

# MODULATION DES INTRAZELLULÄREN REDOX-STATUS DURCH DIE MYKOTOXINE ALTERNARIOL UND ALTERNARIOLMONO-METHYLETHER IN HUMANEN KARZINOMZELLEN

Simone Bächler<sup>a</sup>, Markus Fehr<sup>b</sup>, und Doris Marko<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Wien, 1090 Wien, Österreich

<sup>b</sup>Institut für Angewandte Biowissenschaften, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), 76128 Karlsruhe, Deutschland

Schimmelpilze der Gattung *Alternaria* gehören zu den weit verbreiteten Schwärzepilzen (*Dematiaceae*) aus der Klasse der Deuteromyceten. Derzeit sind 40 - 100 verschiedene Arten von *Alternaria* bekannt, von denen der Stamm *Alternaria alternata* am häufigsten auftritt. Die einzelnen *Alternaria*-Arten zeigen große Unterschiede in dem von ihnen gebildeten Toxinmuster, wobei bislang insgesamt ca. 30 *Alternaria*-Toxine bekannt sind [1]. Die Mykotoxine Alternariol (AOH) und Alternariolmonomethylether (AME) zählen hierbei zu den Hauptmetaboliten von *Alternaria*.

Aufgrund ihrer ubiquitären Verbreitung spielen *Alternaria*-Toxine als Lebensmittel- bzw. Futtermittelkontaminanten eine wichtige Rolle und stellen daher eine nicht zu vernachlässigende Gefahr für die menschliche Gesundheit dar. So wird ein vermehrter Schimmelpilzbefall von Getreide mit *Alternaria*. in nördlichen Regionen Chinas in Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz an Ösophaguskrebs gebracht [2]. AOH und AME zeigen *in vitro* genotoxische und mutagene Eigenschaften [3, 4]. Wir konnten bereits zeigen, dass AOH als Topoisomerasegift wirkt und dabei eine Präferenz zur II $\alpha$ -Isoform aufweist, was zu den genotoxischen Eigenschaften von AOH beitragen könnte [4].

Im oxidativen Stoffwechsel eukaryontischer Zellen entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wobei die Generierung von ROS im Gleichgewicht mit einem antioxidativen Abwehrsystem steht. Kommt es durch endogene oder exogene Faktoren zu einem Übergewicht an prooxidativen Prozessen, können diese in der Folge zur Schädigung von Proteinen, Membranlipiden sowie der DNA führen [5]. Teil des zellulären

Abwehrsystems sind die Phase II-Enzyme, welche ROS und elektrophile Metabolite detoxifizieren können [6] und die unter physiologischen Bedingungen in geringem Maße konstitutiv exprimiert werden. Ihre Genexpression ist durch Verbindungen induzierbar, die in der Lage sind ROS zu generieren [7].

Ein zentraler Faktor bei der Induktion dieser Enzyme ist der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor erythroid 2p45 (NF-E2) - related factor 2*“ (Nrf2). Unter physiologischen Bedingungen wird Nrf2 durch Keap1 im Zytoplasma gehalten und in seiner Aktivität inhibiert. Eine Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehaltes kann die Dissoziation des Transkriptionsfaktors Nrf2 von seinem zytosolischen Bindungspartner Keap1 bewirken, wodurch das Nrf2-Protein in den Zellkern translozieren kann. Nach Ausbildung eines Heterodimers mit weiteren Transkriptionsfaktoren kann dieses an das antioxidativ responsive Element (antioxidant response element; ARE) binden, wodurch die Gentranskription von detoxifizierenden Phase II-Enzymen induziert wird [8, 9]. Durch eine Aktivierung des Nrf2-ARE-Signalweges kann daher auf eine mögliche Generierung von oxidativem Stress zurückgeschlossen werden.

Weiterhin spielt das Tripeptid Glutathion (GSH) eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung eines intakten, zellulären Redoxsystems [10]. GSH ist maßgeblich an intrazellulären Entgiftungsprozessen beteiligt und kann aufgrund seiner Nukleophilie spontan mit einer Reihe von schädlichen Elektrophilen reagieren. Daneben katalysieren GSH-S-Transferasen, die zu den sogenannten Phase-II-Entgiftungsenzymen zählen, die Übertragung von nukleophilem GSH auf elektrophile Metabolite [11]. Durch die Einwirkung von ROS kann es in der Folge zu einem Absinken des intrazellulären GSH-Spiegels kommen, wodurch die antioxidative Kapazität der Zelle sinkt und die Wahrscheinlichkeit der Zellschädigung durch Elektrophile zunimmt. Eine Änderung des GSH-Spiegels in der Zelle kann daher auf eine mögliche Einwirkung von ROS oder elektrophile Noxen zurückgeführt werden [12].

Im Fokus unserer Untersuchungen stand die Frage, ob die beiden Mykotoxine AOH und AME in der Lage sind oxidativen Stress in der Zelle auszulösen, was möglicherweise neben der Topoisomerasegiftung zur Genotoxizität dieser Mykotoxine beiträgt.

Hierzu wurde der intrazelluläre Gehalt an ROS nach Behandlung mit den Mykotoxinen mittels Dichlorofluorescein Assay in menschlichen Kolonkarzinomzellen untersucht.

