

Aus dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch  
(Prof. Dr. Dr. E. Märtlbauer)  
der Tierärztlichen Universität München

---

**Untersuchungen zur Toxizität und zu den molekularen  
Wirkungsmechanismen von Deoxynivalenol**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
**Carina Magdalena Nielsen**  
aus  
Hamburg

München 2009

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Märtlbauer  
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. Potschka

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>SCHRIFTTUM</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	Allgemeines	3
<b>2.2</b>	Bildung der Trichothecene	4
<b>2.3</b>	Physikalisch-chemische Eigenschaften	5
<b>2.4</b>	Biologische Eigenschaften	8
<b>2.5</b>	Metabolisierung	9
<b>2.6</b>	Zelluläre und molekulare Effekte von Deoxynivalenol	10
<b>3</b>	<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>14</b>
<b>3.1</b>	Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines	14
<b>3.2</b>	Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells	32
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	Zytotoxisches Potential	63
<b>4.2</b>	Induktion von Transkriptionsfaktoren in Hepatomazellen	65
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>72</b>
	<b>SUMMARY</b>	<b>74</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

15-AcDON	15-Acetyldeoxynivalenol
3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol
ATA	Alimentary Toxic Aleukia
ATF3	Activated transcription factor 3
IL-8	Interleukin 8
DNA	Deoxyribonucleic acid
DON	Deoxynivalenol
EGR1	early growth response 1
ERK1/2	extracellular signal regulated kinase 1/2
EU	Europäische Union
FOS	fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
HUVEC	Human umbilical vein endothel cell
IgA	Immunglobulin-A
IL-6	Interleukin 6
JNK1/2	Jun NH2-terminal kinase 1/2
JUN	jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
KGW	Körpergewicht
MAPK	Mitogen activated protein kinase
NIV	Nivalenol
RNA	Ribonucleic acid
RT-PCR	Reverse transcription- polymerase-chain-reaction
SCF	Scientific committee on food of the European commission
TDI	Tolerierbare tägliche Aufnahme
TNF	Tumor necrose factor

*Für meine Tochter  
Anna Maria*

# 1 Einleitung

Fusarien sind die wichtigsten toxinbildenden Schimmelpilze in den gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre. Als sogenannte Feldpilze infizieren sie unter ungünstigen Witterungsbedingungen während der Vegetationsperiode das Getreide. Dabei kann es zur Produktion toxischer sekundärer Metabolite, sog. Mykotoxine, kommen. Unter diesen genusspezifisch auch als Fusarientoxine bezeichneten Metaboliten kommt insbesondere den Trichothecenen Bedeutung zu. Sie stellen die weltweit am häufigsten nachgewiesenen Kontaminanten von Nahrungsmitteln auf Getreidebasis dar. Aufgrund ihrer hohen chemischen und physikalischen Stabilität werden die Toxingehalte in Getreide durch die bei der weiteren Verarbeitung bzw. Lebensmittelherstellung eingesetzten Verfahren nicht signifikant reduziert.

Von den über 180 bekannten Trichothecenen stellen insbesondere Deoxynivalenol (DON), ein Typ B Trichothecen, sowie T-2 Toxin und HT-2 Toxin (Typ A) ein besonders hohes gesundheitliches Risiko für den Menschen dar. Aus klinischen Studien an Tieren ist bekannt, dass unter dem Einfluss von Trichothecenen vor allem Störungen des Immunsystems, Wachstumsdepression, Reproduktionsstörungen und Symptome einer Mangelernährung auftreten. DON induziert zudem in Dosen von 0,05–0,2 mg pro kg Körpergewicht Erbrechen bei Schweinen, bei geringeren Dosierungen kommt es zu verringerter Futteraufnahme und reduziertem Wachstum.

Auf molekularer Ebene interferieren Trichothecene mit der 60S Untereinheit des Ribosoms und behindern damit die Proteinsynthese durch Inhibition der Syntheseschritte. Je nachdem welche Phase des Translationsprozesses inhibiert wird, können Trichothecene in verschiedene funktionale „biologische“ Typen unterteilt werden. Die Hemmung der Initiationsphase (Typ T) ist typisch für T-2 Toxin, Nivalenol (NIV) und Verrucarol, während DON, Verrucarol und Fusarenon X die Elongationsphase (Typ ET), sowie den Terminationsschritt unterbinden. Weiterhin unterdrücken Trichothecene die DNA- und RNA-Synthese, zeigen toxische Effekte an der Zellmembran, beeinflussen die mitochondriale Funktion und nehmen Einfluss auf die Zellteilung, wobei beim zytotoxischen Potential der einzelnen Toxine große Unterschiede bestehen.

Diese biologischen Wirkungen sind vor allem nach längerer Exposition und bei höheren Konzentrationen zu beobachten. Der Einfluss niedriger Toxinmengen auf zelluläre Stoffwechselwege, die über pflanzliche Lebensmittel aufgenommen kaum zu vermeiden sind, wurden bislang nur unter dem Aspekt der immunmodulatorischen Eigenschaften der Trichothecene untersucht. Deswegen sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels vergleichender Genexpressionsanalyse neue und grundlegende Erkenntnisse zum molekularen Wirkungsmechanismus von Trichothecenen, im speziellen DON, in immunkompetenten und nicht immunkompetenten humane Zellen gewonnen werden. Dazu wurden in einem ersten Schritt die zelltyp-abhängige Empfindlichkeit humaner Zelllinien gegenüber Trichothecenen untersucht. Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich auf DON induzierte Veränderungen der Genexpression, sowie die Aktivierung von Signaltransduktionswegen.

---

Teile der Arbeit wurden im Rahmen des Graduiertenkollegs „Genomforschung in der Tiermedizin“ (GRK1029) durch die Deutsche Forschungsgesellschaft (DFG) gefördert. Eine weitere Förderung erfolgte durch die Brigitte und Wolfram Gedeck-Stiftung über die Gesellschaft für Mykotoxinforschung.

## 2                   SCHRIFFTUM

### 2.1    Allgemeines

Trichothecene sind Mykotoxine die von einer Reihe von verschiedenen Pilzen produziert werden. Chemisch gehören sie zu den Sesquiterpenoiden (Ciegler 1975, Rocha et al. 2005). Im Jahr 1949 isolierten Freeman und Morrison aus *Trichothecium roseum* das erste Trichothecen mit dem Namen Trichothecin. Deoxynivalenol (DON; 12,13-epoxy-3 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15-trihydroxy-trichothec-9-ene-8-one) wurde von einer japanischer Arbeitsgruppe isoliert und als 4-Deoxy-Nivalenol beschrieben (Yoshizawa & Morooka 1974, Yoshizawa & Morooka 1975). Vesonder et al. (1973) nannte das Toxin Vomitoxin, da kontaminiertes Futter bei Schweinen zu Erbrechen führte.

In den Jahren 1942-47 erkrankten 10 % der Bevölkerung von Orenburg in Sibirien nach dem Verzehr von überwinterten Getreide. Das Krankheitsbild fand als Alimentary Toxic Aleukia – Syndrom (ATA) Eingang in die Literatur. Symptome waren u.a. Erbrechen, Entzündungen der Haut, Durchfall, Hämorrhagien, Sepsis, Depletion des Knochenmarkes und eine ausgeprägte Leukopenie. In den Proben konnte Olifson (1972) *F. poae* und *F. sporotrichioides* nachweisen und machte ein als „Poaeufusarin“ bezeichnetes Toxin ursächlich für die Krankheitssymptome verantwortlich. Mirocha & Pathre (1973) untersuchten mittels Gaschromatographie das „Poaeufusarin“ und konnten 7 Hauptkomponenten erfassen, wobei den größten Teil das T-2 Toxin ausmachte.

Heute sind mehr als 180 Trichothecene bekannt, wobei T-2 Toxin unter dem Aspekt der Toxizität und DON im Hinblick auf dessen Vorkommenshäufigkeit die größte lebensmittelhygienische Bedeutung besitzt (Grove 1988, Pestka & Smolinski 2005, Grove 2007). Verschiedene nationale und internationale Gremien wie das gemeinsame FAO/WHO Expertenkomitee (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADITIVES; JECFA, 2001) oder das SCF (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD, 2001 und 2002) veröffentlichten zum Teil umfangreiche Monographien zur toxikologischen Bewertung und zum Vorkommen der Trichothecene. Aufgrund der durch den Wissenschaftlichen Lebensmittelausschuss der Europäischen Union (SCF 2002) durchgeführten



Risikobewertungen für die Trichothecene T-2 Toxin, HT-2 Toxin, DON und Nivalenol wurden die folgenden tolerierbaren täglichen Aufnahmen pro Kilogramm Körpergewicht (TDI) berechnet: Deoxynivalenol 1 µg, Nivalenol 0,7 µg und T-2/HT-2 Toxin 0,2 µg pro Kilogramm Körpergewicht (TDI-Wert).

## 2.2 Bildung der Trichothecene

Trichothecene werden von einer Reihe pflanzenpathogener Pilze aus den Genera *Fusarium*, *Mycothecium*, *Trichoderma*, *Trichothecium*, *Verticimonosporium*, *Myrothecium* und *Stachybotrys* produziert wobei den Fusarien bei weitem die größte Rolle zukommt (Ueno 1985, Rocha et al. 2005). Wichtige toxinbildende Fusarienarten sind in Tab. 1 aufgeführt. Von ca. 145 bislang beschriebenen Fusarien-Spezies besitzen ca. 20 Spezies, die Fähigkeit Mykotoxine zu bilden. *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum* verursachen die partielle Taubährigkeit, die gefährlichste Ährenkrankheit im Weizenanbau, die unter anderem durch die Bildung sogenannter Schmachtkörner zu Ernteverlusten, Qualitätsbeeinträchtigungen (z.B. schlechtere Back-, Brau- und Saatgutqualität) und Toxinbelastungen des Erntegutes führt. Die befallenen Körner sind rosa bis weinrot gefärbt (Bottalico et al. 1989, Bottalico & Perrone 2002), allerdings können auch bei geringem Fusarienbefall und optisch unveränderten Körnern bereits Fusarientoxine im Getreide nachgewiesen werden (Ueno 1985). Beim Mais äußern sich die Symptome einer Fusarieninfektion als Wurzel-, Stängel-, bzw. Kolbenfäule (ear rot disease) (SCOOP 2003). *F. graminearum* und *F. culmorum* gelten als die bedeutendsten DON-Produzenten, *F. poae* und *F. sporotrichioides* repräsentieren wichtige T-2 bzw. HT-2 Toxin Produzenten. Beim besonders häufig mit T-2/HT-2 belasteten Hafer (Hocke 2008) spielt hingegen *F. langsethiae* die größte Rolle.

**Tabelle 1** Wichtige toxinbildende Fusarienarten in Europa nach Chelkowski (1998), Logrieco et al. (2002) und Grove, Reimann und Roy (2007)

<b>Fusarien</b>	<b>Mykotoxine</b>
<i>F. acuminatum</i>	DAS <sup>a</sup> , T-2, HT-2
<i>F. cerealis</i>	FUS-X <sup>b</sup> , NIV <sup>c</sup>
<i>F. culmorum</i>	Ac-DON <sup>d</sup> , DON, NIV, FUS-X
<i>F. equiseti</i>	DAS, FUS-X, NIV
<i>F. graminearum</i>	Ac-DON, DON, FUS-X, NIV
<i>F. langsethiae</i>	T-2, HT-2
<i>F. poae</i>	DAS, NIV, T-2, HT-2,
<i>F. sambucinum</i>	DAS, T-2
<i>F. sporotrichioides</i>	DAS, T-2, HT-2,
<i>F. tricinctum</i>	DAS, T-2

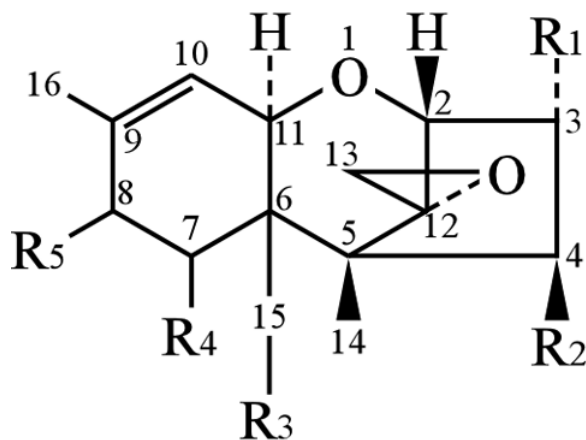
<sup>a</sup> Diacetoxyscirpenol, <sup>b</sup> Fusarenon X, <sup>c</sup> Nivalenol und <sup>d</sup> Acetyldeoxynivalenol

### 2.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Trichothecene sind nicht flüchtige, zyklische Sesquiterpenoide mit einem Epoxidring zwischen C<sub>12</sub> und C<sub>13</sub>, der für die biologische Wirksamkeit der Verbindungen, insbesondere der Hemmung der Proteinbiosynthese essentiell ist (Sudakin 2003, Pestka & Smolinski 2005). Die Doppelbindung zwischen C<sub>9</sub>/C<sub>10</sub> ist wichtig für die zytotoxischen Eigenschaften der Verbindung (Rocha et al. 2005). Abb. 1 zeigt die Struktur einiger Trichothecene, deren zytotoxische Eigenschaften in Rahmen dieser Arbeit detaillierter untersucht wurden. Ueno (1977) teilte die Trichothecene auf Grund ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen ein. Die Typ A Trichothecene sind charakterisiert durch Hydroxylgruppen und Karbonsäuren als Substituenten und weisen keine Ketogruppe am C<sub>8</sub> auf. Sie umfassen Toxine wie T-2 Toxin, HT-2 Toxin, Mono- und Diacetoxyscirpenol und Neosolaniol. Zu den Typ B Trichothecen, die durch eine Ketogruppe am C<sub>8</sub> gekennzeichnet sind, zählen DON und dessen biosynthetische Vorstufen 3- bzw. 15-Acetyldeoxynivalenol, sowie Nivalenol und Fusarenon X. Typ C Trichothecene, die zum Teil auch in bestimmten Pflanzen (*Baccharis megapotamica*) gefunden werden, besitzen eine zweite Epoxidgruppe am C<sub>7</sub>/C<sub>8</sub> oder C<sub>9</sub>/C<sub>10</sub> (Cortocin und Baccharin). Die letzte Gruppe, Typ D Trichothecene wie Satratoxin, Roridin A, Verrucarin A zeichnet sich durch ein makrozyklisches Ringsystem zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>15</sub> aus (Pestka 2007). Die beiden letzteren Gruppen haben keine lebensmittelhygienische Bedeutung, da sie von Schimmelpilzen produziert werden, die üblicherweise auf Körnern von

Nutzgetreide nicht nachweisbar sind. Eine Exposition des Menschen gegenüber makrozyklischen Trichothecenen ist allerdings dadurch gegeben, dass das Genus *Stachybotrys*, der wichtigste Produzent dieser Toxine, häufig nach Wasserschäden in Häusern und Wohnungen nachweisbar ist und dabei insbesondere beim Wachstum auf zellulosehaltigen Materialien (Holz, Tapeten, Isolierungsmaterialien) hohe Toxinmengen bildet.

Trichothecene sind chemisch-physikalisch stabile Moleküle, welche während Lagerung, Mahlprozessen, Erhitzen und anderen Produktionsschritten von Lebens- und Futtermitteln nicht zerstört werden (SCF, 1999). Sie werden weder bei der Nahrungsmittelzubereitung noch im Mund hydrolysiert oder abgebaut (Lauren & Smith 2001, Bretz et al. 2005). Die meisten Trichothecene sind löslich in Aceton, Chloroform oder Ethylacetat. Die polareren Typ B Trichothecene lassen sich auch in Ethanol, Methanol, Acetonitril und Wasser lösen (Ueno 1985, Yagen & Bialer 1993). Weitere physikalisch-chemische Eigenschaften sind in Tab. 2 zusammengefasst.



Toxin	R1	R2	R3	R4	R5
T-2	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
HT-2	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Deoxynivalenol	OH	H	OH	OH	=O
Nivalenol	OH	OH	OH	OH	=O
Satratoxin G	H	-O-C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> <sup>a</sup> -O-	H	H	H
Satratoxin H	H	-O-C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> <sup>a</sup> -O-	H	H	H

<sup>a</sup> Makrozyklisches Ringsystem zwischen C<sub>4</sub> und C<sub>15</sub>

**Abbildung 1:** Strukturformel einiger wichtiger Trichothecene

**Tabelle 2:** Physikalisch-chemische Eigenschaften von T-2, Deoxynivalenol und Satratoxin G

	T-2 Typ A	Deoxynivalenol Typ B	Satratoxin H Typ D
Summenformel:	C <sub>24</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>29</sub> H <sub>36</sub> O <sub>9</sub>
Molekulargewicht:	466,5	296,3	528,2
Schmelzpunkt:	151-152°C	151-153°C	162-166°C
Absorptionsmaximum:	< 200 nm	218 nm	255 nm
Molarer Extinktionskoeffizient (ε) in Methanol (218 nm):		6400	10400

## 2.4 Biologische Eigenschaften

Die in zahlreichen Fütterungs- und anderen Tierversuchen erhobenen Daten zur Toxizität der Trichothecene sind in den bereits erwähnten Monographien des SCF (1999, 2001, 2002) und der JEFCA (2001) detailliert und umfassend dargestellt. Ein Überblick zur Toxizität von DON bzw. T-2/HT-2 Toxin ist auch in den in den letzten Jahren am Lehrstuhl angefertigten Dissertationen von Spindelböck (2004) und Hocke (2008) zu finden. Weitere Informationen zur *in vivo* Toxizität von DON geben zudem die Übersichtsarbeiten von Pestka and Smolinski (2005) und Pestka (2007).

DON verursacht in hohen Dosen Mykotoxikosen bei Nutztieren, wobei Monogastrier, insbesondere Schweine, empfindlicher sind als Tiere mit Vormagensystem (Pestka 2007), da bei letzteren - wie auch beim Geflügel - ein beträchtlicher Teil des über die Nahrung aufgenommenen DON's von der mikrobiellen Flora im Darm abgebaut wird. Die Darmflora des Schweines wie auch des Menschen besitzt hingegen nur in sehr geringem Maß diese Fähigkeit (Desjardins et al. 1993, ERIKSEN 2003). Dementsprechend sind beim Schwein bis zu 82 % des aufgenommenen Toxins im Serum nachweisbar (Rotter et al. 1996, Goyarts et al. 2005), beim Rind hingegen konnten nur ca. 1 % systemisch nachgewiesen werden (Prelusky et al. 1984). Eine perorale DON-Aufnahme induziert bei Schweinen ab Konzentrationen von 0,05 - 0,2 mg/kg Körpergewicht (KGW) Erbrechen. Ab einer Dosis von 1 - 2 mg DON/kg Futter zeigten junge Schweine Nahrungsverweigerung (Anorexie), wahrscheinlich als Folge einer erhöhten zentralen Serotoninausschüttung (Prelusky 1996). Längere Aufnahme (über Wochen) eines mit DON belasteten Futters (4 mg DON/kg Futter) resultierte in Wachstumsdepression und Gewichtsverlust (FRIEND 1986). Diese Beobachtungen konnten auch in neueren Arbeiten bestätigt werden (Doll et al. 2003, Danicke et al. 2004). Durch T-2/HT-2 ausgelöste Intoxikationen beim Nutztier äußern sich in relativ unspezifischen Symptomen wie Futterverweigerung, Dermatitisen, Durchfällen, sowie Hämorrhagien und Nekrosen der Magen- und Darmschleimhaut, der Milz und des Knochenmarks und ähneln damit der Strahlenkrankheit (Ueno 1985).

Anhand der ausgeprägten akuten toxischen Effekte bei Tieren wurde vielfach darauf hingewiesen, dass Trichothecene im speziellen DON, ähnliche Effekte auch auf den Menschen haben könnte (Pestka & Smolinski 2005). Allerdings treten durch Trichothecene

verursachte Mykotoxikosen beim Menschen unter den heutigen Lebensbedingungen in den industrialisierten Staaten nicht auf. Historisch gesehen gibt es aber einige entsprechende Berichte, wobei als Auslöser extreme Witterungsbedingungen bzw. Hungersnöte zu nennen sind. Die ersten detaillierten Angaben über Erkrankungen von Menschen nach dem Verzehr *Fusarien* kontaminierten Getreides stammen aus Sibirien. Ende des 19. Jahrhunderts wurde über entsprechende Ausbrüche berichtet, die Symptome waren Erbrechen, Kopfschmerzen und Schwindel. Im Jahr 1913 trat in Rußland ein vergleichbares Krankheitsbild die sog. Alimentary Toxic Aleukia (ATA) nach dem Verzehr von überwinterten Getreide auf. Symptome waren Diarrhö, Erbrechen, Leukopenie, Hämorrhagien und Schock, zum Teil traten bei den betroffenen Personen auch Todesfälle auf (Pestka & Smolinski 2005). Größere Ausbrüche wurden in den Jahren 1942-47 in der Umgebung von Orenburg, Russland beobachtet. Betroffen waren 10 % der Bevölkerung (Forgacs 1972). In neuerer Zeit wurde aus dem asiatischen Raum über eine akute Mykotoxikose bei Menschen berichtet. Nach dem Verzehr von verschimmeltem Getreide traten Übelkeit, Erbrechen, Verdauungsstörungen, Schwindelgefühl, Diarrhoe und Kopfschmerz auf. In den stark mit *Fusarien*-Spezies kontaminierten Getreideproben konnten neben DON (3 - 93 mg/kg) auch andere Trichothecene nachgewiesen werden, allerdings mit weitaus niedrigerer Inzidenz und in deutlich geringeren Konzentrationen (JECFA 2001). Bei einer anderen Epidemie in Indien konnten zusätzlich die Symptome Völlegefühl, akutes Abdomen, Schlundirritationen und Blut im Stuhl beobachtet werden. Auch hier wurden im verzehrten Lebensmittel neben DON noch andere Toxine nachgewiesen (Eriksen & Alexander 1998).

