities against human cancer cells. Chem Res Toxicol 2007; 20(3): 465-73
- ENGELHARDT D. G. Mykotoxine - Giftige Stoffwechselprodukte von Schimmelpilzen. Retrieved 31.3.2008, 2008, from <http://www.mykotoxin.de/Dokumente/wasistes.pdf>.
- FOHRSDAHL S. Effects of cyclodepsipeptide mycotoxins on osteoclasts in vitro. Diplomarbeit, Universität Wien 2005
- GUPTA S, KRASNOFF S. B, UNDERWOOD N. L, RENWICK J. A, ROBERTS D. W. Isolation of beauvericin as an insect toxin from *Fusarium semitectum* and *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*. Mycopathologia 1991; 115: 185-189

- HAMILL R. L., HIGGINS C. E., BOAZ H. E., GORMAN M. The structure of beauvericin: a new depsipeptide antibiotic toxic to *Artemia salina*. Tetrahedron Lett. 1969; 49: 4255-4258
- HIRAGA K, YAMAMOTO S, FUKUDA H, HAMANAKA N. Enniatin has a new function as an inhibitor of Pdr5p, one of the ABC transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun 2005; 328(4): 1119-25
- IVANOVA L, SKJERVE E, ERIKSEN G. S., UHLIG S. Cytotoxicity of enniatins A, A1, B, B1, B2 and B3 from *Fusarium avenaceum*. Toxicon 2006; 47(8): 868-76
- JESCHKE P, HARDER A, ETZEL W, SCHINDLER M, THIELKING G. Synthesis and anthelmintic activity of cyclohexadepsipeptides with cyclohexylmethyl side chains. Bioorg Med Chem Lett 2007 17(13): 3690-5
- JOSEPHS R. D, KRSKA R, SCHUMACHER R, GRASSENBAUER M. A rapid method for the determination of the *Fusarium* mycotoxin beauvericin in maize. Fresenius J Anal Chem 1999; (363): 2567-2568
- JOW G. M., CHOU C. J., CHEN B. F., TSAI J. H. Beauvericin induces cytotoxic human acute lymphoblastic leukemia cells through cytochrome c release, caspase 3 activation: the causative role of calcium. Cancer Lett 2004; 216: 165-73
- KOURI K, LEMMENS M, LEMMENS-GRUBER R. Beauvericin induced channels in ventricular myocytes and artificial membranes. BBA-Biomembranes, 2003; 1609: 203-210
- KOURI K, DUCHEN M.R., LEMMENS-GRUBER R. Effects of beauvericin on the metabolic state and ionic homeostasis of ventricular myocytes of the guinea pig. Chem Res Toxicol 2005; 18: 1661-1668
- KRSKA R, MOLINELLI A. Mycotoxin analysis: state-of-the-art and future trends." Anal Bioanal Chem 2007; 387(1): 145-8

- KRSKA R, SCHUHMACHER R, GRASSENBAUER M, LEMMENS M, LEMMENS-GRUBER R, ADLER A, LEW H Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium subglutinans*. Mycotoxin Research 1997; 13: 11-16
- LEMMENS-GRUBER R, RACHOY B, STEININGER E, KOURI K, SALEH P, KRSKA R, JOSEPHS R, LEMMENS M. The effect of the *Fusarium* metabolite beauvericin on electromechanical and -physiological properties in isolated smooth and heart muscle preparations of guinea pigs. Mycopathologia 2000; 149(1): 5-12
- LEVY D, BLUZAT A, SEIGNEURET M, RIGAUD J. Alkali cation transport through liposomes by the antimicrobial fusafungine and its constitutive enniatins. Biochem Pharmacol 1995; 50(12): 2105-7
- LOGRIECO A, MORETTI A, CASTELLA G, KOSTECKI M, GOLINSKI P, RITIENI A, CHELKOWSKI J. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. Applied and Environmental Microbiology 1998; 3084-3088
- MARKS SC., ODGREN PR. Structure and Development of the Skeleton. In: Principles of Bone Biology, 2nd ed. (Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA, Hrsg), Academic Press, San Diego, 2002; 3-15.
- MORETTI A, LOGRIECO A, Mycotoxin Research 10 1994; 73-78
- MUNKVOLD G, STAHR H, LOGRIECO A, MORETTI A, RITIENI A. Occurrence of Fusaproliferin and Beauvericin in *Fusarium*-Contaminated Livestock Feed in Iowa. Appl Environ Microbiol. 1998, 64(10): 3923-3926
- NAKAGAWA H, TAKAMI M, UDAGAWA N, SAWAE Y, SUDA K, SASAKI T, TAKAHASHI N, WACHI M, NAGAI K, WOO J.T. Destruixins, cyclodepsipeptides, block the formation of actin rings and prominent clear zones and ruffled borders in osteoclasts. Bone 2003; 33(3): 443-55
- NAKAJYO S, MATSUOKA K, KIT AYAMA T, YAMAMURA Y, SHIMIZU K, KIMURA M, UR AKAWA N. Inhibitory effect of beauvericin on a high K+-induced tonic contraction in guinea-pig taenia coli. Jpn J Pharmacol 1987; 45(3): 317-25

