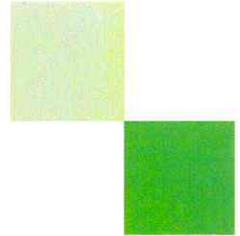




UFZ-Umweltforschungszentrum
Leipzig-Halle GmbH
in der Helmholtz-Gemeinschaft



Dissertation 04/2006

Immunmodulation durch Mykotoxine

Beate Krumm

ISSN 1860-0387

Immunmodulation durch Mykotoxine

Von der Fakultät Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie

der Universität Leipzig

genehmigte

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

von

Diplombiologin Beate Krumm
geboren am 26.03.1978 in Leipzig

Dekan:	Prof. Dr. Annette Beck-Sickinger
Gutachter:	Prof. Dr. Sunna Hausschildt
	Prof. Dr. Egon Marth
	PD Dr. Wolfram Eichler
Tag der Verteidigung:	24.02.2006

in Gedenken an meinen Vater

04.12.1940 - 30.08.2002

bibliographische Beschreibung

Krumm, Beate

Immunmodulation durch Mykotoxine

Universität Leipzig, Dissertation

S. 115, Lit: 210, Abb. 34, Tab. 6,

Referat

Durch kontaminierte Lebensmittel und Innenräume ist der Mensch mit Schimmelpilzen und daraus resultierenden gesundheitlichen Belastungen konfrontiert. Neben unspezifischen Krankheitssymptomen konnte durch epidemiologische Studien auch ein Zusammenhang zwischen Allergien und einer Schimmelpilzbelastung ermittelt werden. Die Ursachen Allergie-vermittelnder Effekte durch Schimmelpilze sind weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass Mykotoxine, sekundäre Stoffwechselmetabolite der Schimmelpilze, eine Rolle spielen. Mykotoxine besitzen immunsuppressive Effekte und könnten über adjuvante Effekte die Immunregulation beeinflussen, so dass ein erhöhtes Risiko für allergische Reaktionen besteht. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss ausgewählter Mykotoxine auf die Sekretion Th1 und Th2 relevanter Zytokine und auf intrazelluläre Signalwege (STAT1, STAT6 und $I\kappa B\alpha$) humaner PBMC zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Mykotoxine Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin die Zytokinsekretion stärker beeinflussen als die Vitalität der Zellen. Unter Einfluss von Patulin und Gliotoxin konnte eine Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2-Dominanz beobachtet werden. Von diesen beiden Mykotoxinen könnte daher ein Allergierisiko ausgehen. Zusätzlich wurde für Patulin gefunden, dass es die Promotorregion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 direkt stimuliert, was mit einer weiteren Verstärkung des Th2-Signals einhergeht. Unter Einfluss von Gliotoxin konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität der IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Promotoren sowie des NF κ B-Weges festgestellt werden. Alle untersuchten Mykotoxine führten zu einer Unterdrückung der STAT1-Aktivierung. Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT6 wurde nur durch Gliotoxin, Citrinin und T-2 Toxin vermindert. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich schwache Effekte z.B. auf die IFN- γ -Sekretion addieren können, wenn mehrere Mykotoxine gleichzeitig appliziert werden.

Die vorliegende Dissertation wurde im Zeitraum von September 2002 bis zum September 2005 am Department Umweltimmunologie des Umweltforschungszentrums Leipzig-Halle GmbH unter Leitung von Frau Dr. Irina Lehmann in Zusammenarbeit mit dem Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmakologie für Naturwissenschaftler, Fakultät für Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie der Universität Leipzig unter der Leitung von Frau Professor Dr. sc. nat., habil. Karen Nieber angefertigt.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xiv
Tabellenverzeichnis	xv
Verzeichnis der Abkürzungen	xvii
1 Einleitung	1
1.1 Schimmelpilze und Mykotoxine	2
1.2 Allergien	5
1.3 Zytokine und Immunregulation	6
1.4 Intrazelluläre Signalwege	10
1.5 Mischexposition und gesundheitliche Relevanz	12
1.6 Aufgabenstellung	14
2 Methoden	17
2.1 Zellkulturarbeiten	17
2.1.1 Kultivierung der Zelllinie Jurkat	17
2.1.2 Präparation mononukleärer Zellen	18
2.2 Kultivierung und Stimulation von peripheren Blutzellen	18
2.2.1 Mykotoxinexposition polyklonal stimulierter humaner PBMC	18
2.2.2 Kultivierung peripherer Blutzellen bei polyklonaler Stimula- tion für mRNA-Präparation	19
2.2.3 Kombinationseffekte der Mykotoxine auf polyklonal stimulier- te humane PBMC	20

2.3	MTT-Test	20
2.4	Nachweis der mRNA Expression von Zytokinen mittels real time PCR	21
2.4.1	mRNA-Präparation	21
2.4.2	cDNA-Synthese	22
2.4.3	Real-time PCR	23
2.5	Bestimmung der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand mittels ELISA	25
2.6	Untersuchungen zur Genaktivierung und Signaltransduktion	26
2.6.1	Transiente Transfektion	26
2.6.2	Einfluss der Mykotoxine auf die Aktivierung von Promotern	27
2.6.3	Einfluss der Mykotoxine auf Signalproteine	27
2.6.4	Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung	28
2.6.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.6.6	Western Blotting	30
2.7	Statistische Auswertung der Meßwerte	31
3	Ergebnisse	33
3.1	Immunmodulatorische Effekte durch Mykotoxine auf polyklonal sti- mulierte PBMC	33
3.1.1	Beeinflussung der Vitalität	33
3.1.2	Beeinflussung der Zytokinsekretion	36
3.2	Vergleich der Beeinflussung der Zytokinexpression auf mRNA- und Protein-Ebene	44
3.3	Beeinflussung der Aktivität von Promotoren	49
3.4	Beeinflussung der Signaltransduktion	51
3.5	Kombinationseffekte der Mykotoxine	57
4	Diskussion	65
4.1	Toxische Effekte von Mykotoxinen	66
4.2	Einfluss der Mykotoxine auf immunkompetente Zellen	68
4.3	Kombinationseffekte	87

Zusammenfassung	91
Literaturverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

1.1	Untereinheiten regulatorischer Zellen in Allergie und Asthma	9
3.1	Einfluss der Mykotoxine auf die Vitalität	34
3.2	Einfluss von Patulin auf die Zytokinsekretion	36
3.3	differenter Einfluss von Patulin auf die Zytokinsekretion	37
3.4	Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion	38
3.5	differenter Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion	39
3.6	Einfluss von Ochratoxin A auf die Zytokinsekretion	40
3.7	Einfluss von Citrinin auf die Zytokinsekretion	41
3.8	differenter Einfluss von Citrinin auf die Zytokinsekretion	42
3.9	Einfluss von T-2 Toxin auf die Zytokinsekretion	43
3.10	Einfluss von Patulin auf mRNA-Expression	45
3.11	Vergleich des Einflusses von Patulin auf die Zytokinexpression auf Protein- und mRNA-Ebene	46
3.12	Einfluss von Patulin auf mRNA-Expression	47
3.13	Vergleich des Einflusses von Gliotoxin auf die Zytokinexpression auf Protein- und mRNA-Ebene	48
3.14	Einfluss von Patulin auf Aktivität von Promotoren	49
3.15	Einfluss von Gliotoxin auf Aktivität von Promotoren	50
3.16	Einfluss von Patulin auf Signalproteine	51
3.17	Einfluss von Patulin auf Signalproteine	52
3.18	Einfluss von Gliotoxin auf Signalproteine	53

3.19 Einfluss von Gliotoxin auf Signalproteine	53
3.20 Einfluss von Ochratoxin A auf Signalproteine	54
3.21 Einfluss von Citrinin auf Signalproteine	55
3.22 Einfluss von T-2 Toxin auf Signalproteine	56
3.23 Kombinationseffekt der Gliotoxin-Citrinin-Mischung	58
3.24 Kombinationseffekt der Patulin-Gliotoxin-Mischung	59
3.25 Einfluss der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Mischung auf die Zytokinsekretion	60
3.26 Differenter Einfluss der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Mischung auf die Zytokinsekretion	61
3.27 Kombinationseffekt der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Mischung	62
3.28 Kombinationseffekt der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Citrinin-Mischung	63
4.1 Struktur von Gliotoxin	75
4.2 Struktur von Patulin	79
4.3 Struktur von Ochratoxin A	81
4.4 Struktur von Citrinin	84
4.5 Struktur von T-2 Toxin	87

Tabellenverzeichnis

1.1	Mathematische Formulierung von Vorhersagekonzepten für die Toxizität von Gemischen	13
2.1	Angabe der Reagenzien für die verschiedenen PCR-Ansätze	23
2.2	Amplifikationsprotokolle	24
2.3	eingesetzte Konzentrationen der Mykotoxine	28
3.1	Angabe der IC_{50} -Werte	35
3.2	Angabe der IC_{50} -Werte für den Einfluss der Mykotoxine auf die Zytokinsekretion anti-CD3/anti-CD28-stimulierter PBMC.	44

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
Abb	Abbildung
AHR	<i>airway hyperreactivity</i>
AK	Antikörper
APZ	antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Klassifizierung von Oberflächen-Antigenen)
cDNA	Komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
CTLA-4	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i>
d	Tag
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylen Pyrokarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Dominant Negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-Immunoassay)
ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Proteinkinasen
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GAS	<i>interferon-gamma activated site</i>
h	Stunde
hOAT4	humaner organischer Aniontransporter 4
IC	inhibition concentration
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IL	Interleukin
JAK	Janus-Tyrosinkinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KA	Konzentrationsadditivität
kDa	Kilodalton
LARS	Leipziger-Allergie-Risikokinder-Studie
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molarität
mA	Milliamper
mAK	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mU	Milliunit
mV	Millivolt
NF κ B	Nukleärer Faktor- κ aktivierter B-Zellen
ng	Nanogramm
NK	Natürliche Killer (-Zellen)
NKT	natürliche Killer T(-Zellen)
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NTP	Nukleinsäuretriphosphat
OD	optische Dichte
OTA	Ochratoxin A
PAGE	Polyakrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Zellen im Blut)
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pg	Pikogramm
PHA	Phytohämagglutinin
Phe	Phenylalanin
PMA	phorbol myristate acetate (Phorbolmyristatacetat)
POD	Peroxidase
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)

RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SBS	<i>sick building syndrome</i>
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl acid</i>)
STAT	Signaltransduktionsprotein (<i>signal transducer and activator of transcription</i>)
Tab	Tabelle
T-bet	T-Box exprimiert in T-Zellen
TGF	<i>tumor growth factor</i> (Tumorstromungsfaktor)
Th	T-Helfer (-Zellen)
TLR	<i>toll like receptor</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tr	regulatorische T-Zellen
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Umdrehungen
u.a.	unter anderem
UW	unabhangige Wirkung
z. B.	zum Beispiel

Kapitel 1

Einleitung

Industrie, Verkehr, Intensivierung der Landwirtschaft, aber auch das Konsumverhalten des Einzelnen haben insbesondere in letzten 50 Jahren zu Veränderungen unserer natürlichen Umwelt geführt. Diese Verunreinigungen gefährden die Existenzgrundlage vieler Lebewesen, aber auch des Menschen selbst. Seit langem ist bekannt, dass Umweltfaktoren verschiedene Erkrankungen auslösen können. Die Belastung der Atemluft mit anthropogenen Schadstoffen kann die Entwicklung von Atemwegserkrankungen fördern und deren Verlauf ungünstig beeinflussen. So kann der lungengängige Feinstaub der Luft den Gesundheitszustand von Patienten mit Atemwegserkrankungen und Herz-Kreislauf-Beschwerden verschlechtern. Herz-Kreislauf-Beschwerden gehören zu den wichtigsten Krankheitsbildern in Deutschland. Große Bedeutung kommt dabei den klassischen Risikofaktoren wie Rauchen, Fehlernährung und Bewegungsmangel zu. Aber auch verschiedene Umweltbelastungen können nach neuesten Erkenntnissen Herz-Kreislauserkrankungen auslösen. An den Feinstaubpartikeln können allerlei Schadstoffe haften, so in den Körper transportiert werden und damit entzündliche Reaktionen im Organismus fördern.

Unter dem Begriff „Umwelt“ wird gewöhnlich die äußere Umwelt, zum Beispiel die Außenluft, verstanden. Allerdings verbringen die Deutschen die meiste Zeit ihres Lebens in Innenräumen. Ein Erwachsener hält sich täglich etwa 20 Stunden in geschlossenen Räumen auf. Durch verringerte Luftwechselzahlen in den Innenräumen kommt es zu einer Anreicherung der ubiquitären Allergene (von Milben, Haustieren, Schimmel u.a.) und von anderen lufthygienisch relevanten Komponenten [Herbarth et al., 1999]. Bauliche Veränderungen verhindern eine kontinuierliche Frischluftzu-

fuhr in den Wohnräumen [Altmann-Brewe, 1997]. Die Folge sind unter anderem eine erhöhte Luftfeuchte und daraus resultierendes Pilzwachstum. Die häufigsten bei Schimmelpilzbelastung im Innenraum beschriebenen Symptome sind unspezifisch, so z. B. Bindehaut-, Hals- und Nasenreizungen sowie Husten, Kopfschmerzen oder Müdigkeit. Ein qualitativer Zusammenhang zwischen Atemwegssymptomen oder Allergien und dem Vorkommen von Feuchtigkeit oder Schimmel in der Wohnung wurde in zahlreichen epidemiologischen Studien gezeigt [Schäfer et al., 1999, Flannigan et al., 1991, Müller et al., 2002, Jovanovic et al., 2004, Gent et al., 2002, Kilpelainen et al., 2001]. Warum sich unter dem Einfluss von Schimmelpilzen Allergien entwickeln und zwar nicht nur gegen Schimmelpilzallergene, sondern auch gegen andere Allergene, wie z. B. Gräserpollen [Müller et al., 2002] ist noch nicht geklärt.

1.1 Schimmelpilze und Mykotoxine

„Schimmelpilze“ ist ein Sammelbegriff für Pilze, die typische Pilzfäden und Sporen ausbilden und dadurch makroskopisch als (oft gefärbter) Schimmelbelag sichtbar werden. Es handelt sich dabei nicht um eine systematische Einheit, sondern das Erscheinungsbild einer wissenschaftlich nicht definierbaren Gruppe [Altmann-Brewe, 1997]. Zur Vermehrung und Verbreitung bilden Schimmelpilze Sporangiosporen und Konidien (asexuell), seltener Zygosporien und Ascosporen (sexuell). Die meisten Sporen haben einen Durchmesser unter $10\ \mu\text{m}$. Sie können eingeatmet werden sowie in der Luft über weite Strecken schweben und mit dem Wind transportiert werden. Die in den Innenräumen nachgewiesenen Schimmelpilze können zwei Quellen haben. Zum einen gelangen sie über Lüftungsvorgänge aus der Aussenluft in den Innenraum oder sie stammen aus Quellen im Innenraum. Die Temperaturen für das Wachstum von Schimmelpilzen liegen in den Innenräumen meist in einem optimalen Bereich. Feuchtigkeit ist der entscheidende Faktor für eine Schimmelpilzbelastung in Innenräumen.

Eine massive Inhalation von Schimmelpilzsporen, oft in Verbindung mit organischen Stäuben kann zu akuten oder chronischen Infektionen der oberen und unteren Atemwege, Infektionen von Haut und Schleimhäuten, Allergien und toxische Wirkungen führen [Mücke and Lemmen, 1999]. Schimmelpilze scheinen auch bei

der Entwicklung des „*Sick building Syndrom*“ (SBS) eine Rolle zu spielen. Das SBS beschreibt spezifische Gesundheitsbeschwerden bei Personen, die in Gebäuden mit schlechter Innenraumluftqualität arbeiten oder leben. Symptome, die dem SBS zugeschrieben werden sind unter anderem allergische Rhinitis, Kopfschmerzen, Grippe-ähnliche Beschwerden, tränende Augen und Behinderung der Atmung. *Penicillium* und *Stachybotrys* Arten stehen stark mit SBS im Zusammenhang [Cooley et al., 1998].

Innenraumrelevante Schimmelpilze sind: *Aspergillus* und *Penicillium* Arten [Flannigan et al., 1991, Vujanovic et al., 2001, Müller et al., 2002, Jarvis and Miller, 2005]. Die Hauptquellen im Innenraum sind *Penicillium chrysogenum*, *P. brevicompactum*, *P. expansum*, *P. commune* und *Aspergillus versicolor*. Seltener kommen vor: *Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus* und *A. fumigatus* [Müller et al., 2002]. Daneben treten auch *Stachybotrys chartarum* und *Trichoderma viride* im Innenraum auf [Flannigan et al., 1991, Jarvis and Miller, 2005]. Diese für den Innenraum relevanten Schimmelpilzarten können verschiedene Mykotoxine, giftige Stoffwechselprodukte, produzieren, unter anderem Patulin, Citrinin, Ochratoxin A, Gliotoxin und T-2 Toxin [Flannigan et al., 1991, Bennett and Klich, 2003].

Mykotoxine haben als sekundäre Stoffwechselprodukte unterschiedliche chemische Strukturen und unterschiedliche Wirkungen auf den menschlichen Organismus. Beim Verzehr verschimmelter Lebensmittel sind Mykotoxine eine häufige Ursache von Lebensmittelvergiftungen. Sie können aber auch über die Raumluft verteilt, unspezifische Symptome wie Kopf- und Gliederschmerzen, Schleimhautreizungen und erhöhte Infektanfälligkeit hervorrufen.

Je nach Pilzart und Umgebungsbedingungen können Mykotoxine in sehr variablen Konzentrationen auf der Oberfläche und im Inneren von Pilzsporen vorkommen [Mücke and Lemmen, 1999]. Viele der etwa 300 bekannten Mykotoxine besitzen neben der allgemeinen Zelltoxizität eine immuntoxische, karzinogene, mutagene, teratogene, nephrotoxische und neurotoxische Wirkung [Steyn, 1995]. Bei einer niedrigen Exposition können diese Mykotoxine immunsuppressiv wirken und die Suszeptibilität für Krankheiten erhöhen [Pestka and Bondy, 1990]. Abhängig von der Dosis, der Zeit und dem Expositionsweg können sie auch immunstimulatorisch sein [Pestka and Bondy, 1990].

Das Mykotoxin Gliotoxin, produziert von *Aspergillus fumigatus*, ist vielfältig un-

tersucht. Über 90% der Aspergillosen auf *Aspergillus fumigatus* zurückzuführen, wobei vor allem das bronchopulmonale Organsystem besiedelt wird [Reiss, 1997]. Gliotoxin supprimiert Makrophagen-Funktionen, blockiert die Bildung von alloreaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (Nukleärer Faktor- κ aktivierter B-Zellen) in T- und B-Zellen [Mullbacher and Eichner, 1984, Pahl et al., 1996]. Gliotoxin induziert *in vivo* Apoptose in Thymozyten, Milzzellen und Zellen der mesenterialen Lymphknoten [Sutton et al., 1994]. Immunsuppressive Effekte wurden auch von Patulin berichtet [Escoula et al., 1988], insbesondere auf das zelluläre und humorale Immunsystem von Mäusen und Ratten. Es besitzt außerdem mutagene, karzinogene und teratogene Eigenschaften [Dickens and Jones, 1961]. Anders als Patulin besitzt Ochratoxin A neben karzinogenen und teratogenen Effekten, hauptsächlich renale und hepatotoxische Eigenschaften in Versuchstieren [Kuiper-Goodman and Scott, 1989]. Für Ochratoxin A wurde gezeigt, dass es strukturelle und funktionelle Veränderungen im Immunsystem induziert. So ist unter Einfluss von Ochratoxin A die Thymusgröße reduziert [Boorman et al., 1984], die Anzahl der Milzzellen vermindert [Gupta et al., 1983] und es findet eine Nekrose der Keimzentren in Milz und Lymphknoten statt [Kanisawa et al., 1977]. Ochratoxin A beeinflusst die Antikörperfunktion [Creppy et al., 1983], die proliferative Antwort der T-Lymphozyten auf polyklonale Stimuli [Cooray et al., 1982] und die Aktivität der natürlichen Killer (NK)-Zellen [Luster et al., 1987]. Wie Ochratoxin A besitzt auch Citrinin nephrotoxische Eigenschaften, aber auch immunotoxische Effekte wurden beschrieben. Citrinin stimuliert die Lymphozytenblastogenese in Milzzellkulturen und die Antikörperantwort steigt bei intraperitonealer Verabreichung in Mäusen an [Reddy et al., 1988]. Immunotoxische Eigenschaften sind auch von Trichothezenen bekannt. Hämatologische Störungen wie Neutropenie, Thrombopenie und aplastische Anämie wurden im Menschen gefunden. *In vitro* konnten in humanen Geweben zytotoxische Effekte von T-2 Toxin sowohl auf Vorläuferzellen von Megakaryozyten als auch auf Vorläuferzellen von roten und weißen Blutzellen gezeigt werden [Froquet et al., 2001, Rio et al., 1997].

Für die Untersuchung von Mykotoxinwirkungen fanden schon vielfältige *in vitro* Modelle Verwendung. Die Effekte von Mykotoxinen auf T- und B-Zellen wurden in einem Proliferationsassay, auf die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität und auf die NK-Zell-Aktivität von *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) unter-

sucht [Berek et al., 2001]. Die Stimulierung der PBMC erfolgte mit Phythämagglutinin (PHA) und Concanavalin A (Con A). Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Mykotoxinen wurden vier verschiedene Tests, der MTT-Test, der Neutral-Rot-Test, der Lactat-Dehydrogenase-Test und ein DNA-Assay [Papadimitriou and Lelkes, 1993] anhand von zwei verschiedenen Zelllinien verwendet [Bondy and Armstrong, 1998]. Es fanden kaum Untersuchungen zu Mykotoxineffekten auf die Zytokinproduktion statt. Anhand von PBMC von Schweinen erfolgte die Untersuchung der Wirkung von Fumonisin B1 auf die Modulierung des Zytokinprofils [Taranu et al., 2005]. In der Arbeitsgruppe Umweltimmunologie am Umweltforschungszentrum in Leipzig wurden die Mykotoxine Citrinin, Gliotoxin und Patulin auf ihre Effekte auf die Zytokinproduktion humaner T-Lymphozyten untersucht, indem PBMC mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert wurden [Wichmann et al., 2002].

Bisher fanden keine Untersuchungen zu möglichen Allergie-vermittelnden Effekten von Mykotoxinen statt. Es wurde spekuliert, dass u. a. Mykotoxine verantwortlich sind, dass sich unter dem Einfluss von Schimmelpilzen Allergien entwickeln und zwar nicht nur gegen Schimmelpilzallergene, sondern auch gegen andere Allergene, wie z. B. Gräserpollen [Müller et al., 2002]. Bisher konnte diese Hypothese jedoch nicht belegt werden.

1.2 Allergien

Unter einer allergischen Reaktion versteht man eine Hypersensibilität oder Überreaktion des Immunsystems gegen Substanzen, die von den meisten Menschen toleriert werden. Die allergischen Reaktionen werden nach Coombs und Gell in vier Typen unterteilt. Die häufigste Form ist die Immunglobulin E (IgE)-vermittelte Typ-I-Reaktion (Soforttyp), bei der Mastzellen über die allergengetriggerte Kreuzvernetzung von IgE aktiviert werden und Entzündungsmediatoren, wie z. B. Histamin, sezernieren. Seltener ist die Typ-II-Reaktion (zytotoxischer Typ), bei der sich die auslösenden Antikörper IgM oder IgG gegen ein Antigen auf der Zelloberfläche richten. Daraufhin werden das Komplementsystem oder NK-Zellen aktiviert und dadurch die Zielzellen lysiert. Bei den Typ-III-Reaktionen (Immunkomplexreaktion) lagern sich Immunkomplexe im Gewebe ab. Das Komplement wird aktiviert und polymorphe Granulozyten angelockt. Sie verursachen lokale Gewebeschäden und

Entzündungen. Relativ häufig kommen Typ-IV-Reaktionen (verzögerter Typ) vor, die nach einem wiederholten Allergenkontakt durch sensibilisierte T-Lymphozyten ausgelöst werden. Die T-Zellen sezernieren Zytokine, die Makrophagen anlocken und eine Entzündungsreaktion bewirken.

Die Entstehung einer Typ I Hypersensitivitätsreaktion gegen ein spezifisches Allergen führt zu einer Serie von Interaktionen zwischen antigen-präsentierenden Zellen (APZ), T- und B-Lymphozyten. Beim initialen Kontakt mit dem Allergen präsentieren die APZ den T-Zellen kleine Peptidfragmente in Verbindung mit dem MHC (*major histocompatibility complex*) Klasse II Molekülen. T-Lymphozyten, die einen passenden T-Zell-Rezeptor (TZR) spezifisch für das Peptid und MHC Klasse II besitzen, binden an den Peptid-MHC Komplex der APZ. Dies führt zu weiteren Interaktionen, die die Bildung eines „zweiten“ Signals, T-Zellproliferation und Zytokinsekretion nach sich ziehen. Die T-Zellen interagieren mit B-Zellen, die den passenden allergenspezifischen Rezeptor tragen, und stimulieren diese allergenspezifisches IgE zu produzieren. Die allergenspezifischen IgE binden dann an Oberflächenrezeptoren von Mastzellen, Basophilen, Makrophagen und anderen APZ. Bei erneutem Kontakt mit dem spezifischen Allergen setzen unter anderem die Mastzellen Histamin frei und es kommt zu den typischen allergischen Reaktionen. Die Symptome der Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ I äußern sich in Urtikaria und Heuschnupfen, Schwellungen der Schleimhäute und Reizungen des Bindehautgewebes.

1.3 Zytokine und Immunregulation

T-Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Anfangsphase der Sensibilisierung gegen ein Allergen. Sie können in zwei verschiedene Phänotypen unterteilt werden. Zum einen die $CD4^+$ Zellen, die mit der Erkennung von löslichen Fremdproteinen (z.B. Allergenen) assoziiert sind, und zum anderen die $CD8^+$ Zellen, die auf intrazelluläre Pathogene (z.B. Viren) reagieren. Bezogen auf ihr Zytokinsekretionsprofil werden $CD4^+$ T-Lymphozyten unterteilt in T Helfer Zellen vom Typ 0 (Th0), Th1-, Th2- und Th3-Zellen, sowie regulatorische T-Zellen (Tr). Th1-Zellen produzieren Interferon (IFN)- γ , Interleukin (IL)-2 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α und β , sind damit Effektoren der zellvermittelten Immunität und dienen der Abwehr von intrazellulären Erregern durch die Aktivierung der Makrophagen und der Zellzytotoxizität

[Romagnani, 1995, 1996a,b, 2000]. Th2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13, sind Effektoren der humoralen Immunität, hemmen die Makrophagenfunktion, rekrutieren eosinophile Granulozyten und dienen der Abwehr von extrazellulären Erregern, wie z. B. parasitären Würmern [Romagnani, 1995, 1996a,b, 2000]. Unter diesen Zytokinen sind IFN- γ und IL-4 representative Zytokine für Th1- und Th2-Zellen und werden oft als Unterscheidungsmarker benutzt.

Th1- und Th2-Zellen entwickeln sich aus einem naiven Vorläufer in Reaktion auf eine ligandeninduzierte Stimulation. Viele Faktoren regulieren die Th1- und Th2-Induktion. Einer der am besten charakterisiertesten ist die Zytokinumgebung zum Zeitpunkt der Differenzierung. IFN- γ und IL-12 sind die wichtigsten Zytokine für die Regulation der Differenzierung und Stärke der Th1-Antwort [Agnello et al., 2003]. IFN- γ wirkt auf die Th1-Polarization durch Aufregulierung der IL-12 Rezeptor β_2 -Kette auf CD4⁺ T-Lymphozyten und Erhöhung der IL-12-Produktion durch Monozyten [Armant et al., 1996]. Von anderen Zytokinen wie IL-18, Type I Interferone und IL-1 α ist bekannt, dass sie auch in der Entstehung einer Th1-Tendenz beteiligt sind [Xu et al., 2000, Rogge et al., 1998, Nguyen et al., 2002]. Das essentielle Zytokin für die Entwicklung von Th2-Zellen ist IL-4. IL-6 sorgt ebenfalls für eine Th2-Differenzierung, wahrscheinlich durch Induzierung von endogenen IL-4 und Hemmung der Th1-Immunantworten [Tanaka et al., 2001, Dodge et al., 2003]. Th1- und Th2-Zytokine beeinflussen sich gegenseitig. IL-4 induziert durch Hemmung der Expression der IL-12 Rezeptor β_2 -Kette eine Unempfindlichkeit für IL-12. Dies verursacht die Inhibierung der IFN- γ -Produktion [Nishikomori et al., 2000]. Ein antiproliferativer Effekt von IFN- γ auf Th2-Zellen aber nicht auf Th1-Zellen ist bekannt. Dies mag in Verbindung mit einer hohen Expression von IFN- γ -Rezeptoren auf Th2-Zellen und der niedrigen Expression auf Th1-Zellen stehen. IFN- γ spielt auch eine indirekte Rolle beim Wachstum von Th1-Zellen durch Induzierung der IL-12 und Runterregulierung der IL-10-Produktion von APZ. Umgekehrt besitzt IL-10 durch Hemmung der IL-12-Sekretion der APZ die Fähigkeit Th1-Differenzierung zu unterdrücken .

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Differenzierung in Th1/Th2-Zellen ist das Zusammenwirken zwischen kostimulatorischen Molekülen auf APZ und deren Liganden auf T-Zellen, wie B7/CD28 und CD40/CD40L [McAdam et al., 1998, Lenschow et al., 1996]. CD80(B7-1)/CD86(B7-2) ist das dominante kostimulatorische Signal

für die Induktion von Th2-Zytokinen, während eine Bindung über CD58 und CD40 die Zytokinproduktion nur in memory T-Zellen erhöhen kann [Ceuppens et al., 1999]. Die Interaktion von CD40/CD40L induziert die IL-12-Produktion von B-Zellen, Monozyten und dendritischen Zellen und bewirkt daher eine Th1-fördernde Umgebung [Armant et al., 1996]. Eine hohe Antigendichte oder hohe Avidität der Interaktion von T-Zellen und APZ begünstigt eine Th1-Differenzierung, wohingegen eine niedrige Antigendosis und niedrige Avidität eine Th2-Differenzierung einleitet, z.B. bei der Stimulation durch einen veränderten Peptid-Liganden oder der Präsentation von Peptiden im Kontext von MHC, der nur schwach bindet [Constant and Bottomly, 1997].

