



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Toxikologische Charakterisierung von Aurofusarin,
einem Sekundärmetaboliten der Gattung *Fusarium*“

verfasst von / submitted by

Konstantin Wolters BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the
degree of

Master of Science (MSc)

Wien, 2016 / Vienna, 2016

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears
on the student record sheet

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Ernährungswissenschaften

Betreut von / Supervisor:

Prof. Dr. rer. nat. Doris Marko

SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus anderen Publikationen entnommen wurden, habe ich unter exakter Angabe des Quelltextes eindeutig gekennzeichnet.

Ich erkläre hiermit weiterhin, dass die vorgelegte Arbeit zuvor weder von mir noch – soweit mir bekannt ist – von einer anderen Person einer Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Wien, 2016

Konstantin Wolters

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich Frau Prof. Dr. Marko für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, sowie für die Vergabe eines solch interessanten Themas und die wertvolle Hilfestellung bei der Bearbeitung danken.

Besonderer Dank gilt außerdem Katharina Jarolim MSc, von der ich in meiner Zeit am Institut sehr viel lernen durfte und an die ich mich trotz ihrer zahlreichen Verpflichtungen als Doktorandin stets bei Fragen und Problemen wenden konnte.

Des Weiteren danke ich allen Mitarbeitern/-innen und Masterstudenten/-innen am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie für ihre Hilfsbereitschaft, sowie für die angenehme und produktive Atmosphäre.

Schließlich danke ich auch meiner Mutter, die mich während meines gesamten Studiums nicht nur finanziell sondern vor allem auch emotional unterstützt hat und die mir bei der Erstellung dieser Masterarbeit immer mit ermutigenden Worten zur Seite stand.

INHALT

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	III
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	3
2.1 Schimmelpilze.....	3
2.2 Mykotoxine.....	4
2.3 Die Gattung Fusarium	5
2.4 Aurofusarin	6
2.4.1 Vorkommen	6
2.4.2 Toxizität.....	8
2.5 Toxikologischer Hintergrund.....	9
2.5.1 Oxidativer Stress	10
2.5.1.1 Redox-Cycling.....	11
2.5.1.2 Die Bedeutung von Glutathion	12
2.5.2 DNA Interkalation	13
2.5.3 Giftung und Inhibition von Topoisomerasen.....	14
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	16
4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	17
4.1 Zytotoxizität	17
4.1.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschluss	17
4.1.2 Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität.....	18
4.1.3 Beeinflussung der Zellproliferation.....	20
4.2 Genotoxizität.....	22
4.3 Oxidativer Stress	24
4.3.1 Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies	24
4.3.2 Beeinflussung des Glutathion-Status.....	26

5	ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG	33
6	MATERIAL UND METHODEN	36
6.1	Chemikalien und Geräte	36
6.1.1	<i>Chemikalien</i>	<i>36</i>
6.1.2	<i>Testsubstanz</i>	<i>37</i>
6.1.3	<i>Zellkultur</i>	<i>37</i>
6.1.4	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>37</i>
6.1.5	<i>Geräte</i>	<i>38</i>
6.2	Zellkultur	40
6.2.1	<i>Kultivierung</i>	<i>40</i>
6.2.2	<i>Wechsel des Kulturmediums</i>	<i>41</i>
6.2.3	<i>Subkultivierung</i>	<i>41</i>
6.2.4	<i>Bestimmung von Zellzahl und -viabilität</i>	<i>41</i>
6.2.5	<i>Anlegen von Stocks</i>	<i>43</i>
6.2.6	<i>In Kulturnahme von Stocks</i>	<i>43</i>
6.3	Comet Assay	44
6.4	WST-1 Assay	48
6.5	Sulforhodamin B (SRB) Assay	49
6.6	Dichlorofluorescein (DCF) Assay	51
6.7	Bestimmung von GSH und GSSG	53
6.8	Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)	59
6.9	Statistik	60
7	ANHANG	61
7.1	Kurzfassung	61
7.2	Abstract	62
8	LITERATURVERZEICHNIS	63

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 2.1	Chemische Struktur von Aurofusarin	7
Abbildung 2.2	Prinzip des Redox-Cycling anhand von Menadion.....	11
Abbildung 2.3	Prinzip der Oxidation von GSH und Bildung von GSSG.....	12
Abbildung 2.4	Darstellung von Plumbagin und Juglon	14
Abbildung 4.1	Zellviabilität nach Trypanausschluss-Verfahren.....	18
Abbildung 4.2	Bestimmung der mitochondrialen Aktivität mittels WST-1 Assay	19
Abbildung 4.3	Beeinflussung des Zellwachstums mittels SRB Assay	21
Abbildung 4.4	Erfassung von DNA-Schäden im Comet Assay	23
Abbildung 4.5	Ergebnisse des DCF Assays	25
Abbildung 4.6	GSH-Bestimmung nach Tietze.	27
Abbildung 4.7	GSSG-Bestimmung nach Tietze	29
Abbildung 4.8	GSSG/GSH-Verhältnisse	31
Abbildung 6.1	Zählgitter einer Neubauer Zählkammer.	42
Abbildung 6.2	DNA Schäden im Comet Assay	44
Abbildung 6.3	Prinzip des Dichlorofluorescein (DCF) Assays.....	52
Abbildung 6.4	Prinzip der tGSH-Bestimmung.....	54
Abbildung 6.5	Umsetzung von 2-VP mit GSH.	55
Abbildung 6.6	Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA.....	59
Tabelle 2.1	Aurofusarin-Gehalt im Vergleich zu anderen Fusarientoxinen.	8

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ARE	antioxidative responsive element
AURO	Aurofusarin
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCo-2	Kolonkarzinomzelllinie
DCF	Dichlorofluorescein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5, 5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EtBr	Ethidiumbromid
FAO	Food and Agriculture Organization
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FKS	Fötales Kälberserum
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion (reduzierte Form)
GSR	Glutathion-Reduktase
GSSG	Glutathion (oxidierte Form)
h	Stunde
IC ₅₀	Wert der halbmaximalen Hemmkonzentration
LMA	low melting agarose
min	Minuten
N7-Gua-Addukt	N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine-Addukt
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
1,4-NC	1,4-Naphthochinon
NQO1	NAD(P)H-Chinonoxidoreduktase 1
Nrf2	„nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2)-related factor 2“
OT	Objektträger
PBS	phosphate buffered saline
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SOD	Superoxiddismutase

SRB	Sulforhodamin B
SSA	Sulfosalicylsäure
tBHQ	tert-Butylhydrochinon
T/C	“test / control”
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triethanolamin
tGSH	Gesamt- (“total”) Glutathion
TNB	5-Thio-2-nitrobenzoat
WST-1	watersoluble tetrazolium
UV	Ultraviolett
2-VP	2-Vinylpyridin

1 EINLEITUNG

Laut Schätzungen der „Food and Agriculture Organization“ (FAO) der Vereinten Nationen sind etwa 25 % der weltweit produzierten Getreide mit Mykotoxinen kontaminiert [BHAT et al., 2010].

Bei Mykotoxinen handelt es sich um Sekundärmetabolite von Schimmelpilzen. Zu den am häufigsten vorkommenden Gattungen zählen *Penicillium*, *Aspergillus* und *Fusarium*. Diese wachsen auf einer Vielzahl verschiedener landwirtschaftlicher Produkte, wo sie Mykotoxine auch unter problematischsten klimatischen Bedingungen produzieren. Die Akkumulation von Mykotoxinen in Futter- und Lebensmitteln bedeutet allerdings ein hohes gesundheitliches Risiko für Tiere und Menschen, da sie unter anderem Störungen des Gastrointestinaltraktes, der Leber, der Nieren sowie des Immunsystems verursachen und zur Entstehung von Krebs beitragen können [BfR, Berlin]. Durch die Beeinträchtigung der Gesundheit des Menschen sowie der Produktivität der Tierzucht, stellen sie zusätzlich auch ein großes ökonomisches Problem dar. Um die Exposition von Menschen und Tieren zu verringern, wurden daher für viele der bekannten Mykotoxine bereits gesetzliche Höchstgehalte für Futter- und Lebensmitteln festgelegt. Die verschiedenen Spezies der Gattung *Fusarium* gehören im gesamten europäischen Raum zu den am häufigsten anzutreffenden Schimmelpilzen, weshalb die von ihnen gebildeten Mykotoxine Zearalenon, Fumonisine und Trichothecene in der Verordnung (EG) 1831/2003 für Lebensmittel bereits reguliert werden. *Fusarium*-Spezies bilden allerdings noch eine Reihe weiterer Sekundärmetabolite, deren toxikologische Relevanz bisher noch nicht geklärt ist. Hinzu zählt auch das Mycelpigment Aurofusarin. [MORISHITA et al., 1968]

Obwohl Aurofusarin bereits seit Ende der 1930er Jahre bekannt ist, wurde sein toxikologisches Gefährdungspotential nie eingehend untersucht. Der Sekundärmetabolit entspricht strukturell einem Naphthochinon-Dimer, eine chemische Verbindungsklasse, für die eine Vielzahl toxikologisch relevanter Mechanismen publiziert wurde, die generell an der Entstehung verschiedenster Erkrankungen beteiligt sein können. Untersuchungen zu strukturell ähnlichen Naphthochinonen ergaben beispielsweise zell- und DNA-schädigende Eigenschaften und ließen diese in den Fokus der Krebsforschung rücken. Erste Fütterungs- [DVORSKA et al., 2001, DVORSKA et al., 2002] und eine *in-vitro* Studie [VEJDOVSZKY et al., 2016] mit Aurofusarin ließen ebenfalls vermuten, dass von dem Sekundärmetaboliten zytotoxische und vermutlich auch pro-oxidative Wirkungen ausgehen.

Die vorliegende Arbeit diene daher der toxikologischen Charakterisierung von Aurofusarin mit Schwerpunkt auf seinen zytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften und sollte zur Erweiterung der bisherigen Erkenntnisse beitragen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Schimmelpilze

Schimmelpilze sind eine weit verbreitete Gruppe von filamentösen Pilzen und weisen, je nach Gattung, eine saprophytische oder parasitäre Lebensweise auf, die sie von energiereichen organischen Nährstoffquellen abhängig macht. Saprophyten bedienen sich dabei an totem organischem Material während Parasiten lebende Organismen als Nahrungsquelle bevorzugen. Da Schimmelpilze keine Gliederung in Wurzeln, Sprosse und Blätter aufweisen, werden sie zu den sogenannten Thallophyten („Lagerpflanzen“) gezählt. Der Thallus besteht dabei aus fadenförmigen Zellen (Hyphen), die das mit dem bloßen Auge sichtbare Myzel bilden. Schimmelpilze kommen ubiquitär vor und können sowohl im Außenbereich, als auch in Innenräumen von Gebäuden, bei entsprechender Feuchtigkeit wachsen. Ihre Vermehrung erfolgt dabei meist über pigmentierte, trocken- und hitzeresistente Sporen, die über den Wind verteilt werden [Kück et al., 2009].

Während die Mehrheit der mehreren tausend bekannten Schimmelpilzarten primär als pflanzenpathogen eingestuft wird, weisen ca. 150 von ihnen auch humanpathogene Eigenschaften auf. Dabei handelt es sich um fakultative pathogene Schimmelpilze, deren Sporen regelmäßig auf Haut und den Schleimhäuten des menschlichen Körpers zu finden sind. Im Falle eines geschwächten Abwehrsystems können diese Sporen auskeimen und der Schimmelpilz kann sich verbreiten. So kann es zur Entstehung von schweren Erkrankungen, den sogenannten Mykosen, kommen [Kück et al., 2009].

In Bezug auf ihre Auswirkung auf Lebensmittel zeigen Schimmelpilze teils gegensätzliche Eigenschaften. So dienen Edelschimmelkulturen der Konservierung und geschmacklichen Verfeinerung von Lebensmitteln wie beispielsweise Käse (*P. roqueforti*, *P. camemberti*, *P. candidum*), Salami (*P. nalgiovense*), Sojasoßen und Sake (*A. oryzae* und *A. sojae*) [TETSCH, 2015]. Ein unerwünschter Befall von Lebensmitteln durch Schimmelpilze führt allerdings normalerweise zum Verderb. Durch Sekretion verschiedener Amylasen, Proteasen und Lipasen verwertet der Schimmelpilz Kohlenhydrate, Proteine und Fette der Lebensmittel. Es kommt so zur Anhäufung von Stoffwechselprodukten, die das Lebensmittel für den Menschen ungenießbar machen. Betroffene Lebensmittel sind in erster Linie Getreide und Backwaren, Obst, Gemüse, Milchprodukte und Nüsse. Neben dem hohen wirtschaftlichen Schaden, birgt der Eintritt von Schimmelpilzen in die Nahrungskette aber auch ein hohes gesundheitliches Gefahrenpotenzial für Menschen und Tiere. Durch ihren umfangreichen

Sekundärmetabolismus sind sie in der Lage Schimmelpilzgifte, die sogenannten Mykotoxine, zu bilden, die im Organismus zu akuten oder chronischen Vergiftungen führen können [Kück et al., 2009]. Daher soll im Folgenden auf die Gefahren, die von der Aufnahme von Mykotoxinen ausgeht, eingegangen werden.

2.2 Mykotoxine

Der Begriff Mykotoxin wurde erstmals 1962 geprägt, nachdem es in England aufgrund von Aflatoxin-kontaminiertem Futtermittel überraschend zu einem Massensterben von Truthähnen („Turkey X disease“) kam. In den darauffolgenden Jahren wurde verstärkt Forschung auf diesem Gebiet betrieben, weshalb heute mehr als 250 Schimmelpilzarten bekannt sind, die etwa 300 verschiedene Mykotoxine produzieren. Die bedeutendsten Mykotoxinproduzenten sind dabei die Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Fusarium*, sowie *Cladosporium*, *Alternaria* und *Stachybotris*. Generell handelt es sich bei Mykotoxinen um sekundären Stoffwechselprodukte, die bei Wirbeltieren bereits in geringsten Mengen giftig wirken können [BENNETT und KLICH, 2003]. Über die eigentliche Funktion der Mykotoxine für den Schimmelpilz gibt es bisher keine wissenschaftlich gesicherten Erkenntnisse. Es wird allerdings vermutet, dass sie als Pathogenitätsfaktoren einen Vorteil gegenüber natürlichen Konkurrenten wie Bakterien verschaffen sollen und der Abwehr von Fressfeinden dienen.

Durch ihr weites Spektrum an verschiedenen chemischen Strukturen, ihren vielfältigen biologischen Wirkungen und der Tatsache, dass viele Mykotoxine von mehr als nur einer Art oder Gattung gebildet werden, ist eine Klassifizierung der Mykotoxine schwierig und unterscheidet sich je nach Gebiet. So werden sie beispielsweise in der Medizin ihrer biologischen Wirkung nach Hepatotoxine, Nephrotoxine, Neurotoxine eingeteilt, während die Zellbiologie sie Gruppen wie Teratogenen, Mutagenen und Karzinogenen zuordnet. In der organischen Chemie bzw. Biochemie hingegen erfolgt die Klassifizierung auf Grundlage chemischen Struktur (z.B. Laktone, Chinone etc.) bzw. ihres biosynthetischen Ursprungs (Polyketide, von Aminosäuren abgeleitet etc.) [BENNETT und KLICH, 2003].

Für den Menschen werden als toxikologisch wichtigste Mykotoxine Aflatoxine (vor allem Aflatoxin B₁, AFB₁), Patulin, Ochratoxin A (OTA), Trichothecene (T-2-Toxin, T-2; Deoxynivalenol, DON), Zearalenon (ZEA), die Fumonisine B₁-B₃, Mutterkornalkaloide (Ergot-Alkaloide) sowie Alternariatoxine beschrieben [BfR, Berlin]. Ihre Bezeichnungen leiten sich oft von ihrer chemischen Struktur, dem Schimmelpilz, dem sie typischerweise

entstammen oder dem Organismus auf dem sie ursprünglich entdeckt wurden, ab. Allgemein sind sie dabei allerdings abzugrenzen von Pilzgiften, die von Großpilzen produziert werden. Zum Beispiel von Muscarin, das vom Fliegenpilz (*Amanita muscaria*) gebildet wird [MICHELOT und MELENDEZ-HOWELL, 2003].

Aufgrund ihres niedrigen Molekulargewichts zwischen 160 und 800 g/mol rufen Mykotoxine, anders als toxische Proteine, keine direkte Immunantwort hervor, weshalb zu Beginn keine Signalsymptome auf eine Vergiftung mit Mykotoxinen hinweisen. Bei Tieren umfasst die akute Toxizität von Mykotoxinen Leber- und Nierenschädigungen, Angriffe auf das zentrale Nervensystem, Haut- und Schleimhautschäden, Beeinträchtigung des Immunsystems sowie hormonähnliche Wirkungen. Eine chronische Aufnahme von geringeren Mengen über einen längeren Zeitraum kann zu den bereits erwähnten kanzerogenen, mutagenen und teratogenen Effekten führen [BfR, Berlin].

Der Eintrag von Mykotoxinen in Nahrungsmittel kann über verschiedene Wege erfolgen. Die Primärkontamination findet bereits über die Lebensmittelrohstoffe statt. Ein Beispiel dafür sind Mutterkornalkaloide, die bereits durch Befall der Pflanzen auf dem Feld mit dem Mutterkornpilz (*Claviceps purpurea*) in das Getreide gelangen. Findet die Kontamination bei lagernden oder bereits verarbeiteten Lebensmitteln statt, spricht man von Sekundärkontamination. Dies ist die einzige Kontamination, die für den Verbraucher anhand der sichtbaren Mycelbildung erkennbar ist. Ebenfalls kann es zur Kontamination durch sogenanntes „carry-over“ kommen. Das bedeutet, dass Nutztiere Mykotoxine über kontaminiertes Futtermittel aufnehmen und sie in unveränderter oder metabolisierter Form im Gewebe ablagern. Anschließend gelangen die Gifte über tierische Produkte wie Milch, Eier oder Fleisch in die Nahrungsmittel. Da Mykotoxine chemisch sehr stabile Verbindungen sind und sich meist auch durch Erhitzen der Lebensmittel nicht zerstören lassen, sind entsprechende Präventivmaßnahmen zur Vermeidung von Schimmelbildung zu treffen [Kück et al., 2009].

2.3 Die Gattung *Fusarium*

Viele *Fusarium* Spezies sind weitverbreitete Pflanzenpathogene in gemäßigten sowie in subtropischen Gebieten, einschließlich aller Anbauggebiete in Europa. Neben *F. avenaceum*, *F. culmorum* und *F. poae*, sind die Pflanzen am häufigsten vom Befall mit *F. graminearum* betroffen. Sie infizieren vorrangig Getreide, wie Weizen, Roggen, Hafer, Reis und Mais, und verursachen sogenannte Fusariosen, wie beispielsweise die partielle

Taubährigkeit („head blight“), Stängel- und Kolbenfäulnis sowie Schrumpfkörner und verminderte Keimfähigkeit von Saatgut. Die Ernteverluste betragen geschätzt bis zu 30 %. Ende der neunziger Jahre wurde *F. oxysporum* von den USA sogar unter dem Synonym „agent green“ zur gezielten Vernichtung von Kokain- und Schlafmohn-Plantagen eingesetzt [KÜCK et al., 2009]. Zusätzlich produzieren bestimmte *Fusarium* Spezies allerdings auch eine Reihe von Mykotoxinen, die für Tier und Mensch negative gesundheitliche Auswirkungen mit sich bringen. Die prominentesten Mykotoxine der Gattung *Fusarium* werden ihrer Struktur nach in die drei Gruppen Trichothecene, Zearalenone und Fumonisine eingeteilt. Aus der Gruppe der Trichothecene werden am häufigsten Deoxynivalenol (DON), Nivalenol (NIV) und T-2-Toxin in Nahrungs- und Futtermitteln gefunden. Sie wirken als Hemmstoffe der Proteinsynthese und werden als zellschädigend beschrieben. Zusätzlich sind sie hauttoxisch, greifen neben dem Verdauungstrakt auch das Nervensystem an und beeinträchtigen die Blutbildung [ROTTER et al., 1996, ERIKSEN und PETTERSSON, 2004]. Für Zearalenon und seine Derivate wurde sowohl bei Tieren als auch beim Menschen eine endokrin aktive Wirkweise nachgewiesen. Erhöhte Aufnahme der Toxine führte, vergleichbar mit erhöhter Östrogenaufnahme, zu Hyperöstrogenismus, einschließlich Unfruchtbarkeit, Scheinschwangerschaften und Verweiblichung von männlichen Individuen [KUIPER-GOODMAN et al., 1987]. Fumonisine hingegen greifen in die Biosynthese von Sphingosin, einem Baustein von Lipiden von Biomembranen, ein. Die Verminderung der Sphingolipide in Zellmembranen durch Fumonisine wurde als mögliche Ursache ihre zytotoxischen [DESAI et al., 2002] und kanzerogenen Eigenschaften diskutiert [GELDERBLUM et al., 2001]. Unter den Fumonisinen stellt Fuminisin B₁ das Toxin mit dem höchsten toxikologischen Potential dar. Dieses wird in Verbindung gebracht mit erhöhter Inzidenz von Speiseröhrenkrebs in Südafrika, China, den USA [MARASAS, 1995] und möglicherweise auch in Italien [FRANCESCHI et al., 1990].

2.4 Aurofusarin

2.4.1 Vorkommen

Aurofusarin wurde zum ersten Mal im Jahr 1937 als Pigment von *Fusarium culmorum* beschrieben. Seine Farbe ist dabei abhängig vom pH des Lösungsmittels und reicht von goldgelb im sauren Milieu bis rot/violett im alkalischen. Aufgrund der geringen Löslichkeit Aurofusarins und seiner Derivate in fast allen Lösungsmitteln, konnten zu dieser Zeit nur

Vermutungen zu seinem Molekulargewicht und seiner Struktur angestellt werden [ASHLEY et al., 1937]. Erst 30 Jahre später gelang Morishita et al. (1968) die vollkommene Aufklärung der chemische Struktur von Aurofusarin sowie die Publikation erster Theorien zu dessen Biosynthese. So handelt es sich bei Aurofusarin um ein Homodimer, das durch Dimerisierung von zwei Molekülen des 1,4-Naphthochinons Rubrofusarin entsteht. Sein Molekulargewicht beträgt insgesamt 570 g/mol (Abbildung 2.1) [MORISHITA et al., 1968].