## **2.5 Metabolisierung**

Die bekannten Daten zur Metabolisierung der Trichothecene, insbesondere DON und T-2/HT-2 Toxin, wurden in mehreren Dissertationen (Spindelböck 2004, Hocke 2008), ebenso wie in den Monographien des SCF und JEFCA ausführlich zusammengefasst. Zur Metabolisierung von DON im tierischen Organismus, insbesondere beim Schwein wurden zudem in jüngerer Zeit eine ganze Reihe von Untersuchungen veröffentlicht (ERIKSEN 2003, Razzazi-Fazeli et al. 2003, Valenta et al. 2003, Bily et al. 2004). Grundsätzlich werden acetylierte DON-Analoga wie 3-Acetyl- und 15-AcetylDON im Magen durch Abspaltung der Acetylgruppen rasch und vollständig zu DON reduziert (ERIKSEN 2003). Bei einmaliger Applikation von DON kann das Toxin bereits kurze Zeit (5 - 20 min) nach peroraler Aufnahme im Serum

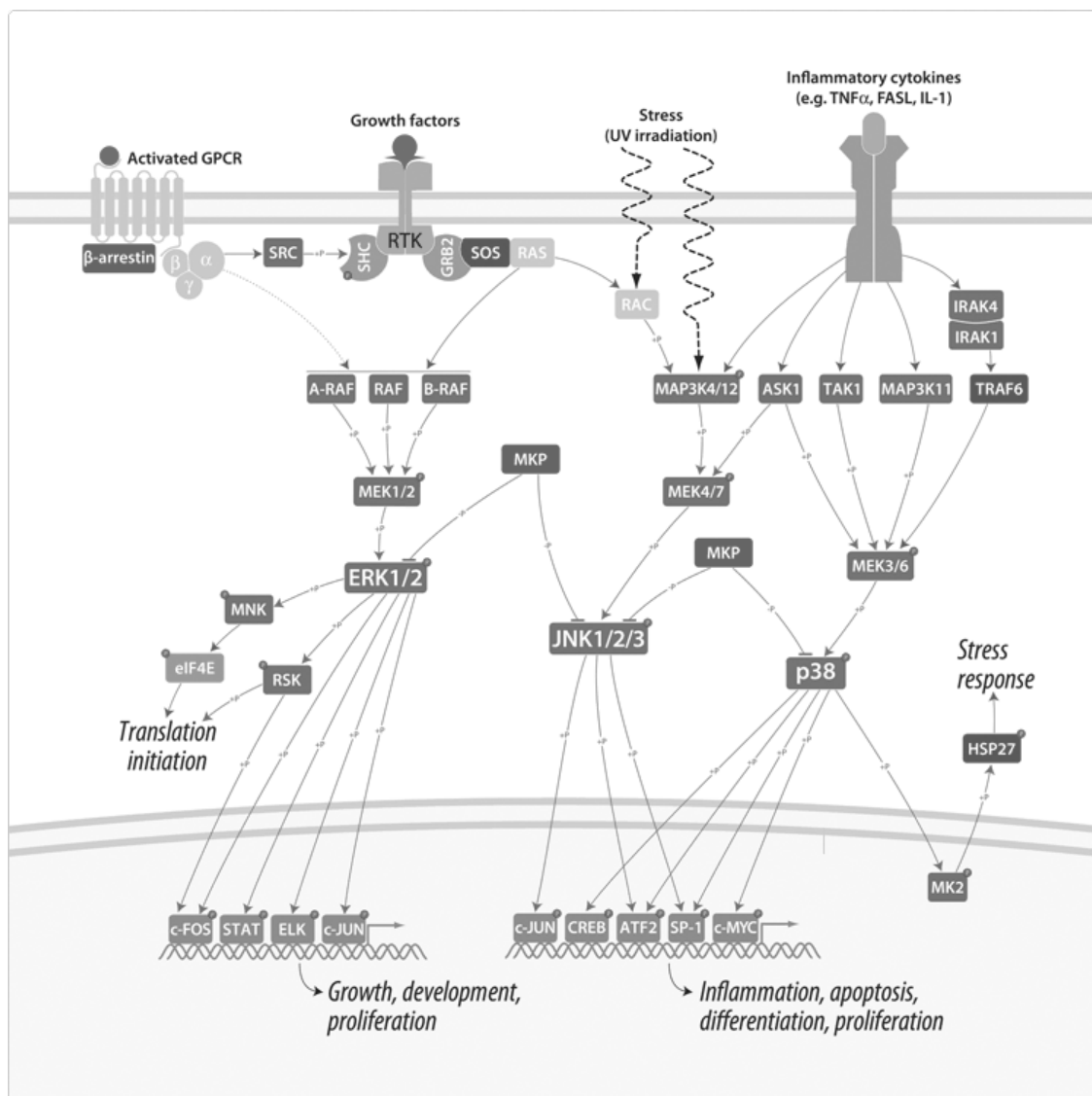
nachgewiesen werden, danach ist innerhalb einiger Stunden ein rascher Abfall des Serumspiegels an freiem DON zu beobachten (Bily et al. 2004). Ein Großteil des Toxins (45 - 68 %) wird über den Urin und Faeces ausgeschieden (Prelusky et al. 1988, Eriksen 2003). Als Metabolite sind im wesentlichen nur in der Leber gebildetes glucuronidiertes DON und das durch mikrobielle Deepoxidation im Dickdarm entstehende De-epoxy-deoxynivalenol (DOM-1) nachzuweisen. Das durchschnittliche Verhältnis von toxischem DON zum atoxischen DOM-1 im Schweine-Urin liegt bei etwa 18 zu 1 (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Bei T-2 Toxin ist eine Metabolisierung prinzipiell über Deacetylierung, Hydroxylierung, Glucuronidierung und Deepoxidation möglich, wobei der Hauptbiotransformationsweg die Deacetylierung am C-4 ist, was zur Entstehung von HT-2 Toxin führt (SCF, 2001). Weitere wichtige Metabolite stellen 3'-OH T-2, 3'-OH HT-2, Neosolaniol und T-2 Tetraol, sowie die entsprechenden Glucuronide dar.

## **2.6 Zelluläre und molekulare Effekte von Deoxynivalenol**

Die meisten toxikologischen Studien befassen sich mit dem immunmodulatorischen Potential von DON (Übersicht bei Pestka et al. (2004). In neueren *in vivo* und *in vitro* Studien, wird auch vermehrt auf Toxineffekte in nicht immunkompetenten Zellen hingewiesen (Moon et al. 2008). Nach DON-Exposition wurden vor allem in der Maus, aber auch bei Schweinen primär Veränderungen der lymphatischen Organe (Milz, Knochenmark und Lymphozyten), sowie auch z.T. der Leber nachgewiesen (Pestka et al. 2005, Tiemann et al. 2008). Makroskopisch sind die Organe unauffällig, histologisch konnten in der Leberzelle des Schweines, in primären Rattenleberzellen und in humanen Hepatozyten toxininduzierte Effekte beobachtet werden, die sich als Veränderungen der Glycogenspeicherung, Eisenanreicherungen, Verlust der Ribosomen und Anreicherung von Fettvakuolen darstellten (Tiemann et al. 2006, Tiemann et al. 2008).

Auf zellulärer Ebene ist der zytotoxische Effekt von Trichothecenen teilweise durch die Hemmung der Proteinsynthese in Folge der Bindung an das Ribosom eukaryotischer Zellen zu erklären (Ueno 1977). Bei T-2 konnte desweiteren eine Apoptoseinduktion mit Caspase-3 Beteiligung, verminderte mitochondriale Funktion und Induktion von oxidativen Stress beobachtet werden (Königs et al. 2008, Sahu et al. 2008). Doch gerade neuere Untersuchungen, speziell für DON zeigen, dass Trichothecene unabhängig davon in Konzentrationen unterhalb proteinsynthesehemmender Dosen weitere zelluläre Funktionen beeinflussen können.

Grundsätzlich binden Trichothecene – ähnlich wie die Ribosom-inaktivierenden Proteine Ricin und Shigatoxin bzw. das Antibiotikum Anisomycin - an die 60S Untereinheit des Ribosoms und interferieren dann mit der Peptidyltransferase-Aktivität. Als Folge davon werden in einem als „ribotoxic stress response“ bezeichneten Prozess Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK) aktiviert (Iordanov et al. 1997, Shifrin & Anderson 1999). Der MAPK-Pathway stellt einen der zentralen Signaltransduktionswege der Zelle dar, eine schematische Darstellung dieser Signalkaskade ist Abb. 2 zu entnehmen. ERK1/2, JNK1/2 und p38 repräsentieren die drei wichtigsten Proteinkinasen. Die MAP-Kinasen sind unter anderem an der Regulation der Proliferation, der Zelldifferenzierung, Migration, des Zellwachstums und des programmierten Zelltodes, Apoptose, sowie der Chemokin- und Zytokinsynthese beteiligt (Krens et al. 2006, Shvartsman et al. 2009).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Pathways (<http://escience.invitrogen.com/ipath/>)



Eine ganze Reihe von Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Pestka, die sich v.a. auf die immunmodulatorischen Effekte von DON konzentrierten, zeigen, dass die Aktivierung der MAP-Kinasen insbesondere von p38 und ERK1/2, in der Expression von Genen resultiert, die die Immunantwort, Chemotaxis sowie Entzündungsvorgänge steuern bzw. Apoptose auslösen. Übersicht bei Pestka (2007). Zu nennen ist hier vorrangig die Induktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF-alpha, sowie die gesteigerte Expression des entzündungsfördernden Enzyms Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Moon & Pestka 2003). Dass DON aber auch die Fähigkeit besitzt andere Signalwege, wie den NF-κB Weg zu aktivieren, zeigt sich in der Induktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin 8 (IL-8) (Moon et al. 2008, Van De Walle et al. 2008). DON ist im Gegensatz zu anderen Mykotoxinen wie Ochratoxin A und Patulin in der Lage, die Sekretion von IL-8 direkt zu beeinflussen (Maresca et al. 2008). Für humane Monozyten (U937-Zelllinie) konnte gezeigt werden, dass die IL-8 Induktion durch DON über den NF-κB Pathway induziert wird. In Untersuchungen von Moon et al. (2008) an einer humanen Darmzelllinie (intestine 407 Zelllinie) zeigte sich jedoch, dass die IL-8 Induktion über den Transkriptionsfaktor EGR1 moduliert und somit von der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 abhängig ist (Gray & Pestka 2007, Moon et al. 2008). Bei einer anderen humanen Darmzelllinie, CaCo-2, war wiederum kein Einfluß der ERK1/2 festzustellen, vielmehr waren p38 bzw. NF-κB in der DON-abhängigen IL-8 Sekretion involviert (Maresca et al. 2008). Diese Beispiele verdeutlichen, dass neben der für Trichothecene typischen Inhibierung der Proteinsynthese, weitere komplexe und zelltypabhängige Effekte im zellulären Stoffwechsel ausgelöst werden. Inwieweit DON zellabhängig die Induktion von Transkriptionsfaktoren steuert, und welche Targetgene dadurch induziert werden ist nur partiell und vor allem für Immunzellen beschrieben (Kinser et al. 2004, Moon et al. 2007).

Bis heute ist nicht klar, über welchen Weg die MAPK-Kaskade aktiviert wird (Bae & Pestka 2008). Auch ob DON die Fähigkeit besitzt, an Zellmembranstrukturen zu binden und dadurch die Signalkaskade zu aktivieren, ist nicht bekannt. Untersuchungen, die sich auf TLR (toll like receptor) oder andere Membranstrukturen konzentrierten, führten hierbei zu widersprüchlichen Ergebnissen (Islam et al. 2003, Pestka & Zhou 2006). In Untersuchungen von Zhou et al. (2003) und Zhou et al. (2005) konnte PKR (Protein RNA activated kinase R) als mögliches Targetgen oberhalb des MAPK Pathways identifiziert werden. PKR Inhibitoren führten bei Monozyten und Makrophagen zu verringerter MAPK-Aktivität und Apoptose-Induktion. In neueren Arbeiten konnte auch für Satratoxin G eine Rolle der PKR bei der

Caspase-unabhängigen Apoptose-Induktion gezeigt werden (Islam et al. 2008). Auch für die Induktion von IL-8 durch DON, die bei Monozyten auf die Aktivierung von p38 sowie NF- $\kappa$ B Pathways zurückgeführt wurde, scheint nach neueren Untersuchungen (Gray et al. 2008) die PKR essentiell zu sein.

### 3 PUBLIKATIONEN

#### 3.1 “Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines”

Carina Nielsen, Maximilian Casteel, Andrea Didier, Richard Dietrich, Erwin Märtlbauer  
MYCOTOXIN RESEARCH

##### Abstract

Trichothecene cytotoxicity of type A (T-2 toxin and HT-2 toxin), type B (deoxynivalenol [DON] and nivalenol [NIV]), and type D (satratoxins G and H) compounds was determined comparatively by using eight permanent human cell lines (Hep-G2, A549, CaCo-2, HEp-2, A204, U937, RPMI 8226, and Jurkat). Viability of cells was measured by a water-soluble tetrazolium (WST-1) reagent cell proliferation assay assessing mitochondrial metabolic activity. Toxicity was expressed as the toxin concentration inhibiting 50 % of cell viability ( $IC_{50}$ ). Depending on the chemotype of the tested trichothecenes, relative cytotoxic activity differed by a factor of 100-1000, the corresponding  $IC_{50}$  values were in the range from 2.2 nmol/l (satratoxin H on Jurkat and U937 cells) to 4,900 nmol/l (deoxynivalenol on HEp-2 cells). In contrast, the specific toxicity of each individual mycotoxin towards different cell lines was within remarkable close limits, and between-cell line differences were much smaller than previously reported. For the cell lines tested,  $IC_{50}$  values were 4.4-10.8 nmol/l for T-2 toxin, 7.5-55.8 mol/l for HT-2 toxin, 600-4,900 nmol/l for DON, 300-2,600 nmol/l for NIV, and 2.2-18.3 nmol/l for satratoxins G/H. Further on, for the first time the toxic activity of trichothecenes on primary cell culture of human endothelial cells (HUVEC) was tested. The susceptibility of this cell line was comparable to the other cell lines tested, with  $IC_{50}$  values ranging from 16.5 nmol/l (T-2 toxin) to 4,500 nmol/l (DON). The results suggest that the current focus of cytotoxicological studies on trichothecenes on lymphoid cell lines may lead to an underestimate of their potential on other target cell systems.

## Introduction

The *Fusarium* mycotoxins are natural contaminants in cereals, and occur regularly in food supplies worldwide. A major group of *Fusarium* mycotoxins, the trichothecenes, are toxic for humans and for animals, whereby inhibition of protein synthesis is thought to be the fundamental mechanism of toxicity (Wei and McLaughlin 1974; McLaughlin et al. 1977). The trichothecenes are non-volatile, low-molecular-weight sesquiterpenoids. Common features of the molecular structure are an epoxide group at C-12, 13 and a double bond at C-9, 10, but extensive variations exist in side chain substitutions of the trichothecene nucleus (Figure 1). Depending on the substituent at C-8 (ketone or isovaleryl group), major trichothecenes are classified as type A (8-isovaleryl; T-2 toxin, HT-2 Toxin) and type B (8-keto; NIV, DON) trichothecenes, respectively (Bennett and Klich 2003). Type C toxins possess a second epoxide group, while the macrocyclic type D trichothecenes have an additional ring system spanning between C-4 and C-15 (Grove 1993). In food, only type A and type B trichothecenes are regarded as relevant. Recently published data from the United Kingdom highlighted the frequency of deoxynivalenol (DON) intake by the population. The majority of adults in this study appeared to be exposed to DON, as observed by urine testing (Turner et al. 2008). In addition, a large collaboration study (SCOOP 2003) revealed that 57 % of the cereal based foods in the EU were contaminated with DON.

The macrocyclic (type D) toxins recently received attention because of their potential health risk after inhalation (Brasel et al. 2005).

Much effort has been placed on the establishment of *in vitro* models to test for trichothecene toxicity in a variety of mammalian cell lines (Gutleb et al., 2002; Gareis 2006). Recent cytotoxicological studies, most of them employing human cell lines, have shown that trichothecenes are able to trigger intracellular pathways leading to apoptosis and necrotic processes (Bouaziz et al. 2008; Chen et al. 2008; Islam et al. 2008; Königs et al. 2008; Pestka 2008). The elucidation of the mechanisms of toxicity has focused on differential responses of mRNA and proteins following *in vitro* exposure. New insights concerning activated cell signalling pathways in human cell lines through gene induction and activation of mitogen-

activated protein kinase (MAPK)-pathways could be demonstrated (Nielsen et al. 2009). The vast majority of these data, however, has been derived from studies including one or two cell lines under different experimental conditions. Considering the chronic dietary exposure of humans to trichothecenes, further *in vitro* models for toxicological investigations are required to understand the impact of these mycotoxins on human health.

Therefore, the objective of this study was to create comparative data on (i) the susceptibility of different human cell lines to trichothecenes, and (ii) the specific activity of different trichothecene chemotypes on individual cell lines using a comprehensive approach. For this purpose the toxicity of type A (T-2 toxin, HT-2 toxin), type B (DON, NIV), as well as type D (satratoxins H and G) trichothecenes to one primary and eight permanent human cell lines of different histological origin was studied. Further on, primary umbilical vein endothelial cell (HUVEC) line was used. All cell lines were tested in a cell culture assay type which employs water soluble tetrazolium (WST-1) as the indicator compound.

## **Materials and methods**

### Toxins

T-2, HT-2, DON, NIV toxin standards were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Standards of satratoxin G and H were kindly provided by Prof. Gareis (Max Rubner-Institut, Kulmbach, Germany). Standards were dissolved in 96% ethanol and stored at -20°C.

### Cell lines and culture conditions

Permanent human cell lines (Hep-G2, A549, CaCo-2, A204, U937, RPMI 8226 and Jurkat) used throughout the study were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) or ECACC (European Collection of Cell Cultures; HEp-2) and cultured in media recommended by the supplier. In detail, hepatoma cell line Hep-G2, TH<sub>1</sub>-lymphocytic cell line Jurkat, B-lymphocytic cell line RPMI 8226 and monocytic cell line U937 were cultured in RPMI 1640 medium. Colon carcinoma cell line CaCo-2 and larynx carcinoma HEp-2 were cultured in MEM-Earle medium, rhabdomyosarcoma cell line A204 in Mc Coy's 5A modified medium and lung carcinoma cell

line A549 in Dulbecco's MEM. All media were supplemented with FCS and, if requested, with 2 mM L-glutamine or 1 % non-essential amino acid (NEAA). Cells were maintained as monolayers in 80 cm<sup>2</sup> culture flasks in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 7 % CO<sub>2</sub> in air. The cell lines were subcultivated when they reached 80 % confluence to maintain exponential growth. HUVEC were obtained from Cell Systems (Biotechnologie Vertrieb GmbH, St. Katherinen) and seeded in culture flasks with endothelial cell growth medium containing supplements (Cell Systems) but no antibiotics. Confluent primary cultures were trypsinized by using the subculture reagent kit recommended by Cell Systems. WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) was from Roche Diagnostics, Penzberg, Germany.

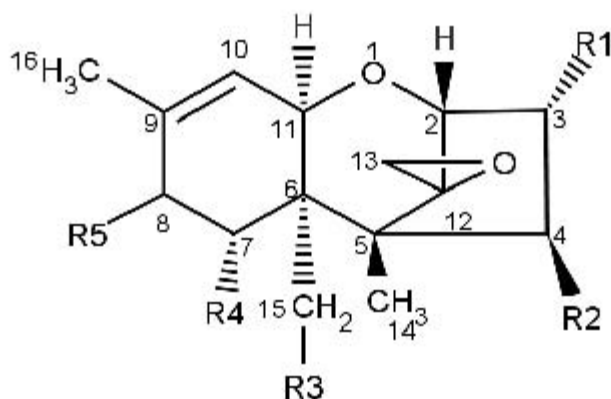
#### WST-1 assay

The toxicity tests were performed using a WST-1 bioassay as described by Nielsen et al. (2009). Initially, the optimal incubation time and cell densities were determined for each cell-line. To perform the assay, cell suspension (0.2 ml) was added to each well of a F96 microwell plate (Nunc, Langensfeld) and, except for the HUVEC, incubated for 24 h at 37 °C. To avoid contact inhibition of cell division, HUVEC cells were seeded at low cell densities ( $1.7 \times 10^3$  cells per well) and cultured for 3 – 4 days until confluency. Initial cell densities for the other cell lines were  $1 \times 10^4$  cells per well (A549, HEp-2, A204 and Hep-G2),  $2 \times 10^4$  cells per well (CaCo-2 and Jurkat),  $1.25 \times 10^5$  cells per well (RPMI 8226), and  $2 \times 10^5$  cells per well (U937), respectively. After 24 h incubation, half of the cell culture medium was replaced with fresh culture medium containing trichothecenes in varying concentrations. The ethanol concentration was adjusted to 0.2% (v/v) in all cultures (Thuvander et al. 1999). Control wells were performed with and without added solvent to check whether or not cell proliferation and viability was influenced under these conditions. Toxin treatment lasted for 48 h in most cases except for CaCo-2 and HUVEC cells (72 h). Then, for the determination of cell viability, the water-soluble dye WST-1 was added. The first report on the cytotoxicity evaluation of mycotoxins by an MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) test was already published in 1987 by Reubel et al. (1987). This assay, which is similar to the MTT test, is based on the release of formazan from the tetrazolium salt WST-1 by various mitochondrial enzymes, which results in a colour change from pale red to dark red. In detail, 10 µl of WST-1 reagent was added to each well

and incubated at 37 °C for variable time periods (0.5 to 2 h). Then, plates were thoroughly shaken and absorbance was measured in a microplate reader at 450 nm. Results were expressed as percentages of the mean absorbance (optical density) for toxin-exposed test wells vs. vehicle-treated controls (normal growth medium with ethanol), which was set to 100 %. All experiments were carried out in triplicates, and results were expressed as mean and standard error of the mean (SEM). Dose-response curves were computer plotted, and the 50 % inhibition of cell proliferation ( $IC_{50}$ ) was calculated from plotted data by a computer programme (RidasoftWin).

## Results and discussion

Numerous studies have been conducted on the cytotoxicity of trichothecenes on a vast variety of animal and human cell lines. When comparing these studies, it becomes obvious that remarkable differences have been reported for identical cell lines (Gutleb et al. 2002). For example, the classical HeLa cell line was the most sensitive in the study of Calvert et al. (2005) whereas Hanelt et al. (1994) stated a comparatively low susceptibility of these cells. The poor comparability of results was attributed to the different methods used for measuring cytotoxicity, which was done in various studies by either visual inspection, staining, counting of cell numbers, or by using colorimetric assays such as the MTT, BrdU or LDH test. Furthermore, other experimental conditions also varied in earlier studies. Therefore, the aim of this study was to generate comparable data, obtained by parallel analysis under standardized conditions, on the cytotoxicity of different trichothecenes to human cell lines.



Toxin	MW	R1	R2	R3	R4	R5
T-2	466.5	OH	OAc	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
HT-2	424.4	OH	OH	OAc	H	OCOCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Deoxynivalenol	296.3	OH	H	OH	OH	=O
Nivalenol	312.3	OH	OH	OH	OH	=O
Satratoxin G	544.5	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>5</sub> <sup>a</sup>	H	H	H
Satratoxin H	528.2	H	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub> <sup>a</sup>	H	H	H

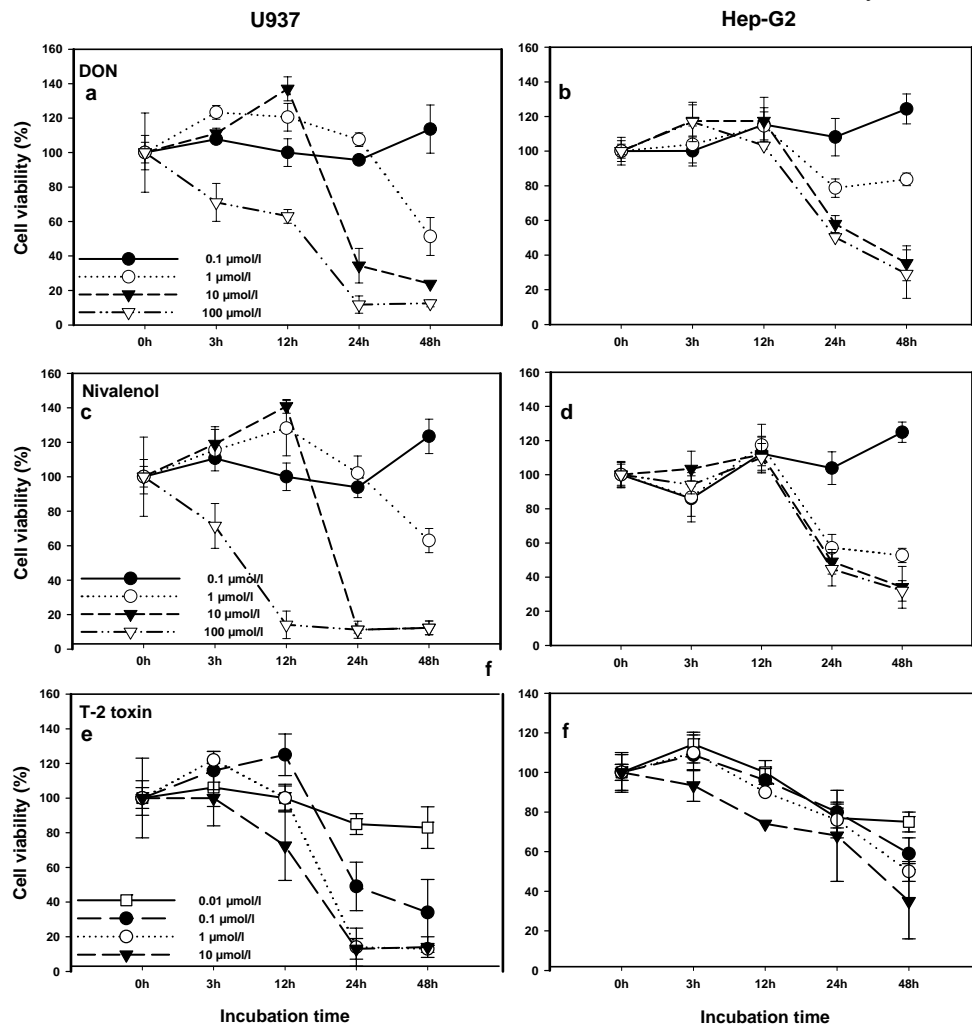
<sup>a</sup> Macrocyclic ringsystem between C<sub>4</sub> and C<sub>15</sub>

**Figure 1.** Structures of trichothecenes tested



With respect to the relevance (frequency of exposure of humans), T-2 toxin, HT-2 toxin, DON and NIV were selected because of their worldwide occurrence in food (Abramson et al. 1998; Curtui et al. 1998; Curtui et al. 2005). Macrocyclic trichothecenes, satratoxin G and H, were included in this study because they are possibly involved in the aetiology of illnesses related to water-damaged-buildings (Croft et al. 1986; Sorenson et al. 1987; Johanning et al. 1996; Johanning et al. 1998; Johanning et al. 1999; Gottschalk et al. 2006; Pestka et al. 2008). Cell-lines were selected because of several reasons: CaCo-2, Jurkat and U937 represent, at least for DON, the most commonly used human cell lines for toxicological studies addressing gastro-intestinal and immunomodulatory effects. Considering recently raised concerns about health risks associated with airborne mycotoxins (Mayer et al. 2007; Mayer et al. 2008), effects of trichothecenes on A549 and HEp-2 cells, originating from the epithelium of lung and larynx, were analyzed. Hep-G2 were used in several recent papers (Bouaziz et al. 2008; Königs et al. 2008; Nielsen et al. 2009) investigating toxin-induced activation of cellular pathways. In contrast, toxin-effects on mesenchymal cells such as the myocyte A204 have been poorly studied but seem to be interesting target cells for trichothecenes. For the same reason, a myeloid cell line was selected to complete the picture about toxic effects on immune cells. Finally, with respect to recent claims on low susceptibility of primary cells towards trichothecenes (Königs et al. 2008) cytotoxic effects of trichothecenes on HUVEC were determined in this study for the first time. To avoid biased results due to de-differentiation of cells, only material from passages 3 – 7 was used for the analyses. For the same reason, all permanent cell-lines were purchased from DSMZ or ECACC and used at maximum for 30 passages. Besides cell lines, toxicity data are mostly dependent from the type of assay. To reduce work load and avoid redundant analyses, we concentrated on the WST-bioassay which is similar to the MTT test and is characterized by high reproducibility. Additionally, several recent papers (Widestrand et al. 1999; Cetin and Bullerman 2005; Ivanova and Uhlig 2008) showed that assays employing parameters of the metabolic activity, such as Alamar Blue and MTT, are in good accordance with - or are even more sensitive than - assays testing membrane function (Neutral Red) or membrane integrity (LDH).