Im Netzwerk der Allergieentwicklung spielen auch dendritische Zellen (DC, *dendritic cells*) eine entscheidende Rolle. Die dendritische Zelle ist ein essentieller Faktor in der Prägung CD4⁺ T-Zellen [de Jong et al., 2005]. Die DC haben eine zentrale Rolle in der Induktion einer Th2-vermittelten allergischen Antwort. In Studien mit Allergikern und in Asthmodellen in Tieren konnte gezeigt werden, dass DC während einer Allergenreizung in die Lunge wandern und dass diese DC eine Tendenz besitzen Th2-Antworten *ex vivo* zu stimulieren verglichen mit DCs aus der Lunge von gesunden Kontrollen [Xia et al., 1995, Reider et al., 2002, Jahnsen et al., 2001]. Die Reifung und Migration der dendritischen Zellen sind wichtige Schritte in der Th2-Prägung gegen Luftallergene. Wie allerdings DC Th2-Antworten selektiv induzieren ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass wenn die Bedingungen der DC-Reifungssignale (MHC Klasse II und kostimulatorische Moleküle) vorhanden sind, eine Th2-Differenzierung dann entsteht, wenn Th1-induzierende Stimuli (IL-12-Produktion der dendritischen Zellen) fehlen. Alternativ dazu gibt eine „drittes Signal“-Hypothese, in der DC aktiv an der Th2-Differenzierung teilnehmen müssen [Kalinski et al., 1999].

Eine allergische Immunantwort beruht auf dem Vorherrschen eines Th2-Phänotypes. Bei der Aufrechterhaltung eines Th1/Th2-Gleichgewichtes spielen spezielle regulatorische T-Zellen eine entscheidende Rolle. Sind diese in ihrer Funktion eingeschränkt oder fehlen sie, kann sich das Gleichgewicht in Richtung Th2 und damit in Richtung einer allergischen Immunantwort verschieben. Es wurden vier Haupttypen der regulatorischen T-Zellen beschrieben: Th3-Zellen, Tr-Zellen, CD4⁺CD25⁺ Zellen und natürliche Killer T (NKT) Zellen (siehe 1.1).

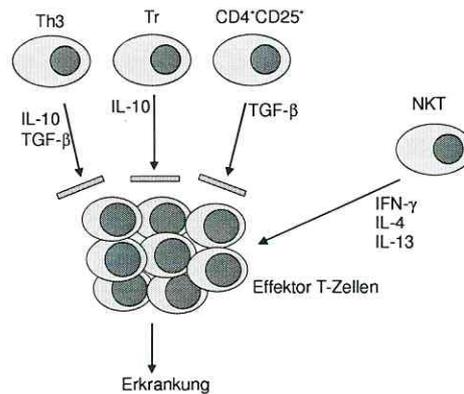


Abbildung 1.1: Untereinheiten regulatorischer Zellen in Allergie und Asthma. Es gibt vier Haupttypen der regulatorischen T-Zellen, die wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Expression von Asthma und Allergie haben. Th3, Tr und CD4⁺CD25⁺-Zellen können Effektor T-Zellen hemmen, NKT-Zellen können deren Differenzierung und Entwicklung fördern.

Th3-Zellen produzieren TGF (*tumor growth factor*)- β und IL-10 und besitzen regulatorische oder suppressive Eigenschaften [Chen et al., 1994]. Tr1-Zellen haben eine niedrige proliferative Kapazität und produzieren große Mengen an IL-10, aber wenig IL-2 und IL-4. CD4⁺CD25⁺ Zellen hemmen die Immunantworten durch direkten Zell-Zell-Kontakt über ein CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*)-Signal sowie durch die Sekretion von TGF- β [Jonuleit et al., 2002]. NKT-Zellen umfassen eine Population von T-Zellen, die Zelloberflächenmarker exprimieren, die charakteristisch sind für NK-Zellen und für konventionelle T-Zellen. Wenn diese NKT-Zellen aktiviert sind, produzieren sie rasch große Mengen an IL-4 und IFN- γ . Diese rasche Zytokinproduktion erlaubt den NKT-Zellen eine starke regulatorische Aktivität und Kontrolle in der Entwicklung von Asthma auszuüben [Akbari et al., 2003]. Ungeklärt ist welche der regulatorischen Zellen entscheidend ist bei der Kontrolle der Entwicklung von Asthma und Allergie [Herrick and Bottomly, 2003]. Es ist möglich, dass die Th3-Zellen hauptsächlich in der Regulierung von Erkrankungen des gastro-intestinalen Traktes involviert sind, während die Tr1-Zellen mehr bei den respiratorischen Erkrankungen involviert sind [Weiner, 2001]. Tr1-Zellen hemmen sowohl die Th2- als auch die Th1-Antworten [Cottrez et al., 2000], und andere regulatorische T-Zellen inhibieren die Entwicklung von Th2-Antworten und von AHR (*airway*

hyperreactivity) [Akbari et al., 2002]. CD4⁺CD25⁺ Zellen hemmen die Entwicklung von respiratorischer Eosinophilie von Mäusen [Suto et al., 2001], scheinen aber die Induktion von AHR nicht zu blocken [Hadeiba and Locksley, 2003]. Die NKT-Zellen sind dagegen wichtig für die Induktion von AHR in Mäusen [Brown et al., 1996], aber ihre Rolle bei Asthma beim Menschen ist noch nicht klar.

1.4 Bedeutung intrazellulärer Signalwege für die Th1/Th2-Differenzierung

Zytokine benutzen nach Bindung an Rezeptoren, die der Typ I und Typ II Zytokinrezeptor-Superfamilie angehören, gemeinsame Mechanismen der Signaltransduktion. Sie aktivieren Mitglieder einer Familie von zytoplasmatischen Protein-Tyrosin-Kinasen, den sogenannten Januskinasen (JAK). Diese sind mit den Zytokinrezeptoren assoziiert und werden nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor aktiviert und phosphorylieren anschliessend die Zytokinrezeptoruntereinheit. Die phosphorylierten Tyrosinreste rekrutieren Proteine mit Bausteinen, die an Phosphotyrosin binden (z.B. mit einer SH2-Domäne). Eine wichtige Familie dieser Proteine ist die STAT-Familie (*signal transducer and activators of transcription*, Signalüberträger und Aktivatoren der Transkription) der Transduktionsfaktoren. Diese Proteine binden an der phosphorylierten Rezeptoruntereinheit, werden dabei selbst phosphoryliert, dimerisieren und wandern in den Zellkern, wo sie die Genexpression regulieren. Dieser Jak-STAT-Weg ist eine einfache Signalkaskade, die die Zellmembran (Rezeptor) und den Kern (Genexpression) direkt verbindet. Es wurden 7 Mitglieder der STAT-Familie-Proteine von Säugern identifiziert und für jedes Mitglied wurde gezeigt, dass sie durch verschiedene Zytokine stimuliert werden.

Die Bindung von IL-4 an dessen Rezeptor aktiviert die IL-4 Rezeptor-assoziierte Jak-Kinasen 1 und 3 [Russell, 1998, Yin et al., 1994] und diese wiederum aktivieren durch Tyrosinphosphorylierung STAT6. Dies erlaubt STAT6 zu dimerisieren und in den Kern zu wandern, wo es an regulatorische Elemente in den Promotoren von IL-4-empfindlichen Genen binden kann [Schindler, 2002]. STAT6-spezifische DNA-Bindungsstellen wurden in den IL-4 und IL-4R-Promotoren [Kaplan et al., 1996], den CD23-Promotor [Shimoda et al., 1996] und den I ϵ -Promotor (Ig, H Ketten Keim-

bahn ϵ) [Linehan et al., 1998] gefunden. STAT6 bewirkt so die Umschaltung auf die IgE-Produktion. Die IFN- γ -Initiation der STAT1 Tyrosinphosphorylierung erfordert die Aktivität von Jak1 und Jak2 [Muller et al., 1993, Watling et al., 1993]. Nach seiner Tyrosinphosphorylierung bildet STAT1 ein Homodimer oder mit STAT2, bei einer Aktivierung durch IFN- α/β , ein Heterodimer. Danach gelangt das Dimer in den Kern, wo die spezifische Bindung an Enhancer-Elementen zu einer Genaktivierung führt [Gupta et al., 1996, Shuai et al., 1994]. STAT1-Homodimere binden an bestimmten DNA-Sequenzen, den GAS (IFN- γ aktivierte Stelle)-Elementen [Decker et al., 1997], danach werden IFN- γ -abhängige Gene induziert. Die GAS-Elemente sind in vielen IFN- γ -induzierten Genen gefunden worden.

Die NF κ B/Rel-Familie der Transkriptionsfaktoren hat eine zentrale Rolle in der Koordination der Expression einer großen Vielfalt von Genen, die die Immunantworten kontrollieren. Die NF κ B/Rel-Familie beinhaltet ein System von fünf verschiedenen DNA-Bindungs-Untereinheiten: p50, p52, p65 (RelA), c-Rel und Rel-B [Blank et al., 1992, Caamano and Hunter, 2002]. Diese können in verschiedenen Kombinationen dimerisieren. Ein Kennzeichen für die NF κ B/Rel-Familie ist ihre post-translationale Kontrolle durch spezifische inhibitorischen Untereinheiten, den I κ B (Inhibitoren von NF κ B)-Proteinen [Gilmore and Morin, 1993, Caamano and Hunter, 2002]. Nach Aktivierung durch eine große Anzahl von Stimulatoren, wie IL-1, TNF- α , Lipopolysaccharid (LPS), oxidativen Stress und virale Produkte, werden die I κ B-Proteine phosphoryliert, ubiquityliert und anschließend durch Proteasomen degradiert. Die Degradation von I κ B erlaubt den NF κ B-Proteinen in den Kern zu gelangen und sich an ihren entsprechenden DNA-Bindungsstellen anzulagern. Dies bewirkt die Transkription einer Vielzahl von Genen, wie antimikrobielle Peptide, Zytokine, Chemokine, Stress induzierte Proteine und anti-apoptotische Proteine. Es gibt sechs Arten der inhibitorischen Proteine (I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , Bcl-3, p100, p105), die mit den NF κ B/Rel-Proteinen im Zytoplasma oder im Kern assoziiert sind. Die I κ B-Interaktion schützt vor DNA-Bindung und dem Kerntransport der NF κ B/Rel-Proteine. Die Dimerkombinationen p50/p65 und p65/p65 der NF κ B/Rel-Faktoren werden schnell unter einer Anzahl von Infektionen aktiviert [Baeuerle and Henkel, 1994]. Dies erlaubt eine umgehende transkriptionelle Antwort auf virale und bakterielle Infektionen, inflammatorische Zytokine und Proliferationsstimuli. Ein I κ B-Protein, das häufig mit p50/p65 und p65/p65 Dimeren assoziiert ist, ist I κ B α [Malek

et al.]. Dieser Hemmer wird schnell abgebaut als Antwort auf diverse Stimuli [Brown et al., 1993]. Die Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ mit nachfolgendem Abbau korreliert mit der Aktivierung von $NF\kappa B$.

Die $NF\kappa B$ /Rel-Familie ist wichtig für die Vermittlung der Rezeptorsignale sowohl in der angeborenen als auch in der erworbenen Immunität. Dies zeigt sich daran, dass die $NF\kappa B$ -Proteine in der Signalkaskade der TNF-Rezeptoren, der Toll-like Rezeptoren und des TZR zwischen geschaltet sind. Die kostimulatorischen Signale des CD28 sind notwendig, um die ganze $NF\kappa B$ -Aktivierung durch die TZR-Signalkette zu übertragen [Karin and Ben-Neriah, 2000]. $NF\kappa B$ reguliert die IL-12-Expression durch APZs und ist deshalb wichtig für die Entwicklung von Th1-Zellen [Yoshimoto et al., 1997]. $NF\kappa B$ hat eine T-Zell-intrinsische Rolle in der Th1-Entwicklung, da c-Rel und RelB-defiziente T-Zellen auch Defekte haben in der IFN- γ Expression [Caamano et al., 1999].

Die $NF\kappa B$ -Aktivität ist essenziell für das Überleben und Aktivierung von Lymphozyten und für die Aufrechterhaltung der normalen Immunantwort. Die konstitutive Aktivierung des $NF\kappa B$ -Weges ist oft mit inflammatorischen Erkrankungen assoziiert, z.B. rheumatische Arthritis, Multiple Sklerosis und Asthma.

1.5 Mischexposition und gesundheitliche Relevanz

Eine Belastung mit Mykotoxinen kann sowohl über eine Schimmelpilzbelastung im Innenraum als auch über kontaminierte Nahrungsmittel verursacht werden. Mykotoxine, die in Nahrungsmitteln gefunden werden, treten meistens nicht als Einzelverbindungen auf, sondern als Mischungen von verschiedenen Mykotoxinen. Verschiedene Mykotoxine können von einer einzigen Schimmelpilzart produziert werden. Daher ist der Mensch häufig mit verschiedenen Mykotoxinen gleichzeitig konfrontiert. Über die Wirkung geringer Mengen oder einer Mischung von Mykotoxinen - vor allem bei lebenslanger Aufnahme - liegen kaum Erkenntnisse vor. Untersuchungen zu Kombinationseffekten von Mykotoxinen sind daher entscheidend. Viele Arbeiten zu einer Exposition gegenüber mehreren Mykotoxinen beschäftigen sich mit den gesundheitlichen Effekten auf Nutztiere.

Für die Vorhersage und Beurteilung von Kombinationseffekten stehen zwei Konzepte zur Verfügung, das Konzept der Konzentrationsadditivität und das der Unabhängigen Wirkung. Mit Hilfe der beiden Konzepte ist man in der Lage aus Toxizitätsdaten von Einzelstoffen Erwartungswerte für die Toxizität von Gemischen zu berechnen. Die Vorhersagbarkeit der Effekte von Stoffgemischen ist abhängig davon ob die einzelnen Mischkomponenten ähnlich oder unähnlich wirken.

Auf die Arbeiten des Pharmakologen Loewe [Loewe and Muischnek, 1926, Loewe, 1927, 1953] geht das Konzept der Konzentrationsadditivität zurück. Allgemein formuliert bezeichnet dieses Konzept das Phänomen, dass sich eine Substanz in Bezug auf den untersuchten Wirkparameter wie die Verdünnung einer anderen Substanz verhält [Grimme et al., 1998]. Konzentrationsadditivität wird für Mischungen verwendet deren Mischungskomponenten gleiche Wirkorte und Wirkweisen haben. Während das Vorhersagekonzept der Unabhängigen Wirkung für Mischungen verwendet wird deren Verbindungen unterschiedliche Wirkorte und Wirkweisen haben. Dabei wird der relative Effekt einer Substanz in Gegenwart einer zweiten nicht verändert. Das Konzept der Unabhängigen Wirkung wurde erstmals von Bliss unter dem Begriff „Independent Joint Action“ formuliert [Bliss, 1939]. Die mathematische Formulierung der Vorhersagekonzepte für die Toxizität von Gemischen ist in der Tabelle 1.1 angegeben.

Tabelle 1.1: Mathematische Formulierung von Vorhersagekonzepten für die Toxizität von Gemischen. C bezeichnet die Konzentrationen der Substanzen S1 bis Sn, E die betrachteten Effekte und ECx die Konzentrationen, die erforderlich sind, um einen bestimmten Effekt s hervorzurufen. Quelle: Grimme et al., 1998

Konzentrations-Additivität

$$\text{binäres Gemisch} \quad \frac{c_{S1}}{EC_x(S1)} + \frac{c_{S2}}{EC_x(S2)} = 1$$

$$\text{multiples Gemisch} \quad \sum_{i=1}^n \frac{c_{S_n}}{EC_x(S_n)}$$

Unabhängige Wirkung

$$\text{binäres Gemisch} \quad E(c_{S1} + c_{S2}) = E(c_{S1}) + E(c_{S2}) - E(c_{S1}) * E(c_{S2})$$

$$\text{multiples Gemisch} \quad E(c_{S1} + c_{S2} + \dots + c_{S_n}) = 1 - \prod_{i=1}^n (1 - E(c_{S_i}))$$

Die Vorhersage-Konzepte liefern Maßstäbe für die Entscheidung, ob der ge-

messene Effekt eines Stoffgemisches größer, gleich oder geringer als aufgrund der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen der einzelnen Komponenten zu erwarten wäre. Abweichungen von Erwartungswerten werden meist mit den Begriffen „Synergismus“ (größer als erwartet) und „Antagonismus“ (geringer als erwartet) charakterisiert. Der Aussagewert hängt vom eindeutigen Bezug auf ein zugrunde liegendes Beurteilungskonzept ab.

1.6 Aufgabenstellung

Es gibt einen Zusammenhang zwischen Schimmelpilzbelastung im Innenraum und Manifestation einer Allergie. Es wird vermutet, dass Mykotoxine bei diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen. Mykotoxine besitzen immunsuppressive Eigenschaften. Ungeklärt ist, ob Mykotoxine auch immunmodulatorisch wirken und ob sie die T-Zell-Funktion so verändern, dass ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung allergischer Reaktionen besteht.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche Allergie-vermittelnde Effekte von Mykotoxinen und die zugrunde liegenden Mechanismen sowie die von einem Gemisch aus verschiedenen Mykotoxinen ausgehende gesundheitliche Gefahr zu klären.

Dafür sollte untersucht werden:

- welchen Einfluss die Mykotoxine Patulin, Gliotoxin, Citrinin, Ochratoxin A und T-2 Toxin auf die Sekretion relevanter Zytokine für die Th1/Th2-Regulation haben;
- ob Mykotoxine einen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege mit Relevanz für Th1/Th2-Regulation haben;
- ob sich schwache Effekte der einzelnen Mykotoxine addieren können, wenn sie als Mischung appliziert werden.

Um diese Fragestellung zu klären, wurden humane periphere mononukleäre Blutzellen polyklonal stimuliert und die Kulturüberstände mittels ELISA auf die Sekretion Th1 und Th2 relevanter Zytokine untersucht. Die real time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) wurde eingesetzt, um die auf Proteinebene erhobenen Daten

auf mRNA-Ebene zu bestätigen. Der Reportergenassay wurde verwendet, um Effekte der Mykotoxine auf die Aktivierung von Genpromotoren zu detektieren. Der Einfluss der Mykotoxine auf intrazelluläre Signalwege wurde mit Hilfe des Western Blots untersucht.

Kapitel 2

Methoden

2.1 Zellkulturarbeiten

2.1.1 Kultivierung der Zelllinie Jurkat

Für ausgewählte Experimente zur Signaltransduktion wurde die humane akute T-Zelleukämie Zelllinie Jurkat, erhalten vom Institut Chemie und Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät der Paris-Lodron Universität Salzburg, Fachbereich molekulare Biologie, AG Allergie und Zytokine (Leiter: Prof. Dr. Albert Duschl), verwendet.

Die in Suspension wachsenden Zellen wurden in RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin) Medium unter Zugabe von 5% FKS (Biochrom AG, Berlin) bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle 2-3 Tage erfolgte die Verdünnung der Zellkultur um ca. 1:4.

Zum **Einfrieren** der Zellen wurden diese gezählt, bei 1250 U/min, 10 min zentrifugiert und mit einer Zellzahl von $5 - 7 \cdot 10^6$ /ml in kaltem Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO (Merck, Darmstadt)) eingestellt und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem in Isopropanol (Merck, Darmstadt) getauchten Behälter gestellt und bei -80°C über Nacht gekühlt. Das Isopropanol sorgt für eine gleichmäßige Abkühlung der Temperatur von 1°C pro Minute. Anschließend wurden die Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für das **Auftauen** und **Revitalisieren** wurden die Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden mit frischem

warmem Medium in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1250 U/min, 10 min und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, um Reste von DMSO zu entfernen. Anschliessend wurden die Zellen in Kultur genommen.

2.1.2 Präparation mononukleärer Zellen

Die Präparation der peripheren Blutzellen von gesunden Spendern erfolgte in der Sterilbank. Nach einer Verdünnung von 50 ml *Buffy coat* mit 50 ml PBS wurden in sterile 50 ml-Röhrchen, die bereits 12 ml Ficoll Paque (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Schweden) enthielten, vorsichtig 25 ml verdünnter *Buffy coat* überschichtet und diese nachfolgend bei 1750 U/min, 20 min und RT zentrifugiert. Der resultierende Interphasenring wurde mit einer sterilen Pasteur-Pipette abgenommen. Die PBMC wurden dann mit PBS gewaschen (Zentrifugation zweimal bei 1250 U/min, 10 min und RT). Nach Zellkernzählung mit Türk's Reagenz (Serva, Heidelberg) erfolgte ein weiterer Waschschrift. Anschließend wurden die Zellen entsprechend dem jeweiligen Versuchsansatz in Zellkulturmedium aufgenommen.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung pH 7,4 (PBS) 10fach Dulbecco	
KCl	2 g/l
KH ₂ PO ₄ (wasserfrei)	2 g/l
NaCl	80 g/l
Na ₂ HPO ₄	11,5 g/l

2.2 Kultivierung und Stimulation von peripheren Blutzellen

2.2.1 Mykotoxinexposition polyklonal stimulierter humaner PBMC

Zur Untersuchung der Mykotoxineffekte auf die Zytokinsekretion peripherer Blutzellen wurden PBMC mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 (Klon UCHT1, NatuTec, Frankfurt) und anti-CD28 (Klon CD28.2, Immunotech, Marseille) in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in der Sterilbank. Als Medium wurde RPMI 1640 versetzt mit 5% FKS verwendet. Die Ansätze erfolgten in 48-well-Kulturplatten (Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen) jeweils mit 1ml Medium und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Kavität.

Untersucht wurden Effekte der Mykotoxine Citrinin, Gliotoxin, Ochratoxin A, Patulin und T-2 Toxin (alle Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Die Mykotoxine wurden in seriellen Verdünnungen getestet beginnend ab einer Konzentration von 1000 ng/ml im Fall von Patulin und Gliotoxin, ab 4000 ng/ml bei Ochratoxin A, ab 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei Citrinin und ab 3,5 ng/ml im Fall von T-2 Toxin. Alle getesteten Mykotoxine wurden in Methanol (Merck, Darmstadt) verdünnt. Der Einsatz einer Medium-Kontrolle, die in ihrer Endkonzentration 0,05% v/v des Lösungsmittels enthielt, schloss eventuelle Wirkungen des Lösungsmittels auf die Zytokinsekretion der PBMCs aus. Die Versuche wurden in dreifach-Ansätzen durchgeführt. Nach einer 24stündigen Inkubation bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre erfolgte die Abnahme von 700 μl Kulturüberstand, nachdem die Kulturplatten bei 600 U/min für 5 min zentrifugiert wurden. Die Kulturüberstände wurden eingefroren und bis zur Messung im ELISA bei -30°C aufbewahrt.

2.2.2 Kultivierung peripherer Blutzellen bei polyklonaler Stimulation für mRNA-Präparation

Die Untersuchung des Einflusses von Mykotoxinen auf mRNA-Ebene erfolgte mit Patulin und Gliotoxin, da bei diesen Mykotoxinen unterschiedliche Effekte auf die Th1/Th2-Regulation beobachtet wurden.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in der Sterilbank. Als Medium wurde RPMI 1640 versetzt mit 5% FKS verwendet. Die Ansätze erfolgten in 48-well-Kulturplatten jeweils mit 1ml Medium und $1 \cdot 10^6$ Zellen pro Kavität.

Es wurden jene Konzentrationsbereiche untersucht, die zu einer unterschiedlichen Hemmung der IL-4, IL-13 und IFN- γ -Sekretion führten: für Patulin 125 ng/ml, 62,5 ng/ml; 31,25 ng/ml und 15,625 ng/ml; für Gliotoxin 31,25 ng/ml; 15,625 ng/ml; 7,8125 ng/ml und 3,906 ng/ml. Es wurde eine stimulierte und eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt jeweils mit einem Lösungsmittelanteil von 0,05 % v/v. Die Versuche erfolgten in dreifach-Ansätzen. Nach 24 h Inkubation bei 37°C, 5% v/v

CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre erfolgte die Abnahme von jeweils 950 µl zellfreien Kulturüberstand, nachdem die Kulturplatten bei 600 U/min für 5 min zentrifugiert worden waren. Diese wurden in Kavitäten eines Masterblocks überführt und bis zur Messung im ELISA bei -32°C aufbewahrt.

2.2.3 Kombinationseffekte der Mykotoxine auf polyklonal stimulierte humane PBMC

Zur Untersuchung von Kombinationseffekten mehrerer Mykotoxine gleichzeitig auf die Zytokinsekretion peripherer Blutzellen wurden PBMC mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 in einer Endkonzentration von 100 ng/ml stimuliert.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten in der Sterilbank. Als Medium wurde RPMI 1640 versetzt mit 5% FKS verwendet. Die Ansätze erfolgten in 48-well-Kulturplatten jeweils mit 1ml Medium und 1×10^6 Zellen pro Kavität.

Die Untersuchung der Kombinationseffekte der Mykotoxine wurde anhand der IFN- γ -Daten durchgeführt, da die Mykotoxine einen stärkeren Effekt auf die IFN- γ -Sekretion bewirkten. Die Mischungen mit zwei Mykotoxinen erfolgten mit einem festen Verhältnis der IC₅₀-Werte für IFN- γ in seriellen Verdünnungen. Dabei ergaben sich folgende Mischungsverhältnisse: 0,68 Patulin zu 0,32 Gliotoxin beginnend ab einer Konzentration von 9553 nM und 0,42 Citrinin zu 0,58 Gliotoxin ab 100 nM. Die Mischungen mit drei und vier Mykotoxinen wurden in einem festen Verhältnis der IC₂₀-Werte in anschließender serieller Verdünnung durchgeführt. Folgende Mischungsverhältnisse ergaben sich: 0,208 Patulin, 0,109 Gliotoxin zu 0,683 Ochratoxin A beginnend ab einer Konzentration von 1010 nM und 0,19037 Patulin, 0,10022 Gliotoxin, 0,63233 Ochratoxin A zu 0,07707 Citrinin ab 400 nM.

Die weitere Vorgehensweise ist im Abschnitt 2.2.1 beschrieben.

2.3 MTT-Test

Der MTT-Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen durch Messung ihrer metabolischen Aktivität. Er beruht auf einer intrazellulären Reduktion einer löslichen, gelben

Tetrazoliumverbindung zu einem unlöslichen, blauvioletten Produkt mit einem Absorptionsmaximum bei 570 nm. Die Reduktion erfolgt bei intakten Zellen durch Dehydrogenase-Enzyme. Die Menge an entstandenem, blauem Formazan-Produkt ist ein Maß für die intakte Zellfunktion und verhält sich direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Der MTT-Test wurde durchgeführt nach dem Protokoll von Mosmann (Mosmann, 1983), modifiziert durch Wichmann (Wichmann et al., 2002).

Nach dem Entnehmen von 700 μl Kulturüberstand aus jeder Kavität (wie in 2.2.1 beschrieben) wurden 10 μl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) zu jeder Kultur gegeben. Die Zellen wurden weitere 4 h bei 37°C inkubiert. Für die Farbentwicklung wurden die Kristalle durch Zusatz von je 300 μl MTT-Stopp-Lösung [10% w/v Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt) in 50 % v/v N,N'-Dimethylformamid (Serva, Heidelberg)] aufgelöst. Um eine vollständige Auflösung der Kristalle zu gewährleisten wurden die Platten kurz geschüttelt und dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Absorption wurde bei 570 nm in einem ELISA-Reader (Photometer Spectra Image; Tecan) unter Verwendung der Software *EasyWin Kinetics 32* (EasyWin-Software, Tecan, Crailsheim) gemessen.

Die Ergebnisse wurden dargestellt als Prozent der Vitalität/Proliferation bezogen auf die Kontrolle ($\% \text{ Vitalität/Proliferation} = \text{Optische Dichte (OD)-Wert Ansatz/OD-Wert Kontrolle} \times 100$).

2.4 Nachweis der mRNA Expression von Zytokinen mittels real time PCR

Bei ausgewählten Ansätzen wurde die Regulation der Zytokinproduktion auch auf mRNA-Ebene untersucht. Nach Abnahme der Kulturüberstände aus dem polyklonalen Stimulationsansatz erfolgte die mRNA-Präparation aus den in der Kulturplatte verbliebenen Zellen. Dabei wurden jeweils die dreifach-Ansätzen gepoolt.

2.4.1 mRNA-Präparation

Die mRNA-Präparation erfolgte mit Hilfe des total RNA kit (PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen). Alle dafür benötigten Puffer, Lösungen und Materialien

mit Ausnahme von DEPC-Wasser (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen), Ethanol (Merck, Darmstadt) und β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) waren im Kit enthalten. Die Isolation der RNA erfolgte nach dem E.Z.N.A.[®] Total RNA Isolierungsprotokoll für eukaryotische Zellen und Gewebe.

Die in den Kavitäten enthaltenen Zellen wurden mit jeweils 200 μ l TRK-Lysepuffer lysiert und anschließend in ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Dieses Zelllysate wurde mit einem identischen Volumen 70%igen Ethanol versetzt und durch Vortexen sorgfältig gemischt. Nachfolgend wurde die Probe auf eine HiBind[®]-Zentrifugensäule gegeben und für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert. Der Säulendurchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde auf die Säule 750 μ l RNA-Waschpuffer I pipettiert und nochmals für 15 s bei 10000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Danach erfolgte ein zweimaliges Waschen der Säule mit 500 μ l RNA-Waschpuffer II bei einer Zentrifugation für 15 s und 10000 x g. Für das Trocknen der Säule erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit. Danach wurde die Säule auf ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Tube gegeben und mit 50 μ l sterilem DEPC-Wasser durch eine einminütige Zentrifugation bei 10000 x g eluiert.

Die eluierte RNA wurde für einen Tag bei -80°C eingefroren und unmittelbar nach dem Auftauen in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) transkribiert.

2.4.2 cDNA-Synthese

Die Transkription in cDNA wurde mittels AMV Reverse Transkriptase (Promega, Mannheim) entsprechend der Herstellerbeschreibung bei 42°C und 60 min mit einem dNTP-Set und oligo-dT (5'-pd(T)₁₂₋₁₈-3') als Primer (beide von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) durchgeführt.