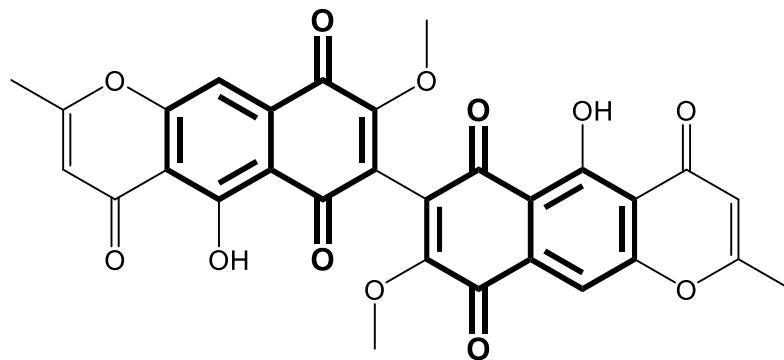


Abbildung 2.1 Chemische Struktur von Aurofusarin mit hervorgehobenen 1,4-Naphthochinon-Strukturen.

Zu seinen Produzenten zählen neben *F. culmorum* überwiegend *F. graminearum*, *F. avenaceum*, *F. poae*, *F. crookwellense* und *F. pseudograminearum*. Aurofusarin wird dabei auch unter suboptimalen Bedingungen wie hohem oder niedrigem pH, hohen Temperaturen und Phosphatmangel produziert [MEDENTSEV und AKIMENKO, 1998]. Da diese Spezies generell zu den am weitest verbreiteten Pflanzenpathogenen, insbesondere von Pflanzen für die Lebensmittel- und Futtermittelproduktion, gehören, konnte Aurofusarin bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden. Eine der Studien untersuchte 83 Futtermittelproben aus den Jahren 2010 und 2012 auf ihren Mykotoxin-Gehalt und fand heraus, dass 84% der Proben mit Aurofusarin kontaminiert waren [STREIT et al., 2013]. Ebenfalls in natürlichen Gräsern, die als Futter für die Weidehaltung von Rindern in Argentinien dienen, konnte in 90% der Proben Aurofusarin nachgewiesen werden [NICHEA et al., 2015]. Für den Menschen relevante Quellen, in denen Aurofusarin nachgewiesen wurde, sind gängige Getreidearten (Weizen, Gerste, Hafer, Mais, Hirse) [KOTIK und TRUFANOVA, 1998, EZEKIEL et al., 2012, WARTH et al., 2012, UHLIG et al., 2013, TOLA et al., 2015] sowie Trauben [MIKUSOVA et al., 2013] und Äpfel [SORENSEN et al., 2009]. Die Konzentrationen von Aurofusarin lagen dabei in

einigen der genannten Studien in etwa gleich hoch bzw. deutlich über jenen der üblichen Fusarientoxine wie DON, ZEA oder T-2. (Tabelle 2.1)

Tabelle 2.1 Aurofusarin-Gehalt im Vergleich zu anderen Fusarientoxinen.

Studie	Mykotoxin	Positiv (%)	Median (µg/kg)	Max (µg/kg)	Vorkommen
Streit et al. 2013	DON	89	122	25.928	in Futtermittelproben
	T2	31	3,8	427	
	ZEA	18	7,1	225	
	AURO	82	85	17.659	
Ezekiel et al. 2012	DON	88	10	14	in Hirse
	T2	-	-	-	
	ZEA	94	12	987	
	AURO	94	69	7.280	
Uhlig et al. 2013	DON	100	12,9	636	in Roggen
	T2	30	150	14,1	
	ZEA	95	11,4	1340	
	AURO	100	1.090	47.300	
Uhlig et al. 2013	DON	100	1.070	7.230	in Hafer
	T2	96	20,1	143	
	ZEA	93	89,9	1670	
	AURO	100	1.350	30.500	
Uhlig et al. 2013	DON	100	383	1.400	in Weizen
	T2	79	3,4	5,3	
	ZEA	96	27,5	210	
	AURO	100	934	5.510	

2.4.2 Toxizität

Was Aurofusarin neben seinem häufigen Vorkommen in Lebens- und Futtermitteln toxikologisch interessant macht, sind vor allem seine strukturellen Eigenschaften. Als Naphthochinon besitzt es möglicherweise neben antibiotischen und insektiziden auch zytotoxische, genotoxische und mutagene Eigenschaften auf Tiere und Menschen [MEDENTSEV und AKIMENKO, 1998]. Die Datenlage zur Toxizität von Aurofusarin ist zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit sehr begrenzt. Erste *in vivo* Versuche mit Geflügel ergaben, dass mit Aurofusarin kontaminiertes Futtermittel bei Fütterung über 8 Wochen zu signifikant verringerten Konzentrationen der Antioxidantien Vit. E, A und verschiedener Carotinoide sowohl im Ei als auch im Gewebe des Embryos führt. Dies könnte ein erstes Anzeichen bezüglich erhöhtem oxidativen Stress sein, wie er oft durch chinoiden Verbindungen hervorgerufen wird [DVORSKA et al., 2001, DVORSKA et al., 2002]. Ein erster *in vitro* Versuch hingegen untersuchte die Zytotoxizität von Aurofusarin in

Caco-2 Zellen, einer kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie. Nach Inkubation über 24 h mit Aurofusarin in einer Konzentration von 10 μ M wurde die mitochondriale Aktivität im Vergleich zur Lösungsmittel-Kontrolle auf 51 % verringert. Dieser Effekt wurde noch zusätzlich durch Kombination mit anderen Mykotoxinen verstärkt [VEJDOVSZKY et al., 2016].

Die bisherigen Ergebnisse lassen demnach vermuten, dass Aurofusarin womöglich über typischen Eigenschaften von Naphthochinonen verfügt. Diese sollen im Folgenden näher erklärt werden.

2.5 Toxikologischer Hintergrund

Naphthochinone sind weitverbreitete Verbindungen in der Natur, die in höheren Pflanzen, Pilzen und Bakterien nachgewiesen wurden. Die chemische Struktur monomerer Naphthochinone basiert auf einem bizyklischen Ringsystem - der Grundstruktur von Naphtalin, substituiert an den Positionen C₁ und C₄ (1,4-Naphthochinone) oder C₁ und C₂ (1,2-Naphthochinone) [MEDENTSEV und AKIMENKO, 1998]. Des Weiteren existieren Naphthochinon-Dimere und -Trimere, denen zytotoxische Wirkung auf verschiedene Tumorzelllinien wie Prostata- oder Brust-Tumorzellen nachgewiesen wurde [EMADI et al., 2011, ROSS et al., 2011]. Naphthochinone haben zudem eine Reihe an physiologischen Funktionen. Die wichtigste repräsentieren dabei die Naphthochinone der Vitamin K Gruppe, Phyllochinone und Menachinone [STAFFORD, 2005]. Aufgrund ihrer antibiotischen, antimykotischen und antiviralen Eigenschaften werden Naphthochinone in vielen verschiedenen Bereichen bereits eingesetzt. Vor allem ihre zytotoxischen Eigenschaften sind von besonderem Interesse für die Wissenschaft. Sie basieren hauptsächlich auf der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die in viele zelluläre Prozesse involviert sind und auch als Signal für Apoptose und programmierten Zelltod dienen [BABULA et al., 2009, GONG und LI, 2011]. Naphthochinone sind auch in der Lage die zelluläre Atmungskette zu beeinflussen, was ein weiterer Mechanismus ihrer zytotoxischen Eigenschaften sein kann [KAWAI et al., 1976, KAWAI und NOZAWA, 1979]. Darüber hinaus zeigen einige Naphthochinone auch genotoxische Eigenschaften, in dem sie indirekt über die Beeinflussung von Topoisomerasen oder direkt durch Interaktion mit der DNA Strangbrüche induzieren [FUJII et al., 1992, VAVERKOVA et al., 2014].

Da es sich bei Aurofusarin um ein Naphthochinonderivat handelt, sollen im Folgenden die wichtigsten Mechanismen, die an Zytotoxizität und Genotoxizität von Naphthochinonen beteiligt sind, näher erläutert werden.

2.5.1 *Oxidativer Stress*

Oxidativer Stress ist definiert als Ungleichgewicht zwischen der Produktion reaktiver Spezies und den antioxidativ wirksamen Verbindungen in einem Organismus. Die wichtigsten reaktiven Spezies stellen dabei reaktive Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS), wie das Hydroxylradikal $\text{OH}^\bullet$, das Superoxidanion $\text{O}_2^{\bullet-}$ und Wasserstoffperoxid H_2O_2 , dar. Endogen entstehen diese Verbindungen unter anderem während der oxidativen Phosphorylierung im Zuge der ATP-Gewinnung durch Reduktion von molekularem Sauerstoff (O_2) [TOYOKUNI und AKATSUKA, 2007]. Exogene Faktoren, die zur Entstehung von oxidativem Stress beitragen können, sind beispielsweise Xenobiotika, die über Redox-Cycling (Kapitel 2.5.1.1) oder über die Bildung freier Radikale ebenfalls ROS generieren können [BOELSTERLI, 2003]. Im Organismus können ROS biologische Makromoleküle wie Lipide, Proteine und die DNA schädigen. Die Schädigung von Lipiden resultiert dabei in verminderter Membranintegrität, während die Schädigung von Proteinen zur Modifikation und zum Verlust der eigentlichen Funktion führen kann. Mögliche oxidative Schäden der DNA hingegen sind unter anderem die Bildung von 8-Oxoguanin und Formamidopyrimidin, Protein-DNA-Addukte, abasische Stellen, DNA-Crosslinks bis hin zu Strangbrüchen [WARIS und AHSAN, 2006]. Die vermehrte Entstehung von 8-Oxoguanin ist deshalb von toxikologischer Relevanz, da diese modifizierte Base mit der Entstehung mutagener Effekte assoziiert wurde, wie beispielsweise mit G→T-Transversion [KAMIYA, 2003]. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde vermutet, dass ROS, neben dem Prozess des Alterns, auch in Verbindung mit der Entstehung von Krebs [HALLIWELL, 2007], Alzheimer [MIROSLAV, 2014] und Arteriosklerose [BONOMINI et al., 2008] stehen. Den ROS gegenüber stehen die Moleküle der antioxidativen Abwehr im Organismus. Das sind vor allem das zelluläre Antioxidans Glutathion, sowie die Enzyme Superoxiddismutase (SOD) und Katalase.

2.5.1.1 Redox-Cycling

Chinoide Systeme sind in der Lage nahezu unbegrenzt ROS zu bilden, ohne dabei verbraucht zu werden. Dieser Vorgang wird durch sogenanntes „Redox-Cycling“ ermöglicht [KLOTZ et al., 2014].

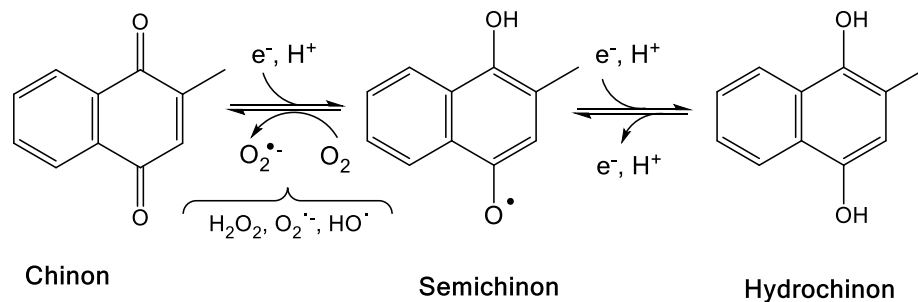


Abbildung 2.2 Prinzip des Redox-Cycling anhand von Menadion.

Redox-Cycling repräsentiert einen Kreislauf, der aus Reduktion einer Verbindung und anschließender (Auto-) Oxidation des Reaktionsproduktes, bei gleichzeitiger Produktion verschiedener ROS, besteht. Dazu werden sowohl geeignete Reduktionsäquivalente als auch Elektronen-Empfänger für die Oxidation des Reaktionsproduktes benötigt. Bei 1,4-Naphthochinonen in Säugerzellen wird diese Reaktion von verschiedenen Enzymen unter Verbrauch von NADH oder NADPH katalysiert [GUTIERREZ, 2000]. Als Beispiel wird in Abbildung 2.2 das Naphthochinon Menadion durch Cytochrom P450 zu seinem Semichinonradikal reduziert, welches durch molekularen Sauerstoff wieder zum Chinon zurück oxidiert werden kann [ROOSEBOOM et al., 2004]. Der Sauerstoff wird im Zuge der Rückoxidation des Semichinons durch Elektronenübertragung zum Superoxidanion $O_2^{\cdot-}$ umgewandelt, das in weiterer Folge zu O_2 oder H_2O_2 disproportionieren kann. H_2O_2 kann dann mittels Fenton-Reaktion in Anwesenheit geeigneter Metall-Ionen wie Eisen (Fe^{2+}) und Kupfer (Cu^{2+}), weiter zum hochreaktiven Hydroxylradikal $OH^{\cdot}$ reagieren [WINTERBOURN, 1995]. Andererseits kann auch eine Zwei-Elektronen-Reduktion des Chinons zum entsprechenden Hydrochinon stattfinden, die durch die NAD(P)H:Chinon-Dehydrogenase-1 (NQO1, DT-Diaphorase) katalysiert wird [THOR et al., 1982]. Im Zuge der Phase II des Fremdstoffmetabolismus werden Hydrochinone zur Erleichterung der Ausscheidung normalerweise mit Glucuronsäuren, Sulfaten oder Glutathion konjugiert [WHO, 1994]. Allerdings können Hydrochinone auch wieder zurück zu Semichinonen oxidiert werden, die dann erneut über die Oxidation durch Sauerstoff weitere ROS bilden können [THOR et al., 1982].

2.5.1.2 Die Bedeutung von Glutathion

Glutathion gilt als wichtigstes zelluläres Antioxidans im menschlichen Organismus. Es handelt sich dabei um ein Tripeptid, das aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin aufgebaut ist. Glutathion schützt die Zellen vor reaktiven Spezies exogenen (Xenobiotika) und endogenen (ROS) Ursprungs, wobei seine Funktion durch seine nukleophile Thiolgruppe bestimmt wird. So werden die meisten reaktive Spezies mittels nicht-enzymatischer Reduktion direkt durch seine reduzierte Form GSH neutralisiert, während Hydroperoxide und H_2O_2 zuerst einer enzymatischen Reaktion, katalysiert durch Glutathionperoxidase oder Katalase, bedürfen.

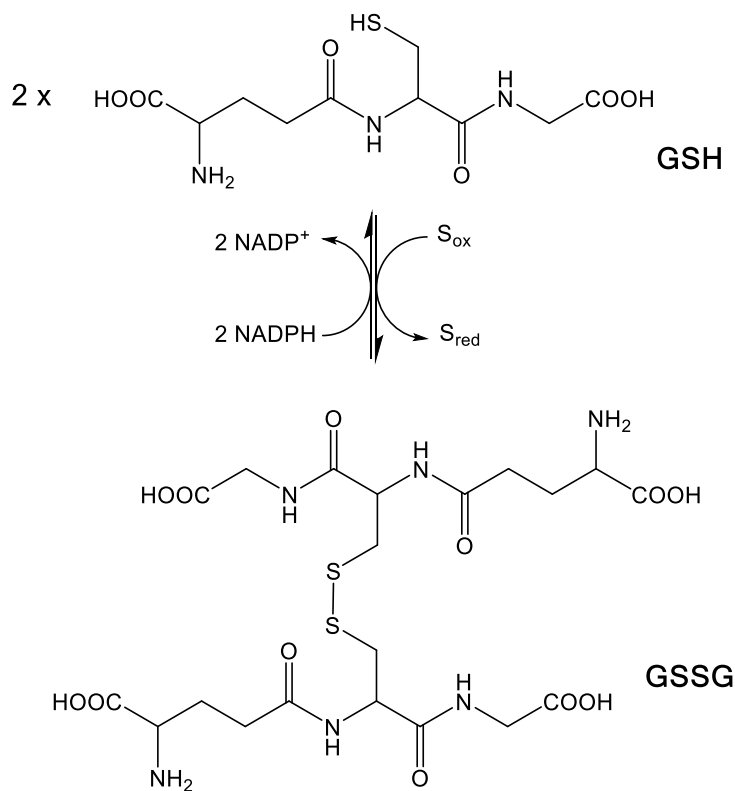


Abbildung 2.3 Prinzip der Oxidation von GSH und Bildung von GSSG. S_{ox}: oxidierte Substanz. S_{red}: reduzierte Substanz.

Beide Reaktionen führen letztendlich über Dimerisierung der GSH-Radikale zur Bildung der oxidierten Form Glutathion-Disulfid (GSSG). Vermittelt durch die GSH-Reduktase und mit NADPH als Reduktionsäquivalent kann GSSG wieder zurück zu GSH reduziert werden (Abbildung 2.3) [LÖFFLER et al., 2007]. Darüber hinaus ist GSH in der Lage, Konjugationsreaktionen mit elektrophilen Verbindungen einzugehen, die anschließend

in Form der Konjugate ausgeschieden werden. Das für die Konjugation verantwortliche Enzym ist die Glutathion-S-Transferase.

Kommt es nun zu einer starken Veränderung des Redox-Status der Zelle und einem gesteigerten Verbrauch von GSH, kann per Reduktion von GSSG rasch GSH „recycelt“ werden. Allerdings fehlt das GSH, das durch Konjugationsreaktionen aus der Zelle entfernt wurde. Um einer Erschöpfung von GSH vorzubeugen, wird so die De-novo-Synthese von Glutathion notwendig. Die Synthese ist dabei ATP-abhängig und wird durch zwei cytosolische Synthetasen katalysiert. Im ersten Schritt verknüpft die γ -Glutamylcystein-Synthetase die γ -Carboxylgruppe von Glutamat mit der α -Aminogruppe von Cystein. Anschließend erfolgt durch die GSH-Synthetase noch die Addition des Glycinrestes [DICKINSON und FORMAN, 2002]. In nicht gestressten Zellen liegt Glutathion je nach Art des Gewebes in einer Konzentration zwischen 0,5 und 10 mM vor, wobei 99% davon seiner reduzierten Form GSH entsprechen [ARRIGO, 1999].

2.5.2 DNA Interkalation

Interkalation beschreibt die Einbringung von Molekülen in die doppelhelikale Struktur der DNA [LERMAN, 1961]. Um in die DNA zu interkalieren, schieben sich die Moleküle zwischen zwei benachbarte Basenpaare ohne dabei die Wasserstoffbrückenbindungen zu zerstören. Dabei handelt es sich in der Regel um planare polyzyklische aromatische Moleküle. Durch ihre Interkalation kann es zu einer lokalen Veränderung der räumlichen Struktur der DNA kommen, die durch die Entwindung der Doppelhelix und Verlängerung der DNA bedingt ist. Replikation sowie Transkription der DNA werden so gestört, weshalb es während des Replikationsvorganges zu Rastermutationen kommen kann. Einige Interkalatoren besitzen demnach mutagene sowie karzinogene Wirkung. Daneben gibt es auch eine Reihe von Verbindungen, die über weitere Molekülgruppen Strangbrüche verursachen und so die DNA zusätzlich schädigen [FERGUSON und DENNY, 2007]. Aufgrund ihrer Eigenschaften werden Interkalatoren auch als Chemotherapeutika (Doxorubicin, Daunorubicin) und für die Färbung der DNA zu Analysezwecken (Ethidiumbromid) eingesetzt.

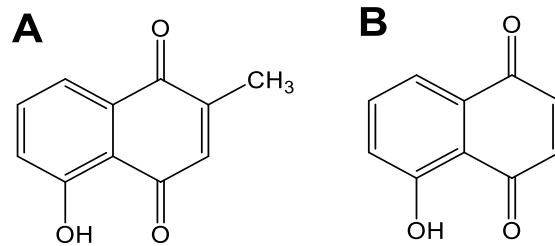


Abbildung 2.4 Darstellung von Plumbagin (A) und Juglon (B)

Naphthochinone, die bereits als DNA-Interkalatoren beschrieben wurden, sind vor allem 1,4-Naphthochinone wie beispielsweise Plumbagin [FUJII et al., 1992] und Juglon (Abbildung 2.4) [VAVERKOVA et al., 2014].