Zusätzlich wurde eine mit oxidativem Stress verbundene Aktivierung des Nrf2-Signalweges mithilfe der Western Blot Analyse untersucht. Der GSH-Gehalt wurde nach der Methode von Tietze [13] bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass die Mykotoxine AOH und AME zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung des intrazellulären ROS-Gehaltes in menschlichen Kolonkarzinomzellen führen. Weiterhin wurde der Nrf2-ARE-Signalweg in Form einer Kerntranslokation von Nrf2 durch die beiden Mykotoxine aktiviert. Nach einstündiger Inkubation mit den *Alternaria*-Toxinen konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme des Kerngehaltes an Nrf2 beobachtet werden, wobei der Nrf2-Gehalt im Kern bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen ( $\geq 0,1 \mu\text{M}$ ) signifikant erhöht war. Nach dreistündiger Inkubation ließ sich ebenfalls eine Zunahme des Nrf2-Gehaltes im Zellkern im gleichen Konzentrationsbereich beobachten, jedoch scheint die Translokation nach dreistündiger Inkubation bereits rückläufig, was für ein schnelles Anschalten des Phase II-Metabolismus spricht. Nach 20 minütiger Inkubation konnte für die beiden *Alternaria*-Toxine noch keine Erhöhung des Nrf2-Gehaltes im Zellkern beobachtet werden. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass AOH stärker aktivierend auf die Translokation von Nrf2 wirkt als der Monomethylether [14].

Die Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes (total GSH, tGSH) zeigte nach einstündiger Inkubationsdauer mit AOH eine Abnahme des intrazellulären tGSH-Gehaltes ab einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M}$ , wobei die Abnahme des tGSH-Gehaltes ab einer Konzentration von  $10 \mu\text{M}$  signifikant ist. Hingegen ist durch Behandlung mit AME keine Änderung des tGSH-Status erkennbar. Nach 24 h serumhaltiger Inkubation konnte keine Modulation des tGSH-Gehaltes durch AOH und AME in HT29-Zellen festgestellt werden [14]. Die Abnahme des tGSH-Gehaltes nach einer Stunde kann als zelluläre Antwort auf oxidativen Stress gesehen werden, da GSH in der Lage ist, ROS abzufangen [15]. Nach 24 h scheint der GSH-Spiegel wieder regeneriert zu sein, was durch den schnellen Turnover des Tripeptids zu erklären ist.

Da der Nrf2-Signalweg eng mit dem Redoxstatus von GSH verbunden ist und ein Zusammenspiel dieser beiden Systeme einen effektiven Schutz der Zellen vor oxidativem Stress darstellt, kann davon ausgegangen werden, dass beide Systeme als

schnelle Antwort auf den durch die Mykotoxine bedingten oxidativen Stress aktiviert werden.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die *Alternaria*-Toxine AOH und AME in menschlichen Kolonkarzinomzellen oxidativen Stress induzieren, was möglicherweise zu ihren genotoxischen Eigenschaften beiträgt. Die Erhöhung des Nrf2-Gehaltes im Zellkern lässt auf die Beteiligung des Nrf2-ARE-Signalweges hinsichtlich der Detoxifizierung dieser Mykotoxine schließen, wobei auch GSH eine maßgebliche Rolle bei der Entgiftung der *Alternaria*-Toxine zu spielen scheint.

- 
- [1] Solfrizzo M., De Girolamo A., Vitti C., Visconti A. (2004) Liquid Chromatographic Determination of *Alternaria* Toxins in Carrots. *J. AOAC Int.* 87(1), 101-106
  - [2] Liu G. T., Qian Y. Z., Zhang P., Dong Z. M., Shi Z. Y., Zhen Y. Z., Miao J. und Xu Y.M. (1991) Relationships between *Alternaria alternata* and oesophageal cancer. *IARC Sci. Publ.* (105), 258-262
  - [3] Brugger E. M., Wagner J., Schumacher D. M., Koch K., Podlech J., Metzler M. und Lehmann L. (2006) Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol. Lett.* 164(3), 221-230
  - [4] Fehr M., Pahlke G., Fritz J., Christensen M. O., Boege F., Altemöller M., Podlech J. und Marko D. (2009) Alternariol acts as a topoisomerase poison, preferentially affecting the IIalpha isoform. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 441-451
  - [5] Galli F., Piroddi M., Annetti C., Aisa C., Floridi E., Floridi A. (2005) Oxidative stress and reactive oxygen species. *Contributions to nephrology.* 149: 240-60
  - [6] Presterla T., Holzclaw W.D., Zhang Y., Talalay P. (1993) Chemical and molecular regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *PNAS.* 90: 2965-9
  - [7] Nguyen T., Sherratt P. J., Pickett C. B. (2003) Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annual review of pharmacology and toxicology.* 43: 233-60
  - [8] Toyokuni S., Akatsuka S. (2007) Pathological investigation of oxidative stress in the post-genomic era. *Pathology International.* 57(8): 461-473
  - [9] Lee J.-M., Johnson J. A. (2004) An important role of Nrf2 -ARE pathway in the cellular defense mechanism. *Journal of biochemistry and molecular biology.* 37(2): 139-43
  - [10] Meyer A. J. (2008) The integration of glutathione homeostasis and redox signaling. *J. Plant Physiol.* 165(13), 1390-1403
  - [11] Hayes J. D., Flanagan J. U. und Jowsey I. R. (2005) Glutathione transferases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 51-88
  - [12] Forman H. J., Zhang H. und Rinna A. (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 1-12

- [13] Tietze F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27(3), 502-522
- [14] Fehr M., Baechler S., Burkart J., Kropat C., Pahlke G. und Marko D. (in preparation) Induction of oxidative stress by the *Alternaria* toxins alternariol and alternariolmonomethylether.
- [15] Yuan L. und Kaplowitz N. (2009) Glutathione in liver diseases and hepatotoxicity. *Mol. Aspects Med.* 30(1-2), 29-41