Die Arbeiten erfolgten auf Eis. Um die RNA in cDNA umzuschreiben, erfolgte eine Herstellung eines cDNA-Mixes mit folgender Zusammensetzung (pro RNA-Probe):

	Stammlösung	Endkonzentration
5 x Puffer	4 μ l	
dNTP's	2 μ l (2mM)	(0,2 mM)
oligo-dT	0,2 μ l (19,6 U/ μ l)	(0,2 U/ μ l)
DEPC-Wasser	3,3 μ l	
AMV-RT	0,5 μ l (10 U/ μ l)	(0,25U/ μ l)

In ein RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Tube wurden 10 μ l cDNA-Mix vorgelegt und mit 10 μ l RNA gemischt. Danach erfolgte eine Inkubation der Proben für 1 h bei 42°C. Die erhaltene cDNA wurde 1 : 10 mit DEPC-Wasser verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -32°C aufbewahrt und die restliche RNA bei -78°C kryokonserviert.

2.4.3 Real-time PCR

Durch die Real-time Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) am *Light-Cycler* (Roche, Mannheim) können spezifische DNA-Abschnitte, welche in geringen Mengen vorliegen, amplifiziert und in Echtzeit quantifiziert werden. Entsprechend den Herstellerangaben zum LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Reagenz Kit (Roche Diagnostik, Mannheim) wurde die Real-Time PCR für GAPDH, IFN- γ , IL-4 und IL-13 durchgeführt.

Im Folgenden sind für die unterschiedlichen PCR-Ansätze die Volumina der einzelnen Reagenzien angegeben 2.1:

Tabelle 2.1: Angabe der Reagenzien für die verschiedenen PCR-Ansätze

	GAPDH	IL-4	IFN- γ	IL-13
DEPC-Wasser	11,6 μ l	10,8 μ l	12,4 μ l	6 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 μ l	3,2 μ l	1,6 μ l	-*
Primer (10 μ M) sense	1 μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l
antisense	1 μ l	1 μ l	1 μ l	2 μ l
LightCycler-DNA Master SYBR Green I	2 μ l	2 μ l	2 μ l	2 μ l
cDNA-Probe	2 μ l	2 μ l	2 μ l	10 μ l
Endvolumen	20 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l

*optimale MgCl₂ Konzentration in Primer Set enthalten

Die Molaritäten von Magnesiumchlorid betragen für GAPDH 4 mM, für IL-4 5 mM und für IFN- γ 3 mM. Bei der GAPDH-, IL-4- und IFN- γ -PCR wurden 18 μ l

des PCR-Ansatzes in die LightCycler-Kapillaren pipettiert. Bei der IL-13-PCR (Kit search GmbH, Heidelberg) wurden 10 μ l PCR-Mix (ohne cDNA) in die LightCycler-Kapillaren pipettiert und 10 μ l cDNA direkt hinzu gegeben.

Folgende Primer wurden verwendet:

GAPDH	sense:	5'-GTCAGTGGTGGACCT-3'
	antisense:	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'
IL-4	sense:	5'-AGAAGACTCTGTGCACCGATTGA-3'
	antisense:	5'-CTCTCATGATCGTCTTTAGCCTTT-3'
IFN- γ	sense:	5'-TTCAGCTCTGCATCGTTTTG-3'
	antisense:	5'-TCAGCCATCACTTGGATGAG-3'

Die PCR wurde bei jeweils 40 Zykluszahlen durchgeführt, jede PCR wurde mit einem zehnminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C gestartet. Für den Nachweis der einzelnen Zytokin-mRNA wurden individuelle Amplifikationsprotokolle verwendet, die nachfolgend aufgelistet sind 2.2:

Tabelle 2.2: Amplifikationsprotokolle

	GAPDH	IL-4	IFN- γ	IL-13
Denaturierungsphase	95°C, 0 s	95°C, 1 s	95°C, 0 s	95°C, 10 s
Hybridisierungsphase	64°C, 5 s	64°C, 10 s mit einer um 0,5°C pro Zyklus erniedrigte Annealingtemperatur bis zum Erreichen der Endannealingtemperatur von 58°C	64°C, 5 s	68°C, 10 s mit einer um 0,5°C pro Zyklus erniedrigte Annealingtemperatur bis zum Erreichen der Endannealingtemperatur von 58°C
Synthesephase	72°C, 17 s	72°C, 16 s	72°C, 16 s	72°C, 16 s

Im Anschluss an die Amplifikation erfolgte eine schrittweise Denaturierung der DNA in einem Bereich von 58°C bis 95°C (Schmelzkurve). Die PCR endete mit der Kühlungsphase (30 s, 40°C). Für die Quantifizierung wurde ein externer Standard mitgeführt (für GAPDH, IFN- γ , IL-4 GenExpress, Berlin; für IL-13: Standard im Kit enthalten). Die Spezifität der PCR-Produkte wurde anhand der Schmelzkurven kontrolliert. Die Ergebnisse wurden mit einem aus der Analyse des *Housekeeping*-Gens GAPDH stammenden Faktor korrigiert und als Prozent der Zytokinexpression

bezogen auf die Kontrolle dargestellt ($\% \text{ Zytokinexpression} = \text{Anzahl der Kopien der Toxin belasteten Probe} / \text{Anzahl der Kopien der Kontrolle} \times 100$).

2.5 Bestimmung der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand mittels ELISA

Das Prinzip der zur Messung der Zytokinkonzentration in den Kulturüberständen verwendeten ELISA ist ein indirekter Sandwich-ELISA. Die Durchführung der ELISA zur Zytokinmessung erfolgte unter Verwendung von OptEIATM-ELISA-Kits von Pharmingen für IFN- γ , IL-4, IL-13 und IL-10.

Die ELISA wurden in 384er Nunc MaxiSorp-Immunoplatten durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte mit dem entsprechenden Beschichtungsantikörper, nachdem die optimalen Konzentrationen durch Verdünnung mit steriler PBS auf 1 : 500 bei IL-4, 1 : 1000 bei IL-13 und IL-10 und 1 : 2000 bei IFN- γ hergestellt wurden. Die Platten wurden mit jeweils 50 μl der verdünnten Beschichtungs-AK-Lösung pro Kavität befüllt und in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C inkubiert. Damit nicht gebundene Beschichtungs-AK entfernt wurden, folgten Waschschrte mit PBS/0,1% Tween[®]20 (Merck, Darmstadt) (3 x 150 μl /Kavität) mit dem ELISA-Platten-Washer Columbus (Tecan, Crailsheim). Die Platten wurden nachfolgend auf Zellstoff ausgeschlagen, um etwaige Waschpufferreste zu entfernen.

Anschließend folgte das Blocken von eventuell verbliebenen freien Protein-Bindungsstellen durch Zugabe von 100 μl 5% FKS in PBS (Assay-Puffer) / Kavität und einer Inkubation von 1 h in der feuchten Kammer bei RT. Während der Inkubation der Platte wurde eine geometrische Standardverdünnungsreihe durch eine serielle 1 : 2 - Verdünnung hergestellt. Im Anschluss an das Blocken folgten Waschschrte mit PBS/0,1% Tween[®]20 (3 x 150 μl /Kavität).

Um Trocknungsartefakte zu vermeiden, wurden nach dem letzten Waschschrte 10 μl Assay-Puffer pro Kavität vorgelegt, darauf erfolgte das Pipettieren der Standards und der aufgetauten Proben mit jeweils 100 μl / Kavität für die Bestimmung von IL-4 und IL-13. Für die Analyse von IL-10 und IFN- γ wurden zusätzlich 50 μl Assaypuffer pro Kavität vorgelegt und 50 μl Probe zugegeben. Nach einer Inkubation von 2 h in der feuchten Kammer bei RT wurden Waschschrte mit PBS/0,1%

Tween[®]*20 durchgeführt (5 x 150 μ l/Kavität). Der biotinylierte AK und das Avidin-POD-Konjugat wurden in der entsprechenden Konzentration durch Verdünnung von 1 : 500 mit Assay-Puffer bei IL-4, 1 : 1000 bei IL-13 und IL-10 und 1 : 2000 bei IFN- γ hergestellt und mit je 50 μ l in die Kavitäten verteilt. Nach einer einstündigen Inkubation in der feuchten Kammer bei RT folgten wiederum Waschschrte mit PBS/0,1% Tween[®]*20 (7 x 150 μ l/Kavität). Anschließend wurde das vorbereitete Substrat (TMB, Becton Dickinson, Heidelberg) mit 50 μ l / Kavität verteilt, im Dunkeln inkubiert und nach erfolgtem Substratumsatz durch Zugabe von 50 μ l 1 M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt)/Kavität abgestoppt. Das Messen der optischen Dichte erfolgte am ELISA-Reader (Photometer Spectra Image; Tecan) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels *EasyWin Kinetics 32* (EasyWin-Software, Tecan, Crailsheim) und die Berechnung der auf die Kontrolle normierten Proteinkonzentrationen mittels Excel XP (Microsoft Deutschland, Unterschleißheim).

2.6 Untersuchungen zur Genaktivierung und Signaltransduktion

Zur Untersuchung der Wirkung von Mykotoxinen auf die Aktivierung von Promotoren fand der Reportergenassay Verwendung. Die Durchführung erfolgte während eines Studienaufenthaltes im Institut Chemie und Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät der Paris-Lodron Universität Salzburg, Fachbereich molekulare Biologie, AG Allergie und Zytokine (Leiter: Prof. Dr. Albert Duschl).

Zur Analyse der Wirkung von Mykotoxinen auf Proteine der Signaltransduktion wurde der SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt.

Im Folgenden sind die dafür eingesetzten Methoden detailliert dargestellt.

2.6.1 Transiente Transfektion

Für die Reportergenassays wurden Jurkat-Zellen eingesetzt und transient mit den jeweiligen Promotoren transfiziert.

Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektamin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe). Dafür wurden pro Ansatz je 50 μl Optimem-Medium (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in jeweils zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße verteilt, anschließend wurden pro Ansatz 1 μl DNA (Plasmide; IL-4 luc -590, IFN- γ luc -300, IL-13 luc und NF κ B luc, freundlicherweise von Prof. Dr. Albert Duschl, AG Allergie und Zytokine, Fachbereich molekulare Biologie, Institut Chemie und Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät der Paris-Lodron Universität Salzburg bereitgestellt) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß und die doppelte Menge an Lipofektamin in ein anderes 1,5 ml Reaktionsgefäß dazugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgten das Mischen der beiden und eine Inkubation von 20 min bei RT. Danach wurde der Mix mit 95 μl / Kavität, in die 5×10^5 Jurkat-Zellen ausgesät, verteilt. Nach 4 h wurde die Transfektion mit 100 μl FKS / Kavität abgestoppt.

2.6.2 Einfluss der Mykotoxine auf die Aktivierung von Promotern

Für die Untersuchung der Beeinflussung der Aktivität von Promotern wurden die Jurkat-Zellen nach der abgestoppten Transfektion mit 10 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 1 μM Ionomycin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen von Patulin und Gliotoxin versetzt und 24 h bei 37°C, 5% v/v CO₂ und wassergesättigter Atmosphäre inkubiert. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden 940 μl Kulturüberstand pro Kavität abgenommen und 100 μl eines Lysepuffers (Cell Culture 5x Lysispuffer; Promega Corporation, Madison, USA; verdünnt in Aqua dest) in jede Kavität pipettiert. Nach 5minütiger Lyse der Zellen wurden 2 x 40 μl /Ansatz (Doppelbestimmung) in eine 96er Platte verteilt. Die Messung erfolgte am Luminometer (Anthos Lucy2 , Type: 18650).

2.6.3 Einfluss der Mykotoxine auf Signalproteine

Um zu untersuchen, ob Mykotoxine einen Einfluss auf intrazelluläre Signalwege mit Relevanz für Th1/Th2-Regulation haben, wurden Signalproteine des Jak/STAT-Weges (STAT1 und STAT6) und der NF κ B-Regulation (I κ B α) mittels Western Blot

nachgewiesen. Zur Analyse des Einflusses von Mykotoxinen auf Proteine der Signaltransduktion wurden $1 \cdot 10^7$ PBMC in 5 ml Medium (RPMI 1640 Medium versetzt mit 5% FKS) in 25ml-Zellkulturflaschen eingesät, mit den Mykotoxinen versetzt, auf 10ml aufgefüllt und für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde mit je 100ng/ml CD3 und CD28-Antikörpern für eine Stunde stimuliert. Als Kontrollen dienten eine unstimulierte und eine stimulierte Kontrolle, jeweils mit 0,05% v/v Endkonzentration Methanol und ein Ansatz ohne Stimulanz und mit der höchsten Konzentration des getesteten Mykotoxins. Für den Versuch wurden Mykotoxinkonzentrationen verwendet für die Effekte auf die Zytokinsekretion beobachtet worden waren (siehe Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: eingesetzte Konzentrationen der Mykotoxine

Mykotoxin	Eingesetzte Konzentrationen
Patulin	250; 100; 50 und 25 ng/ml
Gliotoxin	250; 100; 50; 25 und 10 ng/ml
Ochratoxin A	2000; 1000; 500; 100 und 50 ng/ml
Citrinin	12,8; 10,24; 8,2; 6,6 und 5,2 $\mu\text{g/ml}$
T-2 Toxin	1,5; 1,04; 0,7; 0,5 und 0,3 ng/ml

2.6.4 Proteinisolation und -konzentrationsbestimmung

Für die Proteinisolation wurden die wie unter 2.6.3. beschrieben behandelten Zellen in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 6 min bei 1250 U/min und RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS aufgenommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Nach einer sechsminütigen Zentrifugation bei 1250 U/min und 4°C wurde das Pellet mit 100 μl eiskaltem gebrauchsfertigen Lysispuffer resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 12000 U/min und 4°C für 30 min zentrifugiert. Die Überstände wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt.

Bei der Proteinbestimmung nach Bradford wurden 800 μl aqua dest., 200 μl BioRad-ProteinAssay-Farbstoffkonzentrat (BioRad, München) und 3 μl Probe in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt, 5 min inkubiert und anschließend am Spektrophotometer (Pharmacia LKB Ultrospec III, Pharmacia) gemessen. Die Proteinkon-

zentration wurde mit der Gleichung, die sich durch den mitgeführten BSA-Standard ergab, errechnet.

Die Proteinproben wurden nachfolgend aliquotiert und bei -80°C , bis zur Auftrennung in SDS-PAGE, kryokonserviert.

RIPA-Puffer, pH 7,4

50 mM Tris	Merck, Darmstadt
150 mM NaCl	Merck, Darmstadt
1% NP40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
0,25% Natriumdeoxychelate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1 mM EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCl	Merck, Darmstadt
auf 100 ml aqua dest.	

Lysepuffer Gebrauchslösung

1 mM NaF	Merck, Darmstadt
1 mM Na_2VO_4	Merck, Darmstadt
1 mM PMSF	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
$\frac{1}{2}$ complete mini Tablette	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
auf 5 ml RIPA-Puffer	

2.6.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteine Stat1 (Stat1 α 91 kDa, Stat1 β 84 kDa), Stat6 (110 kDa) und I κ B α (41 kDa) bzw. deren phosphorylierte Form (alle New England Biolabs, Frankfurt (M)) wurden mit Hilfe von SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen. Die Proben wurden mit dreifachkonzentrierten Laemmli-Puffer gemischt (10 μl Probe und 3,5 μl Laemmli-Puffer). Die Proben wurden 2 min bei 100°C denaturiert, kurz anzentrifugiert und unmittelbar anschließend auf das NuPage Novex 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen, Karlsruhe) aufgetragen. Ein Proteingrößenstandard (High-Range Rainbow, Amersham BioSciences, Freiburg) wurde mitgeführt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei einer konstanten Spannung von 140 mV und einer Stromstärke von 80 mA mit der Xcell Sure Lock Mini Cell-Laufkammer (Invitrogen, Karlsruhe) im SDS-Laufpuffer (NuPAGE MES-SDS-Running-buffer, Invitrogen Karlsruhe). Die Auswertung der Protein-Trennung im SDS-PAGE erfolgte im Western Blot.

3 x Laemmli-Probenpuffer pH 6,8

150 mM Tris	Merck, Darmstadt
30% Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
6% SDS	Merck, Darmstadt
30% Glycerol	Merck, Darmstadt
0,3% Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HCl	Merck, Darmstadt

2.6.6 Western Blotting

Durch Western Blotting wurden die im SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (BioRad, München) transferiert. Für den Western Blot wurde ein Extra Thick Blotpaper (BioRad, München), welches kurz im Blotting Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 v/v % Methanol, als premixed Puffer von BioRad, München) getränkt wurde, auf die Graphitplatte (Anode) gelegt. Danach folgten die in Blotting Puffer angefeuchtete Nitrocellulosemembran, das Gel, ein weiteres in Blotting Puffer getränkte Extra Thick Blotpaper und abschließend wurde die obere Graphitplatte (Kathode) auf den Aufbau gelegt. Das Blotting erfolgte bei einer konstanten Spannung von 15 V und einer Stromstärke von 2 A für 15 min im Semi-Dry Blotting System (Bio-Rad, München).

Nach Beendigung des Western Blottings wurde die Membran zum Blocken von unspezifischen Proteinbindungen 60 min mit Blockpuffer [5% Milchmagerpulver in TBS/0,1% Tween®*20] inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper [1:1000 verdünnt in 5 ml Antikörperdiluent (2% ECL Advance Blocking Agent (Amersham Biosciences, Freiburg) in TBS/0,1% Tween®*20)] auf einem Schüttler bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS/0,1% Tween®*20 gewaschen und nachfolgend mit einem Wasserstoff-Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (BioRad, München) für 60 min inkubiert. Zum Nachweis des zu untersuchenden Proteins wurde die Membran, nach dreimaligem Waschen mit TBS/0,1% Tween®*20, mit den Chemilumineszenzlösungen (Peroxidlösung, Luminol-Enhancer; Amersham Biosciences, Freiburg) für 5 min inkubiert. Das Ergebnis der Reaktion wurde am Dokumentationsgerät FluorChemTM 8900, Alpha Innotech detektiert.

Um die Proben optimal auszunutzen, erfolgte anschließend ein *Stripping* der Membran. Mit dieser Methode wurden die Antikörper von der Membran abgewaschen und diese für einen weiteren Nachweis von Proteinen nutzbar gemacht. Als

erstes wurde das phosphorylierte Protein nachgewiesen und nach dem *Stripping* das nichtphosphorylierte. Die Membran wurde mit dem *Stripping*-Puffer für 30 min bei 70°C inkubiert und anschließend dreimal mit TBS/0,1% Tween[®]*20 für jeweils 10 min gewaschen. Danach wurde die Membran zum Blocken 60 min Blockpuffer (5% Milhmagerpulver in TBS/0,1 % Tween[®]*20) inkubiert. Anschließend erfolgte der Nachweis weiterer Proteine mittels des oben dargestellten Verfahrens.

TBS pH 7,6

50 mM Tris	Merck, Darmstadt
150 mM NaCl	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
auf 1 l aqua dest.	

Stripping-Puffer, pH 6,7

62,5 mM Tris	Merck, Darmstadt
2% SDS	Merck, Darmstadt
HCl	Merck, Darmstadt
100 mM -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
(frisch dazugeben)	

2.7 Statistische Auswertung der Meßwerte

Mit statistischen Methoden wurde geprüft, ob vorhandene Unterschiede in den Meßwerten zufällig oder als nicht zufällig anzusehen sind. Dabei wurde der Grenzwert für die Entscheidung, wo die zufallsbedingten Unterschiede aufhören, bei 5% ($p < 0,05$) festgelegt. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mit Hilfe des nicht parametrischen Mann-Whitney U-Tests ermittelt. Die Berechnung erfolgte mit dem Programm STATISTICA 5.5 (StatSoft, Inc., USA). Signifikante Hemmung mit einem $p < 0,05$ wurden mit * gekennzeichnet; für eine signifikante Stimulation wurde für ein $p < 0,05$ # gewählt. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte durch mathematische Anpassung and die HILL-Funktion unter Verwendung von Originin 7,5 (OriginLab Corporation, Northampton, USA).

HILL-Funktion

$$[E\%inh] = \frac{100}{1 + \left(\frac{x}{EC_{50}}\right)^{-p}} \quad (2.1)$$

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Immunmodulatorische Effekte durch Mykotoxine auf polyklonal stimulierte PBMC

Um den Einfluss der Mykotoxine auf die Zytokinsekretion von aktivierten T-Zellen zu untersuchen, wurden PBMC mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert und mit ausgesuchten Konzentrationen der Mykotoxine für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte zur Untersuchung der Zytokinsekretion im ELISA die Abnahme der Kulturüberstände und zur Untersuchung zytotoxischer und proliferationshemmender Effekte der MTT-Test.

3.1.1 Beeinflussung der Vitalität

Der MTT-Test bestimmt die Anzahl lebender Zellen durch Messung ihrer metabolischen Aktivität und ist damit ein Maß der Vitalität. Humane PBMC von 6 Spendern wurden für die Untersuchung des Einflusses von Mykotoxinen auf die Vitalität verwendet. Bei allen untersuchten Mykotoxinen wurde die Vitalität konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 3.1).

Durch **Patulin** wurde die Lebensfähigkeit der PBMC ab einer Konzentration von 3,9 ng/ml signifikant gehemmt (Abb. 3.1 A). Dabei kam es zu einer stetigen Hemmung der Vitalität. **Gliotoxin** führte zu einer signifikanten Hemmung der Vitalität im gesamten eingesetzten Konzentrationsbereich bezogen auf die Kontrolle

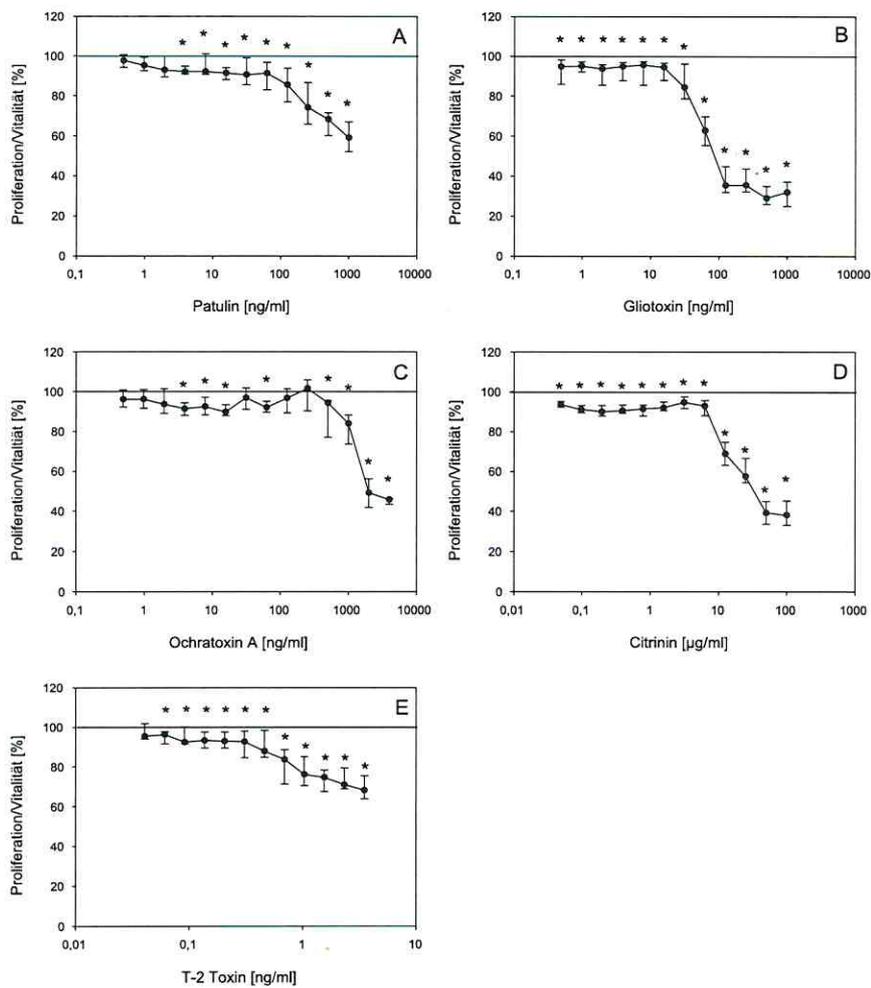


Abbildung 3.1: Einfluss der Mykotoxine Patulin (A), Gliotoxin (B), Ochratoxin A (C), Citrinin (D) und T-2 Toxin (E) auf die Proliferation und Vitalität anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von jeweils 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Vitalität bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Suppression ($p < 0,05$) ist mit einem Sternchen (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

(Abb. 3.1 B). In niedrigeren Konzentrationen wird die Vitalität geringfügig (5-10%) aber signifikant gehemmt und im Konzentrationsbereich von 31,25 - 1000 ng/ml kam es zu starken inhibitorischen Effekten. Die Vitalität der PBMC wird durch **Ochratoxin A** in einigen niedrigen Konzentrationen um 5 - 10% gehemmt, ab 500 ng/ml kam es zu einer konzentrationsabhängigen und signifikanten Hemmung der Vitalität (Abb. 3.1 C). Durch **Citrinin** wird die Lebensfähigkeit der PBMC im gesamten Konzentrationsbereich signifikant vermindert (Abb. 3.1 D). Im Bereich von 0,05 bis 6,25 $\mu\text{g/ml}$ wird die Vitalität um 5 - 10% unterdrückt und ab 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin konzentrationsabhängig gehemmt. Das **T-2 Toxin** führte zu einer stetigen signifikanten Hemmung der Vitalität der PBMC ab 0,061 ng/ml (Abb. 3.1 E).

Der Vergleich der IC_{50} -Werte für die Vitalität zeigte, dass das T-2 Toxin das potenteste zytotoxische Mykotoxin ist (Tab. 3.1). In Reihenfolge ihrer zytotoxischen Potenz folgen Gliotoxin mit einem IC_{50} -Wert von 143, ng/ml, Patulin mit 2086 ng/ml, Ochratoxin A mit 2866,23 ng/ml und Citrinin mit 41,51 $\mu\text{g/ml}$.

Tabelle 3.1: Angabe der IC_{50} (Inhibition Concentration of 50%)-Werte für den Einfluss der Mykotoxine auf die Vitalität anti-CD3/CD28 stimulierter PBMC.

Mykotoxin	IC_{50} -WERTE [ng/ml]
Patulin	2086
Gliotoxin	143,66
Ochratoxin A	2866,23
Citrin	41510
T-2 Toxin	15,17

3.1.2 Beeinflussung der Zytokinsekretion

Durch **Patulin** wurde die Sekretion von IL-4, IL-13, IL-10 und IFN- γ konzentrationsabhängig unterdrückt (Abb. 3.2). Eine signifikante Hemmung der Freisetzung von IL-4 und IL-13 wurde ab einer Konzentration von 62,5 ng/ml und von IL-10 und IFN- γ ab 7,81 ng/ml Patulin beobachtet.

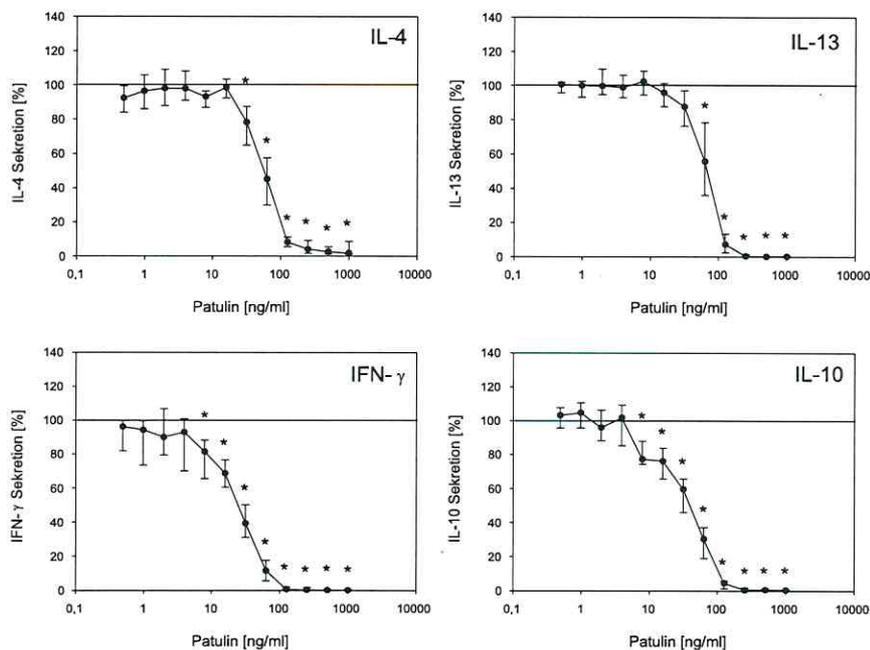


Abbildung 3.2: Einfluss von Patulin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Patulin zeigte eine unterschiedliche Hemmwirkung auf die Freisetzung der einzelnen Zytokine. Um diesen Unterschied herauszuarbeiten wurde die Hemmung der Sekretion jeweils zweier Zytokine mit den entsprechenden p-Werten in der Abbildung 3.3 dargestellt. Durch Vergleich der Sekretion von IL-4 und IFN- γ als auch von IL-13 und IFN- γ wurde in einem Konzentrationsbereich von 7,8 bis

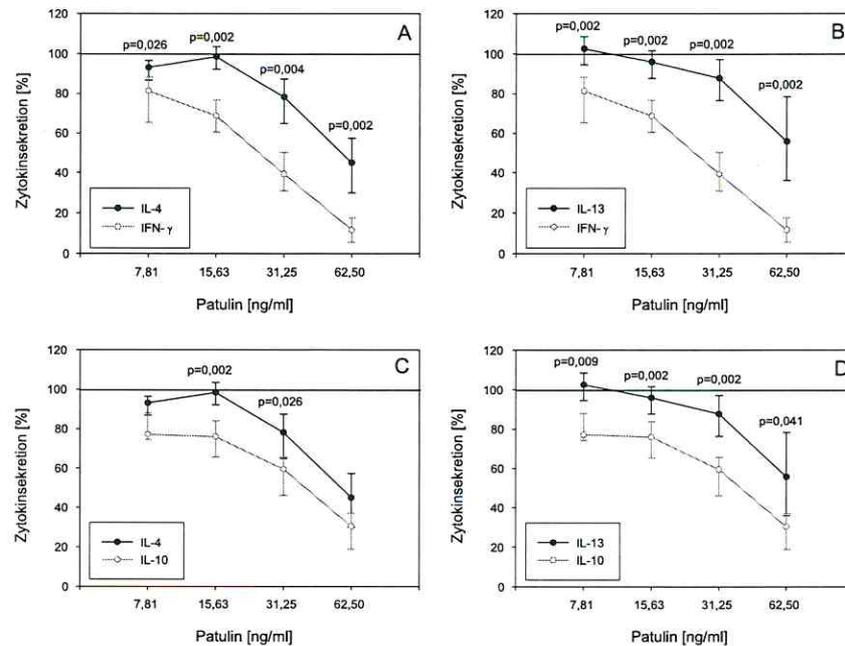


Abbildung 3.3: Einfluss von Patulin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Gezeigt sind die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten p-Werte für den Vergleich der normierten Zytokinsekretionen. A) Unterschied zwischen IL-4 und IFN- γ ; B) Unterschied zwischen IL-13 und IFN- γ C) Unterschied zwischen IL-4 und IL-13; D) Unterschied zwischen IL-13 und IL-10.