2.5.3 Giftung und Inhibition von Topoisomerasen

Da die DNA im Zellkern in einer superspiralisierten und dicht gepackten Form vorliegt und so für die Enzyme des Transkriptionsapparates unzugänglich ist, muss diese vor der Transkription entwunden und anschließend entspiralisiert werden. Zum Abbau der dabei anfallenden Torsionsspannungen dienen die sogenannten Topoisomerasen. Sie helfen bei der Relaxation der DNA indem sie Schnitte in die DNA-Stränge einfügen und diese nach Entlassung der Spannung wieder verbinden. Im Grunde werden dabei zwei Klassen von Topoisomerasen unterschieden: Die Typ I- und die Typ II-Topoisomerasen. Typ I-Topoisomerasen führen dabei Einzelstrangsschnitte ein, während Typ II-Topoisomerasen in der Lage sind beide DNA-Stränge zu trennen und so ein Durchführen eines weiteren doppelsträngigen DNA-Segments durch den Bruch zu ermöglichen [LÖFFLER et al., 2007]. Als essentielle zelluläre Enzyme sind Topoisomerasen an nahezu allen Vorgängen im Zusammenhang mit der DNA beteiligt, weshalb eine Beeinträchtigung ihrer Aktivität zum Erliegen der DNA-Synthese und zur Schädigung der DNA führen kann. Eine solche Beeinträchtigung der Funktion kann durch Inhibition der eigentlichen Enzymfunktion oder durch sogenannte Giftung erfolgen. Katalytische Hemmstoffe verhindern dabei die Bindung der Topoisomerasen an die DNA, stabilisieren den nicht kovalenten DNA-Topoisomerase-Komplex oder hemmen die ATP-Bindung von Typ II-Topoisomerasen [LARSEN et al., 2003]. Unmittelbare Folge sind verstärkte Torsionsspannungen, die letztendlich zur Apoptose der Zellen führen können. Topoisomerasegifte hingegen stabilisieren den kovalenten DNA-Topoisomerase-Komplex und sorgen so für eine Erhöhung der Enzym-DNA-Intermediate. Durch eine Kollision dieser Intermediate mit der Replikationsgabel können ebenfalls

Doppelstrangbrüche der DNA entstehen, die in weiterer Folge zum Absterben der Zelle führen können [FROELICH-AMMON und OSHEROFF, 1995].

Einige Naphthochinone und ihre Derivate haben sich bereits sowohl als katalytische Inhibitoren [KRISHNAN und BASTOW, 2000, TING et al., 2003] als auch als Topoisomerasegifte [FUJII et al., 1992] herausgestellt, die sowohl die Funktion der Typ I- als auch der Typ II-Topoisomerasen beeinträchtigen.

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Aurofusarin wird als Sekundärmetabolit von mehreren Spezies der Gattung *Fusarium* gebildet. Da *Fusarium* Spezies zu den am häufigsten vorkommenden Schadpilzen auf Nutzpflanzen zählen, konnte Aurofusarin bisher dementsprechend oft in diversen Rohstoffen der Futter- und Lebensmittelproduktion nachgewiesen werden [EZEKIEL et al., 2012, STREIT et al., 2013, UHLIG et al., 2013]. Aufgrund der mangelhaften Datenlage zur toxikologischen Relevanz existiert allerdings im Gegensatz zu den besser charakterisierten *Fusarium*-Toxinen (Zearalenon, Trichothecence, Fumonisine) für Aurofusarin keine Festsetzung für Höchstgehalte in Futter- und Lebensmitteln. Erste Untersuchungen zur Toxizität von Aurofusarin zeigten allerdings, dass Aurofusarin *in vitro* zytotoxische Eigenschaften besitzt [VEJDOVSKY et al., 2016] und vermutlich zu erhöhtem oxidativen Stress in Wachteleiern führt [DVORSKA et al., 2001, 2002].

Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten toxikologischen Untersuchungen in der Kolon-Adenokarzinomzelllinie HT29. Zur Untersuchung der Zytotoxizität von Aurofusarin kamen im Rahmen dieser Arbeit zwei Methoden zum Einsatz. Potentielle Effekte von Aurofusarin auf die mitochondriale Aktivität wurden mittels „Watersoluble tetrazolium salt-1“ (WST-1) Assay untersucht. Mittels Sulforhodamin B (SRB) Assay wurde zusätzlich geprüft, ob durch den Sekundärmetabolit eine Beeinflussung der Zellproliferation stattfand. Darüber hinaus wurde eine potentielle genotoxische Wirkung von Aurofusarin mittels Comet Assay untersucht. Mittels Modifikation des Assays durch Zugabe des Enzyms Formamidopyrimidinglycosylase (FPG) sollte zusätzlich geprüft werden, ob Hinweise auf mögliche oxidative DNA-Schäden geliefert werden konnten.

Da es sich bei Aurofusarin um ein Naphthochinondimer handelt und für Verbindung mit Chinonstruktur die potentielle Bildung von ROS mittels Redox-Cycling beschrieben ist, sollte weiter untersucht werden, ob mittels Dichlorofluorescein (DCF) Assay eine erhöhte Bildung von ROS induziert wird. Die Bestimmung der GSH- und GSSG-Konzentrationen diene zusätzlich der Untersuchung des Redox-Status der Zellen um eine Aussage bezüglich Aurofusarin-induziertem gesteigerten oxidativen Stress treffen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollten erste Erkenntnisse zur toxikologischen Charakterisierung von Aurofusarin beitragen und als Grundlage für weiterführende Untersuchungen dienen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da zum Zeitpunkt des praktischen Teils dieser Arbeit noch keine Daten zur Stabilität von Aurofusarin in Lösung, in Abhängigkeit von Temperatur und Lagerungszeitraum, zur Verfügung standen, wurden bei der Handhabung die Empfehlungen des Produzenten BioViotica Naturstoffe GmbH (Dransfeld, Deutschland) befolgt und einige zusätzliche Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Sofort nach Erhalt des Stoffes wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1 mM Aurofusarin in DMSO hergestellt - höhere Konzentrationen waren aufgrund der schlechten Löslichkeit von Aurofusarin nicht möglich. Die dabei erhaltene Menge an Lösung wurde innerhalb von maximal vier Wochen verbraucht. Um mehrmaliges Einfrieren und Auftauen zu verhindern, wurden aus dieser Stammlösung Aliquote in dunkelbraunen Reagiergefäßen hergestellt, die bei -20 °C gelagert und jeweils für eine Durchführung eines Versuchs herangezogen wurden. Sowohl bei der Herstellung der Stammlösung und der Aliquote, als auch bei der Handhabung der Verdünnungslösungen während der Versuche, wurde zusätzlich darauf geachtet unter möglichst lichtgeschützten Bedingungen zu arbeiten.

Eine erste Untersuchung der Stabilität mittels LC-MS/MS durch Jarolim *et al.* (Daten nicht veröffentlicht) ergab mittlerweile, dass es sich bei Aurofusarin um eine instabile Verbindung handelte. So erwies sich Aurofusarin, gelöst in DMSO, als stark temperatur- und lichtempfindlich und war nach einem Tag bei Raumtemperatur und Lichtexposition kaum noch in messbaren Mengen vorhanden.

4.1 Zytotoxizität

4.1.1 Bestimmung der Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschluss

Vor der Durchführung des Comet Assays in HT29 Zellen wurde die Zellviabilität mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmt, um Artefakte auszuschließen. Bei Trypanblau handelt es sich um einen anionischen Diazofarbstoff, der nur in tote oder schwer geschädigte Zellen aufgenommen wird und diese blau färbt. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff aufgrund ihrer intakten Zellmembran nicht auf und erscheinen daher farblos [STROBER, 2001]. Abbildung 4.1 zeigt die Ergebnisse des Trypanblau-Ausschluss nach einstündiger Inkubation mit Aurofusarin. Die Zellviabilität lag für die Lösungsmittelkontrolle DMSO (1 % in der Endkonzentration) sowie für alle Konzentrationen von Aurofusarin über 90 %,

bezogen auf die Gesamtzellzahl. Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle konnte für keine Konzentration ein signifikanter zytotoxischer Effekt beobachtet werden.

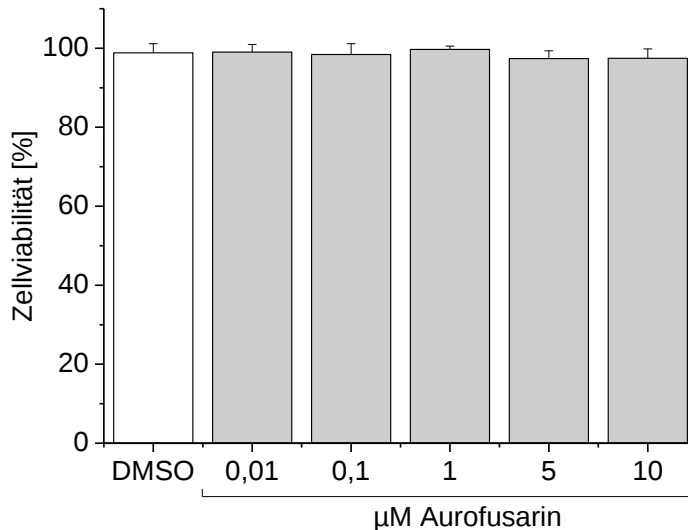


Abbildung 4.1 Bestimmung der Zellviabilität von HT29-Zellen mittels Trypanausschluss-Verfahren nach einstündiger Inkubation mit Aurofusarin bzw. der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1%) Nach Varianzanalyse mittels einfaktorieller ANOVA zeigen sich keine Signifikanzen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle; $n = 4 - 8$ unabhängige Versuche.

4.1.2 Beeinflussung der mitochondrialen Aktivität

Um ein Maß für die Zytotoxizität des Sekundärmetaboliten zu gewinnen, wurde die mitochondriale Aktivität, die nur in Zellen mit intakter mitochondrialer Atmungskette gegeben ist, mit dem WST-1 Assay bestimmt. Dabei wird das WST-1 Reagenz durch die mitochondrialen Oxidoreduktasen zum dunkelroten Farbstoff Formazan reduziert, der anschließend photometrisch bestimmt werden kann. Die Menge des Farbstoffes korreliert daher mit der Anzahl der stoffwechselaktiven Zellen.

In Abbildung 4.2 werden die Ergebnisse des WST-1 Assays dargestellt. Die Inkubation der HT29-Zellen mit Aurofusarin erfolgte für 1 h bzw. 24 h, wobei als Lösungsmittelkontrolle DMSO in einer Endkonzentration von 1% in 10% FKS-haltigem Medium diente. Nach einer Stunde zeigt sich bei keiner der Aurofusarin-Konzentrationen eine signifikante Veränderung der mitochondrialen Aktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Dies deckte sich auch mit den Ergebnissen des Trypanblau-Ausschlusses (Kapitel 4.1.1). Allerdings ließ sich bereits ab einer Konzentration von 1 µM eine leichte Verringerung der mitochondrialen Aktivität auf $97 \pm 7,6$ % der

Lösungsmittelkontrolle erkennen, die bei 5 μM ($92 \pm 8 \%$) und 10 μM ($95 \pm 7,1 \%$) noch verstärkt wurde. Nach 24 h wurde dieser Effekt noch deutlicher, weshalb für 5 μM und 10 μM eine signifikante Verringerung der mitochondrialen Aktivität auf $76 \pm 12 \%$ bzw. $70 \pm 17 \%$ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle beobachtet werden konnte.

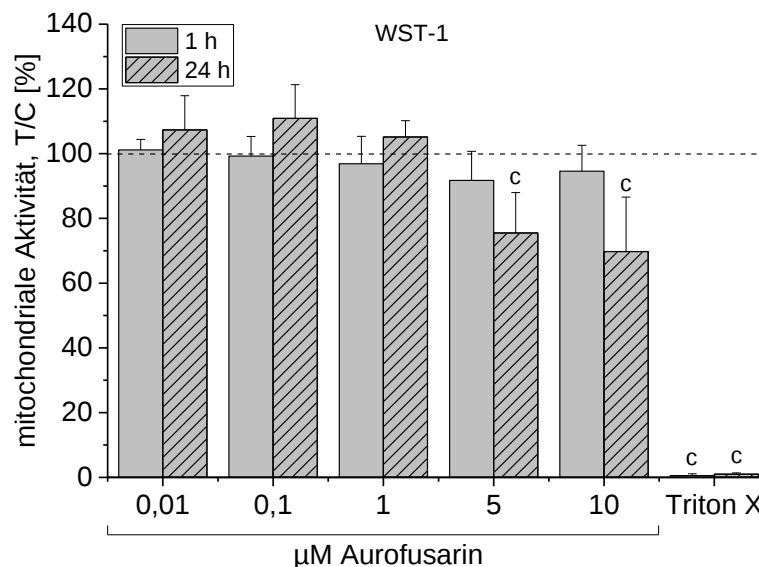


Abbildung 4.2 Bestimmung der mitochondrialen Aktivität von HT29-Zellen mittels WST-1 Assay nach 1- bzw. 24-stündiger Inkubation. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD aus mehreren unabhängigen Vielfachbestimmungen ($n=5$). Die Absorptionen der verschiedenen AURO-Konzentrationen und der Positivkontrolle Triton X wurden auf die der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1% in der Endk.) normiert. Die Signifikanzniveaus der AURO-Konzentrationen, bezogen auf das „No Observed Effect Level“ (NOEL), wurden mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für Triton X mittels Student's t-Test berechnet (a: $p<0,05$; b: $p<0,01$; c: $p<0,001$).

Was zusätzlich nach 24 h auffiel, war eine scheinbare, jedoch nicht signifikante Erhöhung der mitochondrialen Aktivität im niedrigeren Konzentrationsbereich von 0,01 - 1 μM (0,01 μM : 109 %; 0,1 μM : 110%; 1 μM : 105 %). Diese war eventuell auf Artefakte zurückzuführen, die durch die Position der Wells der jeweiligen Konzentration auf der 96-Well-Platte bedingt waren. Die Entstehung solcher Artefakte ist unter anderem für Temperaturgradienten innerhalb einer Platte, die zu unterschiedlichem Wachstum der Zellen führen können, beschrieben [LUNDHOLT et al., 2003]. Zellen, die sich in den Wells am Rand der Platte befanden, wiesen daher im Vergleich zu jenen in der Mitte zum Teil geringeres Wachstum auf. Befand sich demnach die Lösungsmittelkontrolle DMSO, auf die normiert wurde, in den Wells am Rand der Platte, wurde häufiger eine vermeintliche Erhöhung der mitochondrialen Aktivität der niedrigeren Aurofusarin-Konzentrationen in

der Mitte der Platte beobachtet. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für den Anstieg der Proliferation bei 24-stündiger Inkubation mit geringen Aurofusarin Konzentrationen wäre, dass es tatsächlich zu einem Wachstumsreiz kam. Da Aurofusarin aufgrund seiner Chinonstruktur potentiell als Redox-Cycler wirken könnte (Kapitel 2.5.1.1), könnte der Sekundärmetabolit zur Generierung von ROS beitragen. So wurde für geringe Konzentrationen von ROS bereits beschrieben, dass das Zellwachstum angeregt wurde. In hohen Konzentrationen hingegen führen ROS zur Apoptose bis hin zur Nekrose der Zellen [DAY und SUZUKI, 2005], welche hier vermutlich auch für die beobachtete Abnahme der mitochondrialen Aktivität nach Inkubation für 24 h mit 5 μ M und 10 μ M Aurofusarin verantwortlich waren.

Laut Literatur sind Napthochinone auch in der Lage direkten Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien zu nehmen. Beispielsweise stellen sich die Naphthochinone Juglon und Xanthomegnin, bei denen es sich ebenfalls um 1,4-Binaphthochinone wie Aurofusarin handelt, als Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung dar und hemmen die ATP Produktion innerhalb der Mitochondrien [KAWAI et al., 1976, SALING et al., 2011]. Zudem kann exzessive Produktion von ROS, die durch Redox-Cycling der Naphthochinone bedingt sein kann, die mitochondriale DNA schädigen und so ihre Funktion beeinträchtigen [SHOKOLENKO et al., 2009]. Darüber hinaus entzieht das Redox-Cycling der Zelle NADH (Kapitel 2.5.1.1), das als Reduktionsmittel für die Atmungskette verwendet wird. Im Falle des WST-1 Assay wird NADH aber auch für die Regeneration des Succinat-Tetrazolium Reduktase-Systems (STR-H) benötigt, das letztendlich für die Bildung von Formazan verantwortlich ist. Daher sollten bei der Beurteilung der Zytotoxizität von Naphthochinonen wie Aurofusarin weitere Ergebnisse zur Zytotoxizität, neben jenen des WST-1 Assays, berücksichtigt werden.

4.1.3 Beeinflussung der Zellproliferation

Mittels SRB Assay kann eine Beeinflussung des Zellwachstums erfasst werden. Er basiert auf der Bestimmung der Zelldichte durch Färbung des zellulären Proteins. Der Farbstoff SRB bindet dabei an die basischen Aminosäuren und kann anschließend photometrisch bestimmt werden.

In Abbildung 4.3 sind die Ergebnisse des SRB Assays dargestellt. Die Inkubation der HT29-Zellen mit Aurofusarin erfolgte über 24 h, 48 h bzw. 72 h. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 10% FKS-haltiges Medium mit 1% DMSO in der

Endkonzentration verwendet und als Positivkontrolle 1 % Triton X, ein nichtionisches Tensid.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen des WST-1 Assays zeigten auch hier die Konzentrationen 5 μM und 10 μM nach 24 h Inkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, signifikante Effekte auf die Zellen. Es kam in beiden Fällen zu einer signifikanten Reduktion des Proteingehalts auf $92 \pm 5 \%$ bzw. $79 \pm 9 \%$ der Lösungsmittelkontrolle. Ab einer Dauer von 48 h Inkubation mit Aurofusarin trat dieser Effekt bereits ab 1 μM ($78 \pm 27 \%$) auf. Für die Konzentration 5 μM sank der Proteingehalt der Zellen weiter auf $35 \pm 15 \%$ bzw. für 10 μM auf $25 \pm 11 \%$ ab. Der IC_{50} -Wert, die halbmaximale Hemmkonzentration, konnte somit nach 48 h Inkubation mit $3,1 \pm 0,31 \mu\text{M}$ berechnet werden. Nach 72 h Inkubation verringerte sich der ermittelte IC_{50} -Wert weiter auf $2,2 \pm 0,17 \mu\text{M}$, so dass bei einer Konzentration von 10 μM eine fast 90 %-ige Hemmung der Proliferation beobachtet werden kann.

Darüber hinaus wies auch beim SRB Assay, vergleichbar mit den Ergebnissen des WST-1 Assay, der Konzentrationsbereich 0,01 - 1 μM nach 24 h vermutlich auf einen Wachstumsstimulus hin. Diese Beobachtung stärkt den in 4.1.2 erläuterten Verdacht, dass Aurofusarin in geringen Konzentrationen zur Produktion von ROS beitrug.

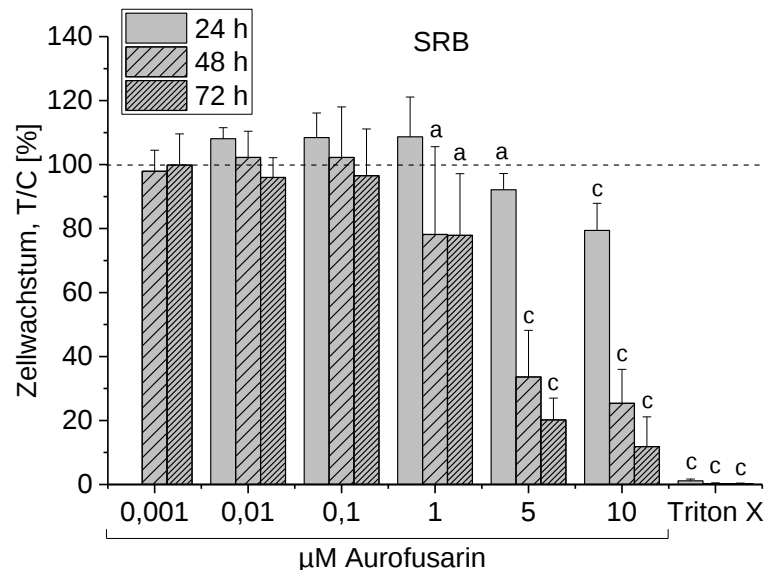


Abbildung 4.3 Beeinflussung des Zellwachstums von HT29-Zellen durch Aurofusarin nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation im SRB Assay. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD aus mehreren unabhängigen Vielfachbestimmungen ($n=4-5$). Die Absorption der verschiedenen AURO-Konzentrationen und der Positivkontrolle Triton X wurden auf die der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1% in der Endk.) normiert. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden für die AURO-Konzentrationen mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für Triton X mittels Student's *t*-Test berechnet (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Hemmung des Zellwachstums durch AURO kann theoretisch über verschiedenste Mechanismen erfolgen. Wie bereits erwähnt sind ähnliche Vertreter aus der Substanzklasse der Naphthochinone beispielsweise in der Lage als Interkalatoren (Kapitel 2.5.3) bzw. Gifte und Inhibitoren der Topoisomerase I- & II-Aktivität (Kapitel 2.5.3) zu fungieren. Da diese Enzyme essentiell für die Replikation und Transkription der DNA sind, führt eine Störung ihrer Funktion zu Zellzyklus-Arrest bis hin zur Ausbildung von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Daraus resultiert letztendlich vermindertes Wachstum bis hin zur Apoptose und Nekrose der Zellen. [KAINA, 2003]

4.2 Genotoxizität

Mit der Einzelzellgelelektrophorese oder Comet Assay wurde untersucht, ob die Inkubation mit Aurofusarin zu einer Beeinträchtigung der DNA Integrität und zur Ausbildung von Strangbrüchen in HT29 Zellen führt. Unter alkalischen Bedingungen konnten in diesem Assay zudem zusätzliche Modifikationen der DNA erfasst und durch Inkubation mit dem Enzym FPG oxidative DNA-Schäden erfasst werden. Das Enzym erkennt dabei u.a. oxidierte Basen und überführt diese in DNA-Strangbrüche, die anschließend erfasst werden können. Anhand der mittels Mikroskopauswertung ermittelten prozentualen Schweifintensität erfolgte die Abschätzung des Ausmaßes der DNA-Schäden.