In a first step the optimum incubation time for each mycotoxin/cell line combination was determined. As an example, time-course and toxin concentration dependent differences in cell viability for U937 and Hep-G2 cell lines after exposure to DON, NIV and T-2 toxin are presented in Figure 2. U937 cells showed clear cytotoxic effects between 12 and 24 h of exposure, whereas more than 50 % of Hep-G2 cells were still proliferating at the same time interval. Interestingly, the 0.01  $\mu\text{mol/l}$  concentration level of T-2 toxin showed a reduction of viability up to 20 % for both cell lines after 48 h of exposure, whereas the 0.1  $\mu\text{mol/l}$  dose of type B trichothecenes (DON, NIV) provoked induction of proliferation compared to negative controls. Similar observations were already reported by Reubel et al. (1989).



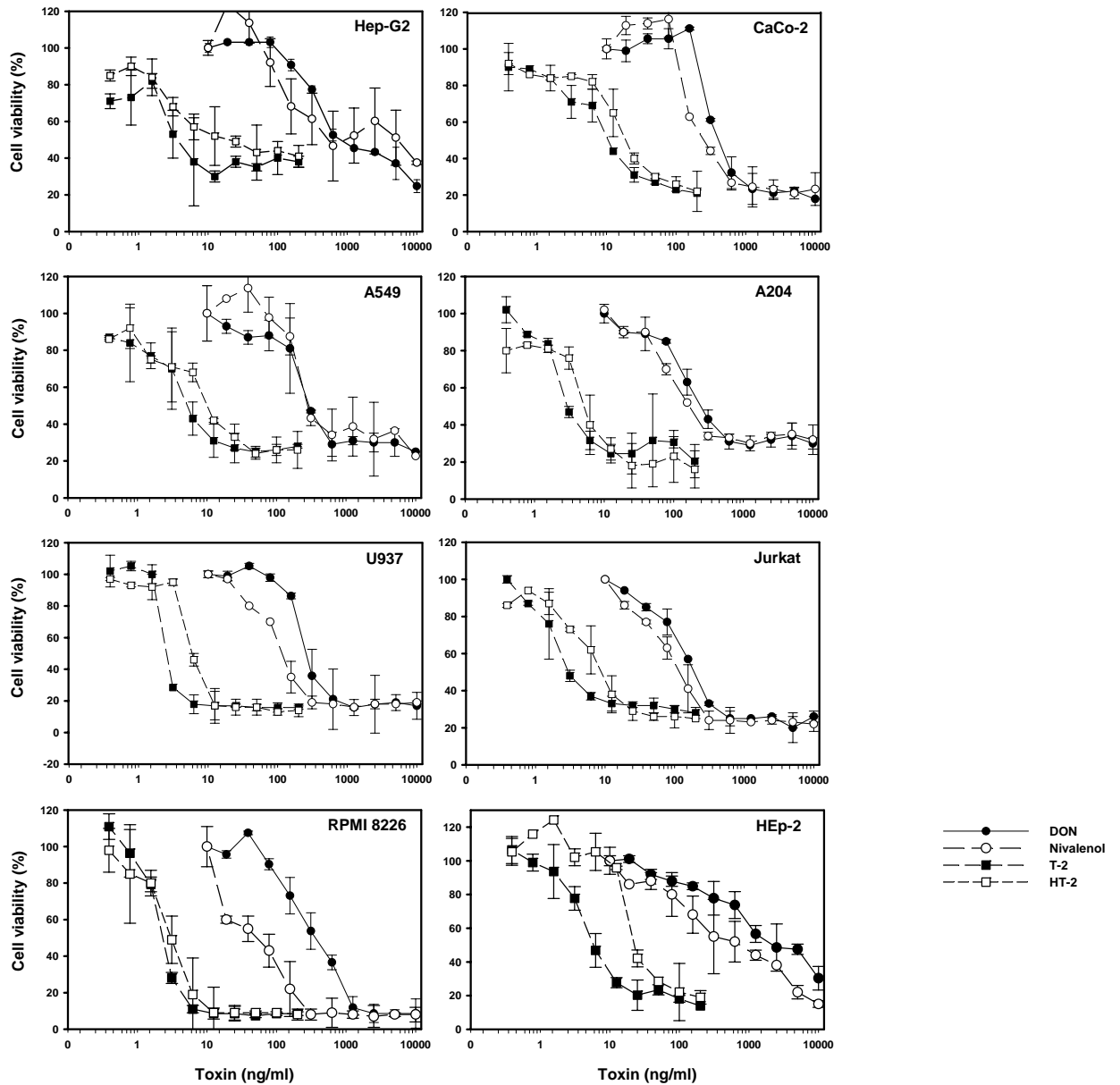
**Figure 2.** Time-course and concentration-dependence of trichothecene decreased viability of U937 and Hep-G2 cells. After exposure to 0.01 µmol/l (□), 0.1 µmol/l (●), 1 µmol/l (○), 10 µmol/l (▼) and 100 µmol/l (▽) concentrations of DON (a,b), nivalenol (c,d) and T-2 toxin (e,f), cell viability was determined via WST-1 test at the indicated times. Results are shown as mean ± SEM of at least four replicates.

Finally, the incubation times used to measure the dose causing 50 % inhibition of cell proliferation (IC<sub>50</sub>) by using the WST-1 test were 48 h for all cell lines, except for CaCo-2 and HUVEC cells which were incubated for 72 h. Table 1 shows the IC<sub>50</sub> values (corresponding dose response curves are shown in Fig. 3 for DON, NIV, T-2 and HT-2 toxin) obtained for eight permanent cell lines and differences in toxicity in one cell line of up to three orders of magnitude were found between the trichothecenes tested. Accordingly a recent study showed that type A trichothecenes reduce the mitochondrial activity of Jurkat cells at approximately 1000-fold lower concentrations than the type B trichothecenes (Nasri et al. 2006), which may be a hint for a trichothecene type dependent effect in human cells.

**Table 1** IC<sub>50</sub> values of DON, nivalenol, T-2, HT-2, satratoxin G and H following 48 h (<sup>a</sup> 72 h) exposure measured by the WST-1 bioassay using eight cell lines and one primary cell culture. The IC<sub>50</sub> values are shown in ng/ml, in parentheses corresponding µmol/l or nmol/l values are given.

Mycotoxin	Hep-G2	A549	HEp-2	CaCo-2 <sup>a</sup>	A204	U937	Jurkat	RPMI 8226	HUVEC <sup>a</sup>
DON (µmol/l)	566 (1.9)	274 (0.93)	1472 (4.9)	310 (1.0)	239 (0.8)	278 (0.9)	191 (0.6)	310 (1)	1329 (4.5)
Nivalenol (µmol/l)	386 (1.2)	253 (0.81)	818 (2.6)	175 (0.5)	166 (0.5)	119 (0.3)	120 (0.3)	75 (0.2)	570 (1.8)
T-2 (nmol/l)	3.5 (7.4)	5.3 (11.3)	5.5 (11.7)	10.8 (23.1)	2.9 (6.2)	2.5 (5.3)	3 (6.4)	2.1 (4.4)	7.7 (16.5)
HT-2 (nmol/l)	23 (55.8)	10.3 (25)	21.8 (52.9)	18.9 (45.9)	5.2 (12.6)	6 (14.5)	8.9 (21.8)	3.1 (7.5)	56.4 (136.9)
Satratoxin H (nmol/l)	3.4 (6.5)	n.d. <sup>1</sup>	4.7 (8.9)	5.5 (10.5)	3 (5.7)	1.2 (2.2)	1.2 (2.2)	n.d.	6.8 (12.8)
Satratoxin G (nmol/l)	3.9 (7.3)	n.d.	9.7 (18.3)	6.4 (12.1)	3.6 (6.8)	2.2 (4.1)	3.1 (5.5)	n.d.	n.d.

<sup>1</sup> n.d. = no data available



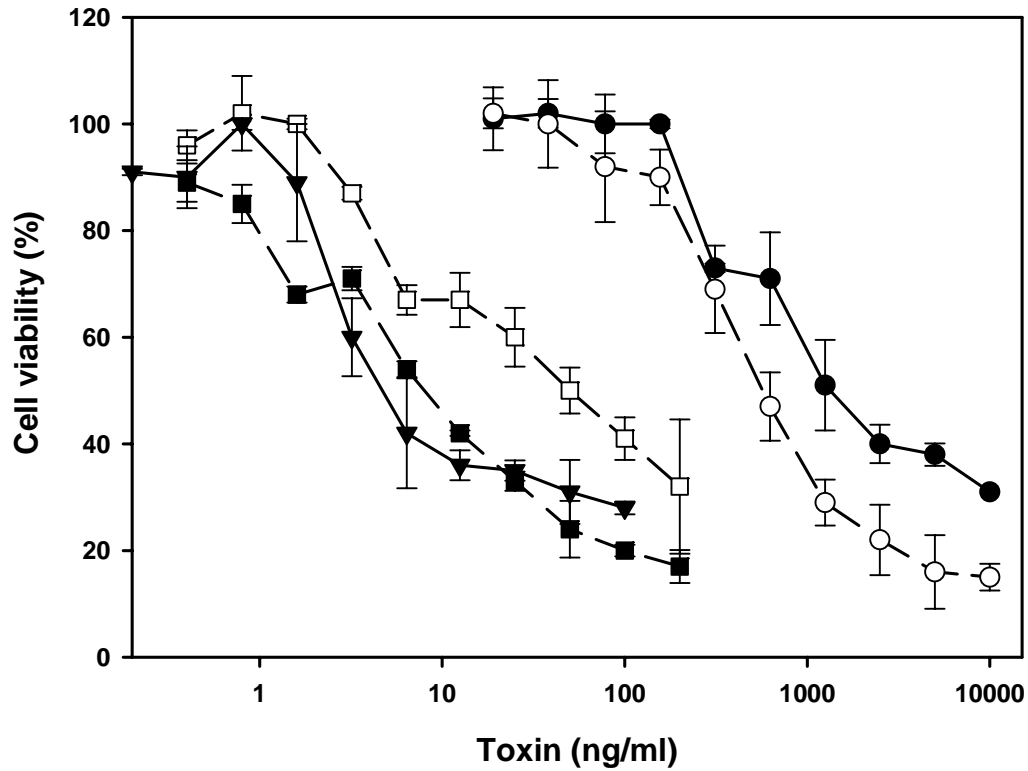
**Figure 3.** Cytotoxic effects of DON (-●-) or NIV (-○-) at concentrations of 10–10,000 ng/ml, and T-2 toxin (-■-) or HT-2 toxin (-□-) at concentrations of 0.4–200 ng/ml on proliferation of Hep-G2, CaCo-2, A549, A204, U937, Jurkat, RPMI 8226 and HEp-2 cell lines following 48-h (<sup>a</sup>72 h) exposure as determined by the WST-1 bioassay; mean ± SEM. IC<sub>50</sub> values are given in Table 1.

Several immunosuppressive effects of trichothecenes have been demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies (Bondy and Pestka 2000; Meky et al. 2001; Gray and Pestka 2007). Schoettler et al. (2006) showed that immune competent Jurkat cells are more sensitive to trichothecenes compared to Hep-G2 cells. Our results are largely in agreement with that of Schoettler et al (2006). The immune competent cells (U937, Jurkat and RPMI8226) were the most sensitive cell lines, with IC<sub>50</sub> values ranging from 2.2 nmol/l for satratoxin H to 1 µmol/l for DON. Slightly reduced sensitivity was observed for A549 and A-204 cells, whereas Hep-G2, HEp-2 and CaCo-2 cells were significantly less affected after 48 h of exposure. Nevertheless, it should be emphasized that the effect of each mycotoxin on different human cell lines was within remarkable close limits in our study and differences between cell lines were much less pronounced as published previously (Gutleb et al. 2002).

The cell line with the highest sensitivity towards DON was Jurkat, a human T cell lymphoblast-like cell line. For this cell type, an IC<sub>50</sub> value of 0.6 µmol/l was obtained, which agrees well with a value of 0.8 µmol/l as reported in a recent study (Nasri et al. 2006). The human myeloma B cell line (RPMI 8226) showed the highest sensitivity to NIV.

As expected from previous literature data (Hanelt et al. 1994; Gutleb et al. 2002), satratoxins G and H (type D compounds) were by far the most toxic trichothecenes in all tested cell culture assays, followed by the type A toxins (T-2 toxin more effective than HT-2 toxin). The lowest cytotoxicity was found for DON, which was less toxic than NIV for all tested cell lines.

In addition, for the cytotoxic activity of trichothecenes on a primary culture of human endothelial cells (HUVEC) was tested under comparable experimental conditions. Although our results indicate that these cells are less sensitive to DON and HT-2 toxin after 72 h of exposure (Table 1; Figure 4), a general tendency towards low sensitivity for trichothecenes, as reported for other primary human cells (Königs et al. 2008; Königs et al. 2009), was not observed for this cell line. Concerning high serum levels after trichothecenes exposure (Turner et al. 2008), this cell line may serve as a complementary model to study trichothecene related cytotoxicity.



**Figure 4.** Cytotoxic effect of trichothecenes on HUVEC cells. Cells were treated for 72 h with T-2 toxin (-■-), HT-2 toxin (-□-), satratoxin H (-▼-) (up to 200 ng/ml) or DON (-●-), nivalenol (-○-) (up to 10,000 ng/ml) and cell viability assay was measured by WST assay; mean  $\pm$  SEM. IC<sub>50</sub> values are given in Table 1.

In conclusion, this comprehensive study presents cytotoxicity data for six different trichothecenes obtained under standardized conditions, using one primary and eight permanent human cell lines. The results provide a basis to establish cell culture models for analytical purposes, as well as for cell-biological investigations. The most important finding is that differences in susceptibility between the human cell lines tested are not as pronounced as reported so far. The current focus of toxicological studies on lymphoid cell lines may, therefore, underestimate the potential hazard which these mycotoxins may pose on human health.

*Acknowledgement:*

*This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK-1029) and from the “Brigitte and Wolfram Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung”. We thank Brunhilde Minich und Christine Ehlich for excellent technical assistance.*



## References

- Abramson D, Clear RM, Usleber E, Gessler R, Nowicki TW, Märtlbauer E (1998) *Fusarium* species and 8-keto-trichothecene mycotoxins in Manitoba barley. *Cereal Chem* 75: 137-141
- Bennett JW, Klich M (2003) Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev* 16: 497-516
- Bondy GS, Pestka JJ (2000) Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol Environ Health B* 3: 109-43
- Bouaziz C, Sharaf El Dein O, El Golli E, Abid-Essefi S, Brenner C, Lemaire C, Bacha H (2008) Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* 254: 19-28
- Brasel TL, Martin JM, Carriker CG, Wilson SC, Straus DC (2005) Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins in the indoor environment. *Appl Environ Microbiol* 71: 7376-7388
- Calvert TW, Aidoo KE, Candlish AG, Fuat AR (2005) Comparison of in vitro cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. *Mycopathologia* 159: 413-419
- Cetin Y, Bullerman LB (2005) Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food Chem Toxicol* 43: 755-764
- Chen JH, Cao JL, Chu YL, Wang ZL, Yang ZT, Wang HL (2008) T-2 toxin-induced apoptosis involving Fas, p53, Bcl-xL, Bcl-2, Bax and caspase-3 signaling pathways in human chondrocytes. *J Zhejiang Univ Sci B* 9: 455-463
- Croft WA, Jarvis BB, Yatawara CS (1986) Airborne outbreak of trichothecene toxicosis. *Atmos Environ* 20: 549-552
- Curtui V, Brockmeyer A, Dietrich R, Kappenstein O, Klaffke H, Lepschy J, Märtlbauer E, Schneider E, Seidler C, Thielert G, Usleber E, Weber R, Wolff J (2005) Deoxynivalenol in food. *Mycotoxin Res* 21: 83-88
- Curtui V, Usleber E, Dietrich R, Lepschy J, Märtlbauer E (1998) A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathologia* 143: 97-103
- Gottschalk C, Bauer J, Meyer K (2006) Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS. *Mycotoxin Res* 22: 189-192

- Gray JS, Pestka JJ (2007) Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes. *Toxicol Sci* 99: 502-511
- Grove JF (1993) Macrocyclic trichothecenes. *Nat Prod Rep* 10: 429-448
- Gutleb AC, Morrison E, Murk AJ (2002) Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by *Fusarium* strains: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 11: 309-320
- Hanelt M, Gareis M, Kollarczik B (1994) Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay. *Mycopathologia* 128: 167-174
- Islam Z, Hegg CC, Bae HK, Pestka JJ (2008) Satratoxin G-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells is mediated by PKR and caspase independent. *Toxicol Sci* 105: 142-52
- Ivanova L, Uhlig S (2008) A bioassay for the simultaneous measurement of metabolic activity, membrane integrity, and lysosomal activity in cell cultures. *Anal Biochem* 379: 16-9
- Johanning E, Biagini R, Hull D, Morey P, Jarvis B, Landsbergis P (1996) Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment. *Int Arch Occup Environ Health* 68: 207-18
- Johanning E, Gareis M, Yang S, Hintikka E-L, Nikulin M, Jarvis B, Dietrich R (1998) Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems (*Stachybotrys chartarum*). *Mycotoxin Res* 14: 60-73
- Johanning E, Landsbergis P, Gareis M, Yang CS, Olmsted E (1999) Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 3: 489-94
- Königs M, Mulac D, Schwerdt G, Gekle M, Humpf H-U (2009) Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. *Toxicology* 258: 106-115
- Königs M, Schwerdt G, Gekle M, Humpf H-U (2008) Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes. *Mol Nutr Food Res* 52: 830-839
- Mayer S, Curtui V, Usleber E, Gareis M (2007) Airborne mycotoxins in dust from grain elevators. *Mycotoxin Res* 23: 94-100
- Mayer S, Engelhart S, Kolk A, Blome H (2008) The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Res* 24: 151-164
- McLaughlin CS, Vaughan MH, Campbell IM, Wei CM, Stafford ME, Hansen BS (1977) Inhibition of protein synthesis by trichothecenes. In Rodricks, JV., Hesseltine CW, Mehlman MA (eds) *Mycotoxins in human and animal health*. Pathotox Publishers, Park Forest South, pp. 263-273

- Meky FA, Hardie LJ, Evans SW, Wild CP (2001) Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food Chem Toxicol* 39: 827-836
- Nasri T, Bosch RR, Voorde S, Fink-Gremmels J (2006) Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes. *Toxicol in Vitro* 20: 832-840
- Nielsen C, Lippke H, Didier A, Dietrich R, Märtilbauer E (2009) Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res*: in press
- Pestka JJ (2008) Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam A* 25: 1128-1140
- Pestka JJ, Yike I, Dearborn DG, Ward MDW, Harkema JR (2008) *Stachybotrys chartarum*, trichothecene mycotoxins, and damp building-related illness: New insights into a public health enigma. *Toxicol Sci* 104: 4-26
- Reubel G, Gareis M, Amselgruber WM (1987) Cytotoxicity Evaluation of Mycotoxins by an MTT-Bioassay. *Mycotoxin Res* 3: 85-96
- Reubel GH, Gareis M, Amselgruber WM (1989) Effects of the *Fusarium* mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on the mitochondrial methylthiazol tetrazolium-cleavage activity of monolayer cells. *Toxicol in Vitro* 3: 311-316
- Schoettler S, Bascope M, Sterner O, Anke T (2006) Isolation and characterization of two verrucarins from *Myrothecium roridum*. *Z Naturforsch [C]* 61: 309-14
- SCOOP (2003) (Scientific Cooperation) Collection of Occurrence Data of *Fusarium* toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States. SCOOP Task 3.2.10 Final Report. Available: <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>. (Scientific Cooperation)
- Sorenson WG, Frazer DG, Jarvis BB, Simpson J, Robinson VA (1987) Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*. *Appl Environ Microbiol* 53: 1370-5
- Thuvander A, Wikman C, Gadhasson I (1999) In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food Chem Toxicol* 37: 639-48
- Turner PC, Rothwell JA, White KLM, Gong Y, Cade JE, Wild CP (2008) Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environ Health Perspect* 116: 21-25

- Wei CM, McLaughlin CS (1974) Structure-function relationship in 12,13-epoxytrichothecenes - novel inhibitors of protein-synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 57: 838-844
- Widestrand J, Lundh T, Pettersson H, Lindberg JE (1999) Cytotoxicity of four trichothecenes evaluated by three colorimetric bioassays. *Mycopathologia* 147: 149-155

### **3.2 “Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells”**

**Carina Nielsen**, Harald Lippke, Andrea Didier, Richard Dietrich, Erwin Märthlbauer  
MOLECULAR NUTRITION & FOOD RESEARCH, VOL 53

#### **ABSTRACT**

To assess the hepatotoxicity of deoxynivalenol (DON), human hepatoma cells (Hep-G2) were used as an *in vitro* model. After exposing Hep-G2 cells to low (1  $\mu$ M) and high dose (10  $\mu$ M), gene expression profiles were analyzed by microarray. More than 5% of genes were up-regulated, most of them being involved in transcriptional regulation. By real-time RT-PCR, elevated expression of transcription factors, commonly induced by activation of MAPK-pathway, was demonstrated for Hep-G2 cells on mRNA and protein level. Further studies, involving U937 human monocytes, showed that effects of DON treatment on mRNA and protein level were concentration dependent and cell-specific. An inverse relation was noticed for the level of DON induced expression of transcription factors (JUN, FOS, EGR1 and ATF3) and the susceptibility of the cell lines towards the mycotoxin. This is the first report giving evidence that on a molecular level the mild hepatotoxic effects of DON are probably caused by the induction of transcription factors which are known to be associated with injury induced liver regeneration processes. With ATF3 a novel downstream target gene was identified in DON-related cell signalling suggesting a potential linkage between molecular action and biological effects like reduction of glycogen storage in liver tissue.

## **1 Introduction:**

The presence of mycotoxins in cereals is a common problem in agriculture and nutrition, particularly deoxynivalenol (DON) is frequently detected at high concentrations worldwide in food crops or related products [1-4]. DON is produced by several species of *Fusarium* fungi which primarily infect wheat, barley and maize crops [5, 6]. DON is only partly eliminated during milling and processing procedures [7, 8] and toxin levels are not significantly altered during baking and cooking [9]. A large collaboration study [10] revealed that 57 % of the cereal based foods in the European Union were contaminated with DON. Recently published data from the United Kingdom highlighted the frequency of DON intake by the population. The majority of adults in this study appeared to be exposed to DON, as concluded from urine testing [11].