- NAMATAME I, TOMODA H, ISHIBASHI S, OMURA S. Antiatherogenic activity of fungal beauveriolides, inhibitors of lipid droplet accumulation in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(3): 737-42
- OHSHIRO T, RUDEL L.L, OMURA S, TOMODA H. Selectivity of Microbial Acyl-CoA: cholesterol Acyltransferase Inhibitors toward Isozymes. *Japan Antibiotics Research* 2007; 60(1): 43-51
- OVCHINNIKOV Y.A, IVANOV V.T, EVSTRATOV A.V, MIKHALEVA I.I, BYSTROV V.F, PORTNOVA S.L, BALASHOVA T.A, MESHCHERYAKOVA E.N, TULCHINSKY V.M. The enniatin ionophores. Conformation and ion binding properties. *Int J Pept Protein Res* 1974; 6(6): 465-98
- PEETERS H, ZOCHER R, KLEINKAUF H. Synthesis of beauvericin by a multifunctional enzyme. *J Antibiot (Tokyo)* 1988; 41(3): 352-9
- PRINCE R, CROFRS A, STEINRAUF L. A comparison of beauvericin, enniatin and valinomycin as calcium transporting agents in liposomes and chromatophores. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974; 59: 697-703
- REISS J. Schimmelpilze, Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung, Springer Verlag, Berlin, 1998; 24-56
- SULYOK M, BERTHILLER F, KRSKA R, SCHUHMACHER R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2006, 20(18): 2649-59
- TOMODA H, HUANG X, CAO J, NISHIDA H, NAGAO R, OKUDA S, TANAKA H, OMURA S. Inhibition of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity by cyclodepsipeptide antibiotics. *J Antibiot (Tokyo)* 1992; 45(10): 1626-32
- UHLIG S, JESTOI M, PARIKKA P. *Fusarium avenaceum* -- the North European situation. *Int J Food Microbiol* 2007, 119(1-2): 17-24
- WU S, CHEN H, LIU Y.C, CHIANG H.T. Block of L-type Ca²⁺ current by beauvericin, a toxic cyclopeptide, in the NG108-15 neuronal cell line. *Chem Res Toxicol* 2002; 15(6): 854-60

- ZAIDI M, BLAIR H, MOONGA B, ABE E, HUANG C. Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 2007; 13(7): 791-801
- ZHAN J, BURNS A. M, LIU M. X, FAETH S. H, GUNATILAKA A. A. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *J. Nat. Prod.* 2007; 70: 227-32
- ZOCHER R, KELLER U, KLEINAUF H. Enniatin synthetase, a novel type of multifunctional enzyme catalyzing depsipeptide synthesis in *Fusarium oxysporum*. *Biochemistry* 1982; 21: 43-48

8. ABBILDUNGSNACHWEIS

Soweit nicht anders angegeben stammen die Abbildungen von mir.

- Abb. 1 www.siumed.edu/~dking2/ssb/skeleton.htm
- Abb.2 www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knochen/zellen/d-osteoklast.php
- Abb. 3 www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/allemand/stuetzgewebe/knochen/zellen/d-osteoklast.php
- Abb. 4 www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/MoreAbout/bonedynamics.html
- Abb. 5 www.mold.ph/fusarium.htm
- Abb. 6 Reiss j. Schimmelpilze, Lebensweise, Nutzen, schaden, Bekämpfung, Springer Verlag, Berlin 1998; 31.
- Abb. 7 www.med.univ-angers.fr/GEIHP/English/Gallery.html
- Abb. 8 www.uoguelph.ca/~gbarron/MISC2004/microfus.htm
- Abb. 9 www.met.psu.edu/dept/research/
- Abb. 10 Herzig A. Optimierung der Biosynthese von Beauvericin, Diplomarbeit, Wien, 2007
- Abb11 edocs.tu-berlin.de/diss/2001/doller_anke.pdf –
- Abb. 1 Herzig A. Optimierung der Biosynthese von Beauvericin, Diplomarbeit, Wien, 2007

Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

9. LEBENS LAUF

Persönliche Angaben

Name	Katharina Zink
Geburtsdatum	10. September 1980
Geburtsort	Wien
Staatsbürgerschaft	Österreich

Studium

Seit Oktober 2001	Studium der Ernährungswissenschaften Universität Wien
-------------------	--

Schulbildung

1990-2000	Bundes Realgymnasium Sportpromenade, Berndorf Abschluss mit dem Reifeprüfungszeugnis
1997-1998	Senior High School Year Dakota Prairie High School Petersburg, North Dakota East Grand Forks Senior High School East Grand Forks, Minnesota
1986-1990	Volksschule Markt, Gutenstein

Berufliche Erfahrung

Seit August 2005	geringfügige Beschäftigung bei Firma Symrise (Aromen und Duftstoffe), Wien
Seit März 2007	Freiwillige Mitarbeiterin bei der Firma Alpenlachs Mag. Rainer Niulaszy
Seit Mai 2008	Freie Mitarbeiterin bei der Firma Brau Union
August 2008	Praktikum bei Firma Symrise Savoury Anwendungstechnik
August 2007	Praktikum bei Firma Symrise Aromenlabor
September 2006	Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften
August 2006	Praktikum bei Firma Symrise Aromenlabor
2000-2001	Hotelfachfrau im Hotel Basur Fam. Egger, Flirsch am Arlberg