Die Ergebnisse des Comet Assays nach einstündiger Inkubation sind in Abbildung 4.4 dargestellt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen vor der Aufarbeitung 1 min mit UV-Licht bestrahlt. Die nicht schraffierten Balken repräsentieren die nicht mit FPG-behandelten Proben, während die schraffierten Balken die FPG-behandelten Proben darstellen. Bei den unbehandelten Proben führte Aurofusarin in den Konzentrationen $\geq 1 \mu\text{M}$ zu einer dosisabhängigen und signifikanten Erhöhung von DNA-Strangbrüchen, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die FPG-behandelten Proben hingegen wiesen sowohl im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle, als auch mit den unbehandelten Proben, dosisabhängige, signifikante Erhöhungen von DNA-Strangbrüchen bereits ab $0,01 \mu\text{M}$ Aurofusarin auf. Die Inkubation mit Aurofusarin führte bei den Proben ohne FPG-Zusatz zu einer Erhöhung der Schweifintensität von $3,66 \pm 1,12 \%$, für die Lösungsmittelkontrolle, auf $6,11 \pm 2,41 \%$ nach Inkubation mit der höchsten eingesetzten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ Aurofusarin. Bei den FPG-behandelten Proben wurde eine Zunahme der Strangbruchrate von $4,45 \pm 1,38 \%$, für DMSO-

inkubierte Zellen, auf $8,89 \pm 2,09$ %, nach Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ Aurofusarin, gemessen. Aurofusarin wies somit in HT29 Zellen leichte, jedoch signifikante genotoxische Eigenschaften ab einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ auf.

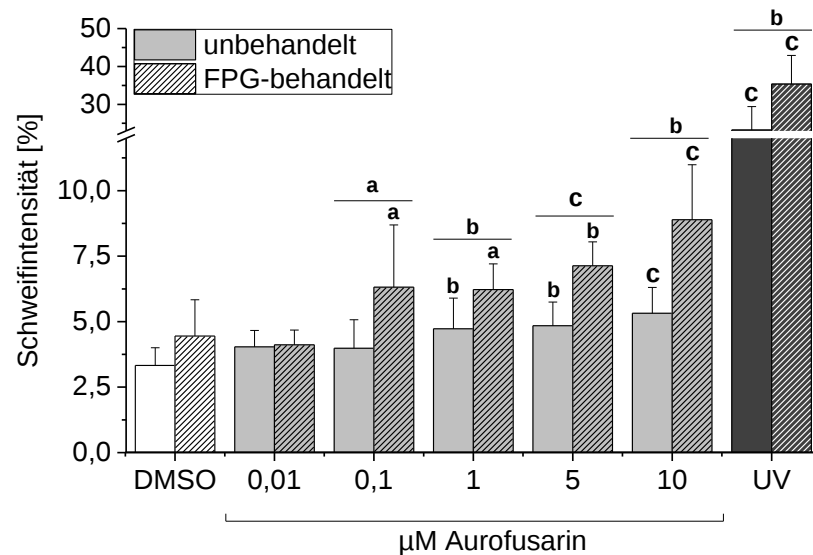


Abbildung 4.4 Erfassung von DNA-Schäden in HT29-Zellen im alkalischen Comet Assay. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD der Schweifintensitäten der unbehandelten (nicht schraffiert), sowie die der FPG-behandelten Proben (schraffiert) nach einstündiger Inkubation. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden mittels einfaktorieller ANOVA ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten Proben und behandelten Proben bzw. zwischen Lösungsmittelkontrolle DMSO und Positivkontrolle UV wurden mittels Student's t-Test berechnet. (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$, c: $p < 0,001$); $n = 4 - 8$ unabhängige Versuche.

Für Naphthochinone wurde eine Reihe an genotoxischen Eigenschaften beschrieben, wie Bildung von Radikalen, DNA-Interkalation, sowie Hemmung und Giftung der Topoisomeraseaktivität (Kapitel 2.5), die für dieses Ergebnis eine Erklärung sein können. Die signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen allerdings lieferte den ersten Hinweis darauf, dass Inkubation mit Aurofusarin zu einer verstärkten oxidativen Schädigung der DNA führte. Da Naphthochinone in der Lage sind, Redox-Cycling zu induzieren, lag die Vermutung nahe, dass diese Schädigungen auf verstärkte ROS-Bildung zurückzuführen waren. Da jedoch durch das FPG-Enzym eine Vielzahl von möglichen DNA-Basenmodifikationen erfasst werden kann, bedarf es noch weiterer Bestätigung durch andere Methoden um oxidativen Stress definitiv als Ursache zu identifizieren. Neben oxidativen Basenschäden zählen beispielsweise auch alkylierte

Basen [SPEIT et al., 2004], abasische Stellen [CASTAING et al., 1999] und DNA-Addukte wie ringgeöffnete N7-Guanin-Addukte zu den FPG-sensitiven Stellen [LI et al., 1997].

4.3 Oxidativer Stress

4.3.1 *Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies*

Da im Comet Assay eine Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen beobachtet wurde und diese auf eine oxidative Schädigung der DNA hindeuteten, sollte als nächstes untersucht werden, ob Aurofusarin zur verstärkten ROS-Bildung beitrug.

Zur Erfassung der intrazellulär gebildeten ROS wurde der Dichlorofluorescein (DCF) Assay verwendet. Im DCF Assay kommt das als Fluoreszenz-Sonde agierendes Molekül 2',7'-Dihydrodichlorofluoresceindiacetat ($H_2DCF\text{-}DA$) zum Einsatz, das nach Aufnahme in die Zelle und Abspaltung von Acetat durch intrazelluläre ROS zu DCF oxidiert wird. Der Anstieg der Fluoreszenz-Intensität kann anschließend mittels Fluoreszenzspektrometer bestimmt werden.

In Abbildung 4.5 werden die Ergebnisse des DCF Assays nach 1 h, 2 h und 3 h Inkubationszeit der HT29-Zellen mit Aurofusarin dargestellt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 1 % DMSO in 10 % FKS-haltigem Medium verwendet, worauf die Fluoreszenzintensitäten normiert wurden (= 100 %). Als Positivkontrolle diente H_2O_2 in den Konzentrationen 50 und 200 μM .

Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle DMSO induzierten nur die Konzentrationen 5 μM und 10 μM nach allen drei Inkubationszeiten einen signifikanten Anstieg der gemessenen Fluoreszenz im DCF-Assay, wobei keine signifikante Zeit- bzw. Konzentrationsabhängigkeit beobachtet wurde. Bei den Positivkontrollen H_2O_2 kommt es allerdings bei beiden Konzentrationen, 50 μM und 200 μM , bereits ab 2 h Inkubation zur Verringerung der Fluoreszenz, was sich wahrscheinlich durch die Katalase-Aktivität der Zellen erklären lässt. Die gleichbleibende Fluoreszenz nach Inkubation mit Aurofusarin über einen Zeitraum bis zu 3 h hingegen lieferte eventuell den ersten Hinweis, dass durch Redox-Cycling von Aurofusarin fortlaufend ROS generiert wurden, die durch die Zelle nicht hinreichend abgebaut werden konnten.

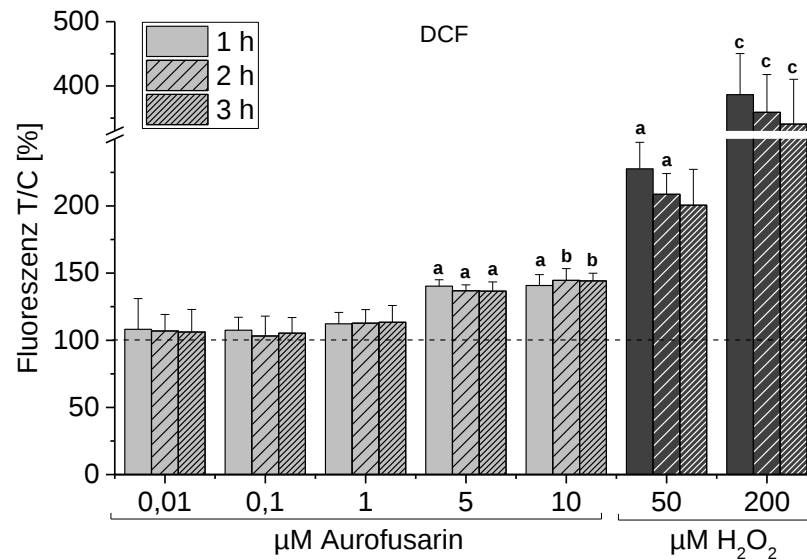


Abbildung 4.5 Ergebnisse des DCF Assays nach 1h, 2h und 3h Inkubation mit Aurofusarin in HT29-Zellen. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD aus mehreren unabhängigen Vielfachbestimmungen ($n=3$). Die Fluoreszenzen der verschiedenen AURO-Konzentrationen und der Positivkontrolle TritonX wurden auf die der Lösungsmittelkontrolle DMSO (1% in der Endk.) normiert. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden für die AURO-Konzentrationen mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für H₂O₂ mittels Student's *t*-Test berechnet (a: $p<0,05$; b: $p<0,01$; c: $p<0,001$).

Insgesamt bestätigten die Ergebnisse des DCF Assays nicht vollständig jene des Comet Assays nach FPG-Behandlung. Die signifikante Erhöhung der FPG-sensitiven Stellen wies im Comet Assay bereits ab einer Aurofusarin-Konzentration von 0,1 µM auf potentiell oxidative Schädigung von DNA-Basen hin.

Die Aussagekraft des DCF Assays ist allerdings durch eine Reihe verschiedener Faktoren, die zu Verfälschung seines Ergebnisses beitragen können, eingeschränkt. Ein Schwachpunkt des DCF Assays ist beispielsweise, dass H₂DCF zwar durch organische Hydroxyperoxide und Hydroxylradikale oxidiert wird, die Oxidation durch das Superoxidradikalanion (O₂^{•-}) allerdings nicht direkt erfolgen kann. Hierzu ist die Disproportionierung oder Umwandlung durch die Superoxiddismutase zu O₂ und H₂O₂ erforderlich. H₂O₂ kann dabei ebenfalls H₂DCF nicht direkt oxidieren und benötigt einen Katalysator wie beispielsweise Häm, Fe²⁺ oder andere Metall-Ionen [OHASHI et al., 2002]. Als sehr effektiver Katalysator wird auch Cytochrom c beschrieben. So findet selbst bei gleichbleibender Cytochrom c-Konzentration und bei einer Erhöhung der O₂^{•-}-Konzentration um das zwanzigfache keine Erhöhung der Fluoreszenz statt, während bei konstanter O₂^{•-}-Konzentration die Fluoreszenz mit Erhöhung der Cytochrom c-

Konzentration linear steigt. Erhöhte Cytochrom c-Konzentrationen von präapoptotischen oder apoptotischen Zellen können daher zur Erhöhung der Fluoreszenz im DCF-Assay führen [WARDMAN et al., 2002]. Ohne entsprechende Katalysatoren hingegen, ist es theoretisch möglich, dass sich gebildetes $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 der Messung entzieht. Da jedoch in den Zellen ausreichend katalytische Substanzen und SOD vorliegen, würden diese zu messbaren Produkten führen. Möglicherweise wird die Oxidation von H_2DCF aber auch durch die antioxidative Abwehr der Zellen verhindert. Es konnte beispielsweise nachgewiesen werden, dass das zelluläre Antioxidans GSH in der Lage ist die reaktiven Spezies abzufangen, bevor sie mit H_2DCF reagieren und so die Fluoreszenz erhöhen konnten. [JAKUBOWSKI und BARTOSZ, 2000]

Aufgrund der diversen Mechanismen, die zur Verfälschung des Ergebnisses des DCF Assays führen können, empfehlen Jakubowski und Bartosz (2000) bei erhöhter H_2DCF -Oxidation eher von erhöhtem oxidativen Stress als von höherer ROS-Bildung zu sprechen [JAKUBOWSKI und BARTOSZ, 2000]. Die Ergebnisse des DCF Assays sollten demnach nicht der direkten Quantifizierung sondern nur zur ersten Abschätzung der generierten ROS verwendet werden.

Abschließend blieb daher festzuhalten, dass der DCF Assay, nach den Ergebnissen des Comet Assays mit FPG-Inkubation, weitere Hinweise auf die vermehrte Bildung von ROS bzw. die Erhöhung von oxidativem Stress lieferte. Aufgrund der erwähnten Unsicherheiten, die mit diesem Assay verbunden waren, empfahl es sich allerdings, weitere Untersuchungen durchzuführen um eine endgültige Aussage zu treffen.

4.3.2 Beeinflussung des Glutathion-Status

Die Ergebnisse des DCF Assays sprachen dafür, dass Aurofusarin eine verstärkte ROS-Bildung induzierte und das Mykotoxin dazu in der Lage war, oxidativen Stress zu induzieren. Daher wurde der Einfluss des zellulären Redoxstatus durch Aurofusarin mittels Bestimmung des GSH bzw. GSSG Gehalts in HT29 Zellen eingehender untersucht. Die im DCF beobachtete Aurofusarin-induzierte zelluläre ROS-Bildung könnte potentiell zu einer entsprechenden Reaktion der antioxidativen Abwehr der Zelle führen. Glutathion stellt dabei das wichtigste Antioxidans dar, da es dadurch Übertragung von Elektronen oder durch Konjugationsreaktionen mit ROS und elektrophilen Verbindungen diese unschädlich machen kann. [LÖFFLER et al., 2007]

Der GSH-Assay beruht auf der Reaktion von GSH und 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) zu 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB), das photometrisch

bestimmt werden kann (Kapitel 6.7). Die Modifikation nach Tietze et al. (1969) erlaubt es zusätzlich, die oxidierte Form von Glutathion, GSSG, zu bestimmen.

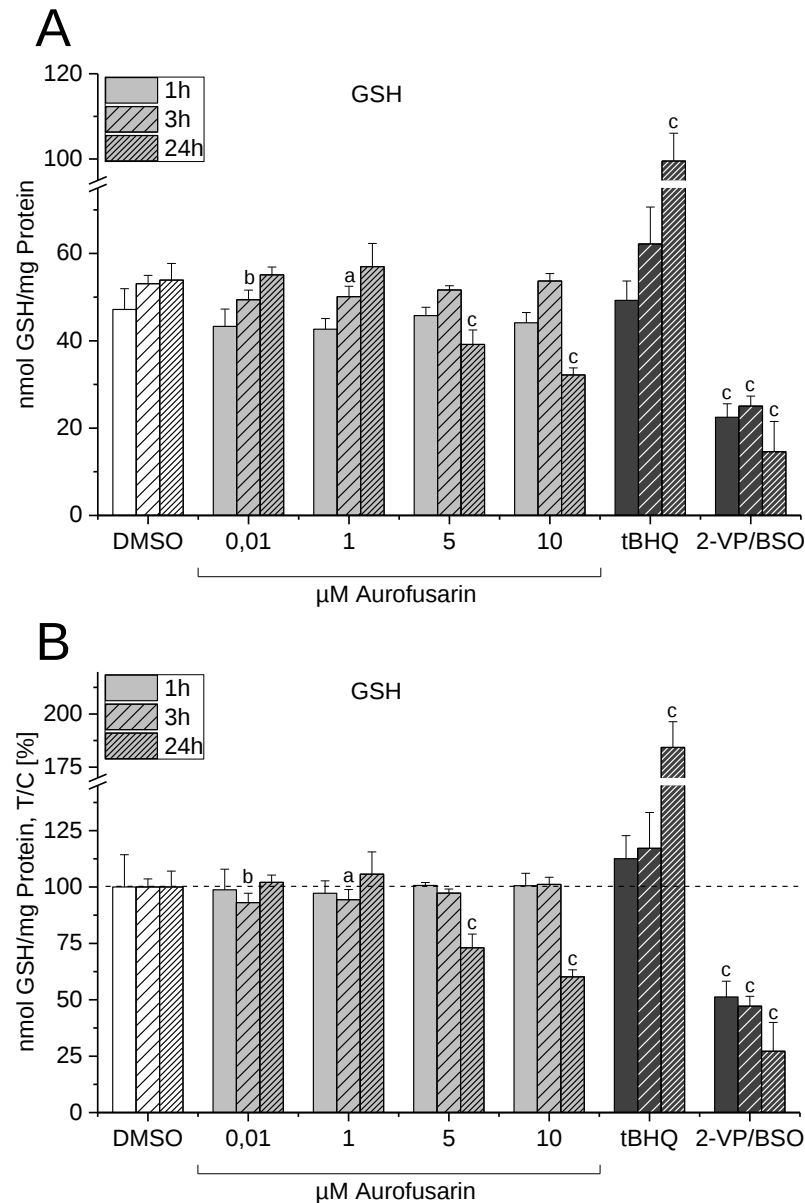


Abbildung 4.6 GSH-Bestimmung nach Tietze (1969) in HT29-Zellen nach 1-, 3- und 24-stündiger Inkubation mit AURO. Dargestellt sind **(A)** die arithmetischen Mittelwerte $\pm$ SD der GSH-Konzentrationen aus mehreren unabhängigen Vielfachbestimmungen ($n=5$) bzw. **(B)** die prozentualen GSH-Konzentrationen, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden für die AURO-Konzentrationen mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für tBHQ, 2-VP und BSO mittels Student's *t*-Test berechnet (a: $p<0,05$; b: $p<0,01$; c: $p<0,001$).

Die Inkubation der HT29 Zellen erfolgte über 1 h, 3 h bzw. 24 h. Als Positivkontrollen wurden tert. Butylhydrochinon (tBHQ) und 2-Vinylpyridin (2-VP) für die Kurzzeit-Inkubationen von 1 h und 3 h, sowie Buthioninsulfoximin (BSO) für die Langzeitinkubation von 24 h verwendet, da 2-VP nach 24 h zytotoxisch wirkt. Dabei erhöht tBHQ über die Aktivierung von Nrf2 die GSH Konzentration [LIU et al., 1996] während 2-VP diese durch Komplexbildung mit GSH [TIETZE, 1969] und BSO durch irreversible Hemmung der γ -Glutamylcystein-Synthetase und damit der Neusynthese von GSH, senkt [MARENGO et al., 2008].

Abbildung 4.6 A zeigt die ermittelten GSH-Konzentrationen nach 1 h, 3 h und 24 h Inkubation mit Aurofusarin in den Konzentrationen 0,1 - 10 μ M, bezogen auf die jeweilige Proteinmenge. Nach einstündiger Inkubation mit AURO zeigt sich für keine Konzentration ein signifikanter Effekt. Ab einer Inkubationsdauer von 3 h hingegen fand eine leichte, jedoch signifikante Reduktion von GSH im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($53,08 \pm 1,94$ nmol/mg Protein) bereits für die Konzentrationen 0,01 μ M ($49,42 \pm 2,21$ nmol/mg Protein) und 1 μ M ($50,12 \pm 2,36$ nmol/mg Protein) statt, die allerdings bei den beiden höheren Konzentrationen, 5 μ M und 10 μ M, nicht mehr beobachtet werden konnte. Zur stärksten Reduktion von GSH kam es nach 24 h Inkubation mit den Konzentrationen 5 μ M ($32,17 \pm 1,62$ nmol/mg Protein) und 10 μ M ($14,59 \pm 6,93$ nmol/mg Protein) auf 73 ± 6 % bzw. 60 ± 3 % der Lösungsmittelkontrolle DMSO (Abbildung 4.6 B).

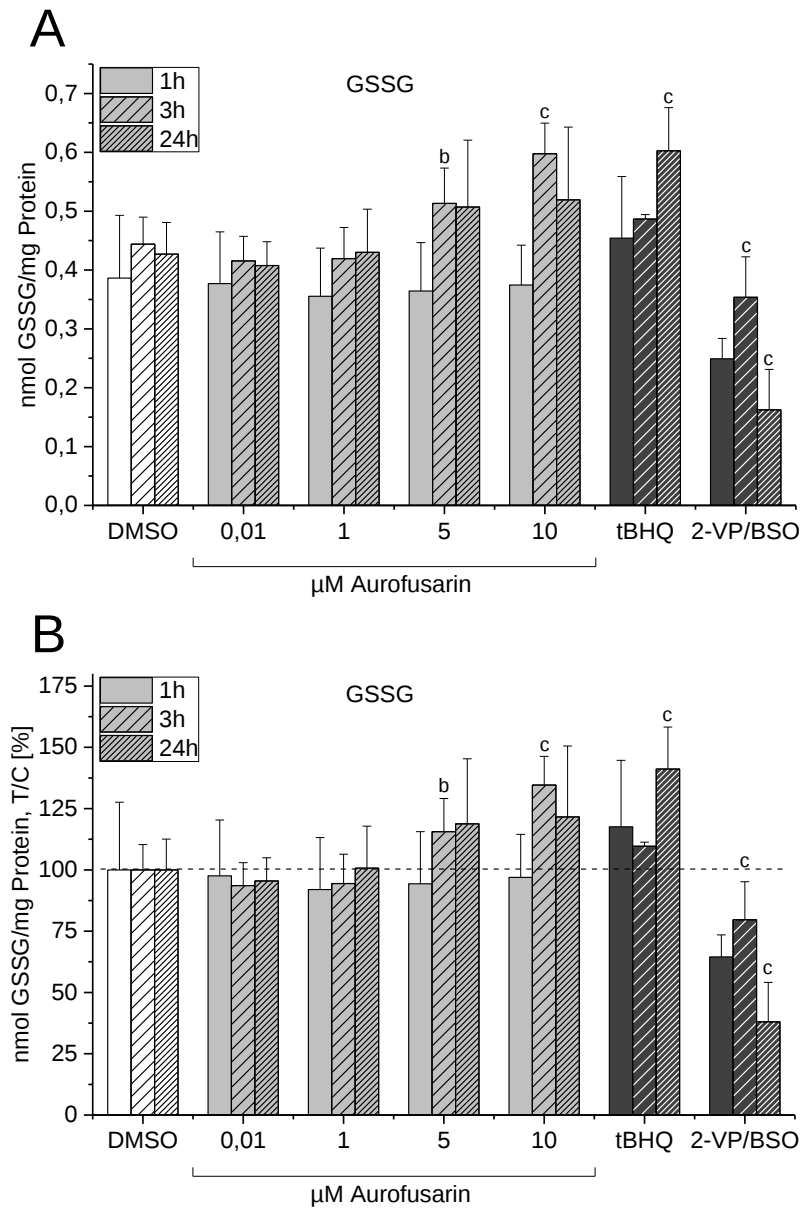


Abbildung 4.7 GSSG-Bestimmung nach Tietze (1969) in HT29-Zellen nach 1-, 3- und 24-stündiger Inkubation mit AURO. Dargestellt sind **(A)** die arithmetischen Mittelwerte der GSSG-Konzentrationen $\pm$ SD aus mehreren unabhängigen Vielfachbestimmungen ($n=4-5$) bzw. **(B)** die prozentualen GSSG-Konzentrationen, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden für die AURO-Konzentrationen mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für tBHQ, 2-VP und BSO mittels Student's *t*-Test berechnet (a: $p<0,05$; b: $p<0,01$; c: $p<0,001$).