Numerous studies addressed DON toxicity in animals [12], with swine representing the most susceptible species [13, 14]. In particular, inflammation and organ failure related to DON toxicity have been evaluated in different experimental *in vivo* models [15-18]. In addition, there exist several *in vitro* studies documenting DON effects on human epithelial and immune cells [19-23]. Although the liver is the primary organ involved in xenobiotic metabolism, and a major target organ of many chemicals, drugs or other pathogens [24], our present knowledge on liver toxicity of DON is scarce. Recently, it has been shown that feeding of DON contaminated wheat elicits histopathological changes in porcine liver [25]. On cellular level, loss of bound ribosomes from endoplasmic reticulum was observed [26]. Furthermore, DON influences several basic metabolic parameters in rat liver cells and human primary hepatocytes [27, 28].

The trichothecene DON is supposed to disrupt normal cell function by inhibition of protein synthesis [29] via binding to the ribosome and by activating cellular kinases involved in signal transduction. However, the cellular mode of action underlying these effects is not yet fully understood. Little is known about cell type-specific toxic mechanisms especially of the mitogen activated protein kinases (MAPKs) pathway and alteration of downstream transcription factor expression in “non-immune cells”. Most of the previous investigations focussed on immunomodulatory effects of DON indicating that early alterations in cell signalling, particularly MAPKs, are critical to trichothecene toxicity [30-32]. MAPK dependent reactions, also known as “ribotoxic stress response”, have been demonstrated for

translation inhibitors such as ricin, anisomycin, T-2 toxin and DON [33, 34]. MAPKs are activated in response to a variety of stimuli, transduce signals from the cell membrane to the nucleus and phosphorylate nuclear transcription factors. Induction of the serine-threonine kinase pathway include the three MAPK subfamilies namely c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinases (JNKs), extracellular signal-related kinases (ERKs), and p38 MAPK. All of these factors enhance the activation of transcription [35] and mediate the regulation of cell signalling under various aspects [36]. As for DON, they markedly induce phosphorylation of p38, JNK and ERK as well as cytokine expression and apoptosis [17, 37-39].

Generally, in immune competent cells, trichothecene-induced MAPK-activity drives activation of immediately early genes (IEG) that promote processes such as cytokine production and cyclooxygenase 2 expression and apoptosis [32, 37, 40]. Two of the best characterized IEGs are the transcription factors JUN and FOS which belong to the AP-1 (activator protein 1) family, regulating a wide range of cellular processes including cell proliferation, cell life or death, survival and differentiation [41, 42]. In murine lymphoid tissue, DON activates components of AP-1 [33, 43]. Another IEG, the early growth response 1 protein (EGR1) has been investigated in DON-treated epithelial intestine 407 cells modulating their IL-8 expression [22]. Transcription factors like JUN and EGR1 are often induced in the same cluster as ATF3 [44], an IEG belonging to the ATF/CREB family of transcription factors which are induced by a variety of stress signals in different cell types.

Based on these data the present study aimed to evaluate early DON effects on mRNA and protein levels in human cell lines as an *in vitro* model to assay the hepatotoxic potential. In order to get a first impression, DON induced alterations of gene expression were screened by microarray. Selected results were confirmed by real-time RT-PCR and Western blot. Beside the expected results that DON activates members of the MAPK family also in hepatocytes, differentially induced expression of immediate early genes like EGR1, JUN and FOS were revealed to depend on incubation time and toxin concentration. Comparing the effects on two different cell lines, it was observed that the level of DON induced expression of transcription factors and the susceptibility of the cell lines towards the toxin was inversely related. Finally, with ATF3 a novel downstream gene was identified in DON-related cell signalling suggesting a potential linkage between molecular action and biological effects such as hepatic metabolism and homeostasis [45, 46].

## **2 Material and methods**

### **2.1 Reagents**

Antibodies against ATF3 (sc-188), EGR1 (sc-189) and c-FOS (sc-52) were obtained from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Anti-p44/42 MAP kinase, phospho-p44/42 MAP kinase, p38 MAP kinase (5F11), SAPK/JNK, phospho-SAPK/JNK, c-JUN (60A8), phospho-c-JUN (Ser63), phospho-c-JUN (Ser73),  $\beta$ -actin antibodies were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Anti-phospho-p38 MAP kinase (pT180/pY182) was obtained from BD Biosciences (San Diego, CA, USA).

### **2.2 General cell culture conditions**

Human cell lines were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) and were used at maximum for 30 passages.

Hepatoma cell line Hep-G2 and monocytic cell line U937 were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% (v/v) FCS. Cells were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> and were fed with fresh medium 12 h prior to the various treatments listed below. For cytotoxicity test, cells were plated at  $2 \times 10^4$  cells per well in 96-well plates. Immunofluorescence was performed on chamber slides (Nunc, Wiesbaden, Germany) plated with  $4 \times 10^5$  cells and incubated at 37 °C for 24 h. For immunoblotting and RNA isolation  $2.5 \times 10^5$  cells per well were plated on 24 multi-well culture dishes and incubated for 24 h.

### **2.3 Determination of DON-related cytotoxicity by WST-1 test**

Cytotoxicity data were obtained from at least three independent experiments. Results were expressed as percentages of the mean absorbance (optical density) of treated vs. negative controls (normal growth medium). Mean optical density of the negative controls was set to 100% viability. For the determination of cell viability, the water-soluble dye WST-1 (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) was used. This assay which is similar to the MTT test is based on the cleavage of the tetrazolium salt WST-1 (slightly red) to formazan (dark red) by various mitochondrial enzymes. After incubation of the cells with varying concentrations of DON for 48 h, 10  $\mu$ l of WST-1 reagent was added to each well and incubated at 37 °C for variable time periods (0.5 to 2 h). Then, microtitre plates were thoroughly shaken for 1 min and absorbance was measured in a microplate reader at 450/655 nm.



## 2.4 Microarray

Total RNA was isolated using the E.Z.N.A. Total RNA kit (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany). For the microarray analyses, Human Genome U133A 2.0 GeneChips (Affymetrix, High Wycombe, UK) with 22,277 probe sets including 14,500 genes were used. The generation of labelled cRNA, hybridization, washing, staining, and scanning was done at the *Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik* (KFB; Regensburg, Germany) following the Affymetrix GeneChip® Expression Analysis Technical Manual. For identification of differentially expressed genes, experimental and baseline arrays were analysed by two-condition-experimental-design using GeneChip® Operating Software (GCOS) software. Herein increased/decreased, marginally increased/marginally decreased, or no change calls were identified. Additionally, differences in signal intensities between perfectly matching and mismatching oligonucleotide-probes on the arrays were compared to recorded alterations in gene expression based on One-Sided Wilcoxon's Signed Rank test. Alterations are depicted by GCOSv1.2 as signal  $\log_2$  ratio. Significances ( $p$ -values) of each change were assigned.

## 2.5 Data analyses

All present and increased genes ( $p$ -value  $< 0.0005$ ;  $\log_2 \geq 2$ ) were selected for further analysis. For this purpose, the software tool BiNGO (Biological Network Gene Ontology plugin tool; [47] from the Cytoscape package [48] was used wherein overrepresentation of gene ontology (GO) categories ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) in biological networks can be assayed. GOs consist of three hierarchically structured vocabularies that describe gene products in terms of their associated “biological processes”, “molecular functions” and “cellular components”. Gene products may be annotated to one or several nodes in each hierarchy. Significantly altered genes were assigned to above named categories. For hypergeometric statistical tests resulting in a significance level of  $p < 0.05$ , Benjamini and Hochberg's FDR multiple testing corrections were performed.

## **2.6 RNA isolation and reverse transcription for real-time RT-PCR**

Total RNA was isolated from cells as described above, quantity and purity was measured spectrophotometrically. The RNA was reversely transcribed from 1 µg starting input using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and subjected to real-time RT-PCR.

## **2.7 Real- time RT- PCR**

All samples were assayed in quadruplicates. RT-PCR reactions for target genes in the different cell lines were performed on a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Typical reactions contained 5 µl of 2 x LightCycler SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), in a total volume of 10 µl. Cyclic amplification was preceded by incubating the reaction mixtures for 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of amplification. Steps and temperatures were as follows: denaturation 15 s at 95 °C, annealing 10 s at 60 °C and extension 10 s at 72 °C, with single fluorescence acquisition at 72 °C after each cycle. Finally a melting curve was generated. Expression levels of HMBS (hydroxymethylbilane synthase) and 28S rRNAs were used as housekeeping-genes. LightCycler experiments further included a calibrator sample measured in triplicates and a standard curve for determination of amplification efficiency. Relative expression of target genes was calculated after normalization by the housekeeping genes. Data were analyzed by LC480 software (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Finally, relative increase or decrease of RNA was expressed as log<sub>2</sub> ratio calculated by comparing relative expression levels in controls to treatment groups.

## 2.8 Primer design

The RT-PCR primers described above were designed using IDT SciTools PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com>) or Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Primers were located in the coding region. Primer sequences and additional information are depicted in Table 1.

**Table 1. Primer pairs applied in real-time RT-PCR for determination of transcription factor expression levels**

Name	5' - 3' Sequence	GenBank ID	Amplicon (Size)
ATF3	for: ttg cta acc tga cgc cct ttg rev: tct gtc gct gac agt gac tg	NM_001674	107
EGR1	for :agg aca gga gga gga gat gg rev: gga agt ggg cag aaa gga ttg	NM_001964	129
JUN	for: aaa cag agc atg acc ctg aac c rev: gat tat cag gcg ctc cag ct	NC_002228	139
FOS	for: tct gtg gct tcc ctt gat ctg a rev: tca tca aag ggc tcg gtc ttc a	NM_005252	168
28S rRNA	for: ccc act aat agg gaa cgt gag- rev: gcc aag cac ata cac caa atg tc	M27830	142
HMBS	Housekeeping-Gene, QuantiTect Primer Assays		

## 2.9 Whole-cell protein preparation and Western blot analysis

Whole-cell extracts were prepared following the Cell Signaling protocol for Western blot analysis, and the amount of protein was quantified by the means of BCA assay (Sigma, Deisenhofen, Germany) using bovine serum albumin as standard. Equal amounts of whole-cell protein extracts were mixed with protein sample buffer and separated on a 10%-15% SDS- PAGE gel. Proteins were transferred to Immobilon-P transfer membrane (Millipore, Bredford, MA) according to standard protocols. The membrane was probed with the corresponding primary antibodies following Cell Signaling protocols. Usually, phosphorylated and unphosphorylated MAPK-kinases were analysed on the same membrane. For this propose, membranes were reprobbed by using stripping buffer (Pierce) following the Restore™ Western Blot Stripping Buffer protocol. Signal visualization by chemiluminescence was achieved by SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate (Perbio Science, Bonn, Germany) on KODAK Image Station 2000R.

### **2.10 Immunofluorescence cell staining**

Hep-G2 cells were treated with indicated DON concentrations for 24 h (for JUN and phospho-JUN detection). Cell labelling protocol for immunofluorescence-microscopy was as follows: cells were fixed in 3% formaldehyde for 15 min and ice-cold methanol for 10 min, blocked with 5% inactivated goat serum for 60 min, and incubated 1 h with specific primary antibodies (1:100) against JUN. Subsequently, cells were incubated with Alexa Fluor 488 labelled secondary antibodies (1:250). For all immunoreagents, phosphate buffered saline (PBS) containing 1% BSA and 0.3% Triton X-100 was used as diluent. Nuclei were counter-stained with DAPI and slides were examined with a BZ-8000 fluorescence microscope (KEYENCE, Osaka, Japan).

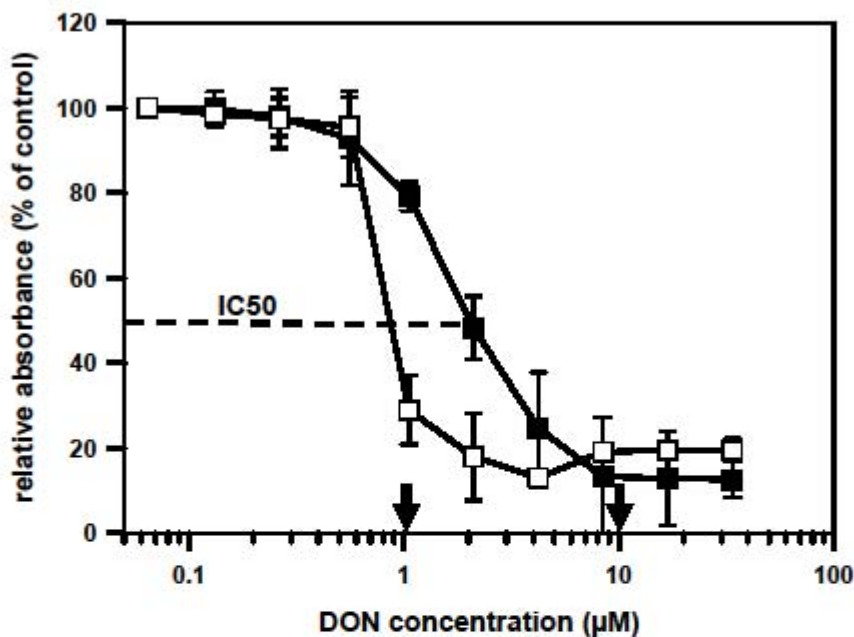
### **2.11 Statistics**

Data were statistically processed on SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) software. A multiway ANOVA was applied for analysis of mRNA expression using Tuckey tests for post hoc comparison of individual factors.

### 3 Results

#### 3.1 Cytotoxicity of DON in Hep-G2 and U937 cells

In the presence of 0.05 to 50  $\mu\text{M}$  DON, cell viability decreased in a concentration dependent manner (Fig. 1). After 48 h exposure to DON, treatment of Hep-G2 cells with 1  $\mu\text{M}$  DON resulted in at least 75% cell viability, whereas at high DON concentrations (10  $\mu\text{M}$ ) only 15% of the cells showed metabolic activity. Hence, these DON concentrations were defined as low and high cytotoxic doses and were used for all further experiments. Treatment of the more sensitive U937 cells with the low DON dose resulted in cytotoxic effects which were within the dynamic range of the viability curves (Fig. 1). The calculated  $\text{IC}_{50}$  values for the cell lines under study were 1.89  $\mu\text{M}$  (Hep-G2) and 0.95  $\mu\text{M}$  (U937).



**Figure 1:** Dose-response curve on cell viability obtained after DON-treatment of different cell lines for 48h: ■ = Hep-G2 cells, □ = U937 cells.  $\text{IC}_{50}$  values (dashed line) of Hep-G2 cells (1.89  $\mu\text{M}$ ) and U937 cells (0.95  $\mu\text{M}$ ) measured by the WST-1 bioassay are depicted. Arrows illustrate the low and high cytotoxic DON dose used for the further experiments. All assays were p

### 3.2 Gene expression analysis by microarray

In order to get a first impression of the early DON effects on cellular processes, changes in the gene expression profile of Hep-G2 cells were analyzed by microarray after treatment with the indicated toxin concentrations for 3 h. After this time point, the DON exposure of the cells induced a statistically significant change in gene expression which was clearly distinct from the control. Furthermore, both treatment groups showed specific gene expression levels which clearly demonstrated a concentration dependent gene modulation. In general, 52.5% of probe sets after low (1  $\mu$ M) and 48.2% of probe sets after high dose (10  $\mu$ M) treatment were detected as present; an increased expression was noticed for 6.9% and 7.5%, respectively. In contrast, only 2.3% decrease in gene expression was observed after 1  $\mu$ M DON treatment and 6.5% after 10  $\mu$ M DON treatment.

The expression profile of low (high) dose revealed 256 (694) significantly ( $p$ -value  $< 0.001$ ) up-regulated probe sets with a  $\log_2$  ratio  $\geq 1$ . Significantly ( $p$ -value  $< 1-0.001$ ) decreased gene expression ( $\log_2$  regulation  $\geq -1$ ) could only be detected for 17 (86) genes. To detect enriched gene functions further data analysis was performed by BiNGO plugin of Cytoscape based on gene ontology categories. Genes were only considered as biologically relevant if the signal  $\log_2$  ratio was greater than 2 (4-fold change) and the  $p$ -value below 0.0005. To extract the statistically over-represented categories and to correct for multiple testing, a hypergeometric test and the Benjamini Hochberg FDR correction was performed. Significantly enriched categories of the genes, up-regulated by low dose or high dose treatment, are summarized in Table 2. The hierarchical structure of Gene Ontology results in the more specific category appearing in the deeper hierarchy. The genes involved in transcription for “biological processes” and nucleic acid binding, transcription factor activity for “molecular processes” were significantly up-regulated in hepatoma cells for both treatments. For “cellular components” these genes were mainly located in the nucleus (Table 2). Similarly affected categories due to DON exposure could be identified for both treatments, in most cases the effect of the higher dose being more pronounced.

**Table 2.**

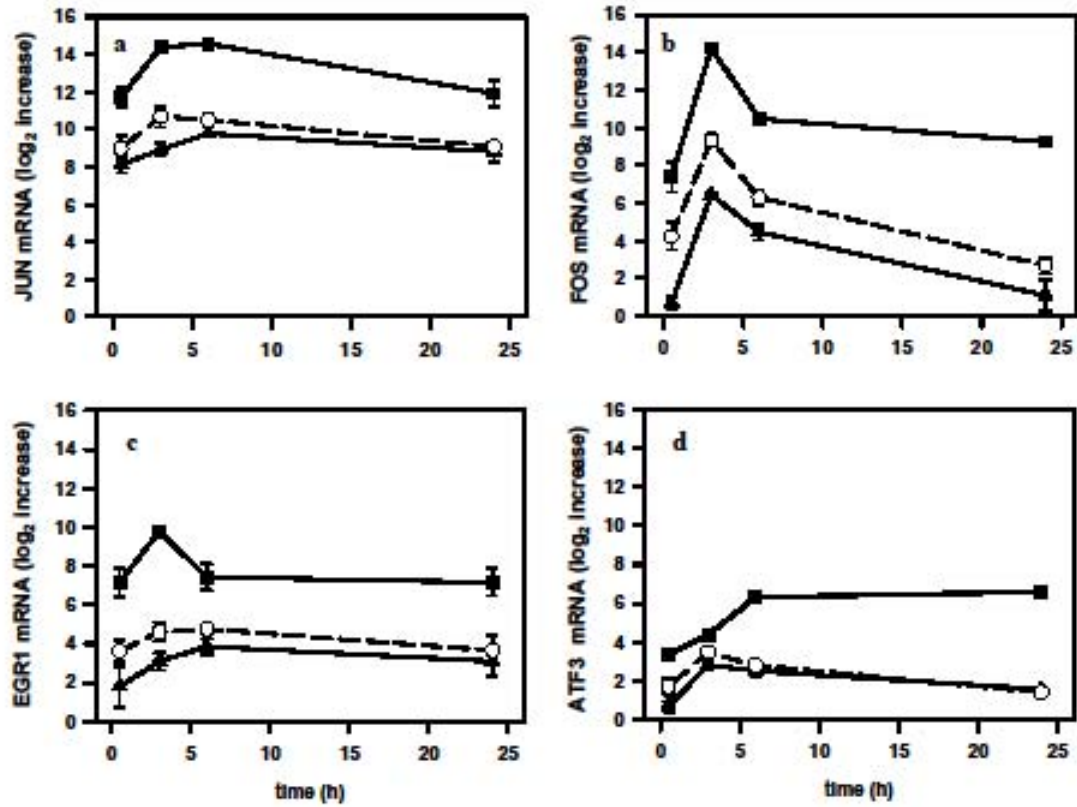
Significantly overrepresented gene categories (terms) in DON treated Hep-G2 cells after 3h exposure according to gene ontology (GO) nomenclature. Only GO processes (www.geneontology.org) with a FDR  $p$  – value of  $< 0.05$ , resulting from BiNGO analysis of microarray data, are shown.

GOterm	GO term (category)	FDR-corrected $p$ -value	
		DON (1 $\mu$ M)	DON (10 $\mu$ M)
<b>Biological Processes</b>			
GO:43283	biopolymer metabolism	8.15E-03	3.65E-10
GO:16070	RNA metabolism	1.25E-03	2.82E-09
GO:6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	8.15E-03	3.67E-08
GO:19219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	1.25E-03	6.09E-10
GO:32774	RNA biosynthesis	7.54E-04	1.21E-10
GO:6350	transcription	1.25E-03	3.25E-10
GO:45449	regulation of transcription	1.09E-03	1.07E-09
GO:6351	transcription, DNA-dependent	7.54E-04	1.35E-08
GO:6355	regulation of transcription, DNA-dependent	7.54E-04	1.86E-10
GO:6366	transcription from RNA polymerase II promoter	8.15E-03	1.35E-08
<b>Molecular Processes</b>			
GO:5488	binding	4.27E-03	5.45E-05
GO:5515	protein binding	1.17E-03	1.72E-06
GO:46983	protein dimerization activity	5.69E-04	1.17E-03
GO:3676	nucleic acid binding	5.69E-04	7.53E-10
GO:3677	DNA binding	6.83E-05	9.09E-15
GO:43565	sequence-specific DNA binding	7.26E-03	7.42E-04
GO:8134	transcription factor binding	1.23E-02	1.17E-03
GO:3700	transcription factor activity	1.05E-03	6.18E-13
GO:3712	transcription cofactor activity	5.12E-03	2.78E-03
GO:3714	transcription corepressor activity	1.70E-03	1.72E-03
GO:30528	transcription regulator activity	6.83E-05	6.18E-13
GO:16564	transcriptional repressor activity	8.94E-03	2.40E-04
<b>Cellular Component</b>			
GO:5622	intracellular	2.76E-02	2.32E-05
GO:44424	intracellular part	9.66E-03	1.34E-06
GO:43226	organelle	6.93E-04	9.58E-06
GO:43229	intracellular organelle	6.93E-04	9.58E-06
GO:43227	membrane-bound organelle	1.87E-04	8.73E-08
GO:43231	intracellular membrane-bound organelle	1.87E-04	8.73E-08
GO:5634	nucleus	5.29E-07	1.61E-14

### 3.3 DON up-regulates transcription factor mRNA in Hep-G2 cells

To validate the microarray results on a quantitative level, different induced genes upon DON challenge were studied by using real-time RT-PCR. Time and dose dependent effects of deoxynivalenol treatment on the relative expression of the four transcription factors JUN, FOS, EGR1 and ATF3 in human Hep-G2 cells were assayed. For this purpose, cells were exposed to high (10  $\mu\text{M}$ ) and low (1  $\mu\text{M}$ ) DON doses for up to 24 h. A low cytotoxic equivalence dose of anisomycin (0.1  $\mu\text{M}$ ) was included as internal control. Anisomycin is a well-known inhibitor of protein synthesis and potent inducer of transcription factor activity [31]. The results are shown in Figure 2 a-d. Compared to the control level, the most prominent increase in mRNA expression was detected for JUN with an approximately 9 to 12  $\log_2$  increase. This early increase in mRNA expression was observed already after 0.5 h of incubation with 1  $\mu\text{M}$  and 10  $\mu\text{M}$  DON. Peak levels of mRNA expression were reached for both toxin concentrations after 6 h. Up to 24 h, expression levels declined slightly but stayed clearly above those of untreated control cells. A similarly strong induction of mRNA was found for FOS and EGR1 in the high dosed group where peak expression was reached after 3 h. In contrast to FOS, highest mRNA levels for EGR1 were detectable in the low dose group after 6 h and remained constantly up-regulated up to 24 h. Moreover, a slight but constant increase in gene expression was found for ATF3. After reaching a maximum  $\log_2$  regulation of 6, ATF3 transcripts remained up-regulated for 24 h in high dose treated Hep-G2 cells. Low dose treatment led to a maximum expression after 3 h and a subsequent decline of ATF3 expression to nearly background levels. Applying multiway ANOVA, significance of the alteration of expression was proved for all mRNAs under study ( $p < 0.001$ ) as well as for each of the factors when assayed separately ( $p < 0.01$ ) in comparison to negative controls. Equally, low DON dose and anisomycin treated groups responded significantly differently from the high toxic DON treatments ( $p < 0.01$ ). Comparing anisomycin and low dose DON treatment, only JUN expression was significantly ( $p < 0.05$ ) influenced whereas no significant differences were detected for ATF3, EGR1 and FOS ( $p > 0.05$ ).