62,5 ng/ml Patulin ein signifikanter Unterschied zwischen den Zytokinen ermittelt (siehe Abb. 3.3 A und B). Die Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10 unterschied sich bei 15,6 und 31,25 ng/ml Patulin (Abb. 3.3 C) und die von IL-13 und IL-10 im Konzentrationsbereich von 7,8 bis 62,5 ng/ml Patulin signifikant von einander (Abb. 3.3 D). Der hemmende Einfluss von Patulin auf die Freisetzung der Zytokine IFN- γ und IL-10 war gleich. Nur bei 62,5 ng/ml Patulin wurde ein signifikanter Unterschied zwischen IFN- γ und IL-10 mit einem p-Wert von 0,01 ermittelt. Zwischen der Sekretion von IL-4 und IFN- γ konnte kein Unterschied beobachtet werden.

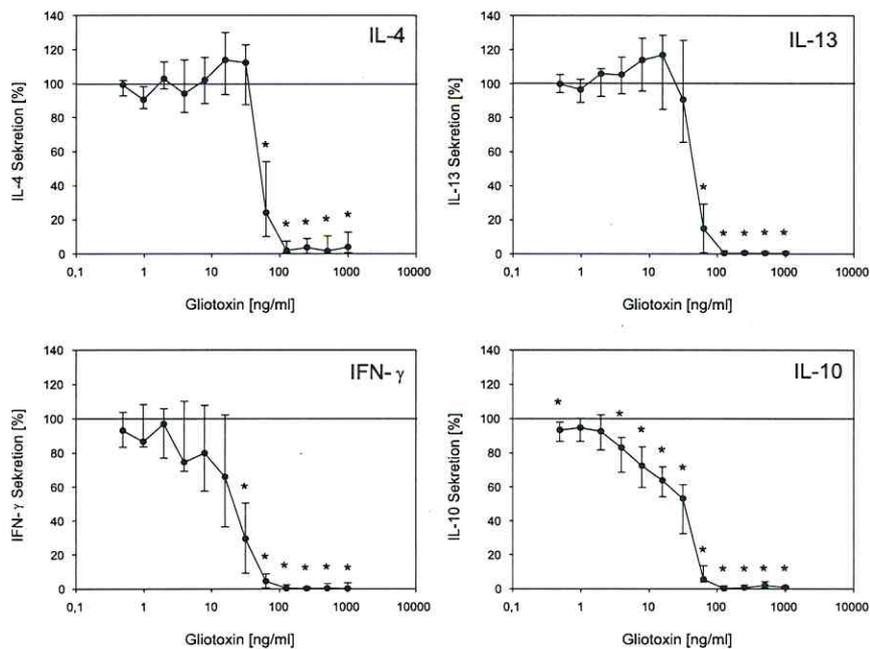


Abbildung 3.4: Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Alle Zytokine wurden in ihrer Sekretion konzentrationsabhängig durch **Gliotoxin** gehemmt. Die Sekretion von IL-4 und IL-13 wurde ab einer Konzentration von 62,5 ng/ml, von IFN- γ ab 31,25 ng/ml und von IL-10 ab 7,81 ng/ml Gliotoxin signifikant unterdrückt (Abb. 3.4).

Die Sekretion der einzelnen Zytokine wurde durch Gliotoxin unterschiedlich stark vermindert. Eine gleiche Hemmwirkung auf die Freisetzung von IL-4 und IL-13 wurde beobachtet. Die Zytokine IFN- γ und IL-10 wurden in niedrigeren Konzentrationen als IL-4 und IL-13 durch Gliotoxin gehemmt. Um den beobachteten Unterschied zu verdeutlichen wurde die Hemmung jeweils zweier Zytokine mit den entsprechenden p-Werten in der Abbildung 3.5 dargestellt.

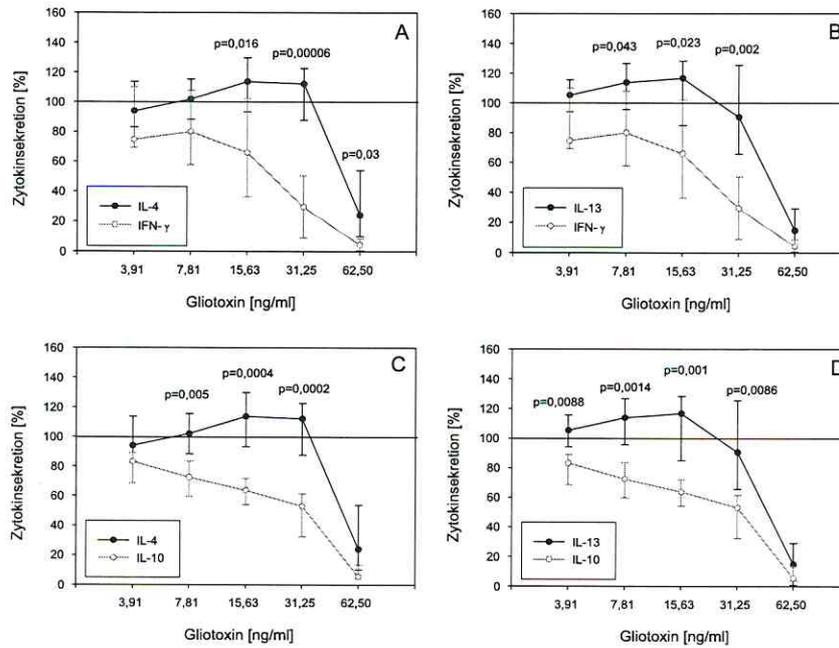


Abbildung 3.5: Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Gezeigt sind die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten p-Werte für den Vergleich der normierten Zytokinsekretionen. A) Unterschied zwischen IL-4 und IFN- γ ; B) Unterschied zwischen IL-13 und IFN- γ C) Unterschied zwischen IL-4 und IL-13; D) Unterschied zwischen IL-13 und IL-10.

Der Vergleich der Sekretion von IL-4 und IFN- γ zeigte in einem Konzentrationsbereich von 15,6 bis 62,5 ng/ml Gliotoxin einen signifikanten Unterschied zwischen den Zytokinen (siehe Abb. 3.5 A). Die IFN- γ - und IL-13-Freisetzung unterschied sich ab 7,81 ng/ml Gliotoxin signifikant voneinander (Abb. 3.5 B). Ein signifikanter Unterschied konnte bei der Sekretion der Zytokine IL-4 und IL-10 im Konzentrationsbereich von 7,81 bis 31,25 ng/ml Gliotoxin festgestellt werden (Abb. 3.5 C). Die Sekretion von IL-13 und IL-10 unterschied sich im Bereich von 3,9 bis 31,25 ng/ml Gliotoxin signifikant von einander (Abb. 3.5 D). Der hemmende Einfluss von Gliotoxin auf die Sekretion der Zytokine IFN- γ und IL-10 war gleich.

Durch **Ochratoxin A** wurde die Sekretion der untersuchten Zytokine IL-4, IL-13, IL-10 und IFN- γ konzentrationsabhängig gehemmt (Abb. 3.6). In geringen Konzentrationen ergeben sich bei der Freisetzung von IL-4, IL-13 und IL-10 einzelne Signifikanzpunkte. In geringen Konzentrationen konnte im allgemeinen kein Einfluss auf die Sekretion der Zytokine beobachtet werden. Ab einer Konzentration von 62,5 ng/ml wurden IL-4, IL-13 und IFN- γ durchgängig signifikant in ihrer Sekretion vermindert. Eine signifikante Hemmung der IL-10-Sekretion konnte ab 125 ng/ml Ochratoxin A ermittelt werden. Eine große Schwankung wurde bei der Sekretion von IL-13 gefunden. Bei drei von sechs Versuchen konnte erst ab 250 ng/ml Ochratoxin eine Hemmung der IL-13-Sekretion beobachtet werden.

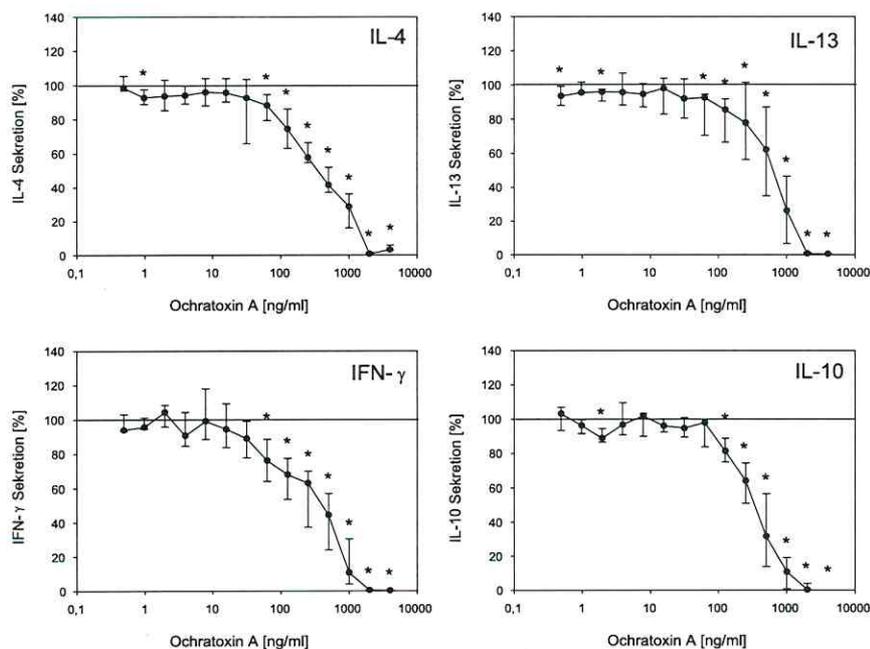


Abbildung 3.6: Einfluss von Ochratoxin A auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Auch **Citrinin** führte zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Zytokinsekretion (Abb. 3.7). Die Sekretion von IL-4 wurde ab 6,25 $\mu\text{g/ml}$, von IL-13 ab 12,5 $\mu\text{g/ml}$ und von IFN- γ ab 0,78 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin signifikant gehemmt. Durch 0,098 und 0,195 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin kam es zu einer signifikanten Erhöhung der IL-10-Freisetzung, während eine signifikante Hemmung ab 3,125 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin beobachtet wurde.

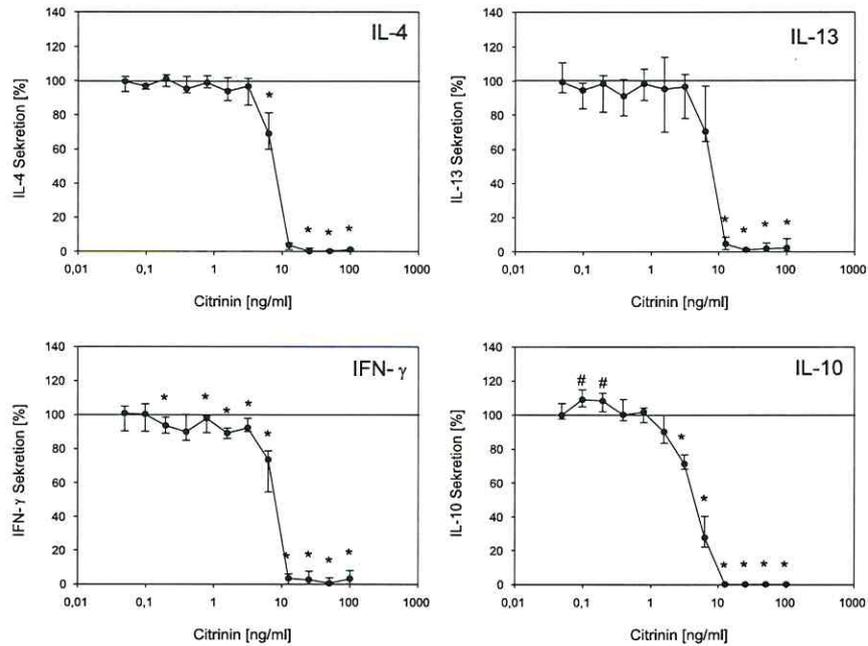


Abbildung 3.7: Einfluss von Citrinin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 8 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Die Sekretion der einzelnen Zytokine wurde durch Citrinin unterschiedlich stark beeinflusst. Die IL-10-Freisetzung wurde in niedrigeren Konzentrationen als die der Zytokine IL-4, IL-13 und IFN- γ gehemmt. Der Unterschied in der Sekretionshemmung der verschiedenen Zytokine ist in der Abbildung 3.8 mit den entsprechenden p-Werten dargestellt.

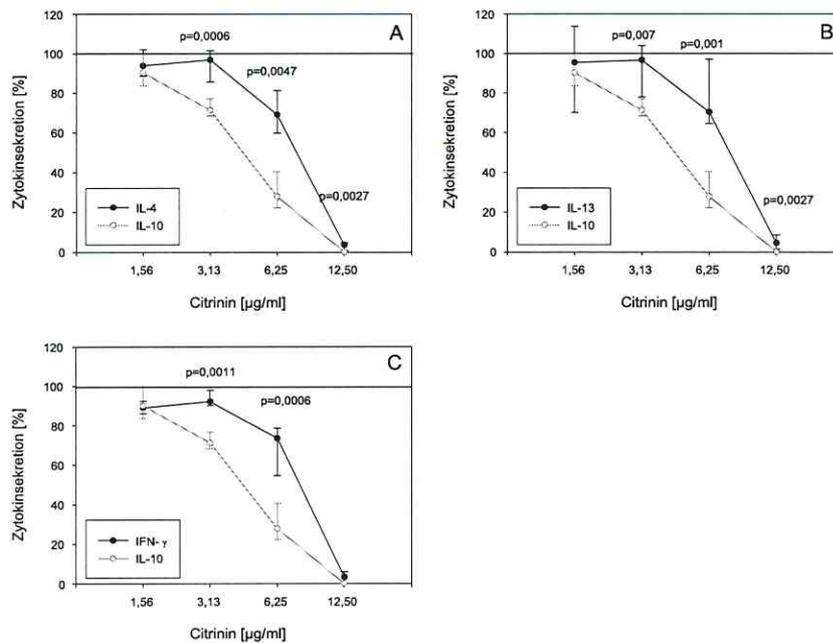


Abbildung 3.8: Einfluss von Citrinin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 8 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Gezeigt sind die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten p-Werte für den Vergleich der normierten Zytokinsekretionen. A) Unterschied zwischen IL-4 und IL-10; B) Unterschied zwischen IL-13 und IL-10; C) Unterschied zwischen IFN- γ und IL-10.

Durch Vergleich der Sekretion von IL-4 und IL-10 (siehe Abb. 3.8 A) und von IL-13 und IL-10 (siehe Abb. 3.8 B) konnte in einem Konzentrationsbereich von 3,125 bis 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin ein signifikanter Unterschied zwischen den Zytokinen ermittelt werden. Die IL-10- und IFN- γ -Sekretion unterschied sich im Bereich von 3,125 und 6,25 $\mu\text{g/ml}$ Citrinin signifikant von einander.

Wie bei den anderen Mykotoxinen kam es durch **T-2 Toxin** ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Zytokinsekretion (Abb. 3.9). Dabei konnte eine signifikante Unterdrückung der IL-4-, IL-13- und IL-10-Sekretion ab 0,461 ng/ml und der IFN- γ -Sekretion ab 0,691 ng/ml T-2 Toxin beobachtet werden. T-2 Toxin

zeigte auf die IFN- γ -Freisetzung eine große Schwankung im Konzentrationsbereich von 0,137 bis 0,691 ng/ml. Bei zwei von acht Versuchen konnte in diesem Bereich eine Erhöhung der IFN- γ -Sekretion beobachtet werden.

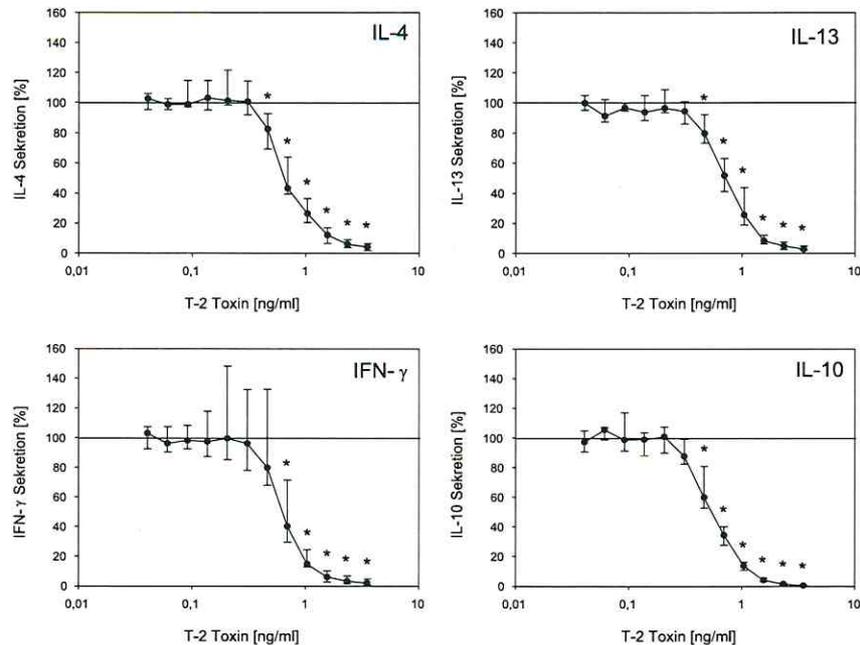


Abbildung 3.9: Einfluss von T-2 Toxin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/28 stimulierter humaner PBMC über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 8 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Durch Vergleich der IC_{50} -Werte für die Zytokinsekretion (Tab. 3.2) ist zu erkennen, dass das T-2 Toxin das potenteste Mykotoxin in Bezug auf die Hemmung der Zytokinsekretion ist. In Reihenfolge ihrer Potenz folgen Patulin = Gliotoxin < Ochratoxin A < Citrinin.

Unter Einfluss von Patulin und Gliotoxin sind die IC_{50} -Werte für IFN- γ und IL-10 viel niedriger als die IC_{50} für IL-4, IL-13 und die Vitalität (Tab. 3.1 und 3.2). Die IC_{50} -Werte für die Vitalität sind für alle untersuchten Mykotoxine höher als die

Tabelle 3.2: Angabe der IC₅₀-Werte für den Einfluss der Mykotoxine auf die Zytokinsekretion anti-CD3/anti-CD28-stimulierter PBMC.

MYKOTOXINE	IC ₅₀ -WERTE [ng/ml]			
	IL-4	IL-13	IFN- γ	IL-10
Patulin	54,04	66,76	21,64	32,24
Gliotoxin	60,57	59,7	19,826	19,88
Ochratoxin A	369,62	542,12	270,04	329,946
Citrinin	7181	7710	7357	4380
T-2 Toxin	0,76	0,816	0,9689	0,617

für die Zytokinsekretion (Tab. 3.1 und 3.2). Die IL-10-Sekretion wird durch Citrinin am stärksten unterdrückt. Die IC₅₀-Werte für T-2 Toxin sind annähernd gleich. Bei Ochratoxin A ist der IC₅₀-Wert für die IL-13-Sekretion deutlich höher als für die anderen Zytokine. Ein signifikanter Unterschied zwischen IL-13 und den anderen Zytokinen konnte bei Ochratoxin A nicht ermittelt werden.

3.2 Vergleich der Beeinflussung der Zytokinexpression auf mRNA- und Protein-Ebene

Um zu untersuchen, ob die unterschiedliche Hemmwirkung auf die Sekretion der einzelnen Zytokine durch die Mykotoxine Patulin und Gliotoxin schon auf mRNA-Ebene geschieht, erfolgte ein Ansatz mit ausgewählten Konzentrationen der Mykotoxine mit anschließender mRNA-Präparation und PCR sowie Kulturüberstandsabnahme und ELISA. Jeweils ein repräsentatives Beispiel für die unnormierte mRNA-Expression der Zytokine IFN- γ , IL-4, IL-13 und des *Housekeeping* Gens GAPDH sind in Abb. 3.10 für Patulin und in Abb. 3.12 für Gliotoxin dargestellt.

Parallel zu der bereits beschriebenen konzentrationsabhängigen Hemmung der Vitalität im MTT-Test trat bei **Patulin** eine Abnahme der GAPDH-mRNA-Expression auf (Abb. 3.10). Eine verminderte IL-4, IL-13 und IFN- γ -mRNA-Expression konnte bei 125 ng/ml Patulin beobachtet werden. Eine Patulinkonzentration von 62,5 ng/ml führte zu einer unveränderten IL-4-mRNA-Expression, zu einer Stimulation der IL-13-mRNA-Expression und zu einer verminderten IFN- γ -mRNA-Expression. Durch 31,25 ng/ml Patulin wurde die IL-4- und IL-13-mRNA-

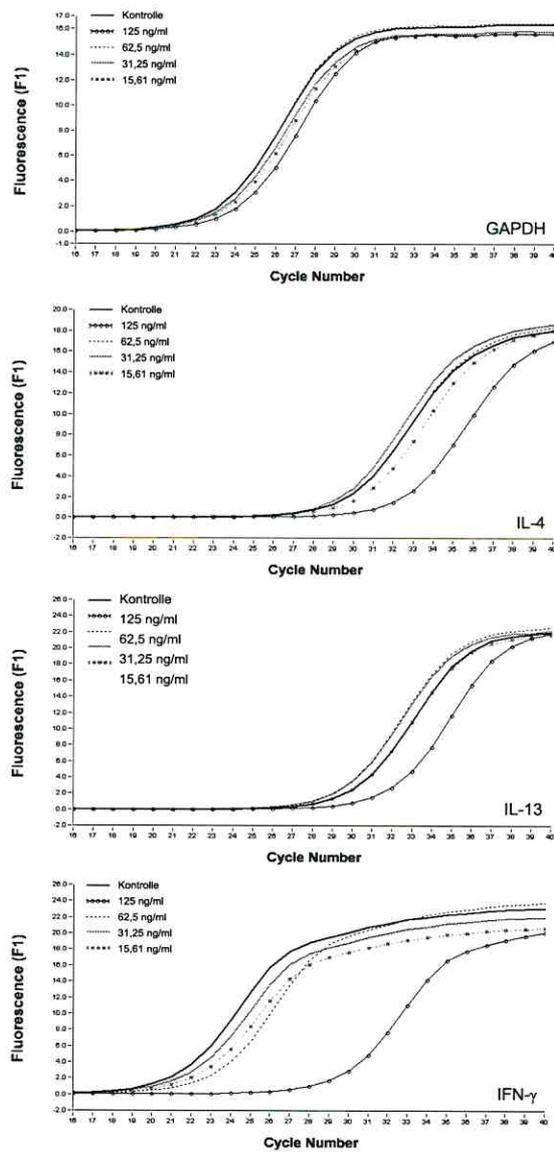


Abbildung 3.10: Vergleich des Einflusses von Patulin auf die mRNA-Expression des Housekeeping-Gens GAPDH und der Zytokin-Gene IL-4, IL-13 und IFN- γ mittels RT-PCR.

Expression stimuliert und die IFN- γ -mRNA-Expression gehemmt verglichen mit der Kontrolle. Bei der niedrigsten Konzentration von 15,6 ng/ml Patulin war die IL-4- und IFN- γ -mRNA-Expression leicht unterdrückt, während die mRNA-Expression von IL-13 unbeeinflusst war.

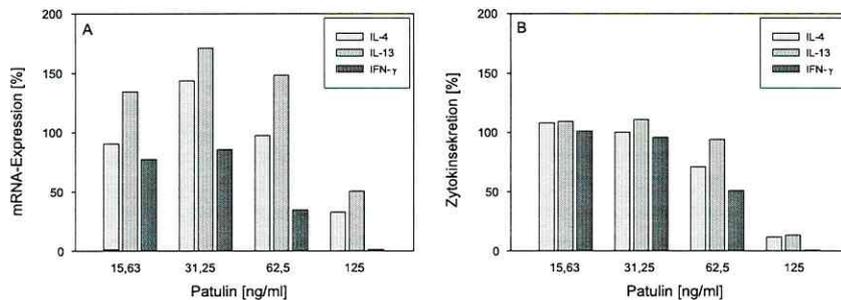


Abbildung 3.11: Vergleich des Einflusses von Patulin auf die Zytokinexpression mit anti-CD3/anti-CD28 stimulierter PBMC auf mRNA- (A) und Protein-Ebene (B). Mit Hilfe von Realtime-PCR (A) und ELISA (B) wurden die Daten analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines Spenders. Die Werte wurden auf die Kontrolle, die 100% gesetzt wurde, bezogen.

In der Abbildung 3.11 ist der Einfluss von Patulin auf die Zytokinexpression auf mRNA- der Protein-Ebene gegenübergestellt. Die mRNA-Expression des *Housekeeping* Gens GAPDH wurde für die Normierung der mRNA-Expression der Zytokine verwendet. Eine Stimulation der IL-4-mRNA-Expression konnte bei 31,25 ng/ml Patulin und der IL-13-mRNA-Expression im Konzentrationsbereich von 15,6 bis 62,5 ng/ml Patulin beobachtet werden (Abb. 3.11 A). In der höchsten Patulinkonzentration wurde eine Hemmung der mRNA-Expression beobachtet. Nach Normierung zeigte sich bei 15,6 und 31,25 ng/ml Patulin eine geringe Hemmung der IFN- γ -mRNA-Expression verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.11 A). Durch 62,5 und 125 ng/ml Patulin wurde die mRNA-Expression von IFN- γ um 65 bzw. 98% gehemmt. Eine konzentrationsabhängige Hemmung konnte auch bei der IFN- γ -Sekretion beobachtet werden (Abb. 3.11 B). Wohingegen die bei der mRNA-Expression beobachtete Erhöhung von IL-4 und IL-13 nicht verzeichnet wurde. Es konnte im Unterschied zur mRNA-Expression eine konzentrationsabhängige Hemmung der Sekretion aller Zytokine ermittelt werden.

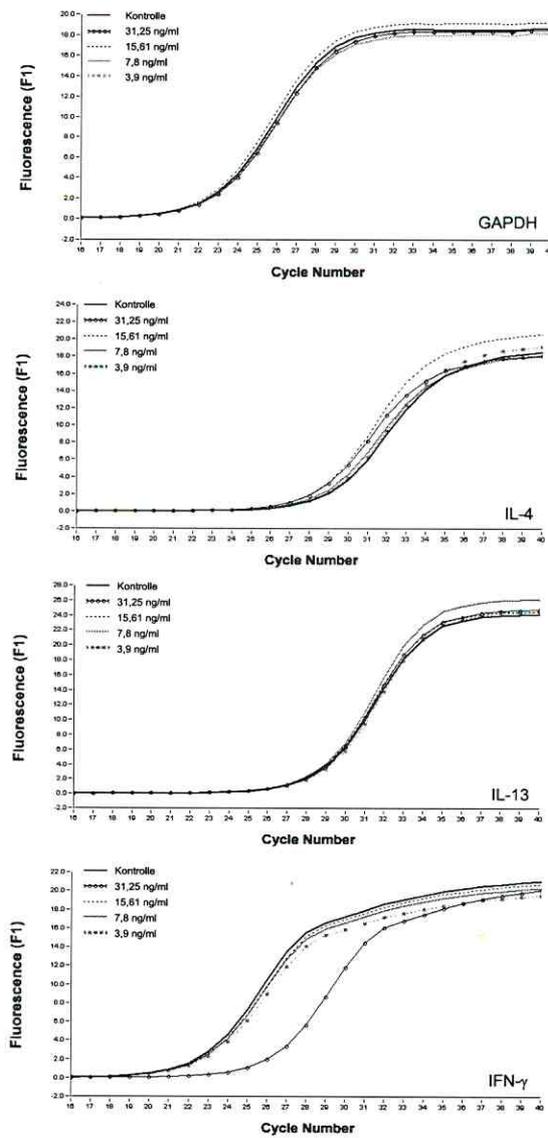


Abbildung 3.12: Vergleich des Einflusses von Gliotoxin auf die mRNA-Expression des Housekeeping-Gens GAPDH und der Zytokin-Gene IL-4, IL-13 und IFN- γ mittels RT-PCR.

Die mRNA-Expression des *Housekeeping*-Genes GAPDH wurde durch **Gliotoxin** nicht verändert (Abb. 3.12). Bei allen getesteten Gliotoxinkonzentrationen kam es zu einer Erhöhung der IL-4-mRNA-Expression verglichen mit der Kontrolle. Wohingegen die mRNA-Expression von IL-13 nicht beeinflusst wurde. In der Abbildung 3.12 ist zu erkennen, dass die IFN- γ -mRNA-Expression durch Gliotoxin unterdrückt wurde. Dabei wurde die stärkste Hemmwirkung bei 31,25 ng/ml Gliotoxin beobachtet.

Die Wirkung von Gliotoxin auf die Zytokinexpression auf mRNA- ist in der Abbildung 3.13 der Protein-Ebene gegenübergestellt. Die mRNA-Expression der Zy-

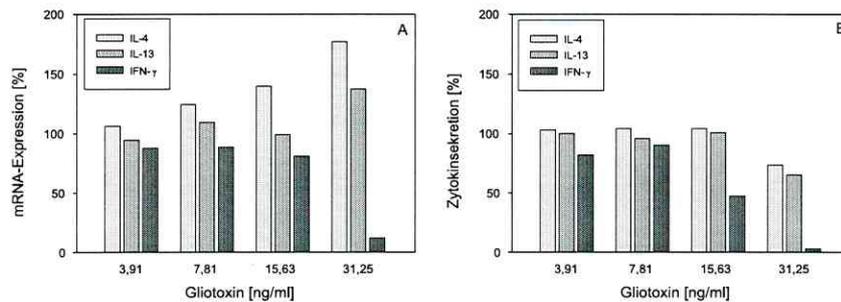


Abbildung 3.13: Vergleich des Einflusses von Gliotoxin auf die Zytokinexpression mit anti-CD3/anti-CD28 stimulierter PBMC auf mRNA- (A) und Protein-Ebene (B). Mit Hilfe von Real-time-PCR (A) und ELISA (B) wurden die Daten analysiert. Dargestellt ist das Ergebnis eines Spenders. Die Werte wurden auf die Kontrolle, die 100% gesetzt wurde, bezogen.

tokine wurde anhand der GAPDH-mRNA-Expression normiert. Die IL-4-mRNA-Expression war über dem gesamten Konzentrationsbereich erhöht, während nur bei 31,25 ng/ml Gliotoxin die mRNA-Expression von IL-13 erhöht wurde (Abb. 3.13 A). Die IFN- γ -mRNA-Expression wurde konzentrationsabhängig gehemmt. Dies konnte auch auf Proteinebene beobachtet werden (Abb. 3.13 B). Während die Sekretion von IL-4 und IL-13 anders als auf mRNA-Ebene beobachtet unverändert blieb bzw. bei 31,25 ng/ml Gliotoxin gehemmt wurde. Der Vergleich der Zytokinexpression auf Protein- und mRNA-Ebene zeigte, dass die Th2-Zytokine auf mRNA-Ebene stimuliert und IFN- γ gehemmt wurde. Während die Zytokinsekretion konzentrationsabhängig vermindert wurde.