In Abbildung 4.8 werden die GSSG-Konzentrationen der verschiedenen Inkubationszeiten dargestellt. Ebenfalls ab 3 h bzw. 24 h zeigte sich eine Veränderung des GSSG-Status. So kam es bei beiden Zeiten zu einer dosisabhängigen Erhöhung der

GSSG-Konzentrationen, die sich allerdings nur bei dreistündiger Inkubation als signifikant herausstellte.

Bei Vergleich der Ergebnisse der GSH-Bestimmung mit jenen der GSSG-Bestimmung, fiel nach der dreistündigen Inkubation auf, dass es zwar bei den Konzentrationen 0,1 μM und 1 μM bereits zu einer signifikanten GSH-Abnahme kam, diese allerdings nicht mit einem Anstieg der GSSG-Konzentration einherging. Dies ließe sich eventuell dadurch erklären, dass GSH durch Konjugationsreaktionen der Zelle entzogen wurde und aufgrund der geringen Abnahme noch keine Neusynthese von GSH stattfand. Die erhöhte GSSG-Bildung nach Inkubation mit den Konzentrationen 5 μM und 10 μM Aurofusarin hingegen wies sowohl nach 3 h als auch 24 h auf eine verstärkte Oxidation von GSH und damit vermutlich auf erhöhte ROS-Bildung hin. Im Gegensatz zur dreistündigen Inkubation ließ sich zudem nach 24 h eine signifikante GSH-Abnahme, ebenfalls für die Konzentrationen 5 μM und 10 μM , beobachten. Eine mögliche Ursache dafür stellte die verstärkte Oxidation und Konjugation von GSH dar, die durch GSR-Aktivität und Neusynthese nicht mehr hinreichend kompensiert werden konnte. Mit Blick auf die Zytotoxizität könnte diese verminderte Fähigkeit der Detoxifizierung eine Erklärung für die Ergebnisse des WST-1 und SRB Assays darstellen. Bei beiden Assays konnte ebenfalls nach 24 h für die Konzentrationen 5 μM und 10 μM eine verminderte mitochondriale Aktivität (Kapitel 4.1.2) bzw. Proliferation der Zellen (Kapitel 4.1.3) festgestellt werden.

Um die Ergebnisse der GSH- und GSSG-Bestimmung zu kombinieren und so eine abschließende Beurteilung des Redoxstatus der Zelle zu vereinfachen, wurde zusätzlich das Verhältnis von oxidiertem Glutathion zu reduziertem Glutathion berechnet (GSSG/GSH). Man erhält so einen Biomarker für das Redoxgleichgewicht und somit einen Indikator für oxidativen Stress [NEMETH und BODA, 1989, SENTELLAS et al., 2014]. In Abbildung 4.8 sind die berechneten GSSG/GSH-Verhältnisse in Prozent dargestellt. Wie bereits die Ergebnisse der GSH- und GSSG-Bestimmung vermuten ließen, kam es im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($0,84 \pm 0,07 \%$) ab einer Inkubationszeit von 3 h und einer AURO-Konzentration von 5 μM zu einem signifikanten Anstieg des GSSG/GSH-Verhältnisses auf $0,98 \pm 0,11 \%$. Bei einer Konzentration von 10 μM fand eine weitere Erhöhung auf $1,14 \pm 0,08 \%$ statt. Der stärkste Anstieg wurde allerdings nach 24 h ebenfalls für die Konzentrationen 5 μM und 10 μM zu beobachten. So kam es bei 10 μM im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ($0,79 \pm 0,1 \%$) zu einer Verdopplung des GSSG/GSH-Verhältnisses auf $1,61 \pm 0,35 \%$.

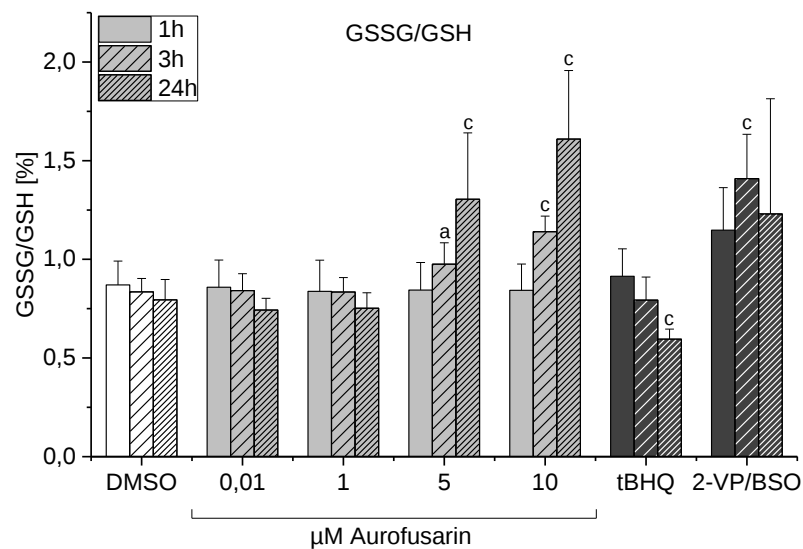


Abbildung 4.8 GSSG/GSH-Verhältnisse in HT29-Zellen nach 1-, 3- und 24- stündiger Inkubation mit AURO in Prozent. Dargestellt sind die arithmetischen Mittelwerte der GSSG/GSH-Verhältnisse $\pm$ SD. Die Signifikanzniveaus, bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO, wurden für die AURO-Konzentrationen mittels einfaktorieller ANOVA bzw. für tBHQ, 2-VP und BSO mittels Student's t-Test berechnet (a: $p < 0,05$; b: $p < 0,01$; c: $p < 0,001$).

Die Ergebnisse der Untersuchung des GSH-Status ließen sich mit den Ergebnissen zur ROS-Induktion des DCF Assays erklären. Die signifikant erhöhte Bildung von ROS, die Mittels DCF-Assay beobachtet wurde, führte im selben Konzentrationsbereich von 5 μ M und 10 μ M AURO bereits nach 3 h zu einer vermehrten Oxidation von GSH. Der Anstieg des GSSG/GSH-Verhältnisses, der aus Abnahme von GSH in Verbindung mit Zunahme von GSSG resultierte, bestätigte letztendlich, dass Aurofusarin ab einer Inkubationszeit von 3 h und einer Konzentration von 5 μ M zu erhöhtem oxidativen Stress der Zellen führt.

Die erhöhte DNA-Schädigung nach Inkubation mit Aurofusarin-Konzentrationen $< 5 \mu$ M, die in Form von FPG-sensitiven Stellen im Comet-Assay detektiert wurde, konnte somit weder durch erhöhten oxidativen Stress im DCF Assay, noch im GSH Assay, erklärt werden. In beiden Assays ließ sich erst ab 5 μ M Aurofusarin eine signifikante Steigerung des oxidativen Stresses beobachten. Als mögliche Erklärung für die FPG-sensitiven Stellen bei niedrigeren Konzentrationen dient die Tatsache, dass durch das FPG-Enzym nicht allein oxidative DNA-Schäden entdeckt werden, sondern auch verschiedene DNA-Addukte, die zur Ausbildung sensibler Stellen führen können [Li et al., 1997, SPEIT et al., 2004]. Solche DNA-Addukte wurden beispielsweise für Aflatoxine beobachtet

[CARVAJAL, 2008], konnten aber auch bereits für Naphthochinone nachgewiesen werden [SAEED et al., 2007].

5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNG

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen durchgeführt, die die Grundlage für eine toxikologische Charakterisierung des bis dato kaum beschriebenen *Fusarium* Sekundärmetaboliten Aurofusarin bilden sollten. Besonderer Fokus wurde dabei auf die Rolle von Aurofusarin als möglichem Redox-Cycler und die damit verbundenen zytotoxischen und genotoxischen Effekte gelegt. Als *in-vitro* Testmodell wurde die humane Adenokarzinom-Zelllinie HT29 ausgewählt.

Zytotoxische Effekte, die bereits durch Vejdovszky *et al.* (2016) für die kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie Caco-2 beschrieben wurden, konnten in der vorliegenden Arbeit auch in HT29-Zellen beobachtet werden. Nach 24 h Inkubation konnte allerdings im Vergleich zu Caco-2-Zellen in HT29-Zellen bereits ab 5 μM Aurofusarin eine signifikante Abnahme der mitochondrialen Aktivität im WST-1 Assay festgestellt werden. Im SRB Assay ließ sich für Aurofusarin ebenfalls nach 24 h im selben Konzentrationsbereich eine signifikante Reduktion der Zellproliferation beobachten. Nach 48 h Inkubation ließ sich der IC_{50} -Wert, die halbmaximale Hemmkonzentration, mit $3,1 \pm 0,3 \mu\text{M}$ Aurofusarin berechnen und verringerte sich nach 72 h weiter auf $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Nach 72 h und einer Konzentration von 10 μM wurde die Proliferation der Zellen schließlich zu ca. 90 % gehemmt.

Die Messung des genotoxischen Potentials von Aurofusarin mittels Comet Assay zeigte eine konzentrationsabhängige DNA-schädigende Wirkung bereits nach 1 h Inkubation, im Konzentrationsbereich von 1 μM bis zur maximal eingesetzten Konzentration von 10 μM . Bei Zugabe von FPG konnte bereits ab 0,1 μM Aurofusarin eine signifikante Zunahme der DNA-Strangbrüche beobachtet werden, ein potentiell Indiz für oxidative Schädigung der DNA-Basen.

Zur eingehenderen Untersuchung des zellulären Redoxstatus wurde der Einfluss von Aurofusarin auf den intrazellulären ROS-Spiegel im Dichlorofluorescein Assay geprüft. Bereits nach 1 h Inkubation der HT29 Zellen mit 5 μM Aurofusarin zeigte sich eine signifikante Zunahme der gemessenen Fluoreszenz, die eine Erhöhung des ROS-Spiegels vermuten ließ. Die Bestimmung des zellulären Antioxidans GSH ergab im selben Konzentrationsbereich eine verstärkte Oxidation von Glutathion zum Disulfid GSSG, bei gleichzeitiger Abnahme der reduzierten Form GSH, vermutlich zurückzuführen auf erhöhten oxidativen Stress der Zelle.

Bei Konzentrationen unter 5 μM Aurofusarin gaben allerdings der Anstieg der FPG-vermittelten DNA-Strangbrüche im Comet Assay, die vermuteten Wachstumsstimuli im

WST-1 und SRB Assay, sowie die signifikante GSH-Abnahme nach 3 h Grund zur Annahme, dass auch bei diesen niedrigeren Konzentrationen, unter 5 μM Aurofusarin, geringe Mengen an ROS gebildet wurden.

Aurofusarin induzierte im DCF Assay demnach oxidativen Stress in HT29 Zellen, möglicherweise durch Redox-Cycling, ein Mechanismus, der für chinoide Verbindungen beschrieben wurde. In weiterer Folge führte der beobachtete oxidative Stress vermutlich zu den, ebenfalls in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen, zytotoxischen und genotoxischen Eigenschaften von Aurofusarin. Die Ergebnisse des Comet Assays ließen allerdings vermuten, dass nicht nur oxidativer Stress für die genotoxischen Effekte verantwortlich war. So wurde nur für Konzentrationen $\geq 5 \mu\text{M}$ eine Erhöhung des intrazellulären ROS-Spiegels im DCF Assay festgestellt, während DNA-Strangbrüche im Comet Assay schon ab 0,1 μM beobachtet werden konnten. Für Naphthochinone, zu denen Aurofusarin zählt, ist die Induktion von DNA-Strangbrüchen über verschiedene Mechanismen beschrieben. Dazu zählen unter anderem die direkte Interaktion mit der DNA durch Interkalation oder die katalytische Hemmung und Giftung der Topoisomerase-Aktivität. Der FPG-vermittelte Anstieg von DNA-Strangbrüchen in HT29 Zellen wurde ab einer Aurofusarin-Konzentration von 0,1 μM beobachtet, wohingegen erhöhter oxidativer Stress im DCF Assay erst ab 5 μM beobachtet wurde. Diese Ergebnisse legen den Rückschluss nah, dass die beobachteten FPG-sensitiven Stellen möglicherweise nicht durch oxidative DNA-Schäden bedingt waren, sondern, dass beispielsweise die Bildung von DNA-Addukten für die beobachteten Effekte eine Rolle spielt.

Darüber hinaus ergab eine erste Untersuchung der Stabilität mittels LC-MS/MS durch Jarolim *et al.* (Daten nicht veröffentlicht), dass es sich bei Aurofusarin um eine instabile Verbindung handelte. So erwies sich Aurofusarin, gelöst in DMSO, als stark temperatur- und lichtempfindlich und war nach einem Tag bei Raumtemperatur und Lichtexposition kaum noch in messbaren Mengen vorhanden. Da selbst bei Inkubationszeiten von 72 h bei 37 °C im SRB Assay noch starke zytotoxische Effekte beobachtet werden konnten, ergab sich die Frage, ob eventuell Abbauprodukte von Aurofusarin zumindest zu der beobachteten Zytotoxizität beitragen.

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Arbeit lässt sich zusammenfassend feststellen, dass Aurofusarin wegen seines ubiquitären Vorkommens in den wichtigsten Rohstoffen der Futter- und Lebensmittelproduktion, sowie aufgrund der in der vorliegenden Arbeit beobachteten toxikologisch relevanten Eigenschaften, zur Charakterisierung als Mykotoxin in Betracht gezogen werden sollte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zur begrenzten Datenlage für die toxikologische Charakterisierung von Aurofusarin und sollen für zukünftige Untersuchungen als Anknüpfungspunkt dienen.

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Chemikalien und Geräte

6.1.1 Chemikalien

Albumin Fraktion V (Bovines Serum-Albumin)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Zertifizierte niedrig schmelzende Agarose (LMA)	Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H. Kalifornien, USA
Zertifizierte molekularbiologische Agarose (NMA)	Bio-Rad Laboratories Ges.m.b.H. Kalifornien, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2PO_4)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Essigsäure	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Ethanol, vergällt	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid-Lösung in Wasser 10 mg/ml	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamin-tetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Dikaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
FPG Enzym	New England BioLabs Inc., Ipswich
Glycerin ROTIPURAN ®	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
HEPES PUFFERAN	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydroxid-Plätzchen (KOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
NADPH	Cayman Chemical, Michigan, USA
N-Laurylsarcosin sodium salt	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Salzsäure 37 %	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe

Sulforhodamin B Natriumsalz (SRB)	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Sulfosalicylsäure (SSA)	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl-)aminomethan	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
WST-1 Zell Proliferation Assay Kit	Roche Applied Science, Basel, CH

6.1.2 Testsubstanz

Aurofusarin	Bioviotica GmbH, Dransfeld
--------------------	----------------------------

6.1.3 Zellkultur

Dulbeccos Modified Eagle's Medium (DMEM) mit Phenolrot, 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin	Gibco by Life Technologies, Carlsbad, USA
Humane Kolonkarzinomzelle HT29	DSMZ, Braunschweig
Fötales Kälberserum (FKS)	Invitrogen Life Technologies, USA
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, St. USA
Trypanblau-Lösung	Sigma Aldrich Chemie GmbH, St. USA
Trypsin (Rinderpankreas, 3,6 U/mg)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe

6.1.4 Verbrauchsmaterialien

96-well Platte, steril	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht
Combitips (10 µl, 50 µl, 100 µl, 250 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläschen 24 x 24 mm	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Dispenser-Tips, Combitips® für Multipette® 4780	Eppendorf AG, Hamburg

Duranflaschen (100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l 2 l)	Schott AG, Mainz
Mirko-Reagiergefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, 5 ml)	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht
Objektträger geschnitten, einseitig, ganz mattiert	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
Objektträger	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Pasteurpipetten (Glas)	Carl Roth GmbH& Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen, unsteril (10 µM, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen, unsteril (5 ml)	VWR Österreich, Wien
Reagiergefäße (15 ml, 50 ml)	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht
Sterile Einwegpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht
Sterilfilter und Flasche (0,5 l)	VWR Österreich, Wien
Zellkulturflaschen (75 cm², 175 cm²)	Sarstedt AG& Co., Nümbrecht

6.1.5 Geräte

Autoklav	Systec DX-150, Systec GmbH, Weitenberg
Brutschränke	WTB-Binder CO2-Brutschrank, Binder, Tuttlingen Heracell 240 i, CO2-Inkubator, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eismaschine	MF 46, Scotsman Frimont, Mailand
Kühl- /Gefrierschränke / -80 °C Ultratiefkühlschränke	Liebherr Premium und Comfort (4°C, -80 °C Ultratiefkühlschränke -20 °C), Liebherr, Bulle, CH
Magnetrührer	IKA® RCT basic safety control, IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Mehrkanalpipetten	Research plus 300 µl, Eppendorf AG, Hamburg

Mikroskopie	Durchlicht-/Fluoreszenzmikroskop Axioskop A1, Zeiss, Oberkochen Objektive: Plan-Neoflux 100 x/ 1,3 (Öl) 4440480 Okular: PL 10 x/ 20 Filter: 365 FT 395, LP 420; UV: BP450-490, FT 510, LP 520
Mikrotiterplattenlesegerät	Victor V3 14200 Multilable Counter, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA Software: Wallac 1420, Version 3.00 Cytation 3 Imaging Multi-Mode Reader, Biotek, USA Software: Gen5
Multisteppipette	Rainin Auto Rep.M, Mettler Toledo, Greifensee, CH
Neubauer Zählkammer	Labor Optik GmbH, Lancing, UK
pH-Meter	Mettler Toledo Seven Easy, Elektrode: Mettler Toledo, Inlab 408/120, Mettler Toledo, Greifensee, CH
Pipetten	Eppendorf Research P 2,5 – 5000 µl
Pipettierhilfe	Pipetus® Akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pumpen	Vacuum Aspiration System, Ditabis, Pforzheim Vakuumsaugpumpe Laboport®, IBS Integra Biosciences, Fernwald
Sterilbank	Hera Safe KS 18, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA Hera Safe KSP 18, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Trockenschrank	Binder, ATP Line™ ED (E2), Binder GmbH, Tuttlingen Ultra-low temperature freezer, MDF- U53V, VIP series, Sanyo electric Co, Ltd; Moriguchi, Präfektur Ōsaka, JPN
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner, VWR Österreich, Wien

Vortexer	Vortexer, lab dancer S40, VWR Deutschland, Darmstadt
Waagen	New Classic MF, ML204/01& ML6001/01, Mettler Toledo, Greifensee, CH DeltaRange Microbalance, XP26, Mettler Toledo, Greifensee, CH
Wasserbad	GD 100, Grant Instruments, Cambridge, UK
Zentrifugen	Avanti J-26-XP, Beckman Coulter, USA Mikro 220, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

6.2 Zellkultur

Bei der Zelllinie HT29 handelt es sich um Zellen eines humanen Adenokarzinoms, die aus dem Primärtumor einer 44 Jahre alten, kaukasischen Frau im Jahr 1964 entnommen wurden. Die Zellen wachsen dabei adhärent und epithelartig in Monolayern oder in größeren Kolonien und besitzen eine Verdopplungszeit von etwa 20 bis 60 Stunden. [DSMZ, Braunschweig]

6.2.1 Kultivierung

Notwendig für die Kultivierung von Zellen ist die Verwendung eines geeigneten Kulturmediums, das alle für das Überleben der Zellen essentiellen Substanzen beinhaltet. Im Fall von HT29 kommt Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) zum Einsatz, das unter anderem anorganische Salze, Vitamine, Glukose und Aminosäuren enthält. Ebenfalls enthalten ist der Indikator Phenolrot, der einen durch die Stoffwechselprodukte des Zellmetabolismus bedingten Abfall des pH-Wertes durch einen Farbwechsel von Rot zu Orange/Gelb anzeigt. Der Zusatz von notwendigen Wachstumsfaktoren erfolgt durch Zugabe von 10 % hitzeinaktiviertem, fötalem Kälberserum (FKS). Zur Vermeidung von Bakterienbefall werden außerdem Antibiotika in Form von 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S - 10.000 Einheiten/10.000 µg/ml) zugesetzt. Diese Zusammensetzung (10% FKS, 1% P/S) wird als komplettes Medium bezeichnet.

Je nach Größe der Kulturflasche (75 bzw. 175 cm² Wachstumsfläche) werden die Zellen in 20 bzw. 40 ml komplettem Medium als Monolayer bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 %

relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei wird das Medium vor Gebrauch auf 37 °C vorgewärmt und alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank durchgeführt.

6.2.2 Wechsel des Kulturmediums

Um ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen zu garantieren, muss regelmäßig das Kulturmedium gewechselt werden. Ausscheidungsprodukte, die aufgrund des Stoffwechsels der Zellen anfallen, senken den pH Wert des Mediums und werden durch den Farbumschlag des Indikators Phenolrot von Rot zu Gelb angezeigt. Außerdem werden dem Medium Nährstoffe entzogen, die ersetzt werden müssen. Je nach Zelldichte und ob nicht ohnehin passagiert werden muss, sollte das Medium alle 2 bis 4 Tage gewechselt werden. Dazu wird das alte Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und durch eine entsprechende Menge an frischem Medium ersetzt.