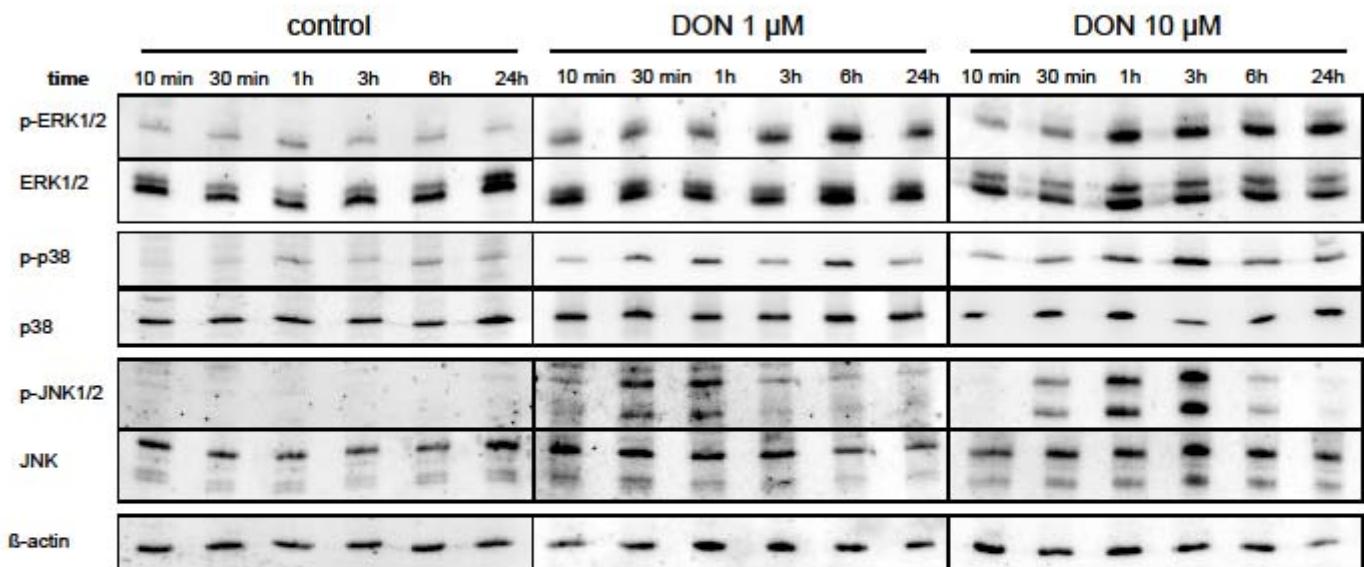




**Figure 2 a-d.** Relative expression of transcription factor mRNA for JUN (a), FOS (b), EGR1 (c), and ATF3 (d) in Hep-G2 cells exposed to 1 μM DON (▲), 10 μM DON (■) or 0.1 μM anisomycin (O, dashed line). All assays were run in quadruplicates; values are means ± standard deviation. Data points represent log<sub>2</sub> regulation compared to untreated time-matched controls. Sampling times were at 0.5, 3, 6 and 24 h.

### 3.4 DON activates MAPKs in Hep-G2 cells on protein level

To verify that the induction of transcription factors was accompanied by an activation of the MAPK pathway, phosphorylation of the main kinases was analyzed by Western blot. Strength and time-course of activation differed between the three factors under study. DON treatments resulted in rapid and strong activation of JNK1/2 and p38, and a long term activation of the ERK1/2 was observed, particularly upon treatment with a high dose of DON (for details see Figure 3.). Both, JNK1/2 and p38 MAPK showed early peak activities 30 min after stimulation, whereas ERK1/2 activity was present for at least up to 24 h. The increase in activity of ERK1/2 did not result from an increase in expression of ERK1/2 protein, as determined by Western blot. At low DON doses (1  $\mu$ M), MAPK phosphorylation was also observed with similar kinetics but at lower induction levels. This suggests a dose and time dependent activity.

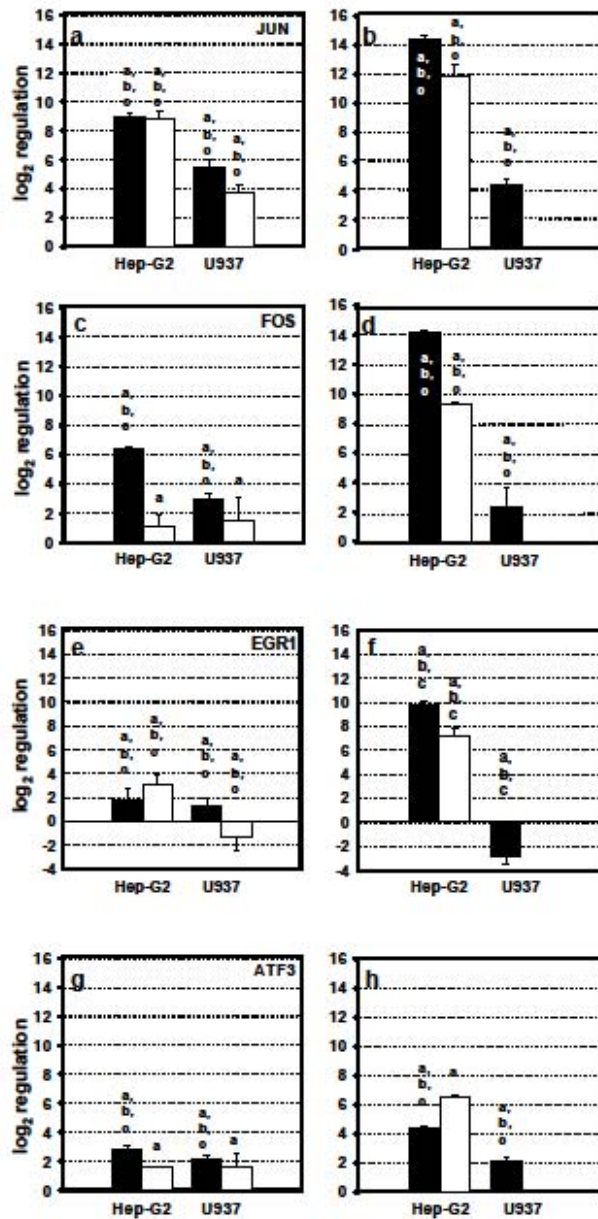


**Figure 3.** Concentration-dependent activation of ERK1/2, JNK1/2, and p38 MAPK in Hep-G2 cells by DON. Cells were treated with 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M for the indicated time periods. For control, cells were incubated with vehicle. Results are representative for three independent experiments.

### **3.5 Comparison of the DON-induced transcription factor mRNA expression in Hep-G2 and U937 cells**

Both cell lines showed a clear dose-dependent effect on mRNA expression of the transcription factors assayed (Figure 4.). Overall, incubation with 10  $\mu$ M DON resulted in higher induction of gene expression than low dose experiments. Nevertheless, each cell line exhibited individual responses and reaction patterns, depending on toxin concentration and incubation time with Hep-G2. Due to the higher susceptibility of the U937 cells, no meaningful data could be collected after 24 h of high-dose treatment, total RNA amounts of the cells decreased to 30% compared to the negative control (data not shown).

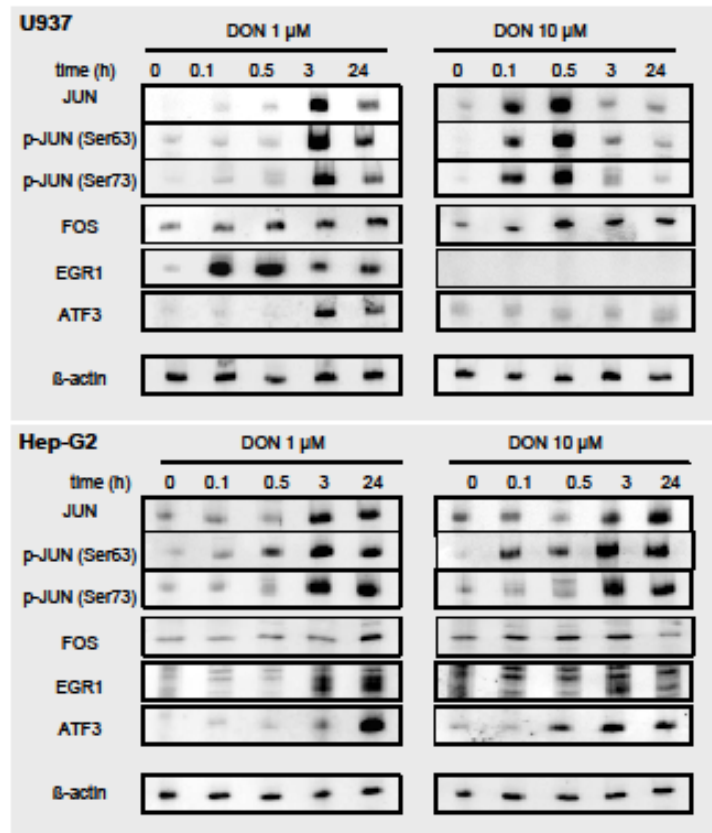
Over the incubation time (3 h and 24 h) and depending on the toxin concentrations (DON 1  $\mu$ M and 10  $\mu$ M), the modulation of transcription factor mRNA expression showed significant differences between the two cell lines ( $p < 0.01$ ). Significance levels for individual genes under study with respect to treatment duration and applied toxin concentrations are indicated in Figure 4. a-h. Most prominent alterations were detected for JUN and FOS mRNA levels. Significant differences were observed for time-dependent JUN expression in the low and high-dosed experiments comparing both cell lines. For FOS and ATF3 targets, both cell lines showed significant concentration-dependent expression at the 3h measuring point. The expression of EGR1 in U937 was partly decreased and significantly different from that in Hep-G2 cells.



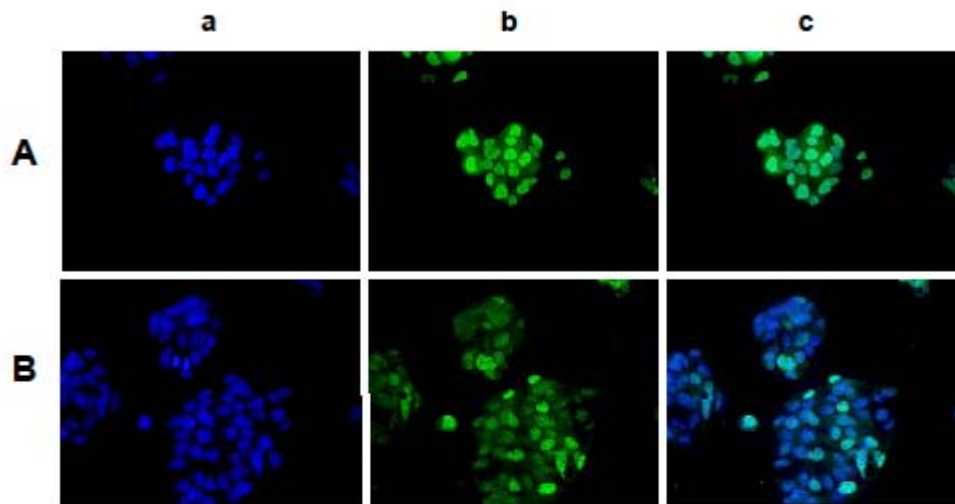
**Figure 4 a-h.** Relative mRNA expression of transcription factors in human cell lines. Left row (graph a,c,e,g): cells were treated with 1  $\mu$ M DON for 3 (black bars) and 24 h (white bars); right row (graph b,d,f,h): cells were treated with 10  $\mu$ M DON for either 3 or 24 h. All samples were assayed in quadruplicates and data are depicted as means  $\pm$  standard deviation. Expression increases and decreases are significantly different in all experimental setups compared to untreated control cell with  $p < 0.05$ . Results of multiway ANOVA are indicated by characters: a = significant differences between cell lines and overall transcription factor expression ( $p < 0.01$ ), b = significant differences between cell lines and specific transcription factor ( $p < 0.01$ ); c = significant difference comparing each cell line to each transcription factor ( $p > 0.01$ ).

### **3.6 Transcription factor protein activation in Hep-G2 and U937 cells upon DON treatment**

To determine treatment effects on level of target proteins, Western blot analyses were performed. Hep-G2 and U937 cells were incubated for 10 and 30 min as well as 3 and 24 h with either 1  $\mu$ M or 10  $\mu$ M of toxin, respectively. The  $\beta$ -actin protein served as the loading control and showed unaltered expression upon DON treatment. Occurrence of band patterns typical for the induction of activated protein increased in a time and concentration dependent manner (Figure 5.). Transcription factor JUN was induced in both cell lines and at both treatment regimes. The highest levels of the transcription factor JUN was usually found after 3 h of DON exposure. Phosphorylated JUN was detected in Hep-G2 cells after 30 min of DON exposure and then consistently onward. To verify the activation of JUN, the translocation of the phosphorylated transcription factor to the nucleus was studied by immunofluorescence in Hep-G2 cells during DON-challenge. Translocation was shown after treatment with DON for 3 h and lasted for at least 24 h as shown in Figure 6. In U937 cells, phosphorylated JUN was already detected after 10 min of treatment with the high cytotoxic dose but could not be found after 24 h (Figure 5.). Similar results were obtained for the activation of EGR1 after low-dose treatment whereas in the high-dose experiments EGR1 expression was not observed at all in the U937 cells. A constant and continuous expression of ATF3 was found in the DON treated Hep-G2 cells but not in the U937 cells exposed to high toxin concentrations. In addition, cell-related transcription factor-expression of overall Western blot data was analysed. Comparison of cell response patterns after low and high dose treatment revealed a higher degree of transcription factor expression similarities in Hep-G2 cells (83%) than that observed in U937 (41.7% similarity). Finally, after Hep-G2 and U937 cells were treated with the high DON dose, they showed an overall dissimilar expression pattern for all transcription factors under study. Remarkably, a considerable accordance in protein induction kinetics of 66.7% was found when comparing low dose-treated U937 with high dose-treated Hep-G2.



**Figure 5.** Western blot analyses of the DON-induced cell line-specific induction and phosphorylation of transcription factors. Cells were treated with DON (1 μM or 10 μM) for different time periods (0.1 to 24 h); Hep-G2 cells – upper panel; U937 cells – lower panel. Phosphorylation of JUN was determined by using antibodies specific for phosphorylated serine at position 63 or 73.



**Figure 6.** Effect of DON on JUN-translocation. Cells were challenged with 1  $\mu$ M DON (row A) or vehicle (row B) for 24h. Nuclei were counterstained with DAPI (column a); phospho-JUN was detected by antibody (phospho-c-JUN (Ser73); column b) and an Alexa488 labelled secondary antibody. Merge picture (column c) demonstrates that after DON treatment phosphorylated JUN is translocated to the nucleus (Ac) while in vehicle treated cells (Bc) only traces of JUN were found.

## 4 Discussion

DON is frequently found in high concentrations in cereal-based products and represents one of the most abundant mycotoxin in food [10]. As a consequence, levels of human exposure can be high. For instance, in a recent study DON was detected in 98.7 % of urine samples from adults in the United Kingdom [11]. In a recent study pigs fed with low concentrations of DON, showed toxin levels of up to 0.5  $\mu\text{M}$  and 0.02  $\mu\text{M}$  in bile and liver, respectively [15]. These levels are clearly below the 1  $\mu\text{M}$  dose used in this study, which therefore may reflect worst case intake scenario rather than mean exposure. The primary organ involved in metabolism of food-borne contaminants is the liver. Two recent studies showed that DON influences several basic metabolic parameters in rat liver cells and primary human hepatocytes. Main focus of these reports was laid on the final cell fate [27, 28]. The present study was predominately designed to evaluate the early DON effects in human hepatoma cells on mRNA and protein level. The human hepatoma cell line, Hep-G2, has been reported to retain many properties of primary liver cells, including metabolic activities [49, 50], and was therefore chosen as an *in vitro* model in the present study.

Knowledge on DON-induced modulation of signalling pathways is substantially derived from studies on murine macrophage lines and lymphoid tissues (for a review see Pestka and Smolinski, 2005) [12]. So far, the cell transcriptional responses of liver cells to DON have not been studied despite recent reports on mild hepatotoxic effects of this mycotoxin [25, 28]. Therefore, gene expression of toxin-treated hepatoma cells was screened by microarray in a first orientating study.

The results obtained are in good accordance with previously published data on the gene expression profile in the spleen of DON-exposed mice identifying immediate early genes as potential targets of DON [43]. Comparison of low and high dose treatment results further indicate that primary activation of transcription tends to switch into negative regulation upon increased toxin concentration (details not shown) which may represent a negative feedback to the translational inhibitory effects of DON at higher concentrations (>3,3  $\mu\text{M}$ ) [31]. These inhibitory effects on transcriptional level became particularly obvious in the high dose 24 h treatment of U937 cells resulting in a reduction of total RNA levels down to 30% in comparison to vehicle controls. However, at inhibitory and subinhibitory DON



concentrations, up-regulation of genes was the predominant effect. Data analysis by the software tool BiNGO revealed that the most prominent alterations in Hep-G2 cells upon DON treatment occur on the level of nuclear transcription factors (Table 2).

Under the microarray conditions the most prominent increase in mRNA expression was detected for the transcription factors JUN and FOS which, in liver, represent immediate early genes induced in regenerating cells [51]. Recently, it was reported that JUN also mediates hepatocyte survival during acute hepatitis [52]. Additionally, the microarrays also showed an increase of further genes, amongst others EGR1 and ATF3. Both factors are known to be induced in the liver by stress-signals [46]. Therefore further studies focussed on these transcription factors and the array data could be confirmed by means of real-time RT-PCR. In addition, analyses of whole cell extracts revealed that induction takes place not only on mRNA but also on protein level.

Activation of MAPKs due to phosphorylation is one main up-stream event triggering IEGs. These immediately early genes are known to act as transcription factors on distinct target genes, thus regulating cell differentiation, proliferation and apoptosis [53, 54]. Concerning cell activation pathways in general, it has been shown that depending on the cell type, toxicant exposure results in the disturbance of JNK, p38 MAPK and ERK signalling [31, 55-58]. Activation of MAPKs causes expression of IEGs which couple short-term signals to long-term cellular responses by acting as transcription factors and regulating the expression of target genes [59, 60]. Earlier studies showed that DON is able to induce MAPK-pathways and IEGs *in vivo* as well as *in vitro* via a mechanism known as “ribotoxic stress response” [40, 43, 61]. These studies, which were often confined to one cell type and/or one particular toxin concentration, were mostly carried out in lymphoid tissue and immune competent cells, and focused on the capacity of DON to modulate immune responses including cytokine induction and apoptosis [22, 32, 62-64]. In the present study, MAPK and transcription factor activation were shown both in Hep-G2 and U937 cells whereby the most striking result was the sustained activation and markedly elevated levels of phosphorylated ERK1/2, particularly upon treatment of Hep-G2 cells with high DON doses (Figure 4.). These findings are in accordance with observations on murine cell lines [65, 66], murine lymphoid tissues [38, 40, 43] and more recently with human intestinal epithelial cells such as CaCo-2 and intestine 407 [22, 23]. In contrast, only a transient activation of the JNK1/2 as well as p38 MAP kinase

cascade was observed both in Hep-G2 and U937 cells. Similar results have been described for human T-cells (Jurkat) and epithelial intestine 407 cells [17, 21]. These results are in good accordance with findings in Hep-G2 cells under DON exposure showing no caspase-3-activity as indicator for p38 activity and apoptosis below 50  $\mu$ M toxin treatment [27, 28].

However, the JUN protein which represents the prototypic target of the JNK kinase, exhibits a prolonged phosphorylation and significant elevated expression upon DON treatment. Reactivity of the expressed protein with phosphospecific antibodies in immunoblots and verification of the translocation to the nucleus via immunofluorescence confirmed the activation of the transcription factor. Recently, Hasselblatt et al. (2007) [67] showed that, in humans, hepatocytes strongly express JUN in response to acute liver injuries suggesting a link between JUN expression and hepatic stress response. In murine macrophages and spleen, DON-induced activation of c-Jun has been shown by electrophoretic mobility shift assays [38, 66, 68] and increased c-Jun mRNA expression after DON exposition has been reported. In murine spleen an 85-fold increase of c-Jun mRNA expression was found by Kinser et al. (2004) [43] which corresponds to the levels detected in our study in human monocytes (U937). In contrast, DON treatment of hepatoma cells resulted in induction levels of >1,000 emphasizing the characteristic response profile of this cell-type. Similar results were obtained for FOS mRNA which was also significantly higher induced in Hep-G2 cells than in U937. A strong induction of FOS mRNA expression was seen as well by Kinser et al. (2004) [43] in murine spleen after feeding the mice with DON. According to Murphy et al. [69], FOS becomes stabilized by sustained ERK signalling, a cellular response which was particular pronounced in the Hep-G2 cells. Activation of the ERK pathway also mediates the production of EGR1 which results in the up-regulation of pro-inflammatory interleukin-8 [22]. Interestingly, an inverse relation was observed in our study between the level of DON-induced expression of transcription factors and the susceptibility of the cell lines towards the toxin. According to the results of the WST-1 test Hep-G2 cells are less sensitive than U937 but were characterized by significantly higher expression of transcription factors (Figure 4.) suggesting that some of the target molecules are involved in cell repairing processes. Dichotomy between susceptibility and reactivity of two responder cell lines is underlined by results of the Western blot where the reaction pattern of the U937 cells tended to be more distinct from that of the Hep-G2 cells upon different treatments. The main focus was for the first time, to analyse the known actions of DON in sensitive immune competent cells (U937) compared to hepatoma cells.

One of the transcription factors under study was stress-inducible ATF3 - a member of the ATF/CREB family of basic leucine zipper type transcription factors - known to regulate several downstream activities related to cell proliferation [70], apoptosis [71] and survival [72]. Regulation of the ATF3 expression by the MAPK-pathway has been shown in previous studies [44, 51, 73]. Upon DON challenges our data demonstrate that ATF3 mRNA expression depends on DON-treatment conditions and is influenced by cell type. In U937 cells, DON modestly activated ATF3 in comparison to Hep-G2 cells. Maximum activation occurred after 3 h. One can further speculate that ATF3 might be involved in the biological outcome of DON hepatotoxicity as this protein is known to be present during liver regeneration [46]. Transgenic mice overexpressing ATF3 in the liver had symptoms of liver dysfunction such as defects in glucose homeostasis and low levels of glycogen storage. It was further shown that Hep-G2 cells overexpressing ATF-3 reveal decreased promoter activity for phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), which is known to be involved in reduction of gluconeogenesis [74]. Interestingly, *in vivo* feeding experiments with diets containing DON and ZON resulted in early acute pathological changes in liver cells, including glycogen reduction [25].

In summary, this study shows for the first time that on a molecular level the mild hepatotoxic effects of DON, shown in recent studies [25, 28], are probably caused by the induction of transcription factors which are known to be associated with injury induced liver regeneration processes and stress response of the cell. Interestingly, cells treated with an equi-toxic dose of the type A trichothecene T2-toxin showed a markedly lower induction rate (results not shown) suggesting a DON-specific response of the cells under study. Particularly, the sustained activation of JUN and the prolonged expression of ATF3 may represent important modules of the cell response of hepatocytes to DON treatment. Recent studies demonstrating a high DON exposure risk of the population [11] and the remarkable high susceptibility of primary hepatocytes found in *in vitro* studies [27] underline the need for further research on hepatotoxicity of DON.

*Acknowledgement:*

*This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK-1029) and from the "Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung".*

## 5 References

- [1] Canady, R. A., Coker, R. D., Rgan, S. K., Krska, R., *et al.*, *Fifty-sixth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*  
International Programme on Chemical Safety, World Health Organization, Geneva 2001, pp. 420–555.
- [2] Curtui, V., Brockmeyer, A., Dietrich, R., Kappenstein, O., *et al.*, Deoxynivalenol in food. *Mycotoxin Research* 2005, 21, 83-88.
- [3] Clear, R. M., Patrick, S. K., Fusarium head blight pathogens isolated from fusarium-damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology-Revue Canadienne De Phytopathologie* 2000, 22, 51-60.
- [4] Gottschalk, C., Barthel, J., Engelhardt, G., Bauer, J., Meyer, K., Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007, 51, 1547-1553.
- [5] Creppy, E. E., Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. *Toxicol. Lett.* 2002, 127, 19-28.
- [6] Trucksess, M. W., Thomas, F., Young, K., Stack, M. E., *et al.*, Survey of deoxynivalenol in US 1993 wheat and barley corps by enzyme-linked-immunosorbent-assay. *J. AOAC Int.* 1995, 78, 631-636.
- [7] Hazel, C. M., Patel, S., Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.* 2004, 153, 51-59.
- [8] Trigo-Stockli, D. M., *Mycotoxins and Food Safety* 2002, pp. 181-188.
- [9] Scott, P., in: Chelkowski, J. (Ed.), *In Cereal Grains, Mycotoxins, Fungi and Quality in Drying and Storage*, Elsevier, Amsterdam 1991, pp. 529-572.
- [10] SCOOP, (Scientific Cooperation) Collection of Occurrence Data of fusarium toxins in Food and Assessment of Dietary Intake by the Population of EU Member States. SCOOP Task 3.2.10 Final Report. Available:  
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>. (*Scientific Cooperation*) 2003.
- [11] Turner, P. C., Rothwell, J. A., White, K. L. M., Gong, Y., *et al.*, Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* 2008, 116, 21-25.
- [12] Pestka, J. J., Smolinski, A. T., Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews* 2005, 8, 39-69.