3.3 Beeinflussung der Aktivität von Promotoren

Zur Untersuchung der Wirkung von Patulin und Gliotoxin auf die Aktivierung von Promotoren wurde der Reportergenassay verwendet. Für den Reportergenassay wurden Jurkat-Zellen eingesetzt und transient mit den jeweiligen Promotoren transfiziert.

Unter Einfluss von 62,5 und 125 ng/ml **Patulin** wurde die Aktivität des IL-4-Promotors und im Konzentrationsbereich von 31,25 bis 125 ng/ml die Aktivität des IL-13-Promotors signifikant erhöht (Abb. 3.14), während auf den IFN- γ -Promotor kein Einfluss beobachtet wurde. Die Aktivität des NF κ B-abhängigen Promotors wurde konzentrationsabhängig gehemmt und erreichte bei der höchsten Patulin-Konzentration (125 ng/ml) ein signifikantes Niveau.

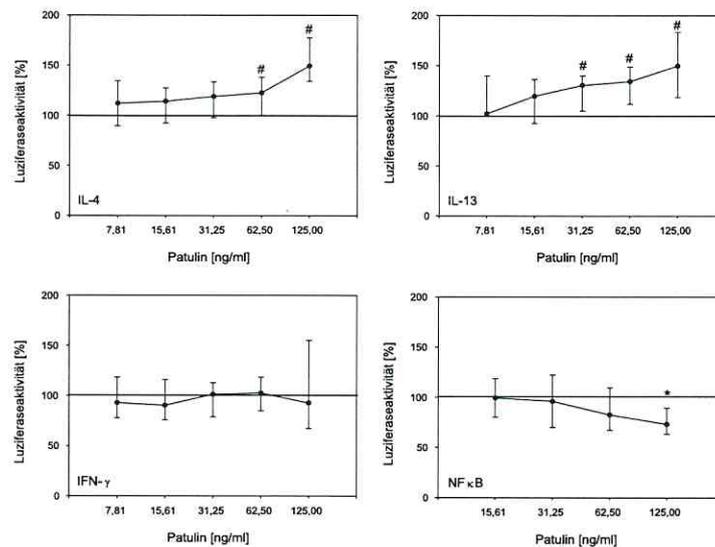


Abbildung 3.14: Einfluss von Patulin auf die Aktivität der IL-4, IL-13, IFN- γ und NF κ B-Promotoren transient transfizierter Jurkat-Zellen über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) und eine signifikante Stimulation mit einem Nummernzeichen (#) über dem Punkt gekennzeichnet.

Gliotoxin bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität der IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Promotoren. Die Aktivität des IL-4-Promotors wurde im Konzentrationsbereich von 31,25 bis 125 ng/ml Gliotoxin signifikant gehemmt. Auch die IL-13-Promotoraktivität wurde durch Gliotoxin unterdrückt. Signifikante Effekte wurden jedoch nur bei 7,81; 15,63 und 125 ng/ml Gliotoxin beobachtet. Bei niedrigen Konzentrationen von Gliotoxin konnte eine leichte Stimulation der Aktivität des IFN- γ -Promotors festgestellt werden, die sich jedoch nicht statistisch signifikant sichern ließ. In den höchsten Konzentrationen (62,5 - 125 ng/ml) konnte eine statistisch signifikante Hemmung ermittelt werden. Die Aktivität des NF κ B-abhängigen Promotors wurde im gesamten Konzentrationsbereich gehemmt (20%) und erreichte im Bereich von 7,81 bis 125 ng/ml Gliotoxin das Signifikanzniveau.

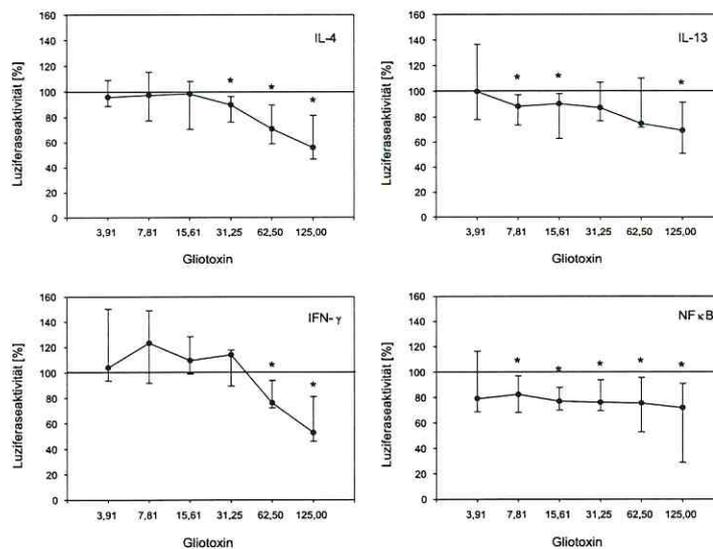


Abbildung 3.15: Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivität der IL-4, IL-13, IFN- γ und NF κ B-Promotoren transient transfizierter Jurkat-Zellen über 24 h. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 5 unabhängigen Experimenten. Dargestellt ist die prozentuale Luziferaseaktivität bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

3.4 Beeinflussung der Signaltransduktion

Um zu klären, welche Signalwege bei der beobachteten Hemmung der Zytokinsekretion beteiligt sind, erfolgte die Untersuchung der Expression von $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6. Diese Proteine können im Rahmen der Regulation der Th1/Th2-Differenzierung eine Rolle spielen. Dafür wurden mit Mykotoxinen vorbehandelten PBMC mit anti-CD3 und anti-CD28 für 1 h in Gegenwart der Mykotoxine stimuliert. Die Expression der Proteine $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6 bzw. deren phosphorylierte Formen wurde mittels Western Blotting untersucht. Jeweils drei Experimente mit humanen PBMC von unterschiedlichen Spendern wurden durchgeführt. Für die Abbildung wurde jeweils ein repräsentatives Ergebnis ausgewählt. Die Mykotoxine wurden in den Konzentrationen eingesetzt, die eine signifikante Hemmung der Zytokinsekretion induzierten.

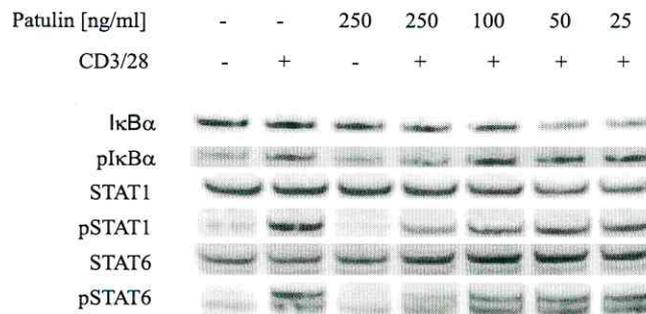


Abbildung 3.16: Der Einfluss von Patulin auf die Expression und Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6. Die mit den Patulin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit anti-CD3/28 stimuliert. Spalte 1: unstimulierte Kontrolle, Spalte 2: stimulierte Kontrolle, Spalte 3: unstimulierte Patulinkontrolle.

Die Stimulation der humanen PBMC führte zu einer deutlichen Verstärkung der Phosphorylierung (Abb. 3.16, 3.18 Spalte 1 und 2). Dies wird besonders deutlich bei STAT1 und STAT6.

Patulin bewirkte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung aller untersuchten Signalproteine (Abb. 3.16). Die Phosphorylierung also die Aktivierung des STAT1-Proteins wurde im gesamten Konzentrationsbereich gehemmt, während die Aktivierung von $I\kappa B\alpha$ nur bei 250 ng/ml leicht vermindert war. Die

beobachteten Doppelbanden für STAT6 wurden nur bei einem Experiment nachgewiesen. Das dargestellte Experiment zeigte eine leichte Erhöhung der Phosphorylierung des STAT6-Proteins, dies konnte bei den anderen Experimenten nicht bestätigt werden. Weitere Experimente mit einer geringeren Konzentration könnten vielleicht die beobachtete Stimulation von STAT6 nachweisen. Die zusammengefassten Ergebnisse für den Einfluss auf die Aktivierung der Signalproteine sind in der Abbildung 3.17 dargestellt.

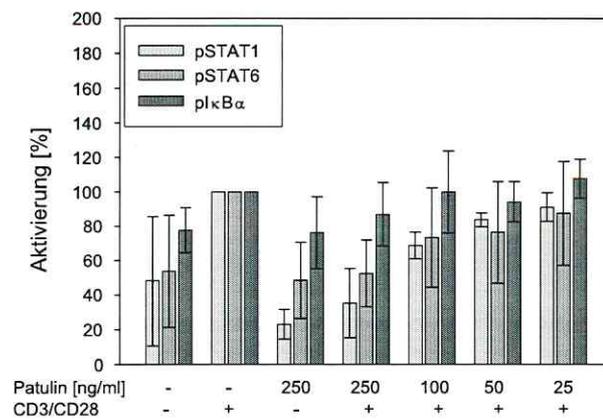


Abbildung 3.17: Der Einfluss von Patulin auf die Phosphorylierung von STAT1, STAT6 und IκBα. Die mit den Patulin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Der Nachweis von STAT1, STAT6 und IκBα erfolgte mittels Western Blotting. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der zusammengefassten Ergebnisse. Gezeigt sind die Intensitäten, die auf die stimulierte Kontrolle bezogen wurden.

Der Vergleich der durchgeführten Experimente für Patulin ergab eine konzentrationsabhängige Hemmung der STAT1-Phosphorylierung, während eine Hemmung der STAT6-Aktivierung nur bei der höchsten Konzentration von 250 ng/ml ermittelt wurde (Abb. 3.17). Die Phosphorylierung von IκBα wurde durch Patulin nicht beeinflusst.

Nach Behandlung mit **Gliotoxin** wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung von STAT1, STAT6 und IκBα festgestellt (Abb. 3.18). Besonders deutlich wurde diese Hemmung bei der Phosphorylierung der beiden STAT-

Faktoren. Die Phosphorylierung des $I\kappa B\alpha$ -Proteins wurde bis zu einer Konzentration von 50 ng/ml Gliotoxin unterdrückt. Die zusammengefassten Ergebnisse für den Einfluss auf die Aktivierung der Signalproteine sind der Abbildung 3.19 dargestellt.

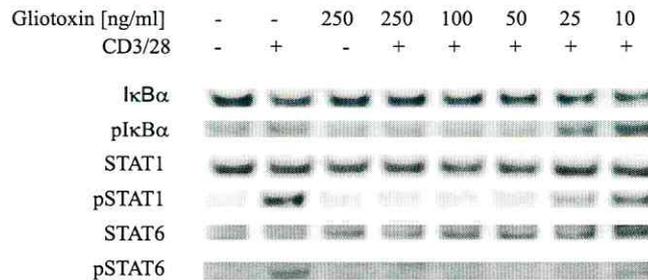


Abbildung 3.18: Der Einfluss von Gliotoxin auf die Expression und Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6. Die mit den Gliotoxin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit CD3/28 stimuliert. Spalte 1: unstimulierte Kontrolle, Spalte 2: stimulierte Kontrolle, Spalte 3: unstimulierte Gliotoxinkontrolle.

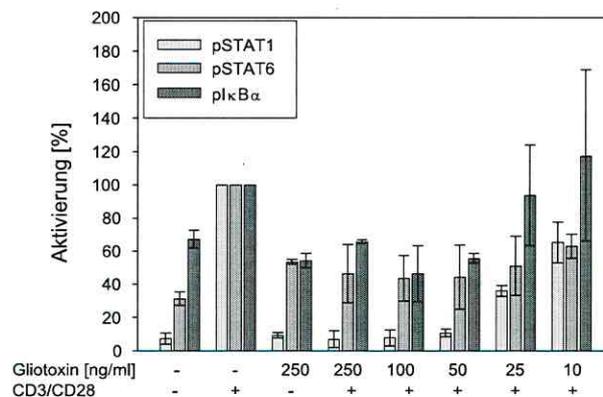


Abbildung 3.19: Der Einfluss von Gliotoxin auf die Phosphorylierung von STAT1, STAT6 und $I\kappa B\alpha$. Die mit den Patulin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert. Der Nachweis von STAT1, STAT6 und $I\kappa B\alpha$ erfolgte mittels Western Blotting. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der zusammengefassten Ergebnisse. Gezeigt sind die Intensitäten, die auf die stimulierte Kontrolle bezogen wurden.

Wie schon in der Abbildung 3.18 konnte auch im Vergleich der durchgeführten

Experimente eine durch Gliotoxin bewirkte Hemmung aller untersuchten Signalproteine beobachtet werden (Abb. 3.19). Durch 50 bis 250 ng/ml Gliotoxin konnte eine 40 - 50%ige Hemmung der Phosphorylierung für $I\kappa B\alpha$ und STAT6 beobachtet werden. Dies entspricht der Phosphorylierung der unstimulierten Kontrolle. Ab 25 ng/ml konnte auf die Aktivierung von $I\kappa B\alpha$ keine hemmende Wirkung festgestellt werden, während die Phosphorylierung von STAT1 und STAT6 in im gesamten Konzentrationsbereich von 10 bis 250 ng/ml Gliotoxin gehemmt wurde.

Unter Einwirkung von **Ochratoxin A** wurde ebenfalls eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylierung der STAT-Faktoren verzeichnet, während die Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ durch Ochratoxin A nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.20). Die größte Hemmwirkung wurde bei der STAT1-Phosphorylierung beobachtet. Dies konnte auch im Vergleich mit den anderen Experimenten bestätigt werden. Der Vergleich der Experimente zeigte eine große Schwankung im Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT6 und $I\kappa B\alpha$. Es wurden sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte auf die STAT6- und $I\kappa B\alpha$ -Aktivierung beobachtet. Es konnte keine Aussage über den Einfluss von Ochratoxin A auf die Phosphorylierung von STAT6 und $I\kappa B\alpha$ getroffen werden.

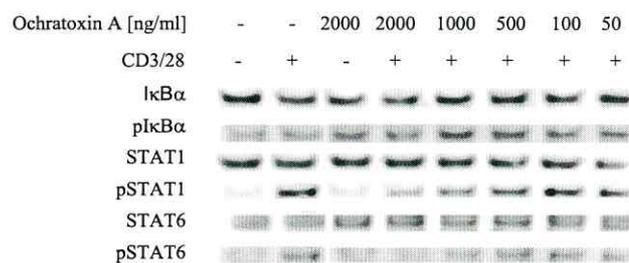


Abbildung 3.20: Der Einfluss von Ochratoxin A auf die Expression und Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6. Die mit den Ochratoxin A vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit CD3/28 stimuliert. Spalte 1: unstimulierte Kontrolle, Spalte 2: stimulierte Kontrolle, Spalte 3: unstimulierte Ochratoxin A-Kontrolle.

Citrinin verursachte in der höchsten Konzentration von 12,8 $\mu\text{g/ml}$ eine geringe Hemmung der Phosphorylierung von STAT1 (Abb. 3.21). Eine Hemmung der Phosphorylierung von STAT6 konnte bis zu 10,24 $\mu\text{g/ml}$ festgestellt werden. Die Expression des STAT6-Proteins wurde unter Einfluss von Citrinin beeinträchtigt, dabei zeigte sich keine Konzentrationsabhängigkeit. Die Expression des unphosphorylierten STAT6 war bei der stimulierten Kontrolle reduziert. Dies deutet auf eine zu niedrige Proteinkonzentration verglichen mit den anderen Ansätzen hin. Die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ blieb durch Citrinin unverändert. Der Vergleich aller Experimente zeigte eine Hemmung der STAT1-Phosphorylierung bei der höchsten Konzentration, eine geringe Hemmung konnte bei 8,2 und 10,24 $\mu\text{g/ml}$ beobachtet werden, während in den beiden niedrigsten Konzentrationen kein hemmender Einfluss festgestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Phosphorylierung von STAT6 wurde bei den beiden höchsten Konzentrationen negativ beeinflusst. Wie bei der Phosphorylierung von STAT6 konnte auch bei der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Phosphorylierung eine hohe Schwankung verzeichnet werden. Ein direkter Einfluss auf die Aktivierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ konnte im Vergleich der Experimente mit Citrinin nicht beobachtet werden. Es konnte kein Unterschied zwischen der unstimulierten und stimulierten Kontrolle in Bezug auf die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ festgestellt werden.

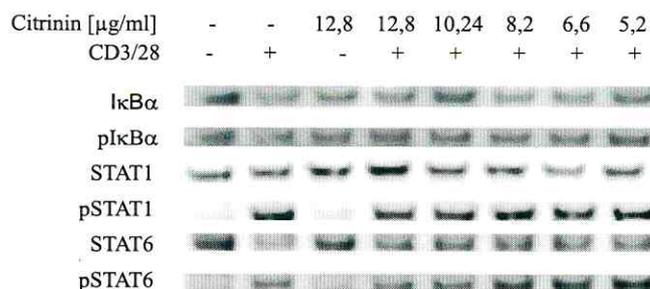


Abbildung 3.21: Der Einfluss von Citrinin auf die Expression und Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, STAT1 und STAT6. Die mit den Citrinin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit CD3/28 stimuliert. Spalte 1: unstimulierte Kontrolle, Spalte 2: stimulierte Kontrolle, Spalte 3: unstimulierte Citrininkontrolle.

Die Aktivierung der STAT-Faktoren wurde bei Behandlung mit **T-2 Toxin** konzentrationsabhängig vermindert (Abb. 3.22). Die Phosphorylierung des $I\kappa B\alpha$ wurde beim dargestellten Experiment im gesamten Konzentrationsbereich leicht gehemmt. Dies konnte im Vergleich mit den anderen Experimenten nicht bestätigt werden. Eine Verminderung der Expression von $I\kappa B\alpha$ wurde beobachtet, diese war konzentrationsunabhängig. Die Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ wurde im Vergleich aller Experimente nicht beeinflusst, wie bei Citrinin zeigte sich auch hier kein Unterschied zwischen der unstimulierten und stimulierten Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Eine Hemmung der STAT1- und der STAT6-Phosphorylierung konnte im Bereich von 1,6 - 1,04 ng/ml für STAT1 und im Bereich von 1,6 - 0,7 ng/ml T-2 Toxin für STAT6 beobachtet werden. Dabei konnte eine große Schwankung der Daten ermittelt werden.

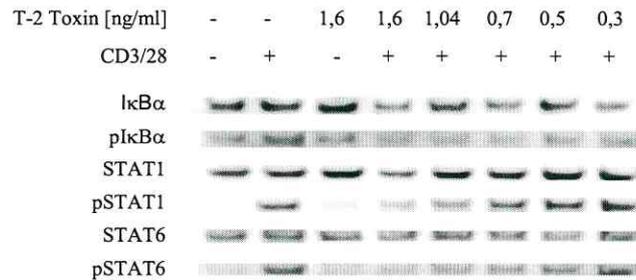


Abbildung 3.22: Der Einfluss von T-2 Toxin auf die Expression und Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$, STAT1 und STAT6. Die mit den T-2 Toxin vorbehandelten PBMC wurden für 1 h mit CD3/28 stimuliert. Spalte 1: unstimulierte Kontrolle, Spalte 2: stimulierte Kontrolle, Spalte 3: unstimulierte T-2 Toxin-Kontrolle.

Die getesteten Mykotoxine zeigten unterschiedliche Wirkungen. Patulin, Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin beeinträchtigten die Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ kaum (Abb. 3.16, 3.20, 3.21, 3.22). Alle Mykotoxine zeigten einen hemmenden Einfluss auf die STAT1-Phosphorylierung. Der Einfluss auf die STAT6-Aktivierung unterlag bei Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin großen Schwankungen. Eine Hemmung der STAT6-Phosphorylierung konnte bei Gliotoxin (über den gesamten Konzentrationsbereich), bei Citrinin und T-2 Toxin beobachtet werden. Bei Patulin und Gliotoxin wurden die gleichen Konzentrationen untersucht. Der Vergleich dieser beiden Mykotoxine zeigte, dass Gliotoxin die größeren Effekte auf die Phosphorylierung der Signalproteine ausübte.

3.5 Kombinationseffekte der Mykotoxine

Um Kombinationseffekte mehrerer Mykotoxine auf die Zytokinsekretion humaner PBMC zu untersuchen, wurden diese mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD3 und anti-CD28 stimuliert und mit verschiedenen Mykotoxinen gleichzeitig inkubiert.

Die Untersuchung der Kombinationseffekte erfolgte anhand der Hemmung der IFN- γ -Sekretion. IC₅₀-(50% Hemmung)- bzw. IC₂₀-Werte (20%-Hemmung) wurden kalkuliert. Die Mischungen wurden jeweils in einem festen Verhältnis der IC₅₀- bzw. der IC₂₀-Werte mit einer seriellen Verdünnung durchgeführt.

Mit Hilfe der Kombinationsexperimente sollte untersucht werden, ob sich die Effekte der einzelnen Mykotoxine verstärken können, wenn sie als Mischung appliziert werden und ob eine Aussage zu Unabhängiger Wirkung bzw. Konzentrationsadditivität der Mykotoxine getroffen werden kann. Dafür wurden die Vorhersagekonzepte der Konzentrationsaddition und der Unabhängigen Wirkung zu Hilfe genommen. Anhand der IC₂₀-Mischung bei drei und vier Mykotoxinen erfolgte die Untersuchung, ob sich Kombinationseffekte auch nachweisen lassen, wenn die Einzelverbindungen in niedrigen Effektkonzentrationen vorliegen.

Bei der Untersuchung von Kombinationseffekten von Chemikalien ist es allgemein üblich, Hemmeffekte gegen die Konzentration aufzutragen. Die graphische Darstellung in den folgenden Abschnitten unterscheidet sich deshalb von der bisher gewählten Form.

In der Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der Mischung mit **Gliotoxin** und **Citrinin** dargestellt. Durch den Vergleich mit den Einzeleffekten von Gliotoxin und Citrinin (Abb. 3.23 B) wurde eine stärkere Hemmung der IFN- γ -Sekretion der Mischung ermittelt. Die beobachteten Effekte lagen mit den Medianen auf der Kurve des Konzeptes der Konzentrationsadditivität (Abb. 3.23 C), während die Schwankung der Ergebnisse die Kurve des Vorhersagekonzeptes der Unabhängigen Wirkung einschloss. Dies lässt den Schluss zu, dass das Konzept der Konzentrationsadditivität die Mischungseffekte am besten beschreibt.

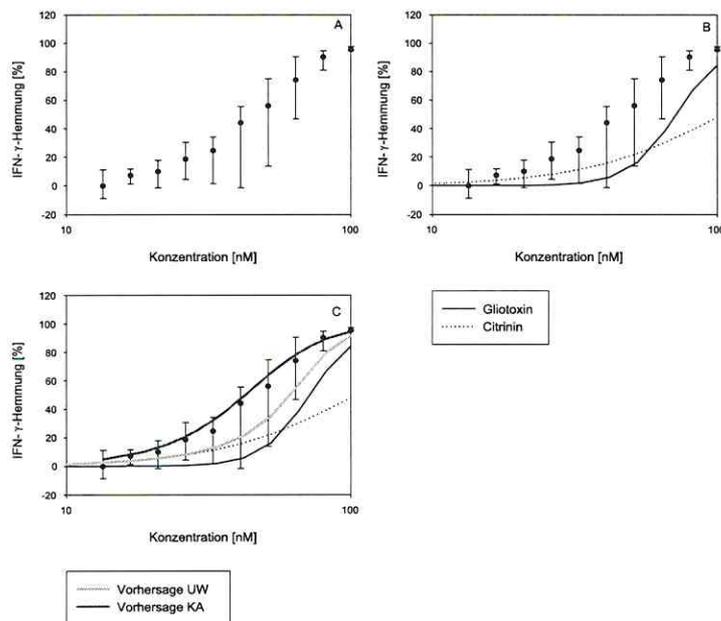


Abbildung 3.23: Kombinationseffekt der Gliotoxin-Citrinin-Mischung. Gezeigt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Spendern (A). Zusätzlich sind die Einzeleffekte der Mykotoxine in den Konzentrationen, die sie in der Mischung haben, dargestellt (B) sowie die zwei Modelle der Vorhersagekonzepte Unabhängige Wirkung (UW) und Konzentrationsadditivität (KA) (C).

Es wurde ebenfalls eine stärkere Hemmung der IFN- γ -Sekretion durch die **Patulin-Gliotoxin-Mischung** im Vergleich mit den Effekten der einzeln applizierten Mykotoxine Patulin und Gliotoxin beobachtet (Abb. 3.24 B). Die Einzeleffekte lagen nah beieinander. Eine Aussage welches Vorhersagemodell die Mischung am besten beschreibt, konnte nicht getroffen werden, da kein Unterschied zwischen den Kurven der beiden Modelle erkennbar war (Abb. 3.24 C). Patulin und Gliotoxin könnten demnach entweder unabhängig oder konzentrationsadditiv wirken.

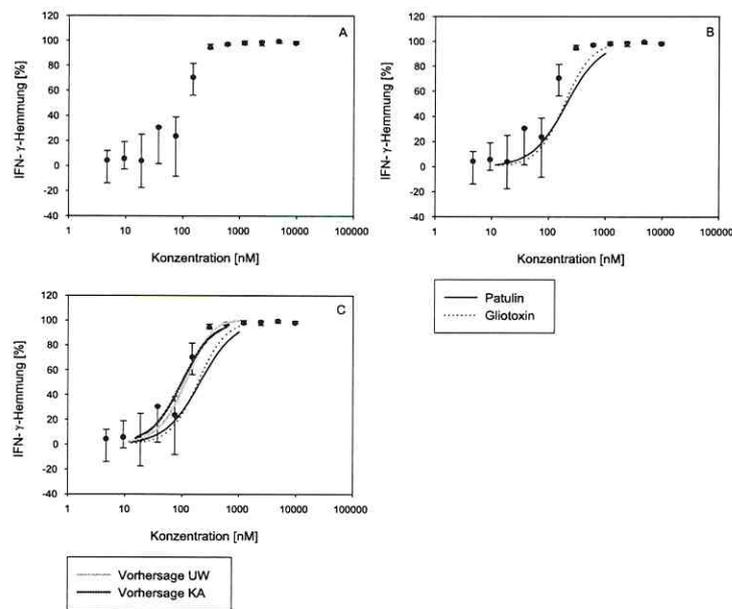


Abbildung 3.24: Kombinationseffekt der Patulin-Gliotoxin-Mischung auf die IFN- γ -Sekretion anti-CD3/CD28 stimulierter humaner PBMC. Gezeigt sind die Mediane sowie die 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen (A), sowie die Einzeleffekte der Mykotoxine in den Konzentrationen, die sie in der Mischung haben (B), und die zwei Modelle der Vorhersagekonzepte Unabhängige Wirkung (UW) und Konzentrationsadditivität (KA) (C).

Neben der Sekretion von IFN- γ wurde bei den Mischungen im Kulturüberstand auch die Sekretion der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 mittels ELISA gemessen. Für die Mischung mit **Patulin, Gliotoxin und Ochratoxin A** wurde die Hemmung der Zytokinsekretion in Abbildung 3.25 dargestellt. Wie bereits bei der Exposition gegenüber Patulin bzw. Gliotoxin beobachtet, wurde die Sekretion des Th1-Zytokins in niedrigeren Konzentrationen gehemmt als der Th2-Zytokine. Der Unterschied in der Hemmung der Sekretion der verschiedenen Zytokine ist in der Abbildung 3.26 mit den entsprechenden p-Werten dargestellt.

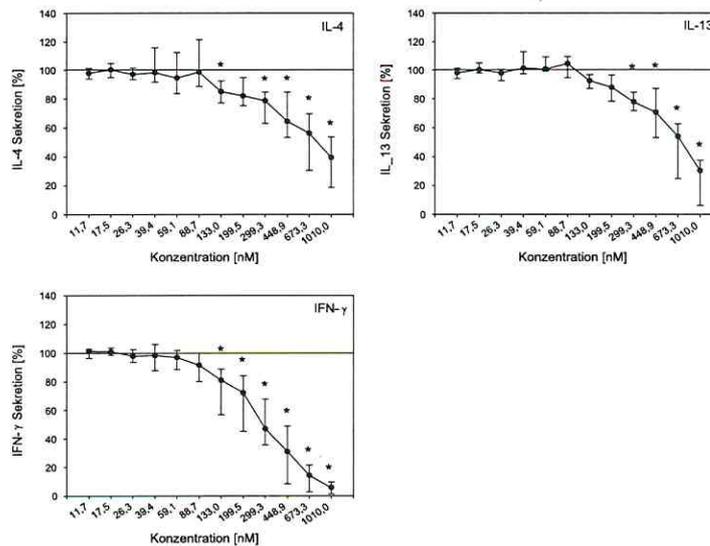


Abbildung 3.25: Einfluss der Mischung mit den drei Mykotoxinen Patulin, Gliotoxin und Ochratoxin A auf die Zytokinproduktion CD3/CD28 stimulierter PBMC über 24 h. Die Mischung erfolgte in einem festen Verhältnis der IC20-Werte der IFN- γ -Sekretion beginnend ab einer Konzentration von 1010 nM. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Spendern. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Signifikante Hemmung ($p < 0,05$) ist mit einem Stern (*) über dem Punkt gekennzeichnet.