6.2.3 Subkultivierung

Da die Zellen ab einer Konfluenz von 100 % beginnen in Poly Layern zu wachsen und in weiterer Folge absterben oder ihre physiologischen Eigenschaften verändern, ist eine rechtzeitige Subkultivierung bei einer Konfluenz zwischen 70 und 80 % notwendig. Das Kulturmedium wird dazu mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen anschließend mit etwa 10 ml PBS gewaschen, um Reste des Mediums, Stoffwechselprodukte der Zellen und tote Zellen zu entfernen. Das PBS wird ebenfalls abgesaugt und der Zellrasen, je nach Größe der Kulturflasche, mit 1,5 - 3 ml Trypsin gleichmäßig bedeckt und für etwa 2 - 3 min im Inkubator bei 37 °C abtrypsinisiert. Der Zellrasen löst sich im Anschluss entweder selbstständig oder kann durch leichtes Klopfen gelöst werden. Durch Zugabe von 10 ml Kulturmedium mit 10% FKS wird die Trypsinierung gestoppt und eine Schädigung der Zellmembranen durch das Trypsin verhindert. Mehrfaches Resuspendieren und Spülen des Flaschenbodens löst zum einen eventuelle Reste des Zellrasens in der Flasche und sorgt für eine Vereinzelung der Zellen.

6.2.4 Bestimmung von Zellzahl und -viabilität

Um eine geeignete Zellzahl für die Subkultivierung und für Inkubationsansätze zu gewährleisten, muss die Anzahl der Zellen in der Zell-Suspension bekannt sein. Mit Hilfe

einer Neubauer Zählkammer kann diese mikroskopisch bestimmt werden. Sie besteht aus einer Glasplatte, die durch ein eingefrästes Zählgitter in neun Quadrate unterteilt ist. Zur Ermittlung der Zellzahl werden allerdings nur die vier äußeren Quadrate des Zählgitters verwendet (Abbildung 6.1). Die Kammer wird vorbereitet, indem ein Deckglas mit etwas Druck aufgesetzt wird, bis an den Rändern Newton'sche Ringe sichtbar sind. Der Kapillarraum zwischen Deckglas und Kammer beträgt so bei jeder Auszählung genau 0,1 mm. Da jedes Quadrat eine Fläche von 1 mm² besitzt, beträgt das Volumen pro Quadrat so folglich 1 µl.

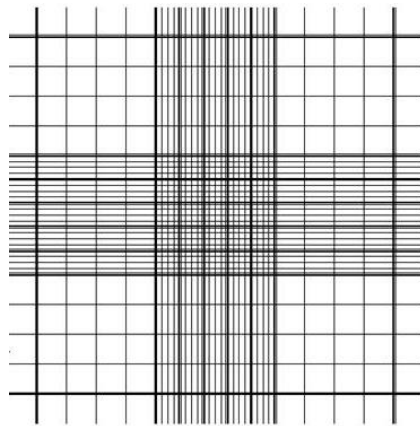


Abbildung 6.1 Zählgitter einer Neubauer Zählkammer. [Zaehlkammer.de]

Nach der Abtrypsinierung werden 20 µl der Zellsuspension mit einer bestimmten Menge Trypanblau (z.B. mit 180 µl, entspricht Verhältnis von 1:10) versetzt. 10 µl dieses Gemischs werden zwischen Deckglas und Zählkammer auf das Zählgitter pipettiert. Unter dem Mikroskop können nun die Zellen in den vier äußeren Quadraten ausgezählt werden. Durch Multiplikation des Mittelwertes der vier Quadrate mit 10.000 erhält man die Zellzahl pro ml Zellsuspension.

Da Trypanblau ein Farbstoff ist, der die intakte Zellmembran einer lebenden Zelle nicht passieren kann, ist eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen anhand der Färbung möglich. Tote Zellen erscheinen dabei blau gefärbt, während lebende Zellen farblos sind. Der Anteil der lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl wird dabei als Viabilität bezeichnet, die sich wie folgt berechnen lässt:

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \frac{\text{Anzahl lebende Zellen}}{\text{Anzahl lebende} + \text{Anzahl tote Zellen}} \times 100$$

6.2.5 Anlegen von Stocks

Die adhärennten Zellen werden abtrypsiniert und 1 ml der Zellsuspension mit etwa 1×10^6 Zellen mit 500 µl einer 3 zu 7 Mischung aus FKS/DMSO in einem Kryoröhrchen vereinigt. DMSO dient dabei als Kryoprotektivum, das zum einen die Kristallisation von Wasser und damit verbundene Schädigung der Zellmembranen, sowie die Dehydratation des Zytoplasmas verhindert. Dabei ist zu beachten, dass DMSO in der eingesetzten Konzentration toxisch wirkt und alle folgenden Arbeitsschritte zügig erfolgen sollten. Zunächst wird das Kryoröhrchen bei -20 °C für 24 Stunden eingefroren. Anschließend erfolgt die Lagerung bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

6.2.6 In Kulturnahme von Stocks

Die gefrorenen Zellstocks werden vorerst unter Schwenken im Wasserbad bei 37 °C angetaut und zügig an einer Sterilbank in 5 ml Medium mit 20 % FKS resuspendiert. Die für die Zellen ursprünglich toxische DMSO-Konzentration von 10 % wird so auf etwa 1 % gesenkt. Um die Zellen weitestgehend vom DMSO zu befreien, wird die Zellsuspension bei 130 g für 4 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird anschließend wieder in 5 ml Medium mit 20 % FKS resuspendiert und in einer kleinen Kulturflasche (25 cm²) bis zur nächsten Passage unter normalen Kulturbedingungen kultiviert. Sobald Zellzahl und Zelldichte hoch genug sind und sich die Zellen geteilt haben, kann wieder auf größere Kulturflaschen und Medium mit 10 % FKS umgestellt werden.

Verwendete Reagenzien

PBS 10x	1710 mM NaCl
	100 mM Na ₂ HPO ₄
	34 mM KCl
	18 mM KH ₂ PO ₄
	pH 7,4; mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen
PBS 1x	PBS 10x 1:10 verdünnen
Trypsin	500 mg Trypsin
	100 ml PBS 10x
	mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen
	über Nacht auf Eis rühren

	pH 7,0 - 7,4 Sterilfiltrieren (Porengröße: 0,22 µm) Lagerung bei -20 °C
Trypanblaulösung	Sigma-Aldrich, München

6.3 Comet Assay

Beim Comet Assay handelt es sich um eine Einzelzellgelelektrophorese mit der es möglich ist DNA-Strangbrüche und eine damit verbundene Schädigung der DNA festzustellen. Solche DNA-Schäden können entweder direkt durch chemische Substanzen und physikalische Einflüsse oder indirekt durch DNA-Reparaturdefekte entstehen. Erstmals wurde die Methode von Östling und Johanson im Jahr 1984 publiziert. Grundsätzlich beruht sie darauf, dass negativ geladene DNA im elektrischen Feld zur Anode wandert. Dazu werden die Zellen in Agarose eingebettet, lysiert und anschließend einer Elektrophorese unterzogen. Aufgrund ihrer Größe kann intakte DNA nicht in die umliegende Agarose zu migrieren, während ihre Bruchstücke dazu in der Lage sind. Um die DNA, sowie die Bruchstücke detektierbar zu machen, werden sie mit dem Farbstoff Ethidiumbromid (10 µg/ml) gefärbt. Dabei handelt es sich um einen roten Phenandridinfarbstoff, dessen Fluoreszenzemission durch Interkalation um das 50- bis 100-fache verstärkt wird. Durch die Fluoreszenz der DNA im Kern, sowie die der DNA-Bruchstücke, die zur Anode wandern, ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei einem Kometen mit Schweif (Abbildung 6.2) [OSTLING und JOHANSON, 1984]. Die Detektion und Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop in Verbindung mit einer computergestützten Software, die die Fluoreszenzintensität des Kerns mit der des Schweifes in Verhältnis setzt (Tail Intensity).

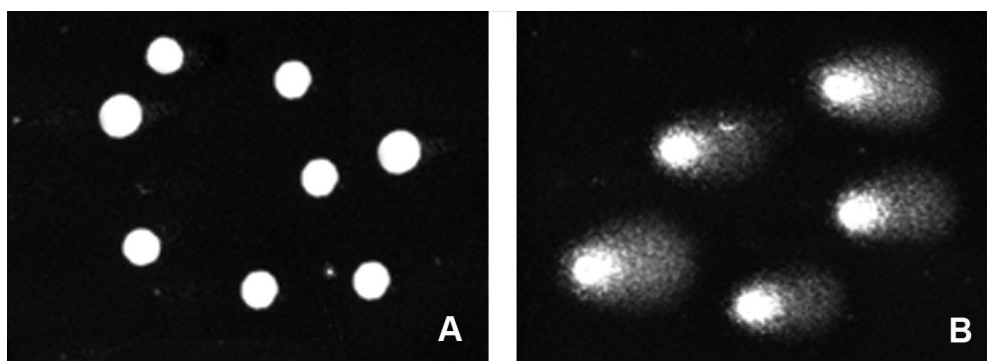


Abbildung 6.2 A: HT29 Zellen nach Inkubation mit DMSO Kontrolle; B: HT29 Zellen nach UV Bestrahlung.

Eine Durchführung der Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen erlaubt es zusätzliche DNA Modifikationen zu erfassen. So können neben DNA-Doppelstrangbrüchen auch DNA-Einzelstrangbrüche, alkalisensitive Stellen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Querverbindungen sowie durch Reparatur verursachte Einzelstrangbrüche erfasst werden. [SINGH et al., 1988] Oxidative DNA-Schäden können mit zusätzlicher Inkubation mit dem DNA-Reparaturenzym Formamidopyrimidin-DNA-glykolase (FPG) detektierbar gemacht werden. Das Enzym erkennt dabei geschädigte DNA-Basen und schneidet diese aus, was in zusätzlichen DNA-Strangbrüchen resultiert. [SPEIT et al., 2004]

Durchführung

Vorbereitung der Objektträger (OT)

- Auf die matte Seite eines einseitig mattierten OT werden 40 µl NMA pipettiert, mit einem zweiten OT gleichmäßig verteilt und aushärten gelassen.
- 2 x 65 µl der NMA werden nebeneinander auf den Agarosefilm pipettiert und jeweils mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt.
- Die Gelpads werden auf einem Metallrack auf Eis ausgehärtet und anschließend in einer Objektträgerbox, die mit einem angefeuchteten Papiertuch ausgelegt ist, bei 4°C gelagert.

Inkubation der Zellen

- 1x10⁶ HT29-Zellen werden in 2 ml serumhaltigem Medium in Petrischalen (Ø 3,5 cm) für 48 h anwachsen gelassen.
- Die Inkubation erfolgt im Anschluss für 1 h in serumfreiem Medium.

Aufarbeitung der Zellen

- Das Inkubationsmedium wird abgesaugt und 2 x mit 1 ml PBS gewaschen.
- Die Zellen werden mit 0,25 ml Trypsin pro Petrischale für 1,5 bei 37 °C abtrypsiniert.
- Der Trypsinverdau wird mit 0,25 ml serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen und Spülen mit der Pipette gelöst.
- Die Zellsuspension wird in ein gekühltes 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt.
- Die Petrischale wird ein weiteres Mal mit 250 µl Medium gespült und mit der Zellsuspension vereinigt.

- Zellzahl und -viabilität werden mit Trypanblau-Ausschluss bestimmt (Kapitel 6.1.4). Die Zellviabilität muss über 80 % liegen.
- Pro vorbereitetem Gelpad werden 50.000 Zellen in je ein 1,5 ml Eppendorfgefäß pipettiert und bei 4 °C für 10 min bei 425g zentrifugiert. Der Überstand wird im Anschluss verworfen.
- Die OT werden codiert beschriftet und die Deckgläser entfernt.
- Das Zellpellets werden in jeweils 65 µl LMA resuspendiert, auf die Gelpads pipettiert und wieder luftblasenfrei mit Deckgläsern abgedeckt. Die Agarose wird wieder auf einem Metallrack auf Eis ausgehärtet.

Lyse der Zellen

- Die Deckgläser werden entfernt und die OT in einen mit 4°C kalter Lysepuffer Gebrauchslösung gefüllten Coplin-Becher gestellt.
- Die Zellen werden über Nacht lysiert.

Enzymbehandlung

- Die OT werden dreimal mit kaltem FPG Enzympuffer für je 5 min gewaschen.
- Während dem Waschen wird ein FPG Aliquot auf Eis aufgetaut und anschließend 1:20 mit kaltem FPG-Puffer verdünnt.
- 50 µl der verdünnten Enzymlösung werden auf jedes Gelpad pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgt über 30 min bei 37 °C im Brutschrank.
- Die OT, die nicht mit FPG behandelt werden, werden jeweils mit 50 µl reinem Enzympuffer inkubiert.

Elektrophorese und Färbung

- Die vorbereitete Elektrophoresekammer wird auf Eis gekühlt und bereits bis zur Ablagefläche mit Elektrophoresepuffer gefüllt.
- Nach Entfernen der Deckgläser werden die OT mit den Gelpads nach oben und der Beschriftung in Richtung Anode auf die Ablagefläche gelegt, fixiert und mit Elektrophoresepuffer bedeckt.
- Equilibrierung für 20 min im Dunkeln.
- Die Elektrophorese wird im Anschluss für 20 min bei 25 V und 200 mA durchgeführt. Die Voltzahl bleibt unverändert, während die Milliamperezahl durch

Zugabe oder Abnahme des Elektrophoresepuffers genau eingestellt werden muss.

- Die OT werden dreimal für jeweils 5 min mit kalten Neutralisationspuffer gewaschen.
- Die Zellen werden mit 30 µl EtBr-Färbelösung pro Gelpad gefärbt und können in einer OT-Box im Dunkeln zwei bis drei Tage gelagert werden.

Auswertung

Die Auswertung erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop mit einer Quecksilberdampflampe und einem nachgeschaltetem CY-3-Filter, um das EtBR anzuregen (Anregung: λ 512 nm; Emission: $\lambda \geq 590$ nm). Das Bild wird mittels CCD-Kamera an einen PC weitergeleitet und mit einer speziellen Software ausgewertet. Pro Gelpad werden mindestens 50 einzelne Zellen ausgezählt. Die Ränder und die Regionen um Luftblasen sind dabei auszulassen, da hier oft anormal hohe DNA-Schäden zu finden sind. [COLLINS, 2004] Als Auswertungsparameter dient die Schweifintensität ("Tail Intensity"), welche die Intensität des Zellkerns mit der des Schweifes in Verhältnis setzt und prozentual dargestellt wird.

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 H ₂ O _{bidest} lösen, pH 10, 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 ml EDTA (pH=10)

	mit H ₂ O _{bidest} 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 ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{bidest} auf 1 l auffüllen
Normal melting agarose (NMA)	0,8 % NMA (BioRad) in Phosphatpuffer
Low melting Agarose (LMA)	0,8 % LMA (BioRad) in Phosphatpuffer
Die Agarose wird kurz aufgeköcht. Bei Einbettung der Zellen mit Hilfe der LMA wird darauf geachtet, dass die Temperatur nicht mehr als 45 °C beträgt, damit die Zellen nicht geschädigt werden.	
Ethidiumbromid-Färbelösung	EtBr-Stammlösung 1:500 verdünnen.
Enzympuffer	40 mM HEPES 0,1 M KCl 0,5 mM EDTA 0,2 mg/ml BSA pH 8 mit KOH einstellen

6.4 WST-1 Assay

Bei WST-1 handelt es sich um ein Tetrazolium Salz („Water-Soluble-Tetrazolium salt“), das durch das Succinat-Tetrazolium Reduktase-System (STR-H) der Mitochondrien zu STR und dem dunkelrotem Farbstoff Formazan reduziert wird. STR oxidiert wiederum NADH/H⁺ zu NAD⁺ und regeneriert somit Reduktionsäquivalente und seine reduzierte Form STR-H. Da das STR/STR-H System nur in den Mitochondrien metabolisch aktiver Zellen aktiv ist und die Bildung von Formazan direkt mit der Anzahl der lebenden Zellen korreliert, kann mit dem WST-1 Assay eine genaue Bestimmung metabolisch aktiver Zellen durchgeführt werden. Dazu wird die Menge des gebildeten Formazan bei 450 nm bzw. 650 nm photometrisch bestimmt.

Verwendet wurde das „Cell Proliferation Reagent WST-1“-Kit der Firma Roche.

Durchführung

- Es werden jeweils 7500 HT29-Zellen pro Well in 100 µl serumhaltigem Medium in eine 96-Well-Platte ausgestreut, wobei die Wells an den Rändern der Platte ausgelassen werden. Die Zellen werden anschließend für 48 h anwachsen gelassen.
- Das Medium wird abgesaugt und die Zellen einmal mit jeweils 100 µl PBS gewaschen.
- Die Inkubation mit den Testsubstanzen findet für 1 h in serumfreiem Medium bzw. für 24 h in serumhaltigem Medium statt.
- Nach der Inkubation wird wieder mit jeweils 100 µl PBS gewaschen.
- WST-1-Reagenz wird 1:10 mit serumfreiem Medium verdünnt und davon 100 µl in jedes Well pipettiert. Die Inkubation mit dem WST-1-Reagenz findet bei 1 h Inkubationszeit für 30 min und bei 24 h Inkubationszeit für 40 min im Brutschrank statt.
- Im Anschluss erfolgt die photometrische Messung bei 450 nm und 650 nm im Mikroplattenlesegerät. Die Absorptionswerte bei 650 nm werden bei der Auswertung von denen bei 450 nm abgezogen.

Auswertung

Zur Berechnung der relativen mitochondrialen Aktivität werden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen der inkubierten Zellen auf jenen der Lösungsmittelkontrolle DMSO bezogen. Die mittlere Extinktion der mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubierten Zellen stellte somit 100% mitochondriale Aktivität dar.

Geräte und Chemikalien

Mikrotiterplattenlesegerät	Victor V3 14200, Perkin Elmer
WST-1-Reagenz	Roche
PBS	Abschnitt 6.2

6.5 Sulforhodamin B (SRB) Assay

Mit Hilfe des Sulforhodamin B Assays kann das Zellwachstum bestimmt werden, indem das zelluläre Protein gefärbt wird. Dabei bindet der Farbstoff Sulforhodamin B im sauren

Milieu an basische Aminosäuren der Zellproteine. Durch photometrische Messung der Intensität des Farbstoffes lässt sich im Rückschluss die Proteinmenge bestimmen.

Erfolgt der Assay im Anschluss an eine Inkubation mit einer Testsubstanz, kann so eine Aussage zu antiproliferativer oder proliferativer, sowie zu etwaigen zytotoxischen Effekten getroffen werden. [SKEHAN et al., 1990]

Durchführung

- Pro Well werden jeweils 7500 HT29-Zellen für 24 h Inkubation, 4000 für 48 h Inkubation und 2000 Zellen für 72 h Inkubation in 100 µl serumhaltigem Medium in eine 96-Well-Platte ausgestreut, wobei die Wells an den Rändern der Platte ausgelassen werden. Die Zellen werden anschließend für 48 h anwachsen gelassen.
- Nach Inkubation mit der Testsubstanz der Zellen in einer 96-Well Platte wird zur Fixierung der Zellen jeweils 10 µl 50%-ige Trichloressigsäure pro Well zugegeben und für eine Stunde bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.
- Die Fixierlösung wird verworfen und vier Mal mit Leitungswasser vorsichtig gewaschen. Anschließend wird die Platte ohne Deckel im Dunkeln über Nacht getrocknet.
- Zur Färbung des Proteins werden jeweils 50 µl SRB-Reagenz pro Well pipettiert und für 60 min unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Färbelösung wird anschließend verworfen und jedes Well zwei Mal mit Leitungswasser und zwei Mal mit 1%-iger Essigsäure gewaschen. Die Platte wird wieder bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss getrocknet.
- Pro Well werden 100 µl 10 mM Tris-Base pipettiert. Die Platte wird anschließend 5 min im Plattenlesegerät geschüttelt und danach die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

Auswertung

Zur Berechnung der relativen Zellproliferation werden die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen der inkubierten Zellen auf jenen der Lösungsmittelkontrolle DMSO bezogen. Die mittlere Extinktion der mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO inkubierten Zellen stellt somit 100% Zellproliferation dar.

Für die Berechnung des IC_{50} für den SRB Assay (Kapitel 4.1.3) wurde die Dose-Response Funktion von Origin Pro 9.1 G verwendet. Dabei handelt es sich um einen

Nicht-Linearen Kurvenfitter, der die Kurvenanpassung auf Grundlage eines sigmoidalen Modells vornimmt.