- [13] Danicke, S., Valenta, H., Klobasa, F., Doll, S., *et al.*, Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung* 2004, 58, 1-17.
- [14] Drochner, W., Schollenberger, M., Gotz, S., Lauber, U., *et al.*, Subacute effects of moderate feed loads of isolated Fusarium toxin deoxynivalenol on selected parameters of metabolism in weaned growing piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 2006, 90, 421-428.
- [15] Doll, S., Danicke, S., Valenta, H., Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, 52, 727-734.
- [16] Pestka, J. J., Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.* 2003, 140, 287-295.
- [17] Pestka, J. J., Uzarski, R. L., Islam, Z., Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes. *Toxicology* 2005, 206, 207-219.
- [18] Rocha, O., Ansari, K., Doohan, F. M., Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review. *Food Additives and Contaminants* 2005, 22, 369-378.
- [19] Gray, J. S., Pestka, J. J., Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes. *Toxicol. Sci.* 2007, 99, 502-511.
- [20] Koenigs, M., Lenczyk, M., Schwerdt, G., Holzinger, H., *et al.*, Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture. *Toxicology* 2007, 240, 48-59.
- [21] Moon, Y., Yang, H., Park, S., Hypo-responsiveness of interleukin-8 production in human embryonic epithelial intestine 407 cells independent of NF- $\kappa$ B pathway: New lessons from endotoxin and ribotoxic deoxynivalenol *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008.
- [22] Moon, Y., Yang, H., Lee, S. H., Modulation of early growth response gene I and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 256-262.

- [23] Sergent, T., Parys, M., Garsou, S., Pussemier, L., *et al.*, Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 2006, *164*, 167-176.
- [24] Treinen-Molsen, M., in: Klaassen, C. (Ed.), *In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Sciences of Poison*, McGraw-Hill Professional, New York 2001, pp. 471–490.
- [25] Tiemann, U., Brussow, K. P., Kuchenmeister, U., Jonas, L., *et al.*, Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts. *Food Chem. Toxicol.* 2006, *44*, 1228-1235.
- [26] Tiemann, U., Brussow, K. P., Muchenmeister, U., Jonas, L., *et al.*, Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone. *Veterinary Journal* 2008, *176*, 188-196.
- [27] Konigs, M., Schwerdt, G., Gekle, M., Humpf, H. U., Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 2008, *52*, 830-839.
- [28] Sahu, S. C., Garthoff, L., Robl, R., Chirtel, S., *et al.*, Rat liver clone-9 cells in culture as a model for screening hepatotoxic potential of food-related products: hepatotoxicity of deoxynivalenol. *J. Appl. Toxicol.* 2008.
- [29] Ueno, Y., Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1984, *4*, S124-S132.
- [30] Pestka, J. J., Zhou, H. R., Moon, Y., Chung, Y. J., Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.* 2004, *153*, 61-73.
- [31] Shifrin, V. I., Anderson, P., Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999, *274*, 13985-13992.
- [32] Yang, G. H., Jarvis, B. B., Chung, Y. J., Pestka, J. J., Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to ERK, p38 MARK, and SAP/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000, *164*, 149-160.
- [33] Zhou, H. R., Lau, A. S., Pestka, J. J., Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response. *Toxicol. Sci.* 2003, *74*, 335-344.

- [34] Iordanov, M. S., Ryabinina, O. P., Wong, J., Dinh, T. H., *et al.*, Molecular determinants of apoptosis induced by the cytotoxic ribonuclease onconase: Evidence for cytotoxic mechanisms different from inhibition of protein synthesis. *Cancer Res.* 2000, 60, 1983-1994.
- [35] Chang, L. F., Karin, M., Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 2001, 410, 37-40.
- [36] Johnson, G. L., Lapadat, R., Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002, 298, 1911-1912.
- [37] Moon, Y., Pestka, J. J., Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicol. Sci.* 2002, 69, 373-382.
- [38] Zhou, H. R., Islam, Z., Pestka, J. J., Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin. *Toxicol. Sci.* 2003, 72, 130-142.
- [39] Zhou, H., Pestka, J. J., Deoxynivalenol-induced apoptosis mediated by p38 mapk-dependent p53 gene induction in raw 264.7 macrophages. *Toxicol. Sci.* 2003, 72, 330-330.
- [40] Kinser, S., Li, M. X., Jia, Q. S., Pestka, J. J., Truncated deoxynivalenol-induced splenic immediate early gene response in mice consuming (n-3) polyunsaturated fatty acids. *J. Nutr. Biochem.* 2005, 16, 88-95.
- [41] Shaulian, E., Karin, M., AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001, 20, 2390-2400.
- [42] Shaulian, E., Karin, M., AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4, E131-E136.
- [43] Kinser, S., Jia, Q. S., Li, M. X., Laughter, A., *et al.*, Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: Immediate early genes as primary targets. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues* 2004, 67, 1423-1441.
- [44] Lu, D., Chen, J., Hai, T., The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem. J.* 2007, 401, 559-567.

- [45] Hai, T., Hartman, M. G., The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 2001, 273, 1-11.
- [46] Hsu, J. C., Laz, T., Mohn, K. L., Taub, R., Induction of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991, 88, 3511-3515.
- [47] Maere, S., Heymans, K., Kuiper, M., BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics* 2005, 21, 3448-3449.
- [48] Cline, M. S., Smoot, M., Cerami, E., Kuchinsky, A., *et al.*, Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat. Protoc.* 2007, 2, 2366-2382.
- [49] Lu, S. C., Huang, H. Y., Comparison of sulfur amino-acid utilization for GSH synthesis between HepG2 cells and cultured rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* 1994, 47, 859-869.
- [50] Urani, C., Doldi, M., Crippa, S., Camatini, M., Human-derived cell lines to study xenobiotic metabolism. *Chemosphere* 1998, 37, 2785-2795.
- [51] Mohn, K. L., Laz, T. M., Melby, A. E., Taub, R., Immediate-early gene-expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated BALB/C 3T3 cells-liver-specific induction-patterns of gene-33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the JUN, FOS, and EGR families. *J. Biol. Chem.* 1990, 265, 21914-21921.
- [52] Hasselblatt, P., Rath, M., Kominenovic, V., Zatloukal, K., Wagner, E. F., Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007, 104, 17105-17110.
- [53] Bottone, F. G., Moon, Y., Alston-Mills, B., Eling, T. E., Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005, 315, 668-677.
- [54] Guo, L. L., Sans, M. D., Gurda, G. T., Lee, S. H., *et al.*, Induction of early response genes in trypsin inhibitor-induced pancreatic growth. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007, 292, G667-G677.
- [55] Chung, Y. J., Zhou, H. R., Pestka, J. J., Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF-alpha expression by deoxynivalenol (vomitoxin). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, 193, 188-201.



- [56] Iordanov, M. S., Choi, R. J., Ryabinina, O. P., Dinh, T. H., *et al.*, The UV (ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 2002, 22, 5380-5394.
- [57] Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., *et al.*, Ribotoxic stress response: Activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA. *Mol. Cell. Biol.* 1997, 17, 3373-3381.
- [58] Iordanov, M. S., Pribnow, D., Magun, J. L., Dinh, T. H., *et al.*, Ultraviolet radiation triggers the ribotoxic stress response in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 15794-15803.
- [59] Rozengurt, E., Early signals in the mitogenic response. *Science* 1986, 234, 161-166.
- [60] Murphy, L. O., MacKeigan, J. P., Blenis, J., A network of immediate early gene products propagates subtle differences in mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. *Mol. Cell. Biol.* 2004, 24, 144-153.
- [61] Pestka, J. J., Zhou, H., HCK- and PKR-dependent mitogen-activated protein kinase phosphorylation and AP-1, C/EBP and NF-KAPPAB activation precede deoxynivalenol-induced TNF-alpha and MIP-2 expression. *Toxicol. Sci.* 2003, 72, 121-121.
- [62] Berek, L., Petri, I. B., Mesterhazy, A., Teren, J., Molnar, J., Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol. in Vitro* 2001, 15, 25-30.
- [63] Sun, X. M., Zhang, X. H., Wang, H. Y., Cao, W. J., *et al.*, Effects of sterigmatocystin, deoxynivalenol and aflatoxin G(1) on apoptosis of human peripheral blood lymphocytes in vitro'. *Biomedical and Environmental Sciences* 2002, 15, 145-152.
- [64] Zhou, H. R., Yan, D., Pestka, J. J., Differential cytokine mRNA expression in mice after oral exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol): Dose response and time course. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 144, 294-305.
- [65] Li, S. G., Ouyang, Y. L., Yang, G. H., Pestka, J. J., Modulation of transcription factor AP-1 activity in murine EL-4 thymoma cells by vomitoxin (deoxynivalenol). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2000, 163, 17-25.
- [66] Zhou, H. R., Jia, Q. S., Pestka, J. J., Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the Src family kinase Hck. *Toxicol. Sci.* 2005, 85, 916-926.

- [67] Hasselblatt, P., Rath, M., Komnenovic, V., Zatloukal, K., Wagner, E., Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to C-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase. *Hepatology* 2007, 46, 690A-691A.
- [68] Wong, S. S., Zhou, H. R., Pestka, J. J., Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-kappa B, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A* 2002, 65, 1161-1180.
- [69] Murphy, L. O., Smith, S., Chen, R. H., Fingar, D. C., Blenis, J., Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products. *Nat. Cell Biol.* 2002, 4, 556-564.
- [70] Tamura, K., Hua, B. Y., Adachi, S., Guney, I., *et al.*, Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J.* 2005, 24, 2590-2601.
- [71] Fawcett, T. W., Martindale, J. L., Guyton, K. Z., Hai, T., Holbrook, N. J., Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem. J.* 1999, 339, 135-141.
- [72] Nakagomi, S., Suzuki, Y., Namikawa, K., Kiryu-Seo, S., Kiyama, H., Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J. Neurosci.* 2003, 23, 5187-5196.
- [73] Inoue, K., Zama, T., Kamimoto, T., Aoki, R., *et al.*, TNF alpha-induced ATF3 expression is bidirectionally regulated by the JNK and ERK pathways in vascular endothelial cells. *Genes Cells* 2004, 9, 59-70.
- [74] Allen-Jennings, A. E., Hartman, M. G., Kociba, G. J., Hai, T. W., The roles of ATF3 in liver dysfunction and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 20020-20025.

## 4 DISKUSSION

Bedingt durch geänderte Anbauverfahren und als Folge des weltweiten Klimawandels ist in den letzten Jahren eine zunehmende Belastung von Getreide und getreidehaltigen Lebensmitteln mit Fusarien, insbesondere Trichothecenen zu beobachten (Pestka 2008). In einer umfangreichen Datenerhebung (Scientific cooperation on Questions relating to Food, SCOOP), aus dem Jahre 2003 wurde europaweit für DON eine Vorkommenshäufigkeit von 57 % ermittelt, in einigen Ländern lag die durchschnittliche Belastung bei über 1000 µg/kg. T-2/HT-2 Toxin konnte in 20 % der Proben nachgewiesen werden. Besonders häufig waren Weizen und Mais (DON) bzw. Hafer (T-2/HT-2 Toxin) kontaminiert. In neueren Untersuchungen aus Deutschland zur Belastung der Lebensmittel mit Fusarientoxinen konnten diese Werte untermauert werden: von 4700 untersuchten Proben waren 75 % mit DON kontaminiert (Curtui et al. 2005) bzw. von 800 Proben 89 % mit T-2/HT-2 Toxin (Hocke 2008); die Medianwerte für DON in Mehlen lagen beispielsweise im Bereich von 60-370 µg/kg, für T-2/HT-2 Toxin bei ca. 1 µg/kg. In einer Biomarker-Studie aus England, bei der die DON Konzentration im Urin von Probanden bestimmt wurde konnte die hohe Exposition der Verbraucher gegen dieses Toxin verifiziert werden; DON wurde in 98,7 % der Proben nachgewiesen. Aus diesen Daten wurde in einer groben Schätzung die tägliche DON-Aufnahme der Bevölkerung abgeleitet. Es zeigte sich, dass ca. 50 % des von der SCF vorgeschlagenen TDI-Wertes von 1000 ng pro kg Körpergewicht ausgeschöpft wurde. Ganz ähnliche Ergebnisse wurden in einer deutschen Studie zur Belastung der Bevölkerung mit DON erhalten (Usleber, persönliche Mitteilung). Bisher vorliegende Daten für T-2/HT-2 Toxin deuten darauf hin, dass bei diesen Toxinen die durchschnittliche Belastung des Verbrauchers deutlich niedriger ist.

Aus der hohen Kontaminationsrate von Lebensmitteln und den in Fütterungsversuchen gezeigtem Potential von Trichothecenen ein komplexes Spektrum an toxischen Effekten hervorzurufen, ergeben sich - insbesondere auch unter dem Aspekt einer chronischen Exposition - eine ganze Reihe von Fragen zur potentiellen Gesundheitsgefährdung des Verbrauchers durch diese Toxine. Essentielle Voraussetzung für eine fundierte

Risikoabschätzung ist allerdings, den molekularen Wirkungsmechanismus der Trichothecene zu kennen und zu verstehen.

#### **4.1 Zytotoxisches Potential**

Eine Vielzahl von Arbeiten beschäftigt sich mit dem zytotoxischen Potential von Trichothecenen und eine ganze Reihe von tierischen und humanen Zelllinien wurden hierbei getestet (Übersicht bei Gutleb et al. (2002)). Beim Vergleich der Studien fällt auf, dass markante Unterschiede in den Ergebnissen zu einer Zelllinie bestehen können. Beispielsweise gehörten bei Calvert et al. (2005), HeLa Zellen zu den empfindlichsten Zellen, während Hanelt et al. (1994) die gleiche Zelllinie als unempfindlich gegenüber Trichothecenen einstufte. Prinzipiell sind diese Unterschiede zum einen auf die verschiedenen eingesetzten Untersuchungsverfahren zurückzuführen, zum anderen haben aber Details der Versuchsdurchführung wie z.B. Inkubationszeiten, Zellzahl, Alter und Differenzierungsgrad der verwendeten Zelllinien, Art und Menge der verwendeten Lösungsmittel (zur Verbesserung der Toxinlöslichkeit), sowie sonstige Zusätze wie Antibiotika einen sehr großen Einfluß auf die Testergebnisse. So zeigten beispielsweise, in den eigenen Untersuchungen die Trichothecene nach 24h Inkubation eine starke Zytotoxizität gegenüber U937 Zellen während die wesentlich unempfindlicheren Hep-G2 Zellen noch zu über 50% proliferierten. Nach 48h unterscheiden sich die IC<sub>50</sub> Werte hingegen nicht mehr wesentlich.

Im Hinblick auf das häufige Vorkommen in der Nahrung und der daraus resultierenden Exposition des Menschen wurden T-2/HT-2 Toxin, DON und Nivalenol für die Untersuchungen ausgewählt (Abramson et al. 1998, Curtui et al. 1998, Curtui et al. 2005). Zusätzlich wurden zwei Vertreter der makrozyklischen Trichothecene (Satratoxin G und H) getestet. Diese Toxine werden in hohen Konzentrationen von Schimmelpilzen der Gattung *Stachybotrys* gebildet, die häufig nach Wasserschäden in Gebäuden nachzuweisen ist. Die Relevanz dieser Toxine bei der Ätiologie des „Sick building Syndroms“ wird seit längeren diskutiert (Croft et al. 1986, Sorenson et al. 1987, Johanning et al. 1996, Johanning et al. 1998, Johanning et al. 1999, Gottschalk et al. 2006, Pestka 2008).

Um belastbares Datenmaterial zur Empfindlichkeit humaner Zellen zu erhalten, wurde eine breite Palette von Zelllinien unterschiedlicher Organherkunft in die Untersuchungen einbezogen. Die Auswahl erfolgte nach folgenden Kriterien: Im Hinblick auf gastro-

intestinale und immunmodulatorische Effekte der Trichothecene wurden CaCo-2 (Darm), U937 (Monozyten) und Jurkat (T-Lymphozyten) ausgewählt, die im übrigen auch in vielen anderen Studien bereits untersucht wurden (Instanes & Hetland 2004, Pestka et al. 2005, Islam et al. 2006, McKean et al. 2006, Nasri et al. 2006, Sergent et al. 2006, Bony et al. 2007, Gray & Pestka 2007, Huang et al. 2007, Bae & Pestka 2008, Van De Walle et al. 2008, Nielsen et al. 2009). Aus dem Bereich des Immunsystems kam desweiteren noch eine Myelomzelllinie, RPMI 6228, zum Einsatz. Mit Fokus auf das gesundheitliche Risiko von Trichothecenen im Zusammenhang mit den „Sick building Syndrom“ wurden die Lungenzelllinie A549 und die Laryngxzelllinie HEp-2 getestet (Mayer et al. 2008). Die Hep-G2 Zellen repräsentieren eine klassische Zelllinie, die oft für pharmakologische Studien als Leber-Model eingesetzt wird. Auch für Studien zu Trichothecenen wurden sie schon öfter genutzt (Chung et al. 2003, Bouaziz et al. 2008, Königs et al. 2008, Nielsen et al. 2009). Da sich die meisten bisherigen Studien zur zytotoxischen Wirkung von Trichothecenen auf Epithelzellen bzw. Immunzellen konzentrieren, wurde noch eine mesenchymale Zelllinie, (A204, Muskel) eingesetzt. Neben diesen permanenten Zelllinien, wurden noch primäre Endothelzellen (HUVEC) verwendet, zumal in mehreren neueren Arbeiten eine geringere Empfindlichkeit primärer Zellen gegen Trichothecene postuliert wurde (Königs et al. 2007, Königs et al. 2009). Zum Nachweis der zytologischen Wirkung kann der WST-1 Test zum Einsatz, ein Zellproliferationstest, der sich am Lehrstuhl seit langem bei der Analyse von Toxinen mikrobieller Herkunft bewährt hat (Dietrich et al. 1999, Dietrich et al. 2005, Moravek et al. 2006).

Die erhaltenen Ergebnisse bestätigten zum einen bei allen eingesetzten Zelllinien das unterschiedliche zytotoxische Potential von Typ A, B und D Trichothecenen, das sich etwa in einem Verhältnis von 10:1:500 darstellte. Auch die besondere Empfindlichkeit der immunkompetenten Zellen konnte bestätigt werden. Für U937, Jurkat und RPMI 8226 Zellen bewegten sich die IC<sub>50</sub>- Werte im Bereich von 2,2 nmol/ml für Satratoxin H bis 1 µmol/l für DON. Geringfügig niedrigere Empfindlichkeiten wurden für die A549 und A204 Zellen ermittelt, während die Epithelzelllinien CaCo-2, Hep-G2 die geringste Reaktivität aufwiesen. Auch bei Oh et al. (2001) waren Hep-G2 Zellen deutlich weniger empfindlich als die U937 Zellen.

Grundsätzlich lagen im Vergleich zur verfügbaren Literatur die IC<sub>50</sub> Werte in einem bemerkenswert engem Bereich (Gutleb et al. 2002). Dies gilt auch für die primären Zellen (HUVEC), die im Rahmen dieser Arbeiten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber

Trichothecenen untersucht wurden. Zwar wurde eine geringfügig niedrigere Sensitivität gegenüber HT-2 Toxin und DON beobachtet, eine generelle geringere Empfindlichkeit dieser primären Zellen gegenüber Trichothecenen konnte im Gegensatz zu den von Königs et al. (2007), Königs et al. (2009) verwendeten Fibroblasten und Epithelzellen aus dem proximalen Nierentubulus für die HUVEC Zellen nicht beobachtet werden. Im Hinblick auf die nach Toxinaufnahme kurzfristig relativ hohen Serumwerte der Trichothecene (Turner et al. 2008), könnte diese Zelllinie ein interessantes Model für weitere toxikologische Studien darstellen.

Zusammenfassend bilden die erhaltenen Daten die Grundlage für die weitere Entwicklung von analytischen Zellkulturverfahren für den Nachweis von Trichothecenen, sind aber auch für zellbiologische Studien zur Toxizität dieser Mykotoxine von Bedeutung.

#### **4.2 Induktion von Transkriptionsfaktoren in Hepatomazellen**

Üblicherweise wird die Zytotoxizität der Trichothecene darauf zurückgeführt, dass sie in der Lage sind, die Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen zu hemmen, wobei die inhibitorischen Konzentrationen zwischen den verschiedenen Toxin-Chemotypen stark variieren können (Ueno 1985). Untersuchungen von Shifrin & Anderson (1999) zeigten jedoch, dass bei manchen Trichothecenen wie z.B. Nivalenol oder T-2 Tetraol die Proteinsynthesehemmung nicht mit der Induktion von apoptotischen Vorgängen, insbesondere der Aktivierung der Caspase-3, korreliert. Dies wurde auf die toxininduzierte Dysregulation intrazellulärer Signalketten und eine dadurch bedingte Veränderung der Genexpression zurückgeführt. Weitere Arbeiten (Iordanov et al. 1997, Iordanov & Magun 1999, Shifrin & Anderson 1999, Li et al. 2000, Iordanov et al. 2002, Chung et al. 2003, Pestka & Zhou 2003, Zhou & Pestka 2003, Zhou et al. 2003, Zhou et al. 2005, Islam et al. 2006, Moon et al. 2007) konnten zeigen, dass DON in der Lage ist, in einem als „ribotoxic stress response“ bezeichneten Prozeß den MAPK-Pathway und Transkriptionsfaktoren *in vivo* und *in vitro* zu induzieren. Diese Studien zur modulierenden Wirkung von DON auf die Signaltransduktion der Zelle konzentrierten sich auf Mäuse (Makrophagen bzw. lymphatisches Gewebe) und die Induktion von Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$  (Pestka & Smolinski 2005). Umfassende Untersuchungen auf molekularer Ebene zu transkriptionalen Veränderungen von epithelialen Zellen unter DON Einfluss wurden bislang nicht beschrieben.

Deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels systematischer vergleichender Genexpressionsanalysen untersucht, inwieweit und in welchem Umfang Trichothecene zelluläre Regulationsmechanismen beeinflussen. Als Modelloxin wurde im Hinblick auf dessen Vorkommenshäufigkeit DON ausgewählt, als Zelllinie Hep-G2. Letzteres erfolgte unter dem Aspekt, dass die Leber das wichtigste Organ für die Metabolisierung und Entgiftung von Lebensmittelkontaminanten darstellt. Zudem konnten in neueren Fütterungsversuchen beim Schwein vergleichsweise hohe Mengen von DON in der Leber nachgewiesen werden (Doll et al. 2003, Doll et al. 2008); für Hepatozyten aus der Ratte und für primäre humane Hepatozyten konnte nach Beginn der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass DON zentrale Stoffwechselfparameter beeinflusst (Sahu et al. 2008). In diesen Arbeiten lag der Fokus auf zytotoxischen Fragestellungen (Apoptoseinduktion, Nekrose und verringerte Membranintegrität), unsere Untersuchungen beschäftigten sich jedoch in Fortführung der oben beschriebenen Versuche zum zytotoxischen Potential mit den frühen durch DON induzierten molekularen Effekten.

Für die Microarray-Untersuchungen wurden basierend auf den Ergebnissen der Zytotoxizitätsstudie zwei unterschiedliche DON-Konzentrationen ausgewählt, bei denen nach einer Behandlungsdauer von 3h noch keine akut toxischen Effekte auf die metabolische Aktivität der Zellen festgestellt werden konnte. Die niedrigere DON-Dosis von 1  $\mu\text{M}$  liegt zwar über den in einer aktuellen Fütterungsstudie (1,1 mg DON/kg Futter) in der Galle und der Leber von Schweinen (Doll et al. 2008) gefundenen Toxinkonzentrationen von 0,5  $\mu\text{M}$  bzw. 0,02  $\mu\text{M}$  Toxin, aber noch in einem Bereich der bei Aufnahme hoch kontaminierter Nahrungsmittel auftreten könnte. Im Gegensatz hierzu wurden in aktuellen *in vitro* Studien, die über eine erhöhte Permeabilität der Darmschleimhaut nach DON-Behandlung berichteten, Konzentrationen von  $\geq 20$   $\mu\text{M}$  eingesetzt (Maresca et al. 2008, Pinton et al. 2008). In den eigenen Untersuchungen wurde im Hinblick auf die bei höheren DON-Konzentrationen auftretende Hemmung der Proteinbiosynthese auch noch der Einfluss einer 10  $\mu\text{M}$  Dosis auf die Genexpression überprüft.