Die Sekretion von IL-4 und IFN- γ (siehe Abb. 3.26 A) unterschied sich signifikant in einem Konzentrationsbereich von 299,3 bis 1010 nM der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Mischung. Ab 448,9 nM konnte durch die Mischung der drei Mykotoxine ein signifikanter Unterschied zwischen der Sekretion von IL-13 und IFN- γ ermit-

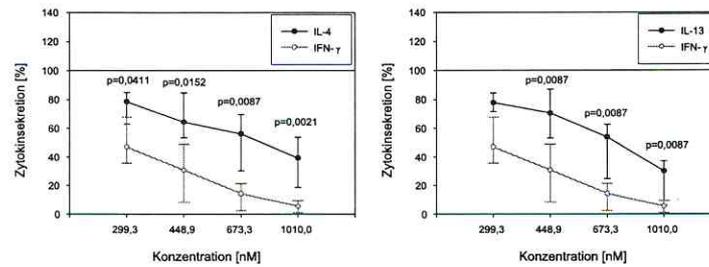


Abbildung 3.26: Differenter Einfluss der Mischung mit den drei Mykotoxinen Patulin, Gliotoxin und Ochratoxin A auf die Zytokinsekretion anti-CD3/CD28 stimulierter PBMC über 24 h. Die Mischung erfolgte in einem festen Verhältnis der IC20-Werte der IFN- γ -Sekretion beginnend ab einer Konzentration von 1010 nM. Gezeigt sind die Mediane sowie 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen. Dargestellt ist die prozentuale Zytokinsekretion bezogen auf die Kontrolle. Gezeigt sind die im Mann-Whitney-U-Test ermittelten p-Werte für den Vergleich der normierten Zytokinsekretionen. A) Unterschied zwischen IL-4 und IFN- γ und B) Unterschied zwischen IL-13 und IFN- γ .

telt werden (siehe Abb. 3.26 B). Die höchste Konzentration der Mischung bewirkte eine 94%ige Hemmung der IFN- γ - und eine 60%ige Hemmung der IL-4-Sekretion. Die Konzentration der einzelnen Mykotoxine betrug in der höchsten Konzentration der Mischung 32,4 ng/ml Patulin, 35,9 ng/ml Gliotoxin und 278,62 ng/ml Ochratoxin A. In der Dosiswirkungsbeziehung von Patulin allein konnte bei 31,25 ng/ml eine 60%ige Hemmung der IFN- γ - und eine 22%ige Hemmung der IL-4-Sekretion beobachtet werden, während bei 31,25 ng/ml Gliotoxin eine 70%ige Hemmung der IFN- γ -Sekretion und eine Erhöhung der IL-4-Sekretion um 10% gefunden wurde. Damit konnte ein geringerer Effekt der Mischung in Bezug auf die unterschiedliche Hemmung von Th1- und Th2-Zytokinen ermittelt werden.

In der Abbildung 3.27 sind die Ergebnisse der Mischung mit den drei Mykotoxinen **Patulin**, **Gliotoxin** und **Ochratoxin A** in Bezug auf die IFN- γ -Sekretion dargestellt. Im Vergleich mit den Einzeleffekten der Mykotoxine Patulin, Gliotoxin und Ochratoxin A wurde eine stärkere Hemmung der IFN- γ -Sekretion beobachtet (Abb. 3.27 B). Die Kurven der Modelle der beiden Vorhersagekonzepte lagen nah aneinander (Abb. 3.27 C), so dass eine Entscheidung, ob das Konzept der Unabhängigen Wirkung oder der Konzentrationsadditivität die Kombinationseffekte am besten beschreibt, nicht getroffen werden konnte.

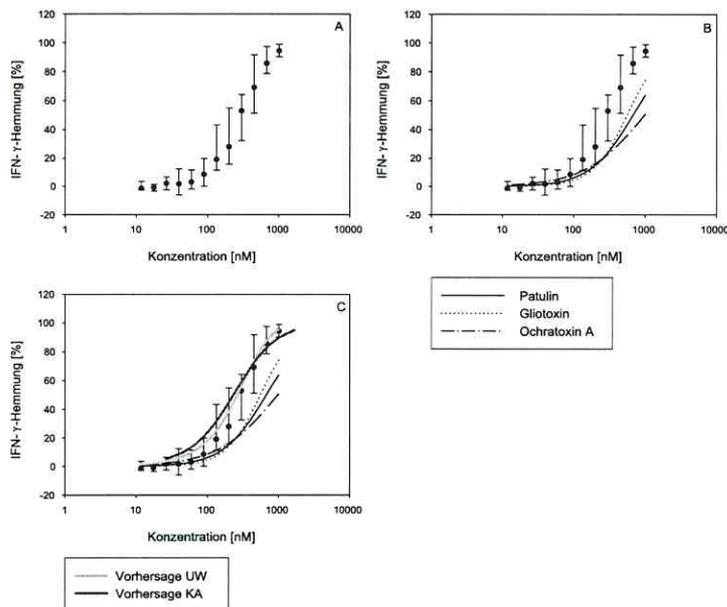


Abbildung 3.27: Kombinationseffekt der Patulin-Gliotoxin-Ochratoxin A-Mischung auf die IFN- γ -Sekretion anti-CD3/CD28 stimulierter humaner PBMC. Gezeigt sind die Mediane sowie die 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Versuchen (A), sowie die Einzeleffekte der Mykotoxine in den Konzentrationen, die sie in der Mischung haben, (B) und die zwei Modelle der Vorhersagekonzepte Unabhängige Wirkung (UW) und Konzentrationsadditivität (KA) (C).

Bei der Vierstoffmischung mit den Mykotoxinen **Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A und Citrinin** wurde eine stärkere Hemmung der IFN- γ -Sekretion im Vergleich mit den Einzeleffekten der Mykotoxine gefunden (Abb. 3.28 B). Von den Modellen der beiden Vorhersagekonzepte Unabhängige Wirkung und Konzentrationsadditivität (Abb. 3.28 C) beschreibt das Modell der Unabhängigen Wirkung die Messergebnisse innerhalb der Schwankungen am besten. Alle vier Mykotoxine scheinen danach unabhängig voneinander zu wirken.

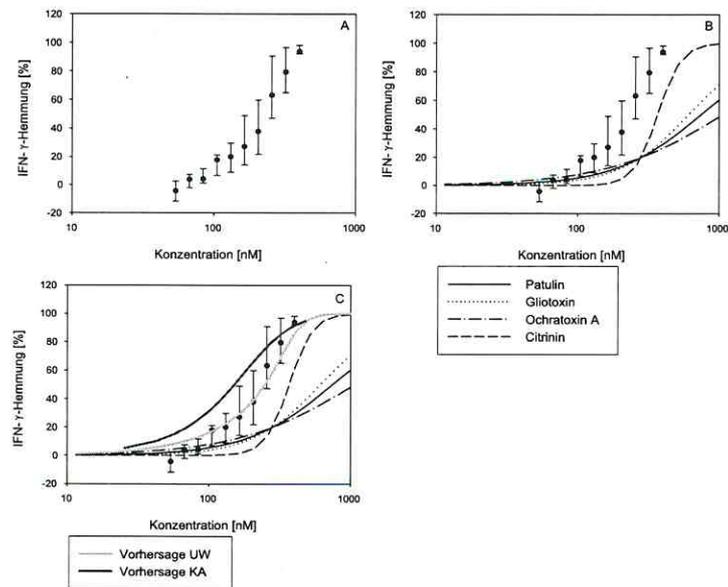


Abbildung 3.28: Kombinationseffekt der Mischung mit Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A und Citrinin auf die IFN- γ -Sekretion anti-CD3/CD28 stimulierter humaner PBMC. Gezeigt sind die Mediane sowie die 25./75.-Perzentile der zusammengefassten Ergebnisse von 6 Spendern (A), sowie die Einzeleffekte der Mykotoxine in den Konzentrationen, die sie in der Mischung haben, (B) und die zwei Modelle der Vorhersagekonzepte Unabhängige Wirkung (UW) und Konzentrationsadditivität (KA) (C).

Kapitel 4

Diskussion

Im Rahmen der LARS-Studie (Leipziger Allergie-Risikokinder-Studie) wurde versucht, umweltrelevante Risikofaktoren zu detektieren, die in Zusammenhang mit einer späteren allergischen Erkrankung stehen können. Schimmelpilze beeinflussen die Gesundheit auf verschiedenen Wegen, wobei gattungsabhängige Gesundheitseffekte beobachtet wurden [Müller et al., 2002]. Es wurde ein Zusammenhang zwischen *Penicillium* im Innenraum und Erkrankungen des Respirationstraktes, sowie zwischen *Aspergillus* und allergischer Sensibilisierung gegen Inhalationsallergene gefunden.

Innerhalb LARS wurde auch festgestellt, dass die Exposition gegenüber Schimmelpilzen mit einer verminderten Anzahl IFN- γ -produzierenden Th1-Zellen im peripheren Blut von Kindern verbunden ist [Lehmann et al., 2003]. Es wurde vermutet, dass Mykotoxine für die beobachtete Hemmung der Th1-Reaktivität verantwortlich sind. Auf der Basis dieser verminderten Th1-Reaktivität könnte sich auch eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber allergischen Erkrankungen entwickeln. Bisher wurden wenige Untersuchungen zu möglichen Allergie-vermittelnden Effekten von Mykotoxinen durchgeführt. Die Hypothese, dass u. a. Mykotoxine verantwortlich dafür sind, dass sich unter dem Einfluss von Schimmelpilzen Allergien entwickeln und zwar nicht nur gegen Schimmelpilzallergene, sondern auch gegen andere Allergene, wie z. B. Gräserpollen [Müller et al., 2002], konnte bisher nicht belegt werden. Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob Mykotoxine das Immunsystem in Richtung einer Th2-Dominanz verschieben können und damit ein Allergierisiko bewirken. Untersucht wurden mögliche immunmodulatorische Effekte der Mykotoxine Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin.

4.1 Toxische Effekte von Mykotoxinen

Um die Vitalität der PBMC zu untersuchen wurde der MTT-Test verwendet. Dieser Test ist ein kolorimetrisches Verfahren, das auf der Fähigkeit des mitochondrialen Enzyms Succinatdehydrogenase, sowie zytosolische Dehydrogenasen und Flavinoxidasen beruht, das gelbe MTT-Salz zu einem unlöslichen, blavioletten Produkt zu reduzieren [Mosmann, Burdon et al., 1993, Liu et al., 1997]. Die Menge an entstandenem, blauem Formazan-Produkt verhält sich direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Alle untersuchten Mykotoxine (Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin) führten zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Vitalität humaner PBMC. Dabei zeigte sich, dass das T-2 Toxin ($IC_{50} = 15,2$ ng/ml) das potenteste Mykotoxin ist. In Reihenfolge ihrer zytotoxischen Potenz folgen Gliotoxin ($IC_{50} = 143,7$ ng/ml) < Patulin ($IC_{50} = 2086$ ng/ml) < Ochratoxin A ($IC_{50} = 2866,2$ ng/ml) < Citrinin ($IC_{50} = 41510$ ng/ml).

Es erfolgten außer in der vorgelegten Arbeit nur wenige Untersuchungen zu zytotoxischen Effekten von Mykotoxinen auf humane PBMC [Wichmann et al., 2002, Thuvander et al., 1999, Meko et al., 2001, Berek et al., 2001], dabei wurden der MTT-Test [Wichmann et al., 2002, Meko et al., 2001] und ein Lymphozytenproliferationstest mit Hilfe von radioaktivmarkierten Thymidin [Thuvander et al., 1999, Berek et al., 2001] verwendet. Die von Wichmann und Mitarbeiter beobachtete Reihenfolge der Mykotoxine Gliotoxin > Patulin > Citrinin, geordnet anhand ihrer zytotoxischen Potenz, konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden [Wichmann et al., 2002]. Ein mit Hilfe des Lymphozytenproliferationstestes ermittelter IC_{50} -Wert von 1,3 ng/ml wurde für T-2 Toxin gefunden [Thuvander et al., 1999]. Eine 50%ige Hemmung der Vitalität wurde zwischen 1 und 5 ng/ml T-2 Toxin ermittelt [Meko et al., 2001], während in der vorliegenden Arbeit ein Wert von 15,2 ng/ml beobachtet werden konnte. Gründe für den Unterschied könnten sein, dass die humanen PBMC über einen längeren Zeitraum (72h [Thuvander et al., 1999] bzw. 5d [Meko et al., 2001]) inkubiert, mit PHA stimuliert und ein anderer Vitalitätstest verwendet wurde [Thuvander et al., 1999].

Anhand von Zelllinien erfolgten viele Untersuchungen zum Einfluss von Mykotoxinen auf die Vitalität der Zellen [Ueno et al., 1995, Schulz et al., 2004, Calvert et al.,

2005, Lewis et al., 1999, Marin et al., 1996, Kitabatake et al., 1993, Lee et al., 1999, Hanelt et al., 1994, Minervini et al., 2005, Visconti et al., 1991]. Anhand einer humanen bronchialen Epithelzelllinie konnte T-2 Toxin als das potenteste zytotoxische Mykotoxin identifiziert werden [Lewis et al., 1999]. Patulin und Ochratoxin A lagen in ihrer Potenz zurück. Gliotoxin wurde anhand der hemmenden Effekte auf die Vitalität der Lungenepithelzelllinie A549 als das zytotoxischste Mykotoxin ermittelt gefolgt von Patulin > Ochratoxin A > Citrinin [Schulz et al., 2004]. Diese beiden Arbeiten bestätigen die in der vorliegenden Dissertation gefundenen Daten. Wenige Arbeiten beschäftigen sich mit Zelllinien des Immunsystems [Ueno et al., 1995, Marin et al., 1996, Minervini et al., 2005]. IC₅₀-Werte wurden anhand der Hemmung der Vitalität in einer Promyelozyten-Zelllinie (HL60-Zellen) mittels MTT-Test von 4 ng/ml für T-2 Toxin, 4,4 µg/ml für Ochratoxin A und 4,0 µg/ml für Citrinin ermittelt [Ueno et al., 1995]. Die HL60 Zellen wurden für 24 h in Gegenwart der Mykotoxine inkubiert und anschließend der MTT-Test durchgeführt [Ueno et al., 1995]. Citrinin und T-2 Toxin zeigten sich in der präsentierten Arbeit mit einem IC₅₀-Wert von 41,51 µg/ml für Citrinin und 15,2 ng/ml für T-2 Toxin weniger potent, während Ochratoxin A mit 2866,23 ng/ml zytotoxischer wirkte. Für Citrinin und T-2 Toxin zeigten sich die promyelotischen Leukämiezellen empfindlicher als die humanen PBMC. Zytotoxische Effekte von Ochratoxin A konnten ab einer Konzentration von 10000 ng/ml bei PMA-stimulierten EL4-Zellen beobachtet werden [Marin et al., 1996]. Der zytotoxische Effekt von T-2 Toxin wurde sowohl an einer T- als auch an einer B-Lymphozyten Zelllinie untersucht und IC₅₀-Werte von 0,2 ng/ml (B-Lymphozytenzelllinie; IM-9) und 0,6 µg/ml (T-Lymphozytenzelllinie; MOLT-4) ermittelt [Minervini et al., 2005]. Die humanen PBMC sind demnach empfindlicher als die HL60-, EL4- und MOLT-4-Zellen. Es wäre zu überlegen, ob für die Bewertung zytotoxischer Effekte von Mykotoxinen nicht generell primäre Zellen herangezogen werden sollten.

Alle untersuchten Mykotoxine hemmten die Vitalität der PBMC. Zusätzlich führten sie zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Zytokinsekretion. Nach Behandlung mit Patulin bzw. Gliotoxin sind die IC₅₀-Werte für IFN-γ und IL-10 viel niedriger als die IC₅₀-Werte für IL-4, IL-13 und die Vitalität. Generell sind die IC₅₀-Werte für die Vitalität für alle getesteten Mykotoxine höher als die für die Zytokinsekretion. Das bedeutet, dass die Zytokinsekretion in niedrigeren Konzentrationen

nen als die Vitalität gehemmt wird. Mykotoxine verursachen demnach Defizite in der Zytokinsekretion humaner immunkompetenter Zellen in Konzentrationen weit unterhalb der zytotoxischen Konzentrationsbereiche. Der Einfluss auf die Zytokinsekretion sollte daher in die Risikobewertung der Mykotoxine einbezogen werden. Zytokine sind involviert in allen Aspekten der Immunregulation. Eine Mykotoxin-vermittelte Dysregulation der Zytokinsekretion kann in immunsuppressiven und/oder immunstimulatorischen Effekten resultieren.

4.2 Einfluss der Mykotoxine auf immunkompetente Zellen

Gliotoxin

Die immunsuppressive Potenz von Gliotoxin ist aus der Literatur bekannt. So testeten Müllbacher und Eichner den Einfluss des Toxins auf alloreaktive zytotoxische T-Zellen *in vitro* [Mullbacher and Eichner, 1984]. Eine Hemmung der Phagozytose von TGM (Thioglykollat-induzierte peritoneale Makrophagen) wurde bei Konzentrationen von 20 - 30 ng/ml Gliotoxin festgestellt [Mullbacher and Eichner, 1984]. Diese Autoren konnten auch zeigen, dass Milz-Zellen und TGM ihre Fähigkeit, alloreaktive zytotoxische T-Zellen zu induzieren, nach Behandlung mit Gliotoxin verloren. Gliotoxin behindert wahrscheinlich in niedrigen Konzentrationen Interleukin-abhängige Prozesse jedoch nicht die Antigen-Präsentation [Mullbacher and Eichner, 1984].

Außer in der präsentierten Arbeit wurde nur von Wichmann und Mitarbeiter Untersuchungen zum Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion humaner PBMC durchgeführt [Wichmann et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion anti-CD3/CD28-stimulierter PBMC gemessen. Es zeigte sich, dass die Sekretion von IFN- γ und IL-10 im Bereich von 7,8 bis 62,5 ng/ml Gliotoxin stärker gehemmt wurde als die Sekretion von IL-4 und IL-13. Die in der vorliegenden Arbeit gefundene Hemmung der Zytokinsekretion in nicht zytotoxischen Konzentrationen konnte bestätigt werden [Wichmann et al., 2002]. In dem von Wichmann und Mitarbeiter beschriebenen Modell wurden humane PBMC ebenfalls polyklonal mit anti-CD3 und anti-CD28 über 24 h stimuliert,

allerdings unterschieden sich die verwendeten CD3-Antikörper (Wichmann et al., 2002: Klon Okt3; Krumm: Klon UHCT1). Es wurde ebenfalls eine unterschiedliche Hemmung der Sekretion der Th1- und Th2-Zytokine mit ähnlichen IC_{50} -Werten für IFN- γ und IL-4 ermittelt [Wichmann et al., 2002]. Auch auf mRNA-Ebene wurden ähnliche Effekte beobachtet. Während 100 ng/ml Gliotoxin zu einer Hemmung sowohl der IFN- γ - als auch der IL-4-Expression führten, wurde unter dem Einfluss von 1 und 10 ng/ml Gliotoxin eine leichte Stimulation der IL-4-mRNA-Expression gefunden [Wichmann et al., 2002]. Dieselbe Tendenz konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Auf mRNA-Ebene konnte unter Einwirkung von Gliotoxin eine konzentrationsabhängige Hemmung der IFN- γ -Expression festgestellt werden, während die IL-4-mRNA-Expression über dem gesamten Konzentrationsbereich von 7,8 bis 62,5 ng/ml stimuliert wurde. Der Vergleich der Zytokinexpression auf Protein- und mRNA-Ebene zeigte auf Ebene der mRNA eine größere Differenz zwischen den Th2-Zytokinen und IFN- γ .

Der unterschiedliche Effekt auf mRNA- und Protein-Ebene lässt sich dadurch erklären, dass die Analyse der mRNA-Expression eine Momentaufnahme zeigt, nämlich mRNA-Expression der Zytokine nach 24 h Stimulation und Mykotoxinexposition. Dagegen repräsentiert die Messung der Zytokinkonzentration im Kulturüberstand mittels ELISA die Zytokinsekretion über die ganze Zeit der Stimulation und Mykotoxinexposition. Neben der Zytokinsekretion spielen hierbei auch Effekte der Zytokinaufnahme in die Zellen durch das Binden an ihre spezifischen Rezeptoren, sowie Proteinabbau eine Rolle. Die PCR-Ergebnisse zur mRNA-Expression der Zytokine wurden mit der GAPDH-Expression korrigiert, um mögliche toxische Effekte durch Veränderungen der Zellzahl auszuschließen.

Nach 24 h wurde konzentrationsabhängig weniger IL-4 im Kulturüberstand gefunden, während die mRNA-Expression unter Einfluss von Gliotoxin erhöht war. Das bedeutet, dass erst nach einer gewissen Zeit die IL-4 und IL-13-mRNA-Expression als erster Schritt und dann die Proteinsekretion nachfolgend unter Einfluss von Gliotoxin stimuliert werden. Es ist zu vermuten, dass bei einer Mykotoxinexposition länger als 24 h die unterschiedliche Wirkung von Gliotoxin auf die Zytokinsekretion deutlicher wird. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass nach 48 h Inkubation mit Gliotoxin die IL-4-Sekretion stimuliert wurde, während eine Hemmung der Sekretion von IFN- γ beobachtet wurde [Wichmann et al., 2003].

Th1- und Th2-Zytokine beeinflussen sich gegenseitig und halten ein Gleichgewicht zu einander aufrecht. Eine einseitige Hemmung der IFN- γ -Expression würde demnach zu einer Überexpression der Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 führen. Dies konnte unter Einfluss von Gliotoxin gezeigt werden. Damit wird das empfindliche Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 in Richtung Th2 verschoben und das Risiko zur Ausprägung einer IgE-vermittelten allergischen Reaktion erhöht.

Obwohl die Sekretion von IFN- γ in niedrigeren Konzentrationen als IL-4 und IL-13 gehemmt und die mRNA-Expression von IL-4 induziert wurde, konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Promotoraktivität der Th1- und Th2-Zytokine unter Einfluss von Gliotoxin ermittelt werden. Demnach bewirkt Gliotoxin die Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung einer Th2-Dominanz nicht auf Ebene der Zytokin-Genpromotoren.

Die Zytokine IL-4 und IL-13 sind wichtig für die Entwicklung von allergischen Erkrankungen [Leung, 1998]. Beide induzieren in B-Lymphozyten den Isotypwechsel zu IgE, erhöhen die Expression des niederaffinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RII (CD23) und des hochaffinen IgE-Rezeptors Fc ϵ RI [Geiger et al., 2000]. Sie lösen die lokale Produktion von proinflammatorischen Chemokinen wie Eotaxin aus und bewirken so die Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Endothel [Kagami et al., 2005, Matsukura et al., 2001]. Die Differenzierung von naiven T-Zellen zu Th2-Zellen ist IL-4-abhängig und kann nicht durch IL-13 ausgelöst werden. Dennoch besitzen beide Zytokine eine enge funktionelle Verbindung. Die Verwendung der IL-13-Rezeptorkette IL-13R α 1 durch IL-4 weist auf eine enge Verbindung zwischen den beiden Zytokinen hin [Horejs-Hoeck and Duschl, 2003]. IL-4 bindet zuerst an die α -Kette des IL-4-Rezeptors (IL-4R α), was eine Assoziation der zweiten Rezeptorkette an IL-4R bewirkt. Als zweite Rezeptorkette wird entweder γ c (common gamma) oder IL-13R α 1 verwendet.

Erstmalig wurde der Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivität der IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Promotoren, sowie eines NF κ B-abhängigen Promotors innerhalb dieser Arbeit untersucht. Die Aktivität des NF κ B-abhängigen Promotors wurde im gesamten Konzentrationsbereich supprimiert.

Die Hemmung des NF κ B-Weges als ein Wirkmechanismus von Gliotoxin wurde von mehreren Gruppen nachgewiesen [Pahl et al., 1996, Kroll et al., 1999, Herfarth et al., 2000]. Die Phosphorylierung von I κ B α mit nachfolgendem Abbau korreliert

mit der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$. Deshalb wurde die Aktivierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ also die Phosphorylierung mit anschließender Degradation durch Proteolyse als Kennzeichen für die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ in der vorliegenden Arbeit verwendet. Das $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ hat im zytoplasmatischen $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Komplex ein höheren Turnover als $\text{NF}\kappa\text{B}$ selbst [Rice and Ernst, 1993]. Damit ist wahrscheinlich die hohe Grundaktivität von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ zu erklären, die auch im Rahmen dieser Arbeit gefunden wurde. Die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ wird unter Einfluss von Gliotoxin konzentrationsabhängig gehemmt. Dabei kam es zu einer Unterdrückung bis auf die Grundaktivität von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ im Konzentrationsbereich von 50 - 250 ng/ml. Durch Hemmung der Aktivierung des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ kommt es nachfolgend zur Blockierung des $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Weges. Die Unterdrückung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ führt dann zu einer selektiven Hemmung der Synthese jener Zytokine, deren Aktivierung über $\text{NF}\kappa\text{B}$ reguliert wird, wie z. B. von $\text{TNF-}\alpha$, IL-12 und nachfolgend auch $\text{IFN-}\gamma$. Damit werden durch Hemmung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ selektiv Th1-Reaktionen gehemmt.

Eine Hemmung der Aktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ wurde unter Einwirkung von Gliotoxin festgestellt [Pahl et al., 1996]. Dabei wurde die Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ in Antwort auf verschiedene Stimuli (LPS, IL-1 α , $\text{TNF-}\alpha$, PMA/PHA) gehemmt. Dies konnte durch die vorliegenden Daten bestätigt werden. Durch die Verminderung der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$ kann Gliotoxin den Signaltransduktionsweg unterbrechen, der zu einer T- und B-Zellproliferation führt [Pahl et al., 1996]. Daneben wurde diskutiert, dass die Hemmung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivierung wahrscheinlich aus einer Suppression der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteolyse resultiert [Pahl et al., 1996].

Während Kroll und Mitarbeiter herausfanden, dass Gliotoxin nicht signifikant die Phosphorylierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ stört [Kroll et al., 1999], konnte in der vorliegenden Arbeit ein inhibitorischer Einfluss auf die Aktivierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ festgestellt werden. Die beobachtete Hemmung der $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Aktivität wird durch die Gliotoxin-verursachte Suppression der Proteasomen ausgelöst [Kroll et al., 1999]. Kroll und Mitarbeiter arbeiteten mit $\text{TNF-}\alpha$ stimulierten Hela-Zellen [Kroll et al., 1999], während in der präsentierten Arbeit PBMC mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert wurden. Neben der Inhibition der Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ durch Gliotoxin [Kroll et al., 1999], muss es einen weiteren Mechanismus geben, der den supprimierenden Einfluss von Gliotoxin auf die Aktivität von $\text{NF}\kappa\text{B}$ erklärt.

Bei Untersuchungen des Einflusses von Gliotoxin auf die Aktivierung von p50 und

p65 in neutrophilen Granulozyten von Rindern wurde festgestellt, dass die Aktivierung von p50 nur minimal durch Gliotoxin beeinflusst wird, während eine signifikant niedrigere Aktivität für p65 beobachtet wurde (Notebaert et al., 2005). Diese Arbeit bestätigt den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen NF κ B-inhibitorischen Effekt von Gliotoxin.

In einem experimentellen Mausmodell wurde Gliotoxin in seiner Eigenschaft als NF κ B-Hemmer sogar therapeutisch eingesetzt [Herfarth et al., 2000]. In diesem Modell wurde Mäusen eine akute Kolitis durch DSS (*dextran sulphate sodium*) induziert. Diese Erkrankung ist gekennzeichnet durch eine Erhöhung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α und IFN- γ (Th1 dominierte Inflammation). Nach Behandlung mit Gliotoxin konnte eine Hemmung der TNF- α - und IL-1 α -Genexpression im entzündlichen Darmgewebe nachgewiesen werden [Herfarth et al., 2000]. Im Fall pathologisch inflammatorischer Reaktionen kann Gliotoxin durch seine NF κ B-inhibitorische Aktivität durchaus auch positive, also heilende Effekte ausüben. Eine längere Behandlung mit niedrigen Konzentrationen von Gliotoxin könnte neben der Hemmung der inflammatorischen Zytokine jedoch auch eine Stimulation von Th2-Zytokinen zur Folge haben und damit Erkrankungen fördern die Th2 geprägt sind, wie z. B. allergische Erkrankungen. So konnte in einem experimentellen Mausmodell festgestellt werden, dass primär nicht-suszeptible Mäuse, bedingt durch die Applikation von Gliotoxin, IgE produzieren und ein Asthma bronchiale entwickeln können (persönliche Mitteilung, Dr. Udo Herz). Eine längere Exposition gegenüber Gliotoxin auch in geringen Konzentrationen kann demnach durchaus das Risiko für die Entstehung allergischer Erkrankungen erhöhen.

Die gesamten *in vivo* Effekte von der Exposition mit der Umwelt ist im Allgemeinen das Ergebnis von komplexen zellulären Interaktionen, im Gegensatz zu Einzelzellantworten, die in *in vitro* Systemen beobachtet werden. Das Mausmodell von Dr. Udo Herz beweist jedoch, dass das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *in vitro* Modell durchaus Hinweise auf *in vivo* Effekte liefern kann.

Neben dem Einfluss von Gliotoxin auf NF κ B wurde auch der Einfluss auf die Aktivierung von STAT1, einen Transkriptionsfaktor, der durch IFN- α und - γ aktiviert wird, untersucht [Pahl et al., 1996]. Die HeLa S3-Zellen wurden erst für 12 h mit IFN- γ und anschließend 30 min mit IFN- α behandelt; Gliotoxin wurde 30 min vor Zugabe von IFN- α dem Kulturmedium zugegeben [Pahl et al., 1996]. Gliotoxin

beeinflusst in Konzentrationen kleiner gleich $10 \mu\text{g/ml}$ die Aktivierung von STAT1 nicht [Pahl et al., 1996]. Dagegen konnte in der vorliegenden Arbeit unter Einfluss von Gliotoxin eine starke Hemmung der STAT1-Aktivierung beobachtet werden. Die humanen PBMC wurden eine Stunde mit Gliotoxin vorbehandelt und anschließend eine Stunde mit anti-CD3 und anti-CD28 in Gegenwart von Gliotoxin stimuliert. Pahl und Mitarbeiter stimulierten die Zellen, was auch zu einer starken Aktivierung von STAT1 führte, bevor Gliotoxin hinzugegeben wurde [Pahl et al., 1996]. Gliotoxin kann demnach seine STAT1-inhibitorischen Effekte nur ausüben, wenn STAT1 nicht vor Zugabe von Gliotoxin aktiviert ist. Gliotoxin hemmt in der vorliegenden Arbeit die STAT1-Aktivierung im gesamten Konzentrationsbereich von 10 bis 250 ng/ml , dabei konnte bei 25 ng/ml eine Hemmung auf rund 35% STAT1-Aktivität beobachtet werden. Dies korreliert gut mit der Hemmung der IFN- γ -Sekretion. Dort wurde bei $31,25 \text{ ng/ml}$ die Sekretion auf rund 30% gehemmt. STAT1 zeigte sich empfindlicher auf die Behandlung mit Gliotoxin als die Sekretion von IFN- γ . Bei 10 ng/ml Gliotoxin konnte eine 40%ige Suppression der STAT1-Aktivierung beobachtet werden, während bei derselben Konzentration die IFN- γ -Produktion nicht beeinflusst wird.

Durch IFN- γ aktivierte STAT1-Dimere binden an GAS (gamma aktivierte Sequenzen). Dieses Element ist fähig IFN- γ -induzierte Genexpression zu steuern [Contursi et al., 2000]. Daneben wurde berichtet, dass aktiviertes STAT1 den Transkriptionsfaktor T-bet (T-Box exprimiert in T-Zellen) induzieren kann. T-bet induziert dann selbst IFN- γ in einer positiven Feedback-Schleife, sowie die IL-12R α 2-Kette, um die Stabilität des Th1-Phänotyps zu gewährleisten [Zhang et al., 2001, Afkarian et al., 2002]. In Arbeiten mit STAT1-Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese Mäuse verschiedene Defekte in ihrem Immunsystem entwickeln und für Infektionen durch Viren und Parasiten empfindlich sind [Meraz et al., 1996, Durbin et al., 1996]. Demnach führt die Hemmung von STAT1 nachfolgend zu einer fehlenden Aktivierung der IFN- γ -Sekretion. Dies konnte unter Einfluss von Gliotoxin in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Im Hinblick auf eine mögliche Rolle der Mykotoxine bei der Induktion IgE-vermittelter allergischer Reaktionen kommt der Aktivierung von STAT6, einem weiteren Transkriptionsfaktor, ebenfalls eine wichtige Bedeutung zu. Wenn die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 an ihren jeweiligen Rezeptor binden, wird die

Phosphorylierung der Rezeptoren selbst und der jeweiligen Substrate induziert. Das Signalmolekül STAT6 wird anschließend von den Janus-Kinasen phosphoryliert. Die Signalkaskade von STAT6 vermittelt viele der wichtigen Differenzierungsprozesse. Nur wenn STAT6 aktiviert ist, kommt es zur IgE-Produktion [Linehan et al., 1998]. Gliotoxin führte allerdings zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der STAT6-Phosphorylierung, was bedeutet, dass dieses Toxin keinen direkten aktivierenden Einfluss auf den STAT6-Signalweg und damit auf die IgE-Produktion ausübt. Ob die geringe Hemmung der IL-4- im Vergleich zur IFN- γ -Sekretion und die möglicherweise daraus resultierende Stimulation der IL-4-mRNA nach 24 h Exposition gegenüber Gliotoxin langfristig nicht doch zu einer STAT6-Aktivierung führen würde, kann auf Grund der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Weiterführende experimentelle Untersuchungen wären erforderlich, um diese Frage zu klären.

Um den Mechanismus der Giftigkeit von Gliotoxin zu erklären, wurde eine Hypothese aufgestellt, dass die Redoxreaktionen zwischen den reduzierten und oxidierten Formen des Gliotoxins mit der Produktion von freien Radikalen einen Zyklus durchlaufen [Eichner et al., 1988]. Während des Redoxzykluses bildet das reduzierte Gliotoxin Superoxidanion und während der Umformung der Dithiolform zu seiner Disulfidform wird das Superoxidanion in Peroxid umgewandelt [Waring and Beaver, 1996]. Peroxid ist ein potenter apoptotischer Stimulus [Matsura et al., 1999]. Daneben wurden kovalente Bindungen von Gliotoxin an zelluläre Makromoleküle als ein beitragender Faktor für seine Toxizität identifiziert [Hinson and Roberts, 1992]. Auch die im Gliotoxin enthaltene Disulfidbrücke scheint für die Wirkung des Mykotoxins wichtig zu sein. Es wurde berichtet, dass das Toxin durch seine Disulfidbrücke die Entstehung der durch NADPH-Oxidase gebildeten Sauerstoffradikale unterdrückt [Yoshida et al., 2000]. Auf der anderen Seite scheint die Disulfidbrücke auch im Fall der Hemmung der Makrophagen-Adhärenz [Mullbacher et al., 1986] und der Gliotoxin-induzierten antiviralen Aktivität [Trown and Bilello, 1972], aber nicht für das Verursachen von DNA-Brüchen [Eichner et al., 1988] wichtig zu sein. Gliotoxin induziert Apoptose in Makrophagen durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen und Cytochrom c-Freisetzung [Suen et al., 2001]. Durch die Bindung an zelluläre Makromoleküle und der reaktiven Disulfidbrücke kann Glioto-

xin in die essentiellen Funktionen der Zelle eingreifen, in dem es an Signalproteine oder Enzyme kovalent bindet und damit die Funktionstüchtigkeit dieser Proteine einschränkt. Dies kann zu einer Veränderung der Immunreaktivität führen.



Abbildung 4.1: Struktur von Gliotoxin

Gliotoxin wird von verschiedenen Zelltypen aufgenommen [Waring et al., 1994]. Untersucht wurden die Tumorzelllinien EL-4, P815, 3T3 und 293, die humane Fibroblasten Zelllinie 27Sk, die humane Lungen-Zelllinie 16Lu und die Wilm's Tumor G-40l Zelllinie sowie peritoneale Makrophagen und T-Zellen aus weiblichen BALB/c Mäusen auf ihre Fähigkeit Gliotoxin aufzunehmen [Waring et al., 1994]. Die Aufnahme in transformierte Zellen erfolgte innerhalb einer Minute, während in primären Zellen die Aufnahme nach 10 - 15 min abgeschlossen war [Waring et al., 1994]. Dabei konnte der Unterschied in der Kinetik der Aufnahme nicht erklärt werden. Einen Hinweis über welchen Mechanismus die Aufnahme erfolgt, konnte nicht ermittelt werden.

Patulin

Patulin ist in den Mittelpunkt des Interesses getreten, nachdem es in verschimmelten Äpfeln und Apfel-Produkten in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen wurde [Stott and Bullerman, 1975, Beretta et al., 2000, Ritieni, 2003, Watanabe and Shimizu, 2005]. Nach den Richtlinien der Weltgesundheitsorganisation dürfen Fruchtsäfte maximal 50 $\mu\text{g/l}$ Patulin enthalten. Dies entspricht den Konzentrationen, die innerhalb dieser Arbeit untersucht wurden. Die als Patulin-Produzenten bekannten Schimmelpilzarten *Penicillium* und *Aspergillus* sind darüber hinaus auch im Innenraum anzutreffen. Eine Patulinexposition kann demnach sowohl über kontaminierte

Nahrungsmittel als auch über die Innenraumluft erfolgen. Deshalb wurde Patulin als ein typisches Mykotoxin für eine Schimmelpilzbelastung gewählt.

Auch für Patulin konnte eine Hemmung der Zytokinsekretion in nicht zytotoxischen Konzentrationen, sowie eine stärkere Hemmung des Th1-Zytokins IFN- γ im Vergleich zum Th2-Zytokin IL-4 beobachtet werden, was mit zuvor beschriebenen Daten von Wichmann und Mitarbeiter konform geht. Wie schon zuvor erwähnt, wurde zwar ein anderer CD3-Antikörper zur Stimulation verwendet, jedoch gab es nur geringfügige Unterschiede der IC₅₀-Werte für IL-4 und IFN- γ zwischen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Wichmann und Mitarbeiter [Wichmann et al., 2002]. Nach 24 h Exposition gegenüber Patulin wurde vergleichbar zu Gliotoxin auf Ebene der mRNA eine Stimulation der IL-4- und eine Hemmung der IFN- γ -Expression beobachtet. Auch dieses Ergebnis entspricht zuvor beschriebenen Literaturbefunden [Wichmann et al., 2002].

Außerdem wird unter dem Einfluss von Patulin die Transkription des humanen IL-4- und IL-13-Promoters erhöht, während die Aktivität des IFN- γ -Promoters nicht beeinflusst wurde. Dies weist auf einen direkten Einfluss von Patulin auf die Genaktivität hin und konnte zum ersten Mal in einer Arbeit gezeigt werden. Das Th1-relevante STAT1-Protein wurde durch Patulin konzentrationsabhängig in seiner Aktivierung unterdrückt. Damit wird nachfolgend auch die Sekretion von IFN- γ gehemmt. Wie schon im Abschnitt Gliotoxin verdeutlicht, könnte durch die stärkere Hemmung von IFN- γ nachfolgend die Sekretion von IL-4 und IL-13 stimuliert werden. Dieser Prozess einer Th2-Aktivierung bei Patulin-Exposition wird zusätzlich gefördert durch die direkte Stimulation des IL-4- und IL-13-Promoters. Noch stärker als von Gliotoxin geht von Patulin ein Risiko für eine überexprimierte Th2-Reaktivität aus, was bedeutet, dass auch von Patulin potentiell ein Allergierisiko ausgehen kann.

Für eine IgE-Produktion ist die Aktivierung von STAT6 notwendig [Linehan et al., 1998]. Patulin zeigte in der höchsten Konzentration (250 ng/ml) einen inhibitorschen Einfluss auf die Aktivierung von STAT6, ansonsten wird die STAT6-Aktivität von Patulin nicht beeinträchtigt. In der höchsten Konzentration ist auch die Sekretion aller Zytokine gehemmt. Das bedeutet, dass in diesen Konzentrationsbereich generell immuntoxische Effekte wirksam werden. Patulinkonzentrationen \leq 100 ng/ml zeigten keinen direkten Einfluss auf die STAT6-Aktivierung. Lediglich

bei einem von drei Versuchen wurde in den geringsten Patulinkonzentrationen (25 und 50 ng/ml) eine STAT6-Aktivierung beobachtet. Dies weist möglicherweise auf eine STAT6-Aktivierung in sehr geringen Patulinkonzentrationen und spenderspezifische Suszeptibilität hin. Die beobachtete Stimulation der Th2-Promotoren, der IL-4- und IL-13-mRNA-Expression und der geringeren Hemmung der Sekretion von IL-4 und IL-13 im Vergleich zu IFN- γ nach einer 24stündigen Patulinexposition könnten langfristig zu einer stärkeren STAT6-Aktivierung als beobachtet führen und damit die IgE-Produktion anschalten. Weitere Experimente wären notwendig, um diese Hypothese zu bestätigen.

Ein eindeutiger Einfluss auf die Aktivität von NF κ B durch Patulin konnte nicht ermittelt werden. Nur in der höchsten Konzentration von 125 ng/ml wird der NF κ B-abhängige Promotor signifikant gehemmt. Dies weist auf einen anderen Wirkmechanismus im Vergleich zu Gliotoxin hin, obwohl beide Mykotoxine zu einer vergleichbaren Hemmung der IFN- γ -Sekretion führten.

Neben der in dieser Arbeit beschriebenen Wirkung auf den Jak/STAT- bzw. den NF κ B-Weg erfolgte bis jetzt nur eine Untersuchung zum Einfluss von Patulin auf intrazelluläre Signalwege [Wu et al., 2005]. Die Behandlung der humanen PBMC für 30 min mit 30 μ M Patulin führte zu einem Anstieg an phosphorylierten extrazellulären Signal-regulierten Proteinkinasen (ERK) 1 und 2 [Wu et al., 2005]. Im Allgemeinen werden ERK1 und ERK2 in Antwort auf Wachstumsfaktoren und Mitogene aktiviert und der ERK1/2-Signalweg ist der entscheidende Regulator für die Zellproliferation [Roux and Blenis, 2004]. Patulin zeigt demnach, anders als in der vorliegenden Arbeit beobachtet, auch stimulierende Effekte auf Signalproteine.

Es wurde berichtet, dass unter Einwirkung von 500 ng/ml und 1000 ng/ml Patulin sowohl die Produktion des Th1-Zytokins IL-2 als auch des Th2-Zytokins IL-5 reduziert wurde [Marin et al., 1996]. Dabei wurde die Thymoma-Zelllinie EL-4 mit PMA in Gegenwart des Mykotoxins für fünf Tage stimuliert und der Kulturüberstand mittels ELISA für IL-2 und IL-5 analysiert. Allerdings ist zu dieser Arbeit anzumerken, dass IL-2 als Marker für Th1-Zellen wenig geeignet ist, da dieses Zytokin auch von Th0-Zellen produziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde IFN- γ als Th1-Marker ausgewählt, da dieses Zytokin ausschließlich von Typ 1 T-Zellen (Th1 und Tc1) produziert wird. Neben IFN- γ als Th1- wurde IL-4 und IL-13 als Th2-Marker ausgewählt, da diese Zytokine insbesondere im Rahmen der

Induktion IgE-vermittelter Reaktionen eine wesentliche Rolle spielen. Die in dieser Arbeit beobachteten differenten Effekte von Patulin auf die Th1/Th2-Regulation lassen sich deshalb nicht mit jenen Daten vergleichen, die von Marin und Mitarbeiter publiziert wurden, da sowohl der experimentelle Ansatz (5 Tage Exposition) als auch gemessene Marker nicht identisch sind [Marin et al., 1996]. Ein weiterer wesentlicher Unterschied ist die in dieser Arbeit beschriebene Verwendung von Primärzellen (humane PBMC) im Vergleich zu Zelllinien (Thymomazelllinie). Für *in vitro* Toxizitätsuntersuchungen werden meistens Zelllinien als Modell genutzt. Jedoch muss dabei beachtet werden, dass diese sich in ihren Eigenschaften sowie in ihrer Suszeptibilität gegenüber toxischen Verbindungen möglicherweise von primären Zellen unterscheiden.

Daten von Patulinkonzentrationen im humanen oder Tierblut sind nicht erhältlich, aber Experimente an Ratten mit [¹⁴C]-markierten Patulin zeigten, dass die Radioaktivität absorbiert und in verschiedene Gewebe verteilt wurde [Dailey et al., 1977]. Das bedeutet, dass Patulin nach einer oralen Aufnahme nicht sofort vollständig entgiftet wird, sondern dass eine Exposition über einen gewissen Zeitraum wahrscheinlich ist.

Bekanntermaßen wird die Nukleinsäure- und Proteinsynthese durch Einwirkung von Patulin gehemmt [Arafat and Musa, 1995, Cooray et al., 1982, Miura et al., 1993]. Patulin besitzt die Fähigkeit in humanen Zellen oxidativen DNA-Schaden zu verursachen [Liu et al., 2003]. Daneben wird die Fähigkeit an Schwefelhydroxyd-Gruppen, Aminosäuren oder Proteine in der Plasmamembran zu binden, als ein Grund für die Toxizität diskutiert [Friedmann, 1990]. Es konnte nachgewiesen werden, dass der inhibitorische Effekt von Patulin auf die transepitheliale Resistenz mit seiner Reaktivität mit SH-Gruppen assoziiert ist [Mahfoud et al., 2002]. Infolge seines elektrophilen Charakters reagiert Patulin mit zellulären Nucleophilen wie Glutathion [Fliege and Metzler, 2000, Pfeiffer et al., 2005] und Proteinen [Fliege and Metzler, 1999]. Bis zu drei Glutathion-Moleküle können mit einem Molekül Patulin reagieren. Während die Addukte mit zwei oder drei Glutathion-Molekülen niedrige oder keine weitere Reaktivität besitzen, führt die anfängliche Reaktion von Patulin mit einem Thiol zu einem Addukt, das sogar reaktiver zwischen den Thiol- und Aminogruppen ist als Patulin selbst [Fliege and Metzler, 2000]. Deshalb kann die

Reaktion mit Glutathion sowohl zu einem Ansteigen als auch Sinken der elektrophilen Reaktivität von Patulin führen. Die Fähigkeit an Proteine zu binden, kann dazu führen, dass für die Signaltransduktion entscheidende Proteine nicht mehr funktionstüchtig sind. Dadurch können verschiedene Signalwege nicht mehr ablaufen und es kommt zu einer Dysregulation, die letztendlich zu einer gestörten Immunreaktivität führen kann.

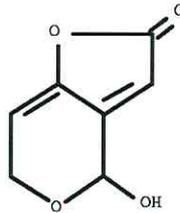


Abbildung 4.2: Struktur von Patulin

Ochratoxin A

Für Ochratoxin A wurde bereits in früheren Studien demonstriert, dass eine Exposition humaner Lymphozyten-Populationen und -Subpopulationen gegenüber dem Toxin die Fähigkeit der Zellen beeinträchtigt, auf aktivierende Stimuli *in vitro* zu reagieren [Lea et al., 1989]. Es wird daher ein inhibitorischen Effekt auf die T-Zellproliferation vermutet. Die Produktion von IL-2 und die Expression des IL-2-Rezeptors wurde unter Einfluss von Ochratoxin A reduziert [Lea et al., 1989]. Die Zellen wurden 1 h mit verschiedenen Konzentrationen des Mykotoxins inkubiert, anschließend gewaschen und mit PHA stimuliert [Lea et al., 1989]. Weiterführende Experimente zeigten, dass die frühen Aktivierungsmarker Ca^{2+} und Proteinkinase C durch Ochratoxin A nicht beeinflusst wurden [Stormer and Lea, 1995].

Bisherige Untersuchungen zu immunsuppressiven Effekten von Ochratoxin A beschäftigten sich nicht mit dem Einfluss auf die Sekretion von IL-4, IL-13, IL-10 und IFN- γ humaner PBMC. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Zytokine ab einer Konzentration von 62,5 ng/ml Ochratoxin A gleichermaßen gehemmt wurden.

Es wurde berichtet, dass bei einer Exposition von 5 und 10 $\mu\text{g/ml}$ Ochratoxin A die Produktion von IL-2 deutlich erhöht wurde, während die Produktion von IL-5 signifikant verringert war [Marin et al., 1996]. Wie schon erwähnt, wurde mit einer Tumorzelllinie und einer längeren Inkubationszeit gearbeitet [Marin et al., 1996]. Die eingesetzten Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit (höchste Konzentration 4 $\mu\text{g/ml}$ Ochratoxin A) und in der Arbeit von Marin und Mitarbeiter unterscheiden sich grundlegend.

Erstmals wurde der Einfluss von Ochratoxin A auf den Jak/STAT- und $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Signaltransduktionsweg mittels Western Blot untersucht. Die Aktivierung des STAT1-Proteins wurde durch Ochratoxin A konzentrationsabhängig gehemmt, während keine Beeinflussung der Phosphorylierung von STAT6 und $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ ermittelt werden konnte. Durch Hemmung der Phosphorylierung von STAT1 wird die Transkription der $\text{IFN-}\gamma$ -abhängigen Gene verhindert. Des Weiteren kann nachfolgend die Stabilität des Th1-Phänotypes nicht mehr gewährleistet werden.

Bis jetzt erfolgten nur Untersuchungen zu Effekten auf intrazelluläre Signalwege anhand des Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Weges [Gekle et al., 2000, Schramek et al., 1997]. Eine Langzeitinkubation einer renalen Nierenepithelzelllinie mit Ochratoxin A führte zu einer Aktivierung von ERK1 und ERK2 [Schramek et al., 1997]. Eine durch Ochratoxin A-induzierte Aktivierung von c-Jun N-terminale Kinase (JNK) konnte ebenfalls beobachtet werden [Gekle et al., 2000]. MAPK-Kaskaden sind wichtige intrazelluläre Signalwege, die Signale von der Plasmamembran in den Zellkern übertragen [Roux and Blenis, 2004]. JNK, die auch als stress-aktivierte Proteinkinasen bekannt sind, repräsentieren eine Gruppe von Enzymen, die durch die Exposition von Zellen mit Zytokinen und Umweltstress aktiviert werden [Whitmarsh and Davis, 1996]. Viele proapoptotische Stimuli (z. B. UV-Strahlung oder $\text{TNF-}\alpha$ -Behandlung) aktivieren JNK. Dies liefert Hinweise für die Rolle des JNK-Signalweges in der Apoptose. Ochratoxin A kann also durch Aktivierung von MAPK eine Apoptose auslösen.

Die immunotoxischen Effekte von Ochratoxin A sind wahrscheinlich mit seiner Beeinflussung auf die basalen Prozesse im Zellmetabolismus begründet [Lea et al., 1989]. Es wurde gezeigt, dass Ochratoxin A die *in vitro* Proteinsynthese durch Konkurrenz mit Phenylalanin in der Phe-tRNA-Synthetase katalysierten Reaktion und

anderen Phe-abhängigen Enzymen hemmt [Bunge et al., 1978, Dirheimer and Creppy, 1991]. Schon niedrige Dosen von Ochratoxin A bei Tierversuchen führen zu Immunsuppressionen. Im Vergleich zwischen interperitonealer und oraler Gabe des Mycotoxins zeigt sich die orale Exposition weniger effektiv in der induzierten Immunotoxizität. Dies könnte auf preventive Effekte von Phenylalanin in der Nahrung beruhen [Thuvander et al., 1995]. Ochratoxin A ist plazentagängig [Fukui et al., 1987] und sowohl embryotoxisch als auch teratogen in Mäusen und Raten [Brown et al., 1976, Hayes et al., 1974]. Bei Untersuchungen mit Lacton-enthaltenen Ochratoxin A und verschiedenen Analogen ergab sich, dass die Toxizität von Ochratoxin A mit seiner Isocoumarin Hälfte assoziiert ist, aber weder eine Auflösung der Phenolhydroxyd-Gruppe noch die Eigenschaft Eisen-Chelate zu bilden mit der Toxizität in Verbindung steht [Xiao et al., 1996]. Dabei scheint auch die Lactoncarbonyl-Gruppe involviert zu sein. Verschiedene Studien schlagen vor, dass bei der Toxizität von Ochratoxin A oxidativer Stress involviert ist [Baudrimont et al., 1994, Belmadani et al., 1999, Omar et al., 1990, Schaaf et al., 2002]. Ochratoxin A induziert oxidativen DNA-Schaden in niedrigen aber nicht zytotoxischen Konzentrationen [Kamp et al., 2005]. Daneben induziert Ochratoxin A konzentrationsabhängig DNA-Einzelstrangbrüche [Lebrun and Follmann, 2002]. Die Synthese von Proteinen und DNA wurde bei Konzentrationen des Toxins von 0,01 - 0,001 mM inhibiert [Braunberg et al., 1992].

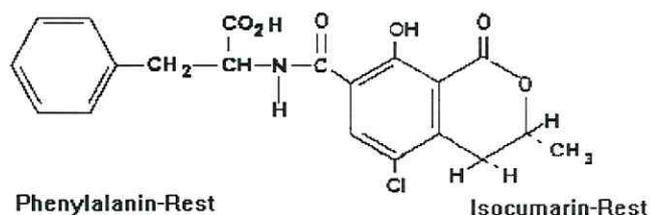


Abbildung 4.3: Struktur von Ochratoxin A

Der Hauptaufnahmeweg für Ochratoxin A ist für den Menschen die Aufnahme von kontaminierter Nahrung, wie z. B. Getreide, Brot, Schwein- und Geflügelfleisch [Jorgensen, 1998], Wein, roten Grapefruchtsaft [Zimmerli and Dick, 1996] und Kuhmilch [Skaug, 1999]. Zusätzlich zur Nahrung ist die Exposition mit Ochratoxin

möglich durch Einatmung von Toxin-enhaltenen Konidien und luftübertragenen Staub. Konidien von *Penicillium verrucosum* können Ochratoxin A in Konzentrationen bis zu 0,5 pg pro Konidie enthalten. In Staubproben aus der Landwirtschaft konnte Ochratoxin A (0,2 - 70 µg/kg) nachgewiesen werden [Skaug et al., 2001]. Tierexperimente zeigten, dass Ochratoxin A sehr effizient vom respiratorischen System aufgenommen werden kann [Breitholtz-Emanuelsson et al., 1995]. Mit Ochratoxin A-assoziierte Konidien oder andere Partikel, die vom respiratorischen System inhaaliert werden, können durch das respiratorische Epithelium absorbiert und an andere Orte verteilt werden [Skaug, 2003]. In Staubproben aus Heizungskanälen konnten Konzentrationen bis über 1500 ppb Ochratoxin A gefunden werden [Richard et al., 1999].

Es gibt zahlreiche Berichte aus vielen Ländern, die eine hohe Frequenz von Kontaminationen mit Ochratoxin A in niedrigen Konzentrationen in humanem Blut beschreiben. Bei Messung des Ochratoxin A-Gehaltes humaner Seren wurden Werte von 0,06 - 6,02 ng/g in der Schweiz [Zimmerli and Dick, 1995], von 21 - 5534 ng/l in Norwegen [Skaug, 2003] und im Durchschnitt 0,29 ng/ml in Marokko [Filali et al., 2002] gefunden. Analysen von Blutproben aus verschiedenen europäischen Ländern zeigten eine Ochratoxin A-Kontamination von Konzentrationen zwischen 100 bis 14400 ng/l [Hald, 1991]. Die von uns getesteten Konzentrationen entsprechen daher durchaus realistischen, *in vivo* vorkommenden Werten. Ein signifikanter Einfluss auf die Zytokinsekretion wurde für Ochratoxin A-Konzentrationen $\geq 62,5$ ng/ml ermittelt, im Vergleich zu 14,4 ng/ml als höchste Konzentration, die im humanen Blut gefunden wurde. In der vorliegenden Arbeit wurde nur eine 24 h Exposition durchgeführt, möglicherweise treten stärkere Effekte bei einer längeren Expositionsdauer auf.

Ochratoxin A wird nicht nur in humanen Seren gefunden, sondern auch in humaner Milch. Daher kann es während des Stillens von der Mutter auf das Kind übertragen werden. Im Vergleich zwischen humaner Milch und Seren wurde festgestellt, dass alle Blutproben Ochratoxin A im Bereich von 90 bis 940 ng/l enthielten, während nur 58% der Milchproben positiv waren (10 - 40 ng/l)[Breitholtz-Emanuelsson et al., 1993].

Die lange Halbwertszeit von Ochratoxin A erlaubt eine Akkumulation im Körper, als Folge der Aufnahme von kleinen Mengen des Mykotoxins durch die Nahrung und

kontaminierten Sporen bis eine messbare Konzentration im Blut, anderen Geweben und Flüssigkeiten erreicht [Zimmerli and Dick, 1995].

Die Frage ist, ob bzw. auf welchem Weg Mykotoxine in die Zellen gelangen. Dies wurde von Lea und Mitarbeiter demonstriert, wobei gezeigt wurde, dass die Aufnahme von Ochratoxin A sich nicht durch eine einfache Diffusion über die T-Zell-Membran erklären lässt [Lea et al., 1989]. Möglicherweise existieren bisher unbekanntes Carriersysteme, die für den Transfer dieses Mykotoxins durch die Zellmembran verantwortlich sind. Die Eigenschaften des Ochratoxin A-Transportes wurde durch den multispezifischen humanen organischen Anion-Transporter 4 (hOAT4) mit Hilfe von stabil transfizierten murinen proximalen Tubuluszellen untersucht [Babu et al., 2002]. Dabei wurde festgestellt, dass die Aufnahme von Ochratoxin A durch verschiedene Substrate für OATs gehemmt wird. Dieser Aufnahmemechanismus befindet sich in den Nieren. Ob ein ähnlicher Mechanismus in PBMC existiert, ist nicht geklärt.

Citrinin

In der präsentierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zytokinsekretion konzentrationsabhängig durch Citrinin gehemmt wurde. Die Zytokinsekretion wurde dabei in nicht zytotoxischen Konzentrationen unterdrückt. Durch Vergleich der Mykotoxine untereinander zeigte sich, dass Citrinin das schwächste Mykotoxin in Bezug auf die zytotoxischen und immunotoxischen Effekte ist, mit einem IC_{50} -Wert von 41510 ng/ml für die Vitalität und rund 7000 ng/ml (IL-4, IL-13 und IFN- γ) bzw. 4300 ng/ml (IL-10) für die Zytokinsekretion. Citrinin hemmte die IL-10-Sekretion in niedrigeren Konzentrationen als die anderen getesteten Zytokine. Dies zeigt die immunmodulatorischen Fähigkeiten von Citrinin. Die Sekretion von IFN- γ wurde in einem Bereich von 3 bis 10 μ g/ml Citrinin gehemmt [Wichmann et al., 2002]. Dies bestätigt den in der vorliegenden Arbeit beobachteten hemmenden Effekt auf die Zytokinsekretion. Weitere Untersuchungen zum Einfluss von Citrinin auf die Zytokinsekretion humaner PBMC fanden nicht statt.

Unter Einfluss von Citrinin wurde die IL-10-Sekretion einer LPS-stimulierten Monozytenzelllinie (MM6) in niedrigeren Konzentrationen als die proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 gehemmt [Johannessen et al., 2005]. Zwar wurde

der Einfluss von Citrinin auf stimulierte Monozyten in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, aber es bestätigt die immunmodulatorischen Fähigkeiten von Citrinin. Citrinin greift demnach unabhängig vom Zelltyp in Signalübertragungswege, die zu einer IL-10-Sekretion führen, ein und bewirkt so die beobachteten inhibitorischen Effekte auf die Sekretion von IL-10.

Von Citrinin gibt es bisher keine Daten im Hinblick auf einen möglichen Einfluss auf die Signaltransduktion. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten Untersuchungen der Veränderung in der Aktivierung von STAT1, STAT6 und $I\kappa B\alpha$ unter Einfluss von Citrinin. Eine Hemmung der STAT1-Aktivierung konnte in den höchsten Konzentrationen beobachtet werden, während der $NF\kappa B$ -Weg durch Citrinin nicht beeinflusst wurde. Sowohl beim Einfluss auf die Phosphorylierung von STAT6 als auch von $I\kappa B\alpha$ wurden starke Unterschiede zwischen den durchgeführten Experimenten beobachtet. Dies weist auf eine spenderspezifische Empfindlichkeit für Citrinin hin.

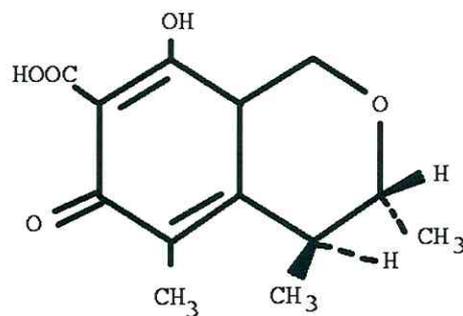


Abbildung 4.4: Struktur von Citrinin

Babu und Mitarbeiter zeigten, dass Citrinin wie Ochratoxin A mit Hilfe des OAT transportiert und so in die Zellen aufgenommen wird [Babu et al., 2002].