Geräte und Lösungen

Mikrotiterplattenlesegerät	Victor V3 14200, Perkin Elmer
TCA	50 % w/v in dest. H ₂ O
Essigsäure	1 % in dest. H ₂ O
SRB	0,4 % w/v in 1 %iger Essigsäure
Tris	10 mM Tris in dest. H ₂ O, pH = 10

6.6 Dichlorofluorescein (DCF) Assay

Der DCF Assay erlaubt eine Quantifizierung von oxidierenden Substanzen wie beispielweise reaktiven Sauerstoff- oder Stickstoffspezies innerhalb der Zelle. Dazu wird die Fluoreszenz-Sonde 2',7'-Dihydrodichlorofluorescindiaceat ($H_2DCF-DA$) verwendet, die die Zellmembran relativ leicht passieren kann und durch zelluläre Esterasen zu nicht fluoreszierendem Dihydrodichlorofluorescin (H_2DCF) und Acetat gespalten wird. In Gegenwart von oxidierenden Substanzen, wird H_2DCF rasch zum fluoreszierenden 2',7'-Dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Mittels Fluoreszenzspektrometer (Ex.: 485 nm; Em.: 528 nm) kann der Anstieg der Intensität des Fluoreszenzsignals bestimmt werden. [WANG und JOSEPH, 1999]

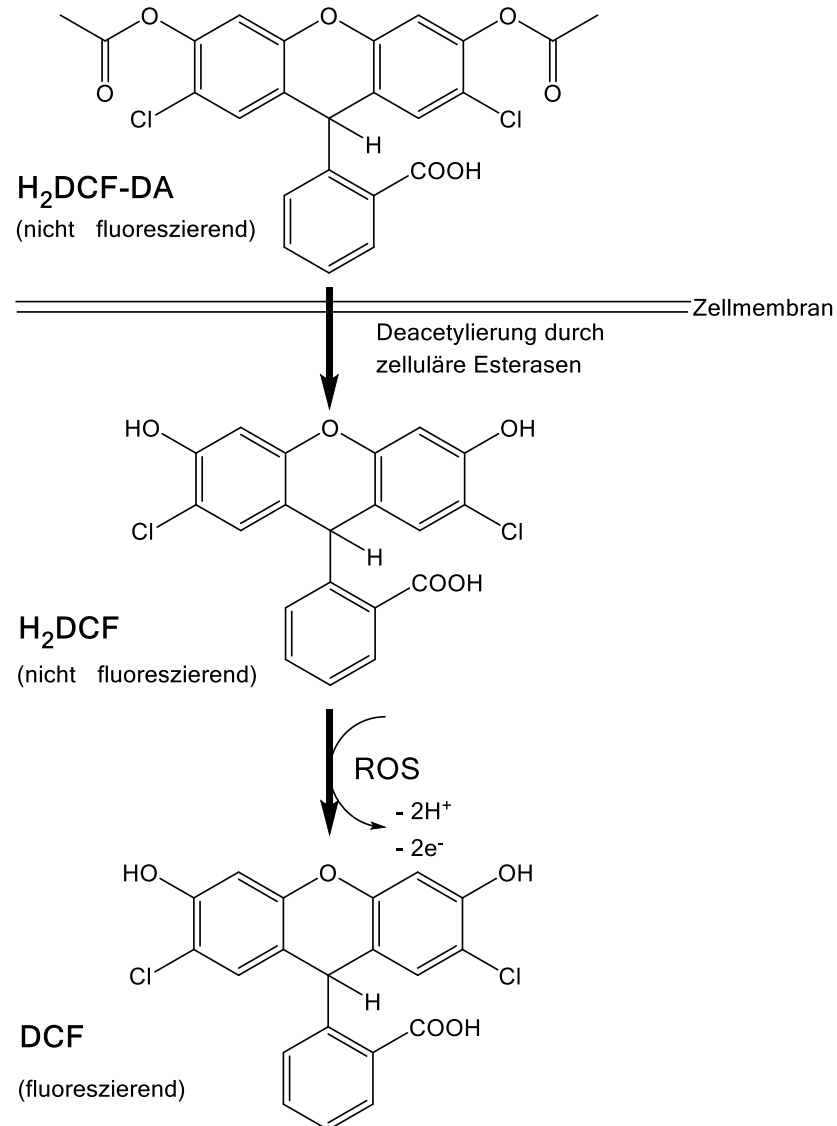


Abbildung 6.3 Prinzip des Dichlorofluorescein (DCF) Assays. modifiziert nach [MARCHESI et al., 1999]

Durchführung

- In einer schwarzen 96-Well Platte werden 20.000 Zellen pro Well ausgestreut und für 48 h bei 37 °C und 5 CO₂ im Brutschrank anwachsen gelassen.
- Das Medium wird mit einer Kanüle abgesaugt und jedes Well mit 150 µl PBS gewaschen.
- Alle folgenden Schritte werden lichtgeschützt durchgeführt, da H₂DCF-DA lichtempfindlich ist.
- Pro Well werden 100 µl einer DCF-DA Lösung pipettiert und für 30 min im Brutschrank inkubiert.

- Die DCF-DA Lösung wird abgesaugt und wieder mit 150 µl PBS pro Well gewaschen.
- Die Inkubation mit der Testsubstanz erfolgt in jeweils 100 µl farblosem Medium pro Well, da Phenolrot die Messung beeinflussen würde.
- Als „Blindwert“ der Messung wird einmal sofort die Fluoreszenz bei 530 nm gemessen und anschließend nach der gewünschten Inkubationszeit.

Auswertung

Um die Fluoreszenzzunahme zu berechnen, wird der „Blindwert“ der Messung vor der Inkubation vom Wert nach der Inkubation abgezogen und anschließend der Mittelwert aller Wells einer bestimmten Substanzkonzentration gebildet. Der Mittelwert wird schließlich auf Fluoreszenzzunahme der Lösungsmittelkontrolle mit DMSO normiert, um die relative Fluoreszenz zu erhalten.

$$\text{Relative Fluoreszenz} = \frac{\text{Mittelwert } (\Delta \text{ Fluoreszenz Testsubstanz})}{\text{Mittelwert } (\Delta \text{ Fluoreszenz DMSO})}$$

Geräte und Chemikalien

Mikrotiterplattenlesegerät	Cytation 3, BioTek
PBS	Abschnitt 6.2
2',7'-Dichlorofluorescein diacetat	Sigma
H₂DCF-DA Stammlösung	10 mM in DMSO
H₂DCF-DA Gebrauchslösung	50 µM H ₂ DCF-DA Stammlösung frisch in PBS ansetzen und vor Licht schützen.
farbloses DMEM	Sigma

6.7 Bestimmung von GSH und GSSG

Das Prinzip der Glutathionbestimmung beruht auf der Reaktion von reduziertem Glutathion (GSH) mit 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB), wodurch 5-Thio-2-nitrobenzoat (TNB) freigesetzt wird. Dabei reagiert die freie Thiolgruppe des GSH mit der Disulfidbrücke des DTNB und bildet selbst ein gemischtes Disulfid, während der Rest des Moleküls als TNB freigesetzt wird. [ELLMAN, 1959] Durch Messung der Absorption bei 412 nm kann TNB anschließend photometrisch bestimmt werden. Da die Umsetzung

von GSH mit DTNB zu TNB stöchiometrisch verläuft, kann durch Bestimmung der Extinktionszunahme direkt auf den Gehalt von GSH geschlossen werden. Die Berechnung des GSH-Gehalts erfolgt durch Vergleich mit bekannten Standards in steigenden Konzentrationen.

Um auch die oxidierte Form von Glutathion (GSSG) bestimmen zu können, entwickelten Tietze et al. 1969 die Methode noch weiter. Aufgrund des sehr niedrigen zellulären Gehalts von GSSG und dem starken Überschuss an GSH ist eine direkte Bestimmung von GSSG nicht möglich. Daher muss das vorhandene GSH vorerst abgefangen werden. Es ergab sich so ein Versuchsablauf, der aus zwei Teilen besteht. Im ersten Teil erfolgt die Bestimmung des gesamten Glutathions (tGSH), also GSH und GSSG zusammen. Dazu wird GSSG mittels Glutathion-Reduktase (GSR) zu GSH reduziert und anschließend mit dem bereits vorhandenen GSH mit DTNB umgesetzt. Da alle Reaktionspartner in einem starken Überschuss vorliegen, verläuft die Extinktionszunahme proportional zum tGSH-Gehalt.

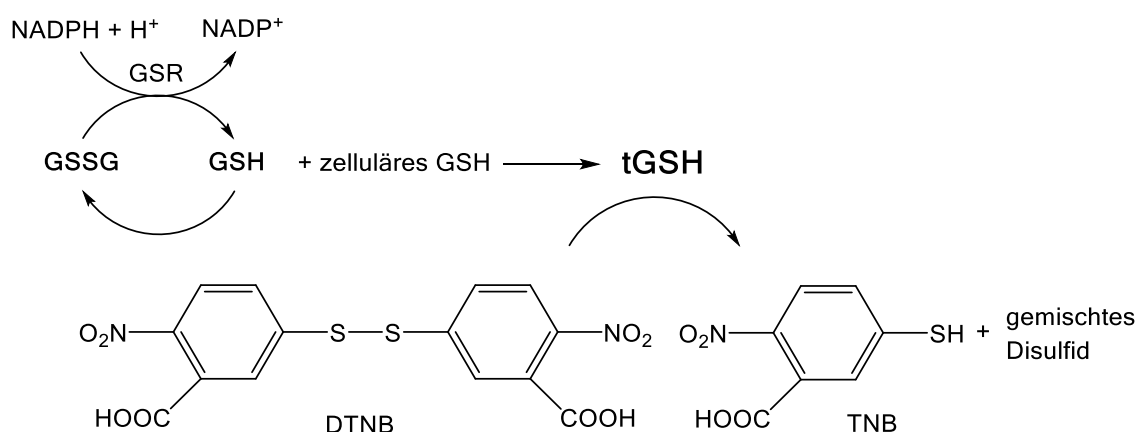


Abbildung 6.4 Prinzip der tGSH-Bestimmung. Entnommen aus [FEHR, 2009]

Im zweiten Teil erfolgt die Bestimmung des GSSG-Gehalts. Ursprünglich wurde der Probe N-Ethylmaleimid zugesetzt, um mit GSH abzureagieren und es so der Reaktion mit DTNB zu entziehen [TIETZE, 1969]. Da N-Ethylmaleimid jedoch die GSR hemmt, wird in dieser Arbeit 2-Vinylpyridin verwendet. 2-Vinylpyridin fängt dabei GSH ab, ohne die Aktivität der GSR signifikant zu beeinflussen [GRIFFITH, 1980].

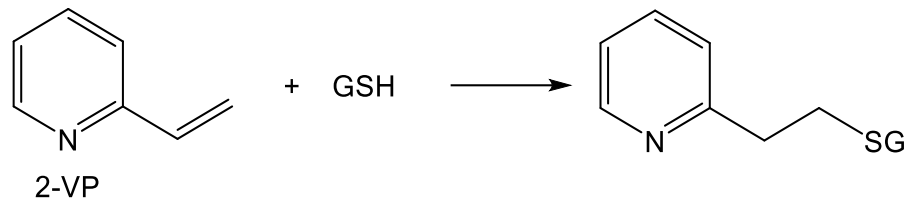


Abbildung 6.5 Umsetzung von 2-VP mit GSH.

Im Anschluss wird das übrig gebliebene GSSG mittels GSR zu GSH reduziert, welches nun wieder für die Reaktion mit DTNB zur Verfügung steht. Die Bestimmung des GSSG-Gehalts verläuft nach der Reaktion mit 2-Vinylpyridin also analog zur Bestimmung von tGSH. Allerdings ist zu beachten, dass aus einem Molekül GSSG zwei Moleküle GSH entstehen.

Durchführung

Kultivierung der Zellen und Inkubation mit der Testsubstanz

- Die Zellen werden in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser in 10 ml serumhaltigem Medium ausgestreut.
- Für 1 h Inkubationszeit werden 1×10^6 Zellen ausgestreut und für 72 h anwachsen gelassen.
- Für 3 h Inkubationszeit werden $1,6 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen.
- Für 24 h Inkubationszeit werden $1,2 \times 10^6$ Zellen ausgestreut und für 48 h anwachsen gelassen.
- Die Inkubation mit der Testsubstanz erfolgt für alle Inkubationszeiten in 6 ml serumhaltigem Medium, wobei darauf zu achten ist, dass die Zellen gleichmäßig vom Inkubationsmedium bedeckt sind.

Zellaufarbeitung

- Das Inkubationsmedium wird verworfen und die Zellen zwei Mal mit 5 ml PBS gewaschen
- Die Zellen werden für 2-3 min mit 1 ml Trypsin im Brutschrank abtrypsiniert.
- Durch Zugabe von 1 ml serumhaltigem Medium wird der Trypsinverdau gestoppt.
- Durch mehrmaliges Spülen der Petrischale mit der Zellsuspension werden die Zellen vom Boden gelöst und anschließend in ein eisgekühltes 15 ml Reagiergefäß überführt.

- Um die restlichen Zellen ebenfalls zu überführen wird noch zwei Mal mit serumfreiem Medium nachgespült und die Suspension mit der ursprünglichen Zellsuspension vereinigt.
- Je Probe werden 20 µl Zellsuspension für eine Viabilitätsbestimmung via Trypanausschlussverfahren entnommen. Die Viabilität sollte dabei nie unter 80 % sein.
- Die restliche Zellsuspension wird bei 4 °C und 420g für 10 min zentrifugiert.
- Der Überstand wird abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 1 ml A/B-Puffer resuspendiert.
- Es wird wieder bei 4 °C und 420g für 10 min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.
- Das Zellpellet wird in 370 µl A/B-Puffer aufgenommen, gründlich resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfreaktionsgefäß überführt.
- Für die Proteinbestimmung (Kapitel 6.8) werden je Probe zwei Mal 10 µl Zellsuspension entnommen und je mit 90 µl A/B-Puffer in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß vereinigt.
- Der Rest der Zellsuspension wird mit 350 µl 10 %iger Sulfosalicylsäure (SSA) versetzt und gevortext. Die Proteine werden für etwa 15 min auf Eis ausgefällt.
- Die ausgefallenen Proteine werden bei 20819g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt.
- Die Proben können so bei -80 °C gelagert werden. Nach dem Auftauen muss allerdings wieder Zentrifugiert werden um weiteres ausgefallenes Protein vor der Bestimmung von GSH und GSSG zu entfernen.

Bestimmung von tGSH

- Als Doppelbestimmung werden je Probe, GSH-Standard und Blindwert zwei Mal 10 µl in eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Blindwert dient 5 %ige SSA.
- Je Well werden zügig 190 µl des tGSH-Mixes mittels Mehrkanalpipette hinzugefügt.
- Die Messung im Plattenleser sollte unmittelbar erfolgen, da die enzymatische Reaktion direkt beginnt und der lineare Absorptionsbereich so rasch überschritten werden kann.

- Vor jeder Messung wird die Platte 30 Sekunden geschüttelt. Zur Bestimmung der Extinktionszunahme erfolgt die erste Messung direkt (E1) und die zweite Messung (E2) exakt 2 min später. Es wird bei 405 nm gemessen.

Bestimmung von GSSG

- Je Probe werden 200 µl Überstand mit 4 µl unverdünntem 2-VP und 40 µl 50 %igem Triethanolamin (TEA) versetzt und für 1 Stunde im Thermomixer bei 26 °C und 1300 rpm umgesetzt.
- Je umgesetztem Probenüberstand, GSSG-Standard und Blindwert werden 20 µl in Doppelbestimmung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Als Blindwert dient 5 %ige SSA.
- Je Well werden zügig 180 µl des GSSG-Mixes mittels Mehrkanalpipette hinzugefügt.
- Die Messung im Plattenleser sollte unmittelbar erfolgen, da die enzymatische Reaktion direkt beginnt und der lineare Absorptionsbereich so rasch überschritten werden kann.
- Vor jeder Messung wird die Platte 30 Sekunden geschüttelt. Zur Bestimmung der Extinktionszunahme erfolgt die erste Messung direkt (E1) und die zweite Messung (E2) exakt 10 min später. Es wird bei 405 nm gemessen.

Auswertung

Aus den Werten der Doppelbestimmung werden die Mittelwerte gebildet. Zur Berechnung der Extinktionszunahme pro Minute wird E1 von E2 abgezogen und der Wert durch die Anzahl der Minuten geteilt. Mit Hilfe der Extinktionszunahme pro Minute der Standardlösungen wird eine Standardgerade erstellt und mittels linearer Regression die Geradengleichung aufgestellt. Durch Umstellen der Geradengleichung und Einsetzen der Extinktionszunahmen pro Minute der Proben, können die tGSH- bzw. die GSSG-Konzentrationen berechnet werden. Anschließend werden die Konzentrationen von tGSH und GSSG der Proben auf ihren Proteingehalt bezogen und in nmol/mg Protein angegeben.

Die GSH-Konzentration erhält man durch Subtraktion von GSSG von tGSH.

Geräte und Chemikalien

Mikrotiterplattenlesegerät	Victor V3 14200, Perkin Elmer
Zentrifuge	Avanti J-26-XP, Beckman Coulter
10 %ige SSA	25 g in 250 ml bidest. H ₂ O lösen, Lagerung bei 4 °C.
5 %ige SSA	100 ml 10 %ige SSA mit 100 ml bidest. H ₂ O verdünnen.
Puffer A	4,25 g KH ₂ PO ₄ und 0,585 g EDTA in 200 ml bidest. H ₂ O. pH auf ~7,5 einstellen, damit EDTA sich löst. Lagerung bei 4 °C.
Puffer B	10,9 g K ₂ HPO ₄ und 1,175 g EDTA in 500 ml bidest. H ₂ O lösen. Lagerung bei 4 °C.
A/B-Puffer	7,5 ml Puffer A + 42,5 ml Puffer B
GSH-Stammlösung	1 mM GSH in 5 %iger SSA. Lagerung bei -80 °C.
GSH-Standards	0,625 µM - 20 µM in 5 %iger SSA.
GSSG-Stammlösung	100 µM GSSG in 5 %iger SSA. Lagerung bei -80 °C.
GSSG-Standards	10 µM - 200 µM in 5 %iger SSA.
DTNB-Lösung (6 mM)	7,134 mg in 3 ml A/B-Puffer lösen. Jedes Mal frisch ansetzen.
Glutathion-Reduktase(GSR)-Lösung (50 U/ml)	Enzym wird abhängig von seiner Aktivität mit A/B-Puffer auf 50 U/ml verdünnt. Jedes Mal frisch ansetzen.
NaHCO₃-Lösung (0,5%)	72,5 mg in 15 ml bidest. H ₂ O lösen. Lagerung bei -20 °C.
NADPH-Lösung	16,7 mg NADPH in 1 ml 0,5 %iger NaHCO ₃ -Lösung lösen. Lagerung bei -80 °C.
Triethanolamin-Lösung (50%)	5,31 ml TEA mit 4,690 ml bidest. H ₂ O vereinen. Lagerung bei -20 °C.
tGSH-Mix (pro Well)	164 µl A/B-Puffer 20 µl DTNB-Lösung (6 mM)

	4 µl NADPH-Lösung (20 mM)
	2 µl GSR
GSSG-Mix (pro Well)	154 µl A/B-Puffer
	20 µl DTNB-Lösung (6 mM)
	4 µl NADPH-Lösung (20 mM)
	2 µl GSR

6.8 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinbestimmung mit BCA beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen durch die Aminosäuren Cystin, Cystein, Tyrosin und Tryptophan, sowie durch Peptidbindungen von Proteinen. Die Menge an reduzierten Cu^+ -Ionen ist dabei proportional zur Menge an Protein. Die Quantifizierung erfolgt durch photometrische Messung, da die Cu^+ -Ionen mit Bicinchoninsäure im alkalischen Milieu einen intensiven, violetten Komplex bilden, der ein Absorptionsmaximum bei 562 nm aufweist. Es handelt sich um einen schnellen und einfachen Assay, dessen Ergebnis allerdings durch Proteinsequenzen, die reich an den eingangs erwähnten Aminosäuren sind, verfälscht werden kann [SMITH et al., 1985, WIECHELMAN et al., 1988].

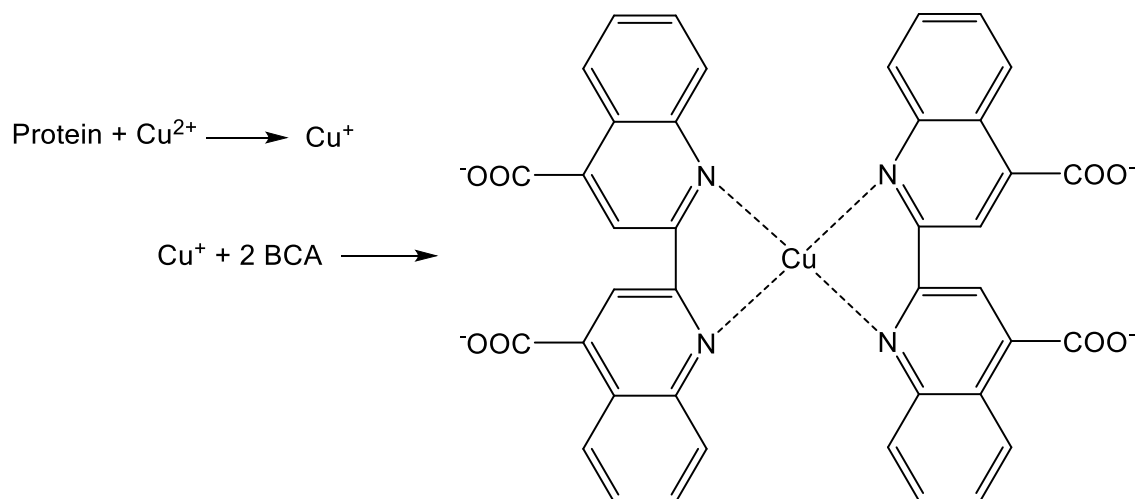


Abbildung 6.6 Prinzip der Proteinbestimmung mit BCA [nach SMITH et al., 1985]

Durchführung

- Zur Erstellung der Standardgeraden wurde eine Standardreihe (0,2 mg/ml - 1 mg/ml) von Bovinem Serum Albumin (BSA) (2 mg/ml) anlegt. Zur Verdünnung

der A/B-Puffer aus der Bestimmung von GSH und GSSG verwendet (Kapitel).

Als Blindwert dient nur A/B-Puffer.

- Es werden jeweils 60 µl der BSA-Standards und des Blindwertes, sowie 100 µl der Proben mit 420 µl bzw. 700 µl BCA-Reagenzlösung versetzt und 30 min bei 37 °C und 1300 rpm im Thermomixer umgesetzt. Die Reaktion wird anschließend auf Eis abgestoppt
- In Doppelbestimmung werden je 200 µl der umgesetzten Proben und Standards in eine 96-Well-Platte pipettiert.
- Die Messung erfolgt bei 595 nm, da der richtige Absorptionsfilter nicht zur Verfügung stand.