In den orientierenden Microarray-Studien wurden unabhängig davon, ob inhibitorische oder subinhibitorische DON-Konzentrationen eingesetzt wurden, eine erhöhte Expression bei 7,5 % bzw. 6,9 % der Gene festgestellt. Dies korreliert mit den bei der Zytotoxizitätsstudie gemachten Beobachtungen, dass bei kurzen Behandlungszeiten proliferative Toxineffekte auftreten. Hierbei waren insbesondere Gene, die entsprechend der „Gene Ontology“ (GO)

Nomenklatur bei der Regulation der Transkription beteiligt sind, betroffen. Dies stellt möglicherweise einen Feedback-Mechanismus der Zelle auf die Proteinsynthese-hemmenden Eigenschaften des Toxins dar. Auch bei Kinser et al. (2004), Kinser et al. (2005), die ein Genexpressionsprofil der Milz DON-behandelter Mäuse erstellten, stand eine gesteigerte Genexpression im Vordergrund. Dies konnte v. a. für Gene aus der Gruppe der Zytokine, Chemokine, aber auch für einige Transkriptionsfaktoren und Hydrolasen gezeigt werden. Entsprechend dazu wurde auch bei den Hep-G2 Zellen eine ausgeprägte Induktion für einige Transkriptionsfaktoren beobachtet. Dies trifft insbesondere für *jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog* (JUN), *early growth response 1* (EGR1), *fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog* (FOS) und *activating transcription factor 3* (ATF3) zu, Faktoren die auch *in vivo* bei Stress, Entzündungen bzw. Regenerationsvorgängen induziert werden (Mohn et al. 1990, Hsu et al. 1991, Hasselblatt et al. 2007).

Im Allgemeinen erfolgt eine Aktivierung und Bildung der Transkriptionsfaktoren unter der Kontrolle des MAPK-Pathways. Nach neueren Untersuchungen handelt es sich bei dem MAPK-Pathway um ein komplexes Netzwerk sich gegenseitig aktivierender und inaktivierender Enzyme, wobei die durch die Kinasen und Phosphatasen gesteuerten Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge zu den zentralen Regulationsmechanismen jeder Zelle gehören. Letztendlich erfolgt die Umsetzung der Signale durch die Induktion einer breiten Palette von Transkriptionsfaktoren. Der MAPK-Signaltransduktionsweg an sich wird durch eine Vielzahl von Stimuli (UV-Licht, Stress, Wachstumshormone, LPS, Zytokine usw.) aktiviert und spielt die wesentliche Rolle bei der Induktion und zellspezifischen Regulation von Zielgenen, die im Zusammenhang mit Apoptose, Differenzierung, Proliferation oder Viabilität der Zelle stehen (Bottone et al. 2005, Guo et al. 2007). Es ist bekannt, dass die über eine Signalkaskade vermittelte Phosphorylierung (d.h. Aktivierung) der Kinasen (ERK1/2, JNK1/2 und p38) Zelltyp- und Stimulus-abhängig erfolgt (Iordanov et al. 1997, Iordanov & Magun 1998, Shifrin & Anderson 1999, Iordanov et al. 2002, Chung et al. 2003).

Bei Mäusen bzw. der murinen Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) wurde der MAPK Pathway in den letzten Jahren im Zusammenhang mit der durch DON ausgelösten „ribotoxic stress response“ bereits intensiv untersucht (Übersicht bei Pestka (2008)). Für humane Zelllinien liegen hingegen nur vergleichsweise wenig detaillierte Daten vor: Jurkat Zellen wurden von Shifrin & Anderson (1999) bzw. Pestka et al. (2005), U937 von Islam et al.



(2006), Int 407 von Moon et al. (2007), Moon et al. (2008) und die CaCo-2 Zellen von Sergent et al. (2006) verwendet. Vor diesem Hintergrund und auch im Hinblick auf die oben erwähnte starke Induktion von Transkriptionsfaktoren wurde die Aktivierung des MAPK-Pathways nach DON Behandlung intensiver untersucht. Als auffälligstes Ergebnis ist hierbei die intensive und prolongierte Phosphorylierung (bis zu 24h) der ERK1/2 Kinase, insbesondere bei hohen DON Konzentrationen, zu nennen. Eine anhaltende Aktivierung der ERK1/2 bei humanen Zelllinien konnte auch von Sergent et al. (2006) bei CaCo-2 Zellen bzw. in geringerem Umfang von Pestka et al. (2005) bei Jurkat Zellen beobachtet werden, während die von Moon et al. (2007) verwendeten Int 407 Zellen auf eine DON-Behandlung mit einer nur kurzfristigen, nach einer ½ h detektierbaren ERK1/2 Phosphorylierung reagierten. Für murine immunkompetente Zellen, sowie für die Milz DON behandelte Mäuse liegen zur prolongierten Aktivierung der ERK1/2 hingegen eine ganze Reihe von Untersuchungen vor (Li et al. 2000, Zhou et al. 2003, Kinser et al. 2004, Kinser et al. 2005, Zhou et al. 2005). Bei den beiden anderen MAP-Kinasen, JNK1/2 und p38, konnte unter DON Einfluss hingegen nur eine kurze Induktion der beiden Enzyme in Hep-G2 Zellen beobachtet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Int 407 Zellen nach DON-Behandlung berichtet Moon et al. (2008), während bei Jurkat Zellen für p38 eine lang anhaltende (> 4h) Aktivierung gefunden wurde (Pestka et al. 2005). Diese letzten Befunde decken sich mit zahlreichen Studien an murinen, immunkompetenten Zelllinien, bei denen deswegen v. a. dem p38-Pathway eine sehr große Rolle, insbesondere für die Induktion apoptotischer Vorgänge, zugeschrieben wurde (Übersicht bei Pestka (2008), Zhou et al. (2003) und Zhou et al. (2005)). Diese im Gegensatz zu anderen Zelllinien prolongierte Aktivierung der p38 könnte somit die von vielen Autoren und auch in den eigenen Untersuchungen festgestellte besondere Empfindlichkeit immunkompetenter Zellen erklären.

Im Hinblick auf die generelle Aktivierung des MAPK-Pathways wurde interessanterweise in einer Studie von (Moon & Pestka 2003) gezeigt, dass nach Behandlung von Zellen mit subtoxischen Dosen (IC<sub>80</sub>) von Trichothecen nur bei DON und DON-Analoga eine Phosphorylierung der p38, JNK1/2 und ERK1/2-Kinasen zu beobachten war. Dies unterstreicht die Bedeutung von DON, da der MAPK-Pathway einen der zentralen Signaltransduktionswege der Zelle darstellt, und könnte auf eine Bedeutung dieses Toxins bei der Ätiologie von multifaktoriellen Erkrankungen hinweisen. Auch das in Fütterungsversuchen (Prelusky 1996) beobachtete Phänomen, dass künstlich mit DON kontaminiertes Futter eine deutlich geringere Symptomatik verursacht als natürlich kontaminierte Rationen, könnte

dadurch erklärt werden. Vor diesem Hintergrund kann die von Pestka (2008) aufgestellte Forderung, dass zukünftige Studien sich intensiver mit Aspekten wie Umfang und Dauer der Trichothecen-induzierten MAPK-Aktivierung beschäftigen sollten, nur unterstrichen werden.

Das am stärksten und längsten induzierte Zielgen unter DON-Exposition in Hep-G2 Zellen stellt der Transkriptionsfaktor JUN dar, obwohl die für die Aktivierung dieses Faktors zuständige Kinase in den MAPK Untersuchungen nur in begrenztem Umfang aktiv. Für JUN in Hep-G2 Zellen konnte hingegen eine lang anhaltende Phosphorylierung gezeigt werden, die Funktionalität, d.h. die nukleäre Translokation, konnte mittels Immunfluoreszenz bestätigt werden. Warum es trotz der kurzen Aktivierung der JNK1/2 zu einer anhaltenden JUN-Induktion kommt, bleibt offen. Für murine Makrophagen und die Milz der Maus konnte eine DON induzierte JUN Aktivierung bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden (Wong et al. 2002, Zhou et al. 2005, Sahu et al. 2008). Kinser et al. (2004) zeigten, dass in der Milz DON-behandelter Mäuse eine 85-fache Steigerung der JUN-Expression auftritt. Ähnliche Werte wurden in unseren Untersuchungen nach Behandlung von U937 Zellen mit einer 1  $\mu$ M DON-Dosis gefunden. Bei den Hep-G2 Zellen wurde hingegen eine Steigerung der Expression um mehr als das 1000-fache beobachtet. Dies unterstreicht die Zelltyp-spezifische Reaktion der Hepatozyten und korreliert mit der von Hasselblatt et al. (2007) berichteten enormen Bedeutung von JUN für die Leberregeneration. Hasselblatt et al. 2007a und Hasselblatt et al. 2007b konnte zudem zeigen, dass eine starke Expression von JUN in humanen Hepatozyten auch bei akuten Leberentzündungen auftritt.

Eine ähnlich starke Induktion konnte für FOS beobachtet werden. Auch hier war der Anstieg in Hep-G2 Zellen ( $> \log 10$ ) deutlich höher als in den U937 Zellen ( $< \log 2.5$ ). Ein starker Anstieg der mRNA Expression von FOS wurde auch in der Milz von Mäusen nach DON-Fütterung beobachtet (Kinser et al. 2004). Nach Murphy et al. (2002), wird FOS durch eine anhaltende ERK1/2 Aktivierung wie sie in den Hep-G2 Zellen beobachtet wurde, stabilisiert. Die anhaltende ERK1/2 Induktion unter DON-Einfluss erklärt auch die v. a. bei hohen DON-Dosen ausgeprägte Expression des EGR1-Proteins, das laut Moon et al. (2007) die verstärkte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-8 auslöst.

Beim Vergleich der Ergebnisse zur toxininduzierten Expression dieser Transkriptionsfaktoren bei Hep-G2 Zellen und U937 Zellen mit den Daten zur Trichothecen-Empfindlichkeit der Zelllinien, fällt auf, dass zwischen beiden Parametern eine indirekte Proportionalität besteht.

Die vergleichsweise unempfindlichen Hep-G2 exprimieren bei Toxinexposition (10  $\mu$ M DON für 3h) große Mengen an JUN ( $> \log 10$ ) und FOS ( $> \log 12$ ), während die sensitiven U937 ein signifikant niedrigeres Expressionsniveau ( $< \log 4$ ) zeigen. Diese Daten müssen noch für die übrigen Zelllinien bestätigt werden, bieten aber einen weiteren interessanten Ansatzpunkt für ein Modell der DON-induzierten Zytotoxizität.

Im Rahmen der Untersuchungen konnte erstmals gezeigt werden, dass es unter DON Einwirkung zu einer signifikanten zelltypspezifischen und konzentrationsabhängigen Induktion eines weiteren Transkriptionsfaktors, nämlich ATF3, kommt. ATF3 gehört zu den „basic leucine zipper“ Transkriptionsfaktoren, die Apoptose, Proliferation und die Lebensfähigkeit von Zellen beeinflussen (Fawcett et al. 1999, Tamura et al. 2005). Die Regulation von ATF3 durch den MAPK-Pathway konnte vielfach gezeigt werden (Mohn et al. 1990, Inoue et al. 2004, Lu et al. 2007). Transgene Mäuse, die eine erhöhte ATF3-Expression aufweisen, zeigen Leberdysfunktionen die sich als gestörte Glucosehomöostase und reduzierte Glykogenspeicherung manifestieren. Eine erhöhte ATF3-Expression wurde auch bei der Leberregeneration nachgewiesen, weswegen dieser Faktor früher auch als LFRF1 (liver regenerating factor 1) bezeichnet wurde. Interessanterweise wurden in jüngster Zeit bei Fütterungsversuchen von Schweinen mit DON kontaminierten Futter pathologische Veränderungen in der Leberzelle gefunden, die sich unter anderen in einer reduzierten Glykogenspeicherung äußerten (Tiemann et al. 2006).

In unseren Untersuchungen konnten somit zum ersten Mal Hinweise darauf gefunden werden, dass auf molekularer Ebene die im Vergleich zur Immuntoxizität geringe hepatotoxische Wirkung von DON auf der Induktion von Transkriptionsfaktoren (JUN, ATF3) beruht, die bekanntermaßen bei einer Trauma-bedingten Leberregeneration bzw. als Stressantwort des Organs vermehrt exprimiert werden. Insbesondere die prolongierte Aktivierung von JUN und die deutlich erhöhte Expression von ATF3 scheint hierbei eine leberspezifische Antwort auf die DON-Exposition zu sein. Die DON-Spezifität der Zellantwort zeigt sich auch darin, dass in einem weiteren Microarray-Versuch, bei dem eine der 1  $\mu$ M DON-Dosis äquivalente T-2 Konzentration eingesetzt wurde, eine deutlich niedrigere Geninduktion auftrat (Ergebnisse nicht dargestellt). Dies ist vielleicht auch auf die von Moon et al (2003) beschriebene unterschiedliche MAPK-Induzierbarkeit von Trichothecen-Chemotypen bei subtoxischen Konzentrationen zurückzuführen. Das hohe Expositionsrisiko der Bevölkerung gegenüber Trichothecenen – insbesondere DON (Turner et al. 2008) – und die jüngst festgestellte hohe

Empfindlichkeit von primären Hepatozyten gegenüber DON (Königs et al. 2008), unterstreichen die Wichtigkeit weiterer Studien zur Hepatotoxizität dieser Mykotoxine.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Rahmen dieser Arbeit die Grundlagen für weitergehende Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismen von DON in humanen Zellen, insbesondere Leberzellen, geschaffen wurde. Insbesondere im Hinblick auf das hochkomplexe Netzwerk des MAPK-Pathways mit seinen vielfältigen Regulationsmechanismen, könnten weitere detailliertere Arbeiten zur DON induzierten Aktivierung bzw. Deaktivierung der Kinasen wichtige Ergebnisse liefern. Unter toxikologischen Gesichtspunkten ist es desweiteren hochinteressant zu prüfen, inwieweit die bei Hepatoma-Zellen erhaltenen Ergebnisse auf primäre Hepatozyten zu übertragen sind. Neben diesen naheliegenden weiterführenden Untersuchungen, lieferte die Genexpressionsanalyse aber auch Anhaltspunkte für weitere Studien, die sich z.B. auf die durch Trichothecene verursachte Wachstumsdepression konzentrieren könnten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Trichothecene inhibieren die Proteinsynthese auf ribosomaler Ebene, unterdrücken die DNA- und RNA-Synthese und zeigen toxische Effekte an Zellmembranen. Klinisch stehen dabei Störungen des Immunsystems, Wachstumsdepression und Reproduktionsstörungen im Vordergrund. Da die diesen Effekten zugrunde liegenden molekularen Mechanismen weitgehend ungeklärt sind, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels systematischer vergleichender genexpressions- und proteomischer Analysen neue und grundlegende Erkenntnisse zum molekularen Wirkungsmechanismus dieser Mykotoxine gewonnen werden.

Zunächst wurde die zytotoxische Aktivität von Trichothecenen vom Typ A (T-2 Toxin and HT-2 toxin), Typ B (Deoxynivalenol [DON] and Nivalenol [NIV]), and Typ D (Satratoxins G and H) für acht humane Zelllinien und eine primäre Zellkultur (Hep-G2, A549, CaCo-2, HEp-2, A204, U937, RPMI 8226, Jurkat und HUVEC) bestimmt und verglichen. Die mittels Zellproliferationstest (WST-1 Test) bei verschiedenen Zelllinien gemessenen IC<sub>50</sub>-Werte lagen im Bereich von 4,4 - 10,8 nmol/l für T-2 Toxin, 7,5 - 55,8 mol/l für HT-2 Toxin, 600-4.900 nmol/l für DON, 300 - 2.600 nmol/l für NIV und 2,2 - 18,3 nmol/l für Satratoxin G/H. Die Empfindlichkeit der primären endothelialen Zellen (HUVEC) unterschied sich nicht wesentlich von den getesteten permanenten Zelllinien. Die IC<sub>50</sub>- Werte bewegten sich zwischen 16,5 nmol/l (T-2 Toxin) und 4.500 nmol/l (DON).

Da bisher kaum Daten zur Lebertoxizität von DON vorliegen, wurde für Hep-G2 Zellen als in-vitro Model mittels Microarray ein umfassendes Expressionsprofil nach der Behandlung mit einer niedrigen (1 µmol) und einer hohen DON-Dosis (10 µmol) erstellt. Unter den Versuchsbedingungen war bei ca. 7 % der untersuchten Gene eine vermehrte Expression zu verzeichnen. Die erhobenen Daten wurden schließlich mit RT-PCR überprüft und verifiziert. In detaillierteren Untersuchungen zur Aktivierung des MAPK-Pathways und der dadurch induzierten Expression von Transkriptionsfaktoren konnte gezeigt werden, dass zwischen Hep-G2 Zellen und den immunkompetenten U937 Zellen deutliche Unterschiede in der DON-Behandlung auftraten. Für einige wichtige Transkriptionsfaktoren (ATF3, JUN, FOS, EGR1) konnte ein mRNA Expressionsprofil erstellt und die Aktivierung der Genprodukte mittels Western Blot bestätigt werden. Die Effekte von DON auf mRNA und Proteinebene

waren konzentrations- und zeitabhängig und beeinflussten zelluläre Prozesse in Hep-G2 Zellen durch die Modulierung der Mitglieder der MAPK-Familie und der korrespondierenden down stream Transkriptionsfaktoren (JUN, FOS, EGR1 und ATF3). Hierbei konnte erstmals zwischen der Höhe der DON induzierten Expression von Transkriptionsfaktoren und der Empfindlichkeit der Zelllinien eine indirekte Proportionalität hergestellt werden. Mit ATF3 (LRF1, liver regenerating factor 1) wurde ein bisher für DON nicht beschriebenes „downstream Gen“ identifiziert, das die im Vergleich zur Immuntoxizität geringe hepatotoxische Wirkung von DON erklären könnte.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass durch die derzeitige Fokussierung wissenschaftlicher Studien auf die Immuntoxizität von DON das Gesamtrisiko für den Verbraucher unterschätzt wird und weitergehende Untersuchungen unter Einbeziehung verschiedener Zelllinien dringend nötig sind.

## 5 SUMMARY

### **Studies on toxicity and molecular mode of action of deoxynivalenol**

Trichothecenes are known to inhibit protein expression on the ribosomal level. Furthermore, they suppress DNA and RNA synthesis and exhibit toxic effects on cell membranes. Major clinical signs are impairment of the immune system, growth depression and reproductional dysfunction. As molecular mechanisms responsible for above mentioned effects are widely unknown, present thesis aimed to obtain basic insights on the molecular mode of action of respective mycotoxins. This topic was covered by the means of gene expression and proteomic analyses.

First of all cytotoxic activities of type A (T-2 toxin and HT-2 toxin), type B (Deoxynivalenol [DON] and Nivalenol [NIV]), and type D (Satratoxins G and H) trichothecenes were comparatively assayed in eight human cell lines (Hep-G2, A549, CaCo-2, HEp-2, A204, U937, RPMI 8226, and Jurkat.). Additionally, HUVEC cells, representing a primary cell culture, were included. IC<sub>50</sub>-values detected by WST-1 assay were as follows: 4.4-10.8 nmol/l for T-2 Toxin, 7.5-55.8 mol/l for HT-2 Toxin, 600-4,900 nmol/l for DON, 300-2,600 nmol/l for NIV and 2.2-18.3 nmol/l for Satratoxins G/H. Sensitivity of primary endothelial cells was not considerably different from that found in permanent cell lines. IC<sub>50</sub> levels varied between 16.5 nmol/l (T-2 Toxin) and 4,500 nmol/l (DON).

Currently data on DON-related liver-cytotoxicity are fairly available. Therefore, an extensive expression profile based on microarray for Hep-G2 cells as an *in vitro* system was compiled. It includes treatment with low (1 µmol) as well as high (10 µmol) DON doses. Under respective conditions approximately 7 % of all genes under study showed increased expression. Microarray data were subsequently evaluated and verified by RT-real-time PCR. In depth analysis of activation reactions in the MAPK-pathways and thereby expression of transcription factors revealed significant differences between Hep-G2 and immunocompetent U937 cells. For some important transcription factors (ATF-3, JUN, FOS and EGR1) an mRNA expression profile was generated. Activation of respective proteins was confirmed by Western-blot. DON-related effects on cellular processes including MAPK-family members

were time and concentration dependent on both RNA and protein level. It could be shown for the first time, that DON induced expression of transcription factors are inversely correlated to cell susceptibility. With ATF-3 (LRF1, liver regenerating factor 1) a yet non-described downstream gene was indentified, thus providing potential explanation for the mild hepatotoxicity compared to the more prominent immunotoxicity of DON.

In summary, present thesis showed that due to focussing on immunotoxicity of DON only - as described in the current literature - the overall risk for consumers is underestimated. Studies including cell lines of different origins are therefore urgently needed.



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

ABRAMSON, D., R. M. CLEAR, E. USLEBER, R. GESSLER, T. W. NOWICKI & E. MÄRTLBAUER (1998):

Fusarium species and 8-keto-trichothecene mycotoxins in Manitoba barley  
Cereal Chem. 75, 137-141

BAE, H. K. & J. J. PESTKA (2008):

Deoxynivalenol induces p38 interaction with the ribosome in monocytes and macrophages  
Toxicol Sci. 105, 59-66

BILY, A. C., L. M. REID, M. E. SAVARD, R. REDDY, B. A. BLACKWELL, C. M. CAMPBELL, A. KRANTIS, T. DURST, B. J. PHILOGENE, J. T. ARNASON & C. REGNAULT-ROGER (2004):

Analysis of Fusarium graminearum mycotoxins in different biological matrices by LC/MS  
Mycopathologia. 157, 117-26

BONY, S., L. OLIVIER-LOISEAU, M. CARCELEN & A. DEVAUX (2007):

Genotoxic potential associated with low levels of the Fusarium mycotoxins nivalenol and fusarenon X in a human intestinal cell line  
Toxicol in Vitro. 21, 457-65

BOTTALICO, A., A. LOGRIECO & A. VISCONTI (1989):

Fusarium species and their mycotoxins in infected corn in Italy  
Mycopathologia. 107, 85-92

BOTTALICO, A. & G. PERRONE (2002):

Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe  
European Journal of Plant Pathology. 108, 611-624

BOTTONE, F. G., Y. MOON, B. ALSTON-MILLS & T. E. ELING (2005):

Transcriptional regulation of activating transcription factor 3 involves the early growth response-1 gene  
J Pharmacol Exp Ther. 315, 668-677

BOUAZIZ, C., O. SHARAF EL DEIN, E. EL GOLLI, S. ABID-ESSEFI, C. BRENNER, C. LEMAIRE & H. BACHA (2008):

Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells  
Toxicology. 254, 19-28

BRETZ, M., S. GÖCKLER & H. HUMPF (2005):

Isolierung und Strukturaufklärung von thermischen Abbauprodukten des Mykotoxins Nivalenol  
Mycotoxin Research. 21, 15-17

- CALVERT, T. W., K. E. AIDOO, A. G. CANDLISH & A. R. FUAT (2005):  
Comparison of in vitro cytotoxicity of Fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines  
*Mycopathologia*. 159, 413-9
- CHUNG, Y. J., H. R. ZHOU & J. J. PESTKA (2003):  
Transcriptional and posttranscriptional roles for p38 mitogen-activated protein kinase in upregulation of TNF- $\alpha$  expression by deoxynivalenol (vomitoxin)  
*Toxicol Appl Pharmacol*. 193, 188-201
- CIEGLER, A. (1975):  
Mycotoxins: occurrence, chemistry, biological activity  
*Lloydia*. 38, 21-35
- CROFT, W. A., B. B. JARVIS & C. S. YATAWARA (1986):  
Airborne outbreak of trichothecene toxicosis  
*Atmospheric Environment* (1967). 20, 549-552
- CURTUI, V., A. BROCKMEYER, R. DIETRICH, O. KAPPENSTEIN, H. KLAFFKE, J. LEPSCHY, E. MÄRTLBAUER, E. SCHNEIDER, C. SEIDLER, G. THIELERT, E. USLEBER, R. WEBER & J. WOLFF (2005):  
Deoxynivalenol in food  
*Mycotoxin Research*. 21, 83-88
- CURTUI, V., E. USLEBER, R. DIETRICH, J. LEPSCHY & E. MÄRTLBAUER (1998):  
A survey on the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania  
*Mycopathologia*. 143, 97-103
- DANICKE, S., H. VALENTA, F. KLOBASA, S. DOLL, M. GANTER & G. FLACHOWSKY (2004):  
Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics  
*Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung*. 58, 1-17
- DESJARDINS, A. E., T. M. HOHN & S. P. MCCORMICK (1993):  
Trichothecene biosynthesis in Fusarium species: chemistry, genetics, and significance  
*Microbiol Rev*. 57, 595-604
- DIETRICH, R., C. FELLA, S. STRICH & E. MARTLBAUER (1999):  
Production and characterization of monoclonal antibodies against the hemolysin BL enterotoxin complex produced by *Bacillus cereus*  
*Appl Environ Microbiol*. 65, 4470-4
- DIETRICH, R., M. MORAVEK, C. BURK, P. E. GRANUM & E. MARTLBAUER (2005):  
Production and characterization of antibodies against each of the three subunits of the *Bacillus cereus* nonhemolytic enterotoxin complex  
*Appl Environ Microbiol*. 71, 8214-20

DOLL, S.,S. DANICKE,K. H. UEBERSCHAR,H. VALENTA,U. SCHNURRBUSCH,M. GANTER,F. KLOBASA & G. FLACHOWSKY (2003):  
Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets  
Arch Tierernahr.57, 311-34

DOLL, S.,S. DANICKE & H. VALENTA (2008):  
Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations  
Mol Nutr Food Res.52, 727-734

ERIKSEN, G. S. & J. ALEXANDER (1998):  
Fusarium toxins in cereals - a risk assessment. Nordic Council of ministers; TemaNord 1998:  
502, 7-27 und 45-58

ERIKSEN, G. S., H. PETTERSON UND J. E. LINDBERG (2003):  
Absorption, metabolism and excretion of 3-acetylDON in pigs.  
Arch. Anim. Nutr.57, 335-345

FAWCETT, T. W.,J. L. MARTINDALE,K. Z. GUYTON,T. HAI & N. J. HOLBROOK (1999):  
Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response.  
Biochem J.339, 135-141

FORGACS, J. 1972. Stachybotryotoxicosis, p. 95-128. *In* S. Kadis, A. Ciegler, and S. J. Ajl (ed.), *Microbiol Toxins.*, vol. 8. NY:Academic Press, New York.