Es konnte eine Inhibition der RNA- und DNA-Synthese durch Citrinin belegt werden [Wasternack and Weisser, 1992]. Citrinin beeinträchtigt den mitochondrialen Metabolismus, in dem es den Eisen-Redox-Zyklus [Da Lozzo et al., 2002] und den die Homeostase der reaktiven Sauerstoffradikale beeinflusst [Ribeiro et al., 1997]. Es

wurde berichtet, dass bei einer oralen Gabe von verschiedenen Dosen von Citrinin (5 - 20 ppm) bei Mäusen sowohl Abweichungen als auch Brüche in Chromosomen von Knochenmarkszellen induziert werden [Jeswal, 1996]. Unter Einfluss von Citrinin wird die Expression des Hitzeschockproteins 50 (HSP70) stimuliert [Liu et al., 2003]. Dies kann als Antwort auf zellulären Stress in Betracht gezogen werden. HSP70 vermittelt effektiven zellulären Schutz als Antwort auf Temperatur und apoptotische Stimuli [Beere and Green, 2001]. Daher ist es möglich, dass eine HSP70-Induzierung mit apoptotischen Prozessen korreliert. Apoptose konnte in humanen Leukämiezellen nach Behandlung mit Citrinin nachgewiesen werden [Ueno et al., 1995].

T-2 Toxin

Erstmals wurde der Einfluss von T-2 Toxin auf die Zytokinsekretion humaner PBMC untersucht. Es konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Sekretion aller untersuchter Zytokine beobachtet werden. Eine unterschiedliche Wirkung auf die Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen wurde dabei nicht festgestellt. T-2 Toxin zeigte sich sowohl als das zytotoxischste als auch das immunotoxischste Mykotoxin, wobei auch bei diesem Mykotoxin die Zytokinsekretion in nicht zytotoxischen Konzentrationen unterdrückt wurde.

Effekte von T-2 Toxin auf die Zytokinsekretion und -genexpression wurden in primären CD4⁺ T-Zellen aus der murinen Milz analysiert [Ouyang et al., 1995]. Dabei wurde bei einer zweitägigen Kultur die Sekretion von IL-2, IL-4 und IL-5 konzentrationsabhängig gehemmt und auf mRNA-Ebene die Expression von IL-4 und IL-5 inhibiert, während die Expression von IL-2 bei 0,5 ng/ml T-2 Toxin superinduziert wurde. Nach 7d wurde die IL-4 und IL-5 Sekretion von ConA stimulierten CD4⁺ T-Zellen unter Einfluss von 1 ng/ml T-2 Toxin induziert [Ouyang et al., 1995]. Die Daten von Ouyang und Mitarbeiter weisen darauf hin, dass bei einer längeren Expositionszeit die Th2-Zytokine unter Einfluss von T-2 Toxin stimuliert werden könnten. Damit könnte auch von diesem Mykotoxin vielleicht ein Allergierisiko durch eine Verschiebung der Th1/Th2-Balance in Richtung Th2 ausgehen. Nach einer Inkubation von 24 h wurden die Zytokine IL-4, IL-13, IL-10 und IFN- γ in der vorliegenden Arbeit alle konzentrationsabhängig gehemmt. Untersuchungen über einen längeren Expositionszeitpunkt müssten folgen um diese These zu bestäti-

gen.

Neben Patulin und Ochratoxin A wurde auch T-2 Toxin auf die Zytokinproduktion von PMA-stimulierten EL4-Zellen über 5 Tage untersucht [Marin et al., 1996]. Auch in diesem Modell wurde jedoch keine differente Hemmung der Zytokine beobachtet. So wurden unter Einfluss von 5 und 10 ng/ml T-2 Toxin IL-2 und IL-5 im gleichen Ausmaß gehemmt [Marin et al., 1996]. T-2 Toxin ist ein sehr toxisches Mykotoxin und wahrscheinlich wird dieser lange Zeitraum gebraucht, um die toxischen Effekte zu überwinden und die Produktion der Th2-Zellen, wie bei Ouyang und Mitarbeiter beobachtet wurde, zu stimulieren.

Nicht nur die Zytokinsekretion wird durch T-2 Toxin beeinflusst, sondern auch die Produktion von Immunglobulinen [Thuvander et al., 1999]. Mit PMA-stimulierte humane PBMC wurden für 7 d mit dem Mykotoxin inkubiert und anschließend IgA, IgG und IgM mittels ELISA im Kulturüberstand nachgewiesen. Dabei gleichen sich die IC_{50} -Wert der Immunglobuline mit rund 3 nM (entspricht 1,4 ng/ml) [Thuvander et al., 1999].

Erstmals wurde der Einfluss von T-2 Toxin auf Signalproteine im Rahmen der vorgelegten Arbeit dargestellt. Die Aktivierung von STAT1 wird durch T-2 Toxin konzentrationsabhängig gehemmt. Auch die STAT6-Phosphorylierung wird beeinträchtigt, dabei zeigte sich wie bei Citrinin und Ochratoxin A eine große Schwankung, die auf eine spenderspezifische Suszeptibilität hinweist. In den Konzentrationen, bei den die Aktivierung von STAT1 unterdrückt wird, kann auch eine Hemmung der Zytokinsekretion beobachtet werden. Ein Einfluss auf den $NF\kappa B$ -Weg konnte nicht beobachtet werden.

Auch für T-2 Toxin wurde nachgewiesen, dass es in Zellen aufgenommen wird. Dies konnte anhand von zwei verschiedenen Zelllinien (CHO - chinese hamster ovary; VERO - african green monkey kidney) demonstriert werden [Trusal and Martin, 1987]. Dabei wurde eine zeit- und temperaturabhängige Aufnahme beobachtet.

Die Hemmung der Proteinsynthese ist wahrscheinlich der primäre Mechanismus der T-2-vermittelten Zytotoxizität [Wang et al., 1998], andere Mechanismen wie Veränderungen der Zellmembran [Bunner and Morris, 1988, Khachatourians, 1990] oder die Suppression der mitochondrialen Funktion [Khachatourians, 1990]

sind möglich. Die Proteinhemmung könnte einer von vielen Gründen für die Immunmodulation sein. Die akute T-2 Toxin-Exposition führt zu schweren Schäden bei sich aktiv teilenden Zellen in Geweben, wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz, Thymus und intestinalen Schleimhäuten [Bondy and Pestka, 2000]. Dies beinhaltet, dass die Leukozyten und das Immunsystem die primären Angriffsziele für T-2 Toxin sind [Bondy and Pestka, 2000]. Morphologische und funktionelle Veränderungen in Membranen wurden im Herzen (Yarom et al., 1983), roten Blutzellen (Segal et al., 1983) und in der Leber (Tremal und Scinicz, 1984) beobachtet.

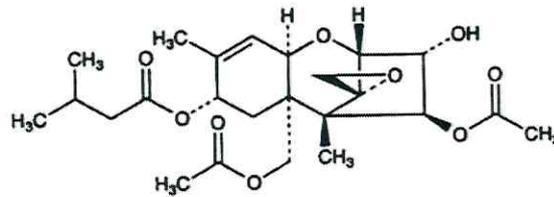


Abbildung 4.5: Struktur von T-2 Toxin

4.3 Kombinationseffekte

Mischungsexperimente mit Mykotoxinen fanden bisher hauptsächlich an Tiermodellen statt [Smith et al., 1997, Wangikar et al., 2004, Theumer et al., 2003, Micco et al., 1988, Huff et al., 1986, Brown et al., 1986, Vesela et al., 1983, Sansing et al., 1976, Glahn et al., 1988]. In den genannten Arbeiten wurde nur eine Kombination von zwei Mykotoxinen untersucht. Für die Analyse der Kombinationseffekte wurden verschiedene Endpunkte und Modelle verwendet, die zu unterschiedlichen Ergebnissen führten. Um die Veränderungen in der renalen Ultrastruktur zu untersuchen, wurden Legehennen mit Ochratoxin A und Citrinin, einzeln und in Kombination gefüttert [Brown et al., 1986]. Die Fütterung mit Ochratoxin A und Citrinin war mit Veränderungen der Membranabgrenzung des proximalen Tubulus verbunden. Die Autoren konnten jedoch keine kombinatorischen Effekte nachweisen [Brown et al., 1986]. Dagegen wurde eine synergistische Wirkung von Ochratoxin A und Citrinin in einem Mausmodell für hepatorenale Karzinogenität [Kanisawa, 1984], sowie in Ratten für

Teratogenität ermittelt [Mayura et al., 1984]. Additive Effekte konnten bei morphologischen Untersuchungen an Hühnerembryonen bei der gemeinsamen Applikation von Ochratoxin A und Citrinin gefunden werden [Vesela et al., 1983].

In vitro Testsysteme fanden mit primären Nierenzellen von Schweinen [Braunberg et al., 1994], mit einer Leberzelllinie [Creppy et al., 1980], mit der Fibroblastenzelllinie L929 [Groten et al., 1998, Tajima et al., 2002] und mit humanen PBMC [Thuvander et al., 1999] statt. Nur zwei der Arbeiten beschäftigen sich mit den Kombinationseffekten von mehr als zwei Mykotoxinen [Groten et al., 1998, Tajima et al., 2002].

Untersuchungen zu Kombinationseffekten mit Hilfe der Vorhersagekonzepte Konzentrationsadditivität und Unabhängige Wirkung erfolgten bis dato nur bei ökotoxikologischen Analysen [Altenburger et al., 2004, 2005, Faust et al., 2001, 2003, Backhaus et al., 2004, Walter et al., 2002].

Damit liefert die vorgelegte Arbeit erste Untersuchungen zu Kombinationseffekten von Mykotoxinen auf die Zytokinsekretion anti-CD3 und anti-CD28 stimulierter humaner PBMC, die mit Hilfe der Vorhersagekonzepte Konzentrationsadditivität und Unabhängige Wirkung analysiert wurden.

Eine Aussage welches Modell der Vorhersagekonzepte die Daten für die Mischung am besten beschreibt, konnte nur für die Mischung mit den vier Mykotoxinen getroffen werden. Das Konzept der Unabhängigen Wirkung erklärt die beobachteten Ergebnisse. Dies lässt sich auch mit den Ergebnissen der Promotoraktivität und des Western Blots bestätigen. Obwohl gleiche Effekte (IFN- γ -Hemmung) beobachtet wurden, haben die Mykotoxine einen unterschiedlichen Wirkmechanismus. Während unter Einfluss von Patulin eine Stimulation der Promotoraktivität von IL-4 und IL-13 beobachtet werden konnte, wurden bei Gliotoxin die Promotoraktivitäten der Zytokingene konzentrationsabhängig gehemmt. Des Weiteren zeigt Gliotoxin eine stärkere Hemmung auf die STAT-Faktoren als Patulin.

Bei der Patulin-Gliotoxin-Mischung und bei der Mischung mit den drei Mykotoxinen lagen sowohl die beiden Vorhersagekonzepte, als auch die beobachteten Ergebnisse sehr nah beieinander, so dass bei diesen Mischungen keine Aussage zu synergistischen bzw. zu antagonistischen Wirkungen getroffen werden konnten. Gliotoxin und Citrinin wirken synergistisch bei Annahme, dass beide Mykotoxine unabhängig voneinander wirken. Dies scheint wahrscheinlich, da nur Gliotoxin die

IFN- γ -Sekretion stärker hemmt im Vergleich zu IL-4 und IL-13. Beide Mykotoxine zeigen auch einen unterschiedlichen Einfluss auf die untersuchten Signaltransduktionsproteine. Gliotoxin zeigte in dem Konzentrationsbereich, in dem eine signifikante Hemmung der Zytokinsekretion beobachtet wurde, eine Hemmung der Phosphorylierung beider STAT-Faktoren bis auf das Niveau der Grundaktivierung. Citrinin verursachte nur eine leichte Hemmung der Phosphorylierung der STAT-Faktoren. Die beobachteten Effekte für die Mischung von Gliotoxin und Citrinin liegen nahe dem Modell für die Konzentrationsadditivität, während die Schwankung der Messwerte beide Modelle umschließt. Dabei ergab sich kein signifikanter Unterschied bei den beobachteten Ergebnissen zu den zwei Vorhersagekonzepten.

In Bezug auf das Allergierisiko von Mykotoxinen ist ein besonderer Augenmerk auf die Mischung mit den drei Mykotoxinen zu legen. Bei dieser Mischung konnte ein differenter Einfluss auf die Zytokinsekretion beobachtet werden. Die IFN- γ -Sekretion wird stärker gehemmt als die IL-4 und IL-13-Sekretion. Es kommt also bei der Mischung von Patulin, Gliotoxin und Ochratoxin A wie bei Patulin und Gliotoxin allein zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung Th2.

Es konnte erstmals unter Verwendung von humanen PBMC nachgewiesen werden, dass niedrige und schwache Effektkonzentrationen von Mykotoxinen eine starke Hemmung auf die Sekretion von IFN- γ bewirken, wenn sie als Mischung appliziert werden. Schwache Effekte der Einzelstoffe können sich also summieren. Dies ist sehr wichtig, da der Mensch nicht nur über eine Schimmelpilzbelastung im Innenraum mit Mykotoxinen konfrontiert ist, indem über Inhalation von Luftpartikel wie Staub, Sporen und andere Schimmelpilzbestandteile die Mykotoxine in den menschlichen Organismus gelangen können, sondern auch über mit Mykotoxin-kontaminierte Nahrungsmittel. Mykotoxine, die in Nahrungsmitteln gefunden werden, treten meistens nicht als Einzelverbindungen auf, sondern als Mischungen von verschiedenen Mykotoxinen. Eine Exposition gegenüber mehreren Mykotoxinen ist demnach allgegenwärtig. Daher ist es umso wichtiger, wenn man die reale Expositionssituation beurteilen will, sich nicht nur die Einzeleffekte zu betrachten, sondern auch die kombinatorische Effekte von Mischungen. Des Weiteren ist zu überlegen, ob die Grenzwerte für einzelne Mykotoxine in Lebensmitteln, heruntergesetzt werden sollten, da sich die Effekte der einzelnen Mykotoxine auch in geringen Konzentrationen verstärken können.

Zusammenfassung

Viele Menschen sind durch Schimmelpilze in Innenräumen oder durch kontaminierte Lebensmittel und daraus resultierende gesundheitliche Folgen stark belastet. Neben unspezifischen Krankheitssymptomen konnte durch epidemiologische Studien ein Zusammenhang zwischen Allergien und der Schimmelpilzbelastung ermittelt werden. Die Ursachen Allergie-vermittelnder Effekte durch Schimmelpilze sind weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass Mykotoxine, sekundäre Stoffwechselmetabolite der Schimmelpilze, beteiligt sind. Mykotoxine besitzen immunsuppressive Eigenschaften und könnten über adjuvante Effekte die Immunregulation beeinflussen, so dass ein erhöhtes Risiko für allergische Reaktionen besteht.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss ausgewählter Mykotoxine auf die Zytokinsekretion und auf intrazelluläre Signalwege humaner PBMC zu untersuchen. Die Arbeiten konzentrierten sich auf die von T-Lymphozyten produzierten Zytokine IL-4, IL-13 und IFN- γ , da diese für die Entstehung allergischer Reaktionen relevant sind, sowie die Signalproteine STAT1, STAT6 und I κ B α . Untersucht wurden die Mykotoxine Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A, Citrinin und T-2 Toxin, da diese von Schimmelpilzen produziert werden, die Innenräume besiedeln und Lebensmittel kontaminieren können.

Die Untersuchung des Einflusses der Mykotoxine auf die Vitalität erfolgte unter Verwendung des MTT-Testes. Die Analyse der Zytokin-Expression auf Protein- und mRNA-Ebene fand mittels ELISA und quantitativer *real time* PCR statt. Der Reporterassay wurde verwendet, um Effekte auf die Aktivierung von Genpromotoren zu detektieren. Untersuchungen zur intrazellulären Signalübertragung erfolgten mittels Western Blot.

Alle untersuchten Mykotoxine hemmten die Vitalität der PBMC. Zusätzlich führten sie zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung der Zytokinsekretion. Be-

merkwürdig ist, dass die Mykotoxinkonzentrationen, die zu zytotoxischen Effekten führten sehr viel höher sind als jene, die Einschränkungen in der Zytokinsekretion bewirkten.

Durch **Patulin** und **Gliotoxin** wurde die Sekretion von IFN- γ in niedrigeren Konzentrationen als die von IL-4 und IL-13 gehemmt. Auf mRNA-Ebene konnte eine Stimulation der IL-4- und IL-13-Expression beobachtet werden, während die Expression von IFN- γ reduziert wurde. Dies führt zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichtes in Richtung einer Th2-Dominanz. Das bedeutet, dass von diesen beiden Toxinen ein Allergierisiko ausgehen könnte. **Ochratoxin A**, **Citrinin** und **T-2 Toxin** zeigten zwar auch eine konzentrationsabhängige Hemmung von IL-4, IL-13 und IFN- γ , eine unterschiedliche Hemmwirkung auf die Sekretion dieser Zytokine konnte nicht ermittelt werden.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten neue Erkenntnisse zum Mechanismus der immunsuppressiven Effekte durch die untersuchten Mykotoxine gewonnen werden. Patulin bewirkte eine Stimulation der Th2-Zytokinpromotoren, während der IFN- γ -Promotor unbeeinflusst war. Unter Einfluss von Gliotoxin konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Aktivität der IL-4-, IL-13- und IFN- γ -Promotoren sowie des NF κ B-Weges festgestellt werden. Alle untersuchten Mykotoxine führten zu einer Unterdrückung der STAT1-Aktivierung. Die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von STAT6 wurde nur durch Gliotoxin, Citrinin und T-2 Toxin vermindert.

Niedrige und schwachwirksame Effektkonzentrationen der Mykotoxine Patulin, Gliotoxin, Ochratoxin A und Citrinin bewirkten eine starke Hemmung der IFN- γ -Sekretion, wenn sie als Mischung appliziert wurden. Durch Mischexposition sind demnach auch niedrige Mykotoxinkonzentrationen relevant, die einzeln zu keinen oder nur sehr schwachen Effekten führen würden. Es wäre deshalb zu überlegen, ob zulässige Grenzwerte für einzelne Mykotoxine z.B. in Lebensmitteln neu beurteilt werden müssten.

Insgesamt führten alle untersuchten Mykotoxine zu einer Immunsuppression, der unterschiedliche zelluläre Mechanismen zugrunde liegen. Nach dem derzeitigen Kenntnisstand ist davon auszugehen, dass die Mykotoxine Patulin und Gliotoxin über adjuvante Effekte das Allergierisiko erhöhen können.

Literaturverzeichnis

- M. Afkarian, J.R. Sedy, J. Yang, N.G. Jacobson, N. Cereb, S.Y. Yang, T.L. Murphy, and K.M. Murphy. T-bet is a stat1-induced regulator of il-12r expression in naive cd4+ t cells. *Nat.Immunol.*, 3(6):549–557, 2002.
- D. Agnello, C.S. Lankford, J. Bream, A. Morinobu, M. Gadina, J.J. O’Shea, and D.M. Frucht. Cytokines and transcription factors that regulate t helper cell differentiation: new players and new insights. *J.Clin.Immunol.*, 23(3):147–161, 2003.
- O. Akbari, G.J. Freeman, E.H. Meyer, E.A. Greenfield, T.T. Chang, A.H. Sharpe, G. Berry, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. Antigen-specific regulatory t cells develop via the icos-icos-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity. *Nat.Med.*, 8(9):1024–1032, 2002.
- O. Akbari, P. Stock, R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu. Role of regulatory t cells in allergy and asthma. *Curr.Opin.Immunol.*, 15(6):627–633, 2003.
- R. Altenburger, H. Walter, and M. Grote. What contributes to the combined effect of a complex mixture? *Environ.Sci.Technol.*, 38(23):6353–6362, 2004.
- R. Altenburger, H. Schmitt, and G. Schuurmann. Algal toxicity of nitrobenzenes: combined effect analysis as a pharmacological probe for similar modes of interaction. *Environ.Toxicol.Chem.*, 24(2):324–333, 2005.
- J. Altmann-Brewe. *Schimmelpilze und Pilzinfekte - Richtig vorbeugen, gezielt behandeln*. Ehrenwirth Verlag GmbH, München, 1997.
- W. Arafat and M.N. Musa. Patulin-induced inhibition of protein synthesis in hepatoma tissue culture. *Res.Comm.Mol.Pathol.Pharmacol.*, 87(2):177–186, 1995.
- M. Armant, R. Armitage, N. Boiani, G. Delespesse, and M. Sarfati. Functional cd40 ligand expression on t lymphocytes in the absence of t cell receptor engagement: involvement in interleukin-2-induced interleukin-12 and interferon-gamma production. *Eur.J Immunol.*, 26(7):1430–1434, 1996.
- E. Babu, M. Takeda, S. Narikawa, Y. Kobayashi, A. Enomoto, A. Tojo, S.H. Cha, T. Sekine, D. Sakthisekaran, and H. Endou. Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin a. *Biochim.Biophys.Acta*, 1590(1-3):64–75, 2002.

- T. Backhaus, A. Arrhenius, and H. Blanck. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ.Sci.Technol.*, 38(23): 6363–6370, 2004.
- P.A. Baeuerle and T. Henkel. Function and activation of nf-kappa b in the immune system. *Annu Rev Immunol.*, 12:141–179, 1994.
- I. Baudrimont, A.M. Betbeder, A. Gharbi, A. Pfohl-Leszkowicz, G. Dirheimer, and E.E. Creppy. Effect of superoxide dismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin a in rats. *Toxicology*, 89(2): 101–111, 1994.
- H.M. Beere and D.R. Green. Stress management - heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 11(1):6–10, 2001.
- A. Belmadani, P.S. Steyn, G. Tramu, A.M. Betbeder, I. Baudrimont, and E.E. Creppy. Selective toxicity of ochratoxin a in primary cultures from different brain regions. *Arch.Toxicol.*, 73(2):108–114, 1999.
- J.W. Bennett and M. Klich. Mycotoxins. *Clin.Microbiol.Rev.*, 16(3):497–516, 2003.
- L. Berek, I.B. Petri, A. Mesterhazy, J. Teren, and J. Molnar. Effects of mycotoxins on human immune functions in vitro. *Toxicol.In Vitro*, 15(1):25–30, 2001.
- B. Beretta, A. Gaiaschi, C.L. Galli, and P. Restani. Patulin in apple-based foods: occurrence and safety evaluation. *Food Addit.Contam.*, 17(5):399–406, 2000.
- V. Blank, P. Kourilsky, and A. Israel. Nf-kappa b and related proteins: Rel/dorsal homologies meet ankyrin-like repeats. *Trends Biochem.Sci.*, 17(4):135–140, 1992.
- CL Bliss. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.*, 26:585–615, 1939.
- G.S. Bondy and C.L. Armstrong. Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived llc-pk1 and ok cell lines. *Cell Biol.Toxicol.*, 14(5):323–332, 1998.
- G.S. Bondy and J.J. Pestka. Immunomodulation by fungal toxins. *J Toxicol.Environ.Health B Crit Rev.*, 3(2):109–143, 2000.
- G.A. Boorman, H.L. Hong, M.P. Dieter, H.T. Hayes, A.E. Pohland, M. Stack, and M.I. Luster. Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to ochratoxin a. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 72(2):304–312, 1984.
- R.C. Braunberg, O. Gantt, C. Barton, and L. Friedman. In vitro effects of the nephrotoxins ochratoxin a and citrinin upon biochemical function of porcine kidney. *Arch.Environ.Contam Toxicol.*, 22(4):464–470, 1992.

- R.C. Braunberg, C.N. Barton, O.O. Gantt, and L. Friedman. Interaction of citrinin and ochratoxin a. *Nat. Toxins.*, 2(3):124–131, 1994.
- A. Breitholtz-Emanuelsson, M. Olsen, A. Oskarsson, I. Palminger, and K. Hult. Ochratoxin a in cow's milk and in human milk with corresponding human blood samples. *J.AOAC Int.*, 76(4):842–846, 1993.
- A. Breitholtz-Emanuelsson, R. Fuchs, and K. Hult. Toxicokinetics of ochratoxin a in rat following intratracheal administration. *Nat. Toxins.*, 3(2):101–103, 1995.
- D.R. Brown, D.J. Fowell, D.B. Corry, T.A. Wynn, N.H. Moskowitz, A.W. Cheever, R.M. Locksley, and S.L. Reiner. Beta 2-microglobulin-dependent nk1.1+ t cells are not essential for t helper cell 2 immune responses. *J.Exp.Med.*, 184(4):1295–1304, 1996.
- K. Brown, S. Park, T. Kanno, G. Franzoso, and U. Siebenlist. Mutual regulation of the transcriptional activator nf-kappa b and its inhibitor, i kappa b-alpha. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 90(6):2532–2536, 1993.
- M.H. Brown, G.M. Szczech, and B.P. Purmalis. Teratogenic and toxic effects of ochratoxin a in rats. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 37(2):331–338, 1976.
- T.P. Brown, R.O. Manning, O.J. Fletcher, and R.D. Wyatt. The individual and combined effects of citrinin and ochratoxin a on renal ultrastructure in layer chicks. *Avian Dis.*, 30(1):191–198, 1986.
- I. Bunge, G. Dirheimer, and R. Rosenthaler. In vivo and in vitro inhibition of protein synthesis in bacillus stearothermophilus by ochratoxin a. *Biochem.Biophys.Res.Communic.*, 83(2):398–405, 1978.
- D.L. Bunner and E.R. Morris. Alteration of multiple cell membrane functions in l-6 myoblasts by t-2 toxin: an important mechanism of action. 92(1):113–121, 1988.
- R.H. Burdon, V. Gill, and C. Rice-Evans. Reduction of a tetrazolium salt and superoxide generation in human tumor cells (hela). *Free Radic.Res.Communic.*, 18(6):369–380, 1993.
- J. Caamano and C.A. Hunter. Nf-kappab family of transcription factors: central regulators of innate and adaptive immune functions. *Clin.Microbiol.Rev.*, 15(3):414–429, 2002.
- J. Caamano, J. Alexander, L. Craig, R. Bravo, and C.A. Hunter. The nf-kappa b family member relb is required for innate and adaptive immunity to toxoplasma gondii. *J.Immunol.*, 163(8):4453–4461, 1999.
- T.W. Calvert, K.E. Aidoo, A.G. Candlish, and A.R. Fuat. Comparison of in vitro cytotoxicity of fusarium mycotoxins, deoxynivalenol, t-2 toxin and zearalenone on selected human epithelial cell lines. *Mycopathologia*, 159(3):413–419, 2005.

- J. L. Ceuppens, S. W. Van Gool, D. Bullens, K Rafiq, and A. Kasran. Regulation of th2 cytokine production by human peripheral blood t lymphocytes. *ACI International*, 11:118–125, 1999.
- Y. Chen, V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. Regulatory t cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science*, 265(5176):1237–1240, 1994.
- S.L. Constant and K. Bottomly. Induction of th1 and th2 cd4+ t cell responses: the alternative approaches. *Annu.Rev.Immunol.*, 15:297–322, 1997.
- C. Contursi, I.M. Wang, L. Gabriele, M. Gadina, J. O’Shea, III Morse, H.C., and K. Ozato. Ifn consensus sequence binding protein potentiates stat1-dependent activation of ifngamma-responsive promoters in macrophages. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97(1):91–96, 2000.
- J.D. Cooley, W.C. Wong, C.A. Jumper, and D.C. Straus. Correlation between the prevalence of certain fungi and sick building syndrome. *Occup.Environ.Med.*, 55(9):579–584, 1998.
- R. Cooray, K.H. Kiessling, and K. Lindahl-Kiessling. The effects of patulin and patulin-cysteine mixtures on dna synthesis and the frequency of sister-chromatid exchanges in human lymphocytes. *Food Chem.Toxicol.*, 20(6):893–898, 1982.
- F. Cottrez, S.D. Hurst, R.L. Coffman, and H. Groux. T regulatory cells 1 inhibit a th2-specific response in vivo. *J.Immunol.*, 165(9):4848–4853, 2000.
- E.E. Creppy, G. Lorkowski, G. Beck, R. Rosenthaler, and G. Dirheimer. Combined action of citrinin and ochratoxin a on hepatoma tissue culture cells. *Toxicol.Lett.*, 5(6):375–380, 1980.
- E.E. Creppy, F.C. Stormer, D. Kern, R. Rosenthaler, and G. Dirheimer. Effects of ochratoxin a metabolites on yeast phenylalanyl-trna synthetase and on the growth and in vivo protein synthesis of hepatoma cells. *Chem.Biol.Interact.*, 47(2):239–247, 1983.
- E.J. Da Lozzo, A.S. Mangrich, M.E. Rocha, M.B. de Oliveira, and E.G. Carnieri. Effects of citrinin on iron-redox cycle. *Cell Biochem.Funct.*, 20(1):19–29, 2002.
- R.E. Dailey, A.M. Blaschka, and E.A. Brouwer. Absorption, distribution, and excretion of [14c]patulin by rats. *J.Toxicol.Environ.Health*, 3(3):479–489, 1977.
- E.C. de Jong, H.H. Smits, and M.L. Kapsenberg. Dendritic cell-mediated t cell polarization. *Springer Semin.Immunopathol.*, 26(3):289–307, 2005.
- T. Decker, P. Kovarik, and A. Meinke. Gas elements: a few nucleotides with a major impact on cytokine-induced gene expression. *J.Interferon Cytokine Res.*, 17(3):121–134, 1997.

- F. Dickens and H.E. Jones. Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Br.J.Cancer*, 15, 1961.
- G. Dirheimer and E.E. Creppy. Mechanism of action of ochratoxin a. *IARC Sci.Publ.*, (115):171–186, 1991.
- I.L. Dodge, M.W. Carr, M. Cernadas, and M.B. Brenner. Il-6 production by pulmonary dendritic cells impedes th1 immune responses. *J.Immunol.*, 170(9):4457–4464, 2003.
- J.E. Durbin, R. Hackenmiller, M.C. Simon, and D.E. Levy. Targeted disruption of the mouse stat1 gene results in compromised innate immunity to viral disease. *Cell*, 84(3):443–450, 1996.
- R.D. Eichner, P. Waring, A.M. Geue, A.W. Braithwaite, and A. Mullbacher. Gliotoxin causes oxidative damage to plasmid and cellular dna. *J Biol.Chem.