Geräte und Lösungen

Mikrotiterplattenlesegerät	Victor V3 14200, Perkin Elmer
A/B-Puffer	Kapitel 6.7
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
(2 mg/ml)	
BCA-Reagenzlösung	Sigma
	50 Teile Reagenz A (BCA, Na ₂ CO ₃ , Na-Tartrat, NaHCO ₃) + 1 Teil Reagenz B (4 % (w/v) CuSO ₄ × 5H ₂ O)

6.9 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Programm Origin Pro 9.1 G verwendet. Alle Daten wurden zuerst mittels Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung geprüft. Zur Untersuchung auf signifikante Unterschiede zwischen den Aurofusarin-Konzentrationen und der Lösungsmittelkontrolle bzw. dem „No Observed Effect Level“ (NOEL), wurde eine einfaktorielle ANOVA mit dem Fisher's LSD „post hoc“-Test durchgeführt. Auf signifikante Unterschiede zwischen der Lösungsmittelkontrolle bzw. dem NOEL und der Positivkontrolle des jeweiligen Assays, wurde mit einem t-Test für ungepaarte Stichproben getestet.

7 ANHANG

7.1 Kurzfassung

Aurofusarin ist ein Sekundärmetaboliten der Gattung *Fusarium* und wird hauptsächlich von *F. graminearum*, *F. culmorum* und *F. avenaceum* produziert. Da diese Schimmelpilz-Arten zu den häufigsten Schadpilzen auf Pflanzen zählen, konnte Aurofusarin bereits in vielen Rohstoffen der Lebens- und Futtermittelproduktion nachgewiesen werden. Neben seines ubiquitären Vorkommens stellt sich jedoch auch aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften als Naphthochinon-Homodimer die Frage nach einer potentiell toxikologischen Wirkung auf den menschlichen Organismus. Obwohl bereits viele Naphthochinone als zytotoxische, genotoxische und mutagene Substanzen beschrieben wurden, existieren nur wenige Daten zur toxischen Wirkung von Aurofusarin. Einige Studien zu seiner Toxizität deuteten auf prooxidative und zytotoxische Wirkung hin. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher potentielle Effekte, die durch Aurofusarin verursacht wurden, am Modell der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie HT29 näher zu untersuchen.

Die Untersuchung der Zytotoxizität von Aurofusarin mittels WST-1 Assay und SRB Assay ergab eine signifikante Hemmung der mitochondrialen Aktivität und des Zellwachstums von HT29-Zellen nach 24 h Inkubation mit 5 μM und 10 μM Aurofusarin. Im Comet Assay wurde eine signifikante Zunahme von DNA-Strangbrüchen bereits nach 1 h Inkubation beobachtet, woraus sich die Frage nach den zugrunde liegenden Mechanismen ergab. Da Naphthochinone laut Literatur zu Redox-Cycling in der Lage sind, wurde die potentielle Induktion von oxidativem Stress untersucht. Dementsprechend konnte im DCF Assay eine signifikante Erhöhung des intrazellulären ROS-Spiegels bereits nach 1 h Inkubation mit 5 μM Aurofusarin beobachtet werden. Die Untersuchung des Glutathion-Status ergab zudem nach 3 h und 24 h Inkubation mit Aurofusarin eine signifikante Erhöhung des GSSG/GSH-Verhältnisses und bestätigte somit ebenfalls den erhöhten oxidativen Stress der Zellen.

Obwohl es noch einige Fragen bezüglich der zugrunde liegenden Mechanismen zu klären gilt, zeigte Aurofusarin, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, *in vitro* zytotoxische, genotoxische und prooxidative Effekte und sollte daher als Mykotoxin in Betracht gezogen werden.

7.2 Abstract

Aurofusarin is a secondary metabolite of *Fusarium spp.* and is produced primarily by *F. graminearum*, *F. culmorum* and *F. avenaceum*. Since these fungi species belong to the most abundant plant pathogens, aurofusarin has already been identified in various food and feed commodities. But besides its ubiquitous presence, also its structural properties as a homodimeric naphthoquinone, raise questions about its potential toxicological impact on the human organism. Although various naphthoquinones have been identified as cytotoxic, genotoxic and mutagenic compounds, data about toxic effects of aurofusarin are limited. Some of the few studies about its toxicity indicated prooxidative and cytotoxic effects. The aim of the present work was therefore to further investigate any potential effects caused by aurofusarin in the colon adenocarcinoma cell line HT29.

Studies on the cytotoxicity of aurofusarin with the WST-1 assay and the SRB assay revealed a significant decrease of mitochondrial activity and cell growth of HT29 cells after 24 h of incubation with 5 μ M and 10 μ M aurofusarin. In the comet assay a significant increase of DNA strand breaks could be observed already after 1 h of incubation, thus leading to the question of underlying mechanisms of action. Since, according to literature, naphthoquinones are capable of redox cycling, the potential induction of increased oxidative stress by aurofusarin was further investigated. Accordingly, in the DCF assay a significant increase of the intracellular ROS-level was observed already after 1 h of incubation with 5 μ M aurofusarin. In addition, analysis of the glutathione status after 3 h and 24 h revealed significant increase of the GSSG/GSH-ratio, providing further evidence of increased oxidative stress of the cells.

Although there are still several questions regarding potential underlying mechanisms to clarify, the present results demonstrate cytotoxic, genotoxic and prooxidative effects *in vitro* and aurofusarin should therefore be considered as a full mycotoxin.

8 LITERATURVERZEICHNIS

ARRIGO A.-P. Gene expression and the thiol redox state. *Free Radical Biology and Medicine* 1999; 27 (9–10): 936-944.

ASHLEY J. N., HOBBS B. C., RAISTRICK H. Studies in the biochemistry of micro-organisms: The crystalline colouring matters of *Fusarium culmorum* (W. G. Smith) Sacc. and related forms. *Biochem J* 1937; 31 (3): 385-97.

BABULA P., ADAM V., KIZEK R., SLADKÝ Z., HAVEL L. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. *Environmental and Experimental Botany* 2009; 65 (2–3): 330-337.

BENNETT J. W., KLICH M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16 (3): 497-516.

BfR: Mykotoxine in Lebens- und Futtermitteln. Was muss ich als Verbraucher wissen? http://www.bfr.bund.de/cm/350/mykotoxine_in_lebens_und_futtermitteln.pdf Letzter Zugriff: 10.02.2016

BHAT R., RAI R. V., KARIM A. A. Mycotoxins in Food and Feed: Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 2010; 9 (1): 57-81.

Boelsterli U. A. Mechanistic Toxicology. The molecular basis of how chemicals disrupt biological targets. Taylor & Francis Group. London. 2003.

BONOMINI F., TENGATTINI S., FABIANO A., BIANCHI R., REZZANI R. Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol* 2008; 23 (3): 381-90.

CARVAJAL M. Aflatoxin-DNA Adducts as Biomarkers of Cancer: Nature, Formation, Kinds of AF-DNA Adducts, Methodology, Effects, and Control. 2008: 13-55.

CASTAING B., FOURREY J.-L., HERVOUET N., THOMAS M., BOITEUX S., ZELWER C. AP site structural determinants for Fpg specific recognition. *Nucleic Acids Research* 1999; 27 (2): 608-615.

COLLINS A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26 (3): 249-61.

DAY R. M., SUZUKI Y. J. Cell Proliferation, Reactive Oxygen and Cellular Glutathione. *Dose Response* 2005; 3 (3): 425-42.

DESAI K., SULLARDS M. C., ALLEGOOD J., WANG E., SCHMELZ E. M., HARTL M., HUMPE H.-U., LIOTTA D. C., PENG Q., MERRILL JR A. H. Fumonisin and fumonisin analogs as inhibitors of ceramide synthase and inducers of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 2002; 1585 (2–3): 188-192.

DICKINSON D. A., FORMAN H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. *Biochemical Pharmacology* 2002; 64 (5–6): 1019-1026.

DSMZ: DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. <https://www.dsmz.de/> Letzter Zugriff: 09.02.2016

DVORSKA J. E., SURAI P. F., SPEAKE B. K., SPARKS N. H. C. Antioxidant systems of the developing quail embryo are compromised by mycotoxin aurofusarin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 2002; 131 (2): 197-205.

DVORSKA J. E., SURAI P. F., SPEAKE B. K., SPARKS N. H. C. Effect of the mycotoxin aurofusarin on the antioxidant composition and fatty acid profile of quail eggs. *British Poultry Science* 2001; 42 (5): 643-649.

ELLMAN G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82 (1): 70-7.

EMADI A., LE A., HARWOOD C. J., STAGLIANO K. W., KAMANGAR F., ROSS A. E., COOPER C. R., DANG C. V., KARP J. E., VUICA-ROSS M. Metabolic and electrochemical mechanisms of dimeric naphthoquinones cytotoxicity in breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011; 19 (23): 7057-7062.

ERIKSEN G. S., PETTERSSON H. Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed. *Animal Feed Science and Technology* 2004; 114 (1-4): 205-239.

EZEKIEL C. N., SULYOK M., WARTH B., KRSKA R. Multi-microbial metabolites in fonio millet (acha) and sesame seeds in Plateau State, Nigeria. *European Food Research and Technology* 2012; 235 (2): 285-293.

FEHR M. Dissertation: Mechanismen der genotoxischen Wirkung von Alternaria-Toxinen. Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Karlsruhe 2009;

FERGUSON L. R., DENNY W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 2007; 623 (1-2): 14-23.

FRANCESCHI S., BIDOLI E., BARON A. E., LA VECCHIA C. Maize and risk of cancers of the oral cavity, pharynx, and esophagus in northeastern Italy. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (17): 1407-11.

FROELICH-AMMON S. J., OSHEROFF N. Topoisomerase Poisons: Harnessing the Dark Side of Enzyme Mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270 (37): 21429-21432.

FUJII N., YAMASHITA Y., ARIMA Y., NAGASHIMA M., NAKANO H. Induction of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by the plant naphthoquinones plumbagin and shikonin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36 (12): 2589-94.

GELDERBLOM W. C., ABEL S., SMUTS C. M., MARNEWICK J., MARASAS W. F., LEMMER E. R., RAMLJAK D. Fumonisin-induced hepatocarcinogenesis: mechanisms related to cancer initiation and promotion. *Environ Health Perspect* 2001; 109 Suppl 2 291-300.

GONG K., LI W. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential new treatment for hepatocellular carcinoma. *Free Radical Biology and Medicine* 2011; 51 (12): 2259-2271.

GRIFFITH O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 1980; 106 (1): 207-12.

GUTIERREZ P. L. The metabolism of quinone-containing alkylating agents: free radical production and measurement. *Front Biosci* 2000; 5 D629-38.

HALLIWELL B. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemical Journal* 2007; 401 (1): 1-11.

JAKUBOWSKI W., BARTOSZ G. 2,7-DICHLOROFLUORESCIN OXIDATION AND REACTIVE OXYGEN SPECIES: WHAT DOES IT MEASURE? *Cell Biology International* 2000; 24 (10): 757-760.

- KAINA B. DNA damage-triggered apoptosis: critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66 (8): 1547-1554.
- KAMIYA H. Mutagenic potentials of damaged nucleic acids produced by reactive oxygen/nitrogen species: approaches using synthetic oligonucleotides and nucleotides: survey and summary. *Nucleic Acids Res* 2003; 31 (2): 517-31.
- KAWAI K., AKITA T., NISHIBE S., NOZAWA Y., OGIHARA Y., ITO Y. Biochemical studies of pigments from a pathogenic fungus *Microsporum cookei*. III. Comparison of the effects of xanthomegnin and O-methylxanthomegnin on the oxidative phosphorylation of rat liver mitochondria. *J Biochem* 1976; 79 (1): 145-52.
- KAWAI K., NOZAWA Y. Biochemical studies of pigments from a pathogenic fungus; *Microsporum cookei* VI. Formation of a xanthomegnin-bypass to the mitochondrial electron transport system. *Experientia* 1979; 35 (6): 721-722.
- KLOTZ L. O., HOU X., JACOB C. 1,4-naphthoquinones: from oxidative damage to cellular and inter-cellular signaling. *Molecules* 2014; 19 (9): 14902-18.
- KOTIK A. N., TRUFANOVA V. A. Detection of hapthoquinone fusariotoxin aurofusarin in wheat. *Mikologiya I Fitopatologiya* 1998; 32 (6): 58-61.
- KRISHNAN P., BASTOW K. F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—eleutherin, α lapachone, and β lapachone*. *Biochemical Pharmacology* 2000; 60 (9): 1367-1379.
- Kück U., Engh I., Hoff B., Nowrousian M. *Schimmelpilze. Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin, Heidelberg. 2009.
- KUIPER-GOODMAN T., SCOTT P. M., WATANABE H. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul Toxicol Pharmacol* 1987; 7 (3): 253-306.
- LARSEN A. K., ESCARGUEIL A. E., SKLADANOWSKI A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 99 (2): 167-181.
- LERMAN L. S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *Journal of Molecular Biology* 1961; 3 (1): 18-IN14.
- LI Q., LAVAL J., LUDLUM D. B. Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* 1997; 18 (5): 1035-8.
- LIU R. M., HU H., ROBISON T. W., FORMAN H. J. Increased gamma-glutamylcysteine synthetase and gamma-glutamyl transpeptidase activities enhance resistance of rat lung epithelial L2 cells to quinone toxicity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1996; 14 (2): 192-197.
- Löffler G., Petrides P. E., Heinrich P. C. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg. Berlin Heidelberg. 2007.
- LUNDHOLT B. K., SCUDDER K. M., PAGLIARO L. A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen* 2003; 8 (5): 566-70.
- MARASAS W. F. Fumonisin: their implications for human and animal health. *Nat Toxins* 1995; 3 (4): 193-8; discussion 221.

MARCHESI E., ROTA C., FANN Y. C., CHIGNELL C. F., MASON R. P. Photoreduction of the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein: a spin trapping and direct electron spin resonance study with implications for oxidative stress measurements. *Free Radic Biol Med* 1999; 26 (1-2): 148-61.

MARENGO B., DE CIUCIS C., VERZOLA D., PISTOIA V., RAFFAGHELLO L., PATRIARCA S., BALBIS E., TRAVERSO N., COTTALASSO D., PRONZATO M. A., MARINARI U. M., DOMENICOTTI C. Mechanisms of BSO (L-buthionine-S,R-sulfoximine)-induced cytotoxic effects in neuroblastoma. *Free Radic Biol Med* 2008; 44 (3): 474-82.

MEDENTSEV A. G., AKIMENKO V. K. Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry* 1998; 47 (6): 935-959.

MICHELOT D., MELENDEZ-HOWELL L. M. *Amanita muscaria*: chemistry, biology, toxicology, and ethnomycology. *Mycological Research* 2003; 107 (02): 131-146.

MIKUSOVA P., SROBAROVA A., SULYOK M., SANTINI A. *Fusarium* fungi and associated metabolites presence on grapes from Slovakia. *Mycotoxin Res* 2013; 29 (2): 97-102.

MIROSLAV P. Alzheimer's Disease and Oxidative Stress: A Review. *Current Medicinal Chemistry* 2014; 21 (3): 356-364.

MORISHITA E., TAKEDA T., SHIBATA S. Metabolic products of fungi. XXIX. The structure of aurofusarin. (2). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1968; 16 (3): 411-3.

NEMETH I., BODA D. The ratio of oxidized/reduced glutathione as an index of oxidative stress in various experimental models of shock syndrome. *Biomed Biochim Acta* 1989; 48 (2-3): S53-7.

NICHEA M. J., PALACIOS S. A., CHIACCHIERA S. M., SULYOK M., KRSKA R., CHULZE S. N., TORRES A. M., RAMIREZ M. L. Presence of Multiple Mycotoxins and Other Fungal Metabolites in Native Grasses from a Wetland Ecosystem in Argentina Intended for Grazing Cattle. *Toxins (Basel)* 2015; 7 (8): 3309-29.

OHASHI T., MIZUTANI A., MURAKAMI A., KOJO S., ISHII T., TAKETANI S. Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Letters* 2002; 511 (1-3): 21-27.

OSTLING O., JOHANSON K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123 (1): 291-8.

ROOSEBOOM M., COMMANDEUR J. N., VERMEULEN N. P. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. *Pharmacol Rev* 2004; 56 (1): 53-102.

ROSS A. E., EMADI A., MARCHIONNI L., HURLEY P. J., SIMONS B. W., SCHAEFFER E. M., VUICA-ROSS M. Dimeric naphthoquinones, a novel class of compounds with prostate cancer cytotoxicity. *BJU Int* 2011; 108 (3): 447-54.

ROTTER B. A., PRELUSKY D. B., PESTKA J. J. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J Toxicol Environ Health* 1996; 48 (1): 1-34.

SAEED M., HIGGINBOTHAM S., ROGAN E., CAVALIERI E. Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA. Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene. *Chem Biol Interact* 2007; 165 (3): 175-88.

SALING S. C., COMAR J. F., MITO M. S., PERALTA R. M., BRACHT A. Actions of juglone on energy metabolism in the rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2011; 257 (3): 319-327.

- SENTELLAS S., MORALES-IBANEZ O., ZANUY M., ALBERTÍ J. J. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 2014; 28 (5): 1006-1015.
- SHOKOLENKO I., VENEDIKTOVA N., BOCHKAREVA A., WILSON G. L., ALEXEYEV M. F. Oxidative stress induces degradation of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2009; 37 (8): 2539-48.
- SINGH N. P., MCCOY M. T., TICE R. R., SCHNEIDER E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175 (1): 184-91.
- SKEHAN P., STORENG R., SCUDIERO D., MONKS A., MCMAHON J., VISTICA D., WARREN J. T., BOKESCH H., KENNEY S., BOYD M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82 (13): 1107-12.
- SMITH P. K., KROHN R. I., HERMANSON G. T., MALLIA A. K., GARTNER F. H., PROVENZANO M. D., FUJIMOTO E. K., GOEKE N. M., OLSON B. J., KLENK D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150 (1): 76-85.
- SORENSEN J. L., PHIPPS R. K., NIELSEN K. F., SCHROERS H. J., FRANK J., THRANE U. Analysis of *Fusarium avenaceum* metabolites produced during wet apple core rot. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (4): 1632-9.
- SPEIT G., SCHUTZ P., BONZHEIM I., TRENZ K., HOFFMANN H. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 2004; 146 (2): 151-8.
- STAFFORD D. W. The vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2005; 3 (8): 1873-1878.
- STREIT E., SCHWAB C., SULYOK M., NAEHRER K., KRSKA R., SCHATZMAYR G. Multi-Mycotoxin Screening Reveals the Occurrence of 139 Different Secondary Metabolites in Feed and Feed Ingredients. *Toxins* 2013; 5 (3): 504-523.
- STROBER W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* 2001; Appendix 3 Appendix 3B.
- TETSCH L. Die Schimmelpilze – Minifabriken und Lebensretter. *Biologie in unserer Zeit*, 2015, Vol.45(6), pp.409-410 2015; 409.
- THOR H., SMITH M. T., HARTZELL P., BELLOMO G., JEWELL S. A., ORRENIUS S. The metabolism of menadione (2-methyl-1,4-naphthoquinone) by isolated hepatocytes. A study of the implications of oxidative stress in intact cells. *J Biol Chem* 1982; 257 (20): 12419-25.
- TIETZE F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27 (3): 502-22.
- TING C. Y., HSU C. T., HSU H. T., SU J. S., CHEN T. Y., TARN W. Y., KUO Y. H., WHANG-PENG J., LIU L. F., HWANG J. Isodiospyrin as a novel human DNA topoisomerase I inhibitor. *Biochem Pharmacol* 2003; 66 (10): 1981-91.
- TOLA S., BUREAU D. P., HOOFT J. M., BEAMISH F. W. H., SULYOK M., KRSKA R., ENCARNÇÃO P., PETKAM R. Effects of Wheat Naturally Contaminated with *Fusarium* Mycotoxins on Growth Performance and Selected Health Indices of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. mossambicus*). *Toxins* 2015; 7 (6): 1929-1944.
- TOYOKUNI S., AKATSUKA S. Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathol Int* 2007; 57 (8): 461-73.

UHLIG S., ERIKSEN G., HOFGAARD I., KRSKA R., BELTRÁN E., SULYOK M. Faces of a Changing Climate: Semi-Quantitative Multi-Mycotoxin Analysis of Grain Grown in Exceptional Climatic Conditions in Norway. *Toxins* 2013; 5 (10): 1682.

VAVERKOVA V., VRANA O., ADAM V., PEKAREK T., JAMPILEK J., BABULA P. The Study of Naphthoquinones and Their Complexes with DNA by Using Raman Spectroscopy and Surface Enhanced Raman Spectroscopy: New Insight into Interactions of DNA with Plant Secondary Metabolites. *BioMed Research International* 2014; 2014 12.

VEJDOVSZKY K., WARTH B., SULYOK M., MARKO D. Non-synergistic cytotoxic effects of Fusarium and Alternaria toxin combinations in Caco-2 cells. *Toxicol Lett* 2016; 241 1-8.

WANG H., JOSEPH J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (5-6): 612-6.

WARDMAN P., BURKITT M. J., PATEL K. B., LAWRENCE A., JONES C. M., EVERETT S. A., VOJNOVIC B. Pitfalls in the Use of Common Luminescent Probes for Oxidative and Nitrosative Stress. *Journal of Fluorescence* 2002; 12 (1): 65-68.

WARIS G., AHSAN H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of Carcinogenesis* 2006; 5 14-14.

WARTH B., PARICH A., ATEHNKENG J., BANDYOPADHYAY R., SCHUHMACHER R., SULYOK M., KRSKA R. Quantitation of mycotoxins in food and feed from burkina faso and mozambique using a modern LC-MS/MS multitoxin method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2012; 60 (36): 9352-9363.

WHO: International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 157. Hydroquinone. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc157.htm> Letzter Zugriff: 18.02.2016

WIECHELMAN K. J., BRAUN R. D., FITZPATRICK J. D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: identification of the groups responsible for color formation. *Anal Biochem* 1988; 175 (1): 231-7.

WINTERBOURN C. C. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicology Letters* 1995; 82-83 969-974.