FRIEND, D. W., H. L. TRENHOLM, B. K. THOMPSON, P. S. FISER UND K. E. HARTIN (1986):  
Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs  
Can. J. Anim. Sci. .66, 765-775

FRIEND, D. W., H. L. TRENHOLM, B. K. THOMPSON, P. S. FISER und K. E. HARTIN (1986):  
Effect of feeding diets containing deoxynivalenol (vomitoxin)-contaminated wheat or corn on the feed consumption, weight gain, organ weight and sexual development of male and female pigs  
Can. J. Anim. Sci. 66, 765-775

GOTTSCHALK, C.,J. BAUER & K. MEYER (2006):  
Determination of macrocyclic trichothecenes in mouldy indoor materials by LC-MS/MS  
Mycotoxin Research.22, 189-192

GOYARTS, T.,S. DANICKE,H. J. ROTHKOTTER,J. SPILKE,U. TIEMANN & M. SCHOLLENBERGER (2005):

On the effects of a chronic deoxynivalenol intoxication on performance, haematological and serum parameters of pigs when diets are offered either for ad libitum consumption or fed restrictively

J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.52, 305-14

GRAY, J. S.,H. K. BAE,J. C. LI,A. S. LAU & J. J. PESTKA (2008):

Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates induction of interleukin-8 expression by deoxynivalenol, Shiga toxin 1, and ricin in monocytes

Toxicol Sci.105, 322-30

GRAY, J. S. & J. J. PESTKA (2007):

Transcriptional regulation of deoxynivalenol-induced IL-8 expression in human monocytes

Toxicol Sci.99, 502-511

GROVE, J. F. (1988):

Non-macrocyclic trichothecenes

Nat Prod Rep.5, 187-209

GROVE, J. F. (2007)

The Trichothecenes and Their Biosynthesis

In: J. F. GROVE, E. REIMANN und S. ROY (Hrsg.)

Progress in the Chemistry of Organic Natural Products Vol. 88

Springer Wien, New York, pp. 63-113

GUO, L. L.,M. D. SANS,G. T. GURDA,S. H. LEE,S. A. ERNST & J. A. WILLIAMS (2007):

Induction of early response genes in trypsin inhibitor-induced pancreatic growth

American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology.292, G667-G677

GUTLEB, A. C.,E. MORRISON & A. J. MURK (2002):

Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review

Environ Toxicol Pharmacol.11, 309-320

HANELT, M.,M. GAREIS & B. KOLLARCZIK (1994):

Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the MTT-cell culture assay

Mycopathologia.128, 167-74

HASSELBLATT, P.,M. RATH,V. KOMINENOVIC,K. ZATLOUKAL & E. F. WAGNER (2007):

Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase

Proc Natl Acad Sci U S A.104, 17105-17110

HASSELBLATT, P., M. RATH, V. KOMNENOVIC, K. ZATLOUKAL & E. WAGNER (2007):

Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to C-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase  
Hepatology. 46, 690A-691A

HOCKE, B. K. (2008)

Entwicklung und Validierung von Enzymimmuntests zum Nachweis von T-2 Toxin und HT-2 Toxin sowie Vorkommen dieser Mykotoxine in Lebensmitteln des deutschen Marktes  
Diss. vet. med., München

HSU, J. C., T. LAZ, K. L. MOHN & R. TAUB (1991):

Induction of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 88, 3511-3515

HUANG, P., K. AKAGAWA, Y. YOKOYAMA, K. NOHARA, K. KANO & K. MORIMOTO (2007):

T-2 toxin initially activates caspase-2 and induces apoptosis in U937 cells  
Toxicol Lett. 170, 1-10

INOUE, K., T. ZAMA, T. KAMIMOTO, R. AOKI, Y. IKEDA, H. KIMURA & M. HAGIWARA (2004):

TNF alpha-induced ATF3 expression is bidirectionally regulated by the JNK and ERK pathways in vascular endothelial cells  
Genes Cells. 9, 59-70

INSTANES, C. & G. HETLAND (2004):

Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy  
Toxicology. 204, 13-21

IORDANOV, M. S., R. J. CHOI, O. P. RYABININA, T. H. DINH, R. K. BRIGHT & B. E. MAGUN (2002):

The UV (ribotoxic) stress response of human keratinocytes involves the unexpected uncoupling of the Ras-extracellular signal-regulated kinase signaling cascade from the activated epidermal growth factor receptor  
Mol Cell Biol. 22, 5380-5394

IORDANOV, M. S. & B. E. MAGUN (1999):

Different mechanisms of c-Jun NH2-terminal kinase-1 (JNK1) activation by ultraviolet-B radiation and by oxidative stressors  
J Biol Chem. 274, 25801-25806

IORDANOV, M. S. & B. E. MAGUN (1998):

Loss of cellular K<sup>+</sup> mimics ribotoxic stress - Inhibition of protein synthesis and activation of the stress kinases SEK1/MKK4, stress-activated protein kinase c-Jun NH2-terminal kinase 1, and p38/HOG1 by palytoxin  
J Biol Chem. 273, 3528-3534

IORDANOV, M. S.,D. PRIBNOW,J. L. MAGUN,T. H. DINH,J. A. PEARSON,S. L. Y. CHEN & B. E. MAGUN (1997):

Ribotoxic stress response: Activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA

Mol Cell Biol.17, 3373-3381

ISLAM, Z.,J. S. GRAY & J. J. PESTKA (2006):

p38 mitogen-activated protein kinase mediates IL-8 induction by the ribotoxin deoxynivalenol in human monocytes

Toxicol Appl Pharmacol.213, 235-244

ISLAM, Z.,C. C. HEGG,H. K. BAE & J. J. PESTKA (2008):

Satratoxin G-induced apoptosis in PC-12 neuronal cells is mediated by PKR and caspase independent

Toxicol Sci.105, 142-52

ISLAM, Z.,L. E. KING,P. J. FRAKER & J. J. PESTKA (2003):

Differential induction of glucocorticoid-dependent apoptosis in murine lymphoid subpopulations in vivo following coexposure to lipopolysaccharide and vomitoxin (deoxynivalenol)

Toxicol Appl Pharmacol.187, 69-79

JECFA: JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (2001):

Fiftysixth meeting

WHO Food Additives Series No 47

<http://www.who.int/pcs/jecfa/summaries.htm>

JOHANNING, E.,R. BIAGINI,D. HULL,P. MOREY,B. JARVIS & P. LANDSBERGIS (1996):

Health and immunology study following exposure to toxigenic fungi (*Stachybotrys chartarum*) in a water-damaged office environment

Int Arch Occup Environ Health.68, 207-18

JOHANNING, E.,M. GAREIS,S. YANG,E.-L. HINTIKKA,M. NIKULIN,B. JARVIS & R. DIETRICH (1998):

Toxicity screening of materials from buildings with fungal indoor air quality problems ( *Stachybotrys chartarum* )

Mycotoxin Research.14, 60-73

JOHANNING, E.,P. LANDSBERGIS,M. GAREIS,C. S. YANG & E. OLMSTED (1999):

Clinical experience and results of a Sentinel Health Investigation related to indoor fungal exposure

Environ Health Perspect.107 Suppl 3, 489-94

KINSER, S., Q. S. JIA, M. X. LI, A. LAUGHTER, P. D. CORNWELL, J. C. CORTON & J. J. PESTKA (2004):

Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: Immediate early genes as primary targets  
*Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*.67, 1423-1441

KINSER, S., M. X. LI, Q. S. JIA & J. J. PESTKA (2005):

Truncated deoxynivalenol-induced splenic immediate early gene response in mice consuming (n-3) polyunsaturated fatty acids  
*J Nutr Biochem*.16, 88-95

KÖNIGS, M., M. LENCZYK, G. SCHWERDT, H. HOLZINGER, M. GEKLE & H. U. HUMPF (2007):

Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture  
*Toxicology*.240, 48-59

KÖNIGS, M., D. MULAC, G. SCHWERDT, M. GEKLE & H.-U. HUMPF (2009):

Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture  
*Toxicology*.258, 106-115

KÖNIGS, M., G. SCHWERDT, M. GEKLE & H. U. HUMPF (2008):

Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes  
*Mol Nutr Food Res*.52, 830-839

KRENS, S. F., H. P. SPAINK & B. E. SNAAR-JAGALSKA (2006):

Functions of the MAPK family in vertebrate-development  
*FEBS Lett*.580, 4984-90

LAUREN, D. R. & W. A. SMITH (2001):

Stability of the fusarium mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone in ground maize under typical cooking environments  
*Food Addit Contam*.18, 1011-6

LI, S. G., Y. L. OUYANG, G. H. YANG & J. J. PESTKA (2000):

Modulation of transcription factor AP-1 activity in murine EL-4 thymoma cells by vomitoxin (deoxynivalenol)  
*Toxicol Appl Pharmacol*.163, 17-25

LU, D., J. CHEN & T. HAI (2007):

The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases  
*Biochem J*.401, 559-567

MARESCA, M.,N. YAHI,L. YOUNES-SAKR,M. BOYRON,B. CAPORICCIO & J. FANTINI (2008):

Both direct and indirect effects account for the pro-inflammatory activity of enteropathogenic mycotoxins on the human intestinal epithelium: stimulation of interleukin-8 secretion, potentiation of interleukin-1beta effect and increase in the transepithelial passage of commensal bacteria

Toxicol Appl Pharmacol.228, 84-92

MAYER, A. K.,H. BARTZ,F. FEY,L. M. SCHMIDT & A. H. DALPKE (2008):

Airway epithelial cells modify immune responses by inducing an anti-inflammatory microenvironment

Eur J Immunol.38, 1689-99

MCKEAN, C.,L. TANG,M. BILLAM,M. TANG,C. W. THEODORAKIS,R. J. KENDALL & J. S. WANG (2006):

Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B1 and T-2 toxin in animals and immortalized human cell lines

J Appl Toxicol.26, 139-47

MIROCHA, C. J. & S. PATHRE (1973):

Identification of the toxic principle in a sample of poaeufusarin

Appl Microbiol.26, 719-24

MOHN, K. L.,T. M. LAZ,A. E. MELBY & R. TAUB (1990):

Immediate-early gene-expression differs between regenerating liver, insulin-stimulated H-35 cells, and mitogen-stimulated BALB/C 3T3 cells-liver-specific induction-patterns of gene-33, phosphoenolpyruvate carboxykinase, and the JUN, FOS, and EGR families.

J Biol Chem.265, 21914-21921

MOON, Y. & J. J. PESTKA (2003):

Cyclooxygenase-2 mediates interleukin-6 upregulation by vomitoxin (deoxynivalenol) in vitro and in vivo

Toxicol Appl Pharmacol.187, 80-8

MOON, Y., H. YANG & S. H. LEE (2007):

Modulation of early growth response gene I and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells

Biochem Biophys Res Commun.362, 256-262

MOON, Y., H. YANG & S. PARK (2008):

Hypo-responsiveness of interleukin-8 production in human embryonic epithelial intestine 407 cells independent of NF- $\kappa$ B pathway: New lessons from endotoxin and ribotoxic deoxynivalenol

Toxicol Appl Pharmacol. 231, 94–102

MORAVEK, M.,R. DIETRICH,C. BUERK,V. BROUSSOLLE,M. H. GUINEBRETIERE,P. E. GRANUM,C. NGUYEN-THE & E. MARTLBAUER (2006):

Determination of the toxic potential of Bacillus cereus isolates by quantitative enterotoxin analyses

FEMS Microbiol Lett.257, 293-8



- NASRI, T., R. R. BOSCH, S. VOORDE & J. FINK-GREMMELS (2006):  
Differential induction of apoptosis by type A and B trichothecenes in Jurkat T-lymphocytes  
*Toxicol in Vitro*.20, 832-40
- NIELSEN, C., H. LIPPKE, A. DIDIER, R. DIETRICH & E. MÄRTLBAUER (2009):  
Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells  
*Mol Nutr Food Res*, in press
- OH, G. S., K. H. HONG, H. OH, H. O. PAE, I. K. KIM, N. Y. KIM, T. O. KWON, M. K. SHIN  
& H. T. CHUNG (2001):  
4-Acetyl-12,13-epoxyl-9-trichothecene-3,15-diol isolated from the fruiting bodies of  
*Isaria japonica* Yasuda induces apoptosis of human leukemia cells (HL-60)  
*Biol Pharm Bull*.24, 785-9
- OLIFSON, L. E. (1972):  
To the question of toxic steroids by microscopic fungi, *Fusarium Sporotrichiella* Bilai  
Proceedings of the symposium on mycotoxins, p. 17, Academy of Sciences of Ukrainian S. S.  
R. Kiev, Oct. 3 – 9  
Zitiert nach:  
MIROCHA, C. J. und S. PATHRE (1973):  
Identification of the Toxic Principle in a Sample of Poaeufusarin  
*Appl. Microbiol.* 26, 719 – 724
- PESTKA, J. & H. R. ZHOU (2006):  
Toll-like receptor priming sensitizes macrophages to proinflammatory cytokine gene  
induction by deoxynivalenol and other toxicants  
*Toxicol Sci*.92, 445-55
- PESTKA, J. J. (2007):  
Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks  
*Animal Feed Science and Technology*.137, 283-298
- PESTKA, J. J. (2008):  
Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis  
*Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*.25, 1128-40
- PESTKA, J. J. & A. T. SMOLINSKI (2005):  
Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans  
*Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews*.8, 39-69
- PESTKA, J. J., R. L. UZARSKI & Z. ISLAM (2005):  
Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by  
deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-  
ketotrichothecenes  
*Toxicology*.206, 207-219
- PESTKA, J. J. & H. ZHOU (2003):  
HCK- and PKR-dependent mitogen-activated protein kinase phosphorylation and AP-1,  
C/EBP and NF-KAPPAB activation precede deoxynivalenol-induced TNF-alpha and MIP-2  
expression  
*Toxicol Sci*.72, 121-121

- PESTKA, J. J., H. R. ZHOU, Y. MOON & Y. J. CHUNG (2004):  
Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox  
*Toxicol Lett.* 153, 61-73
- PINTON, P., F. ACCENSI, E. BEAUCHAMP, A. M. COSSALTER, P. CALLU, F. GROSJEAN & I. P. OSWALD (2008):  
Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses  
*Toxicol Lett.* 177, 215-22
- PRELUSKY, D. B. (1996):  
A study on the effect of deoxynivalenol on serotonin receptor binding in pig brain membranes  
*J Environ Sci Health B.* 31, 1103-17
- PRELUSKY, D. B., K. E. HARTIN, H. L. TRENHOLM & J. D. MILLER (1988):  
Pharmacokinetic fate of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol in swine  
*Fundam Appl Toxicol.* 10, 276-86
- PRELUSKY, D. B., H. L. TRENHOLM, G. A. LAWRENCE & P. M. SCOTT (1984):  
Nontransmission of deoxynivalenol (vomitoxin) to milk following oral administration to dairy cows  
*J Environ Sci Health B.* 19, 593-609
- RAZZAZI-FAZELI, E., J. BOHM, K. JARUKAMJORN & J. ZENTEK (2003):  
Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 796, 21-33
- ROCHA, O., K. ANSARI & F. M. DOOHAN (2005):  
Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review  
*Food Additives and Contaminants.* 22, 369-378
- ROTTER, B. A., D. B. PRELUSKY & J. J. PESTKA (1996):  
Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)  
*J Toxicol Environ Health.* 48, 1-34
- SAHU, S. C., L. GARTHOFF, R. ROBL, S. CHIRTEL, D. RUGGLES, T. FLYNN & T. SOBOTKA (2008):  
Rat liver clone-9 cells in culture as a model for screening hepatotoxic potential of food-related products: hepatotoxicity of deoxynivalenol  
*J Appl Toxicol.* 28, 765-772
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF) (1999):  
Opinion on *Fusarium* toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), expressed on 2 December 1999  
[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf)

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF)  
(2001):  
Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins  
Part 5: T-2 Toxin and HT-2 Toxin, 30. May 2001  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out88_en.pdf)

SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD OF THE EUROPEAN COMMISSION (SCF)  
(2002):  
Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* toxins.  
Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, 27.  
February 2002  
[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf)

SCOOP (2003):  
(Scientific Cooperation)  
Report of experts participating in Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium*  
toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States  
<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

SERGEANT, T.,M. PARYS,S. GARSOU,L. PUSSEMIER,Y. J. SCHNEIDER & Y.  
LARONDELLE (2006):  
Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular  
metabolism at realistic intestinal concentrations  
Toxicol Lett.164, 167-176

SHIFRIN, V. I. & P. ANDERSON (1999):  
Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal  
kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis  
J Biol Chem.274, 13985-13992

SHVARTSMAN, S. Y.,M. COPPEY & A. M. BEREZHKOVSII (2009):  
MAPK signaling in equations and embryos  
Fly.3, 62-67

SORENSEN, W. G.,D. G. FRAZER,B. B. JARVIS,J. SIMPSON & V. A. ROBINSON  
(1987):  
Trichothecene mycotoxins in aerosolized conidia of *Stachybotrys atra*  
Appl Environ Microbiol.53, 1370-5

SPINDELBOCK, B. U. (2004):  
Untersuchung zum Vorkommen und zur Häufigkeit von Deoxynivalenol in Lebensmitteln  
Diss. vet. med., München

SUDAKIN, D. L. (2003):  
Trichothecenes in the environment: relevance to human health  
Toxicol Lett.143, 97-107

TAMURA, K.,B. Y. HUA,S. ADACHI,I. GUNEY,J. KAWAUCHI,M. MORIOKA,M. TAMAMORI-ADACHI,Y. TANAKA,Y. NAKABEPPU,M. SUNAMORI,J. M. SEDIVY & S. KITAJIMA (2005):

Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation  
EMBO J.24, 2590-2601

TIEMANN, U.,K. P. BRUSSOW,U. KUCHENMEISTER,L. JONAS,P. KOHLSCHEIN,R. POHLAND & S. DANICKE (2006):

Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two Fusarium toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts  
Food Chem Toxicol.44, 1228-1235

TIEMANN, U.,K. P. BRUSSOW,U. MUCHENMEISTER,L. JONAS,R. POHLAND,A. REISCHAUER,K. JAGER & S. DANICKE (2008):

Changes in the spleen and liver of pregnant sows and full-term piglets after feeding diets naturally contaminated with deoxynivalenol and zearalenone  
Veterinary Journal.176, 188-196

TURNER, P. C.,J. A. ROTHWELL,K. L. M. WHITE,Y. GONG,J. E. CADE & C. P. WILD (2008):

Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom  
Environ Health Perspect.116, 21-25

UENO, Y. (1977):

MODE OF ACTION OF TRICHOTHECENES

Annales De La Nutrition Et De L Alimentation.31, 885-900

UENO, Y. (1985):

THE TOXICOLOGY OF MYCOTOXINS

Crc Critical Reviews in Toxicology.14, 99-132

UENO, Y. (1985):

The toxicology of mycotoxins

Crit Rev Toxicol.14, 99-132

VALENTA, H.,S. DÄNICKE & S. DÖLL (2003):

Analysis of deoxynivalenol and de-epoxy-deoxynivalenol in animal tissues by liquid chromatography after clean-up with an immunoaffinity column  
Mycotoxin Research.19, 51-55

VAN DE WALLE, J.,B. ROMIER,Y. LARONDELLE & Y. J. SCHNEIDER (2008):

Influence of deoxynivalenol on NF-kappaB activation and IL-8 secretion in human intestinal Caco-2 cells  
Toxicol Lett.177, 205-14

VESONDER, R. F.,A. CIEGLER & A. H. JENSEN (1973):

Isolation of the emetic principle from Fusarium-infected corn  
Appl Microbiol.26, 1008-10

WONG, S. S., H. R. ZHOU & J. J. PESTKA (2002):  
Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-kappa B, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells  
*Journal of Toxicology and Environmental Health-Part A*.65, 1161-1180

YAGEN, B. & M. BIALER (1993):  
Metabolism and pharmacokinetics of T-2 toxin and related trichothecenes  
*Drug Metab Rev*.25, 281-323

YOSHIZAWA, T. & N. MOROOKA (1975):  
Biological modification of trichothecene mycotoxins - acetylation and deacetylation of deoxynivalenol by *Fusarium*  
*Applied Microbiology*.29, 54-58

YOSHIZAWA, T. & N. MOROOKA (1974):  
Studies on the toxic substances in the infected cereals part 3 acute toxicities of new trichothecene mycotoxins deoxynivalenol and monoacetate  
*Journal of the Food Hygienic Society of Japan*.15, 261-269

ZHOU, H. & J. J. PESTKA (2003):  
Deoxynivalenol-induced apoptosis mediated by p38 mapk-dependent p53 gene induction in raw 264.7 macrophages  
*Toxicol Sci*.72, 330-330

ZHOU, H. R., Z. ISLAM & J. J. PESTKA (2003):  
Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin  
*Toxicol Sci*.72, 130-142

ZHOU, H. R., Q. S. JIA & J. J. PESTKA (2005):  
Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the Src family kinase Hck  
*Toxicol Sci*.85, 916-926

ZHOU, H. R., A. S. LAU & J. J. PESTKA (2003):  
Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response  
*Toxicol Sci*.74, 335-344

## DANKSAGUNG

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Professor Dr. Dr. E. Märtlbauer für die Überlassung des Themas und die stets freundliche und großzügige Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. R. Dietrich für die zahlreichen Anregungen, die allzeit freundliche Hilfsbereitschaft und hervorragende Betreuung.

Weiterhin möchte ich mich besonders bei Frau Brunhilde Minich und Christine Ehlich für die ausgezeichnete technische Unterstützung, das ausgezeichnete Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Für finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs und des Stipendiums der Gesellschaft für Mykotoxinforschung sei der Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) und der Brigitte und Wolfram Gedeck-Stiftung gedankt.

Zuletzt möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und all denen, die mich in dieser Zeit unterstützt haben, ganz herzlich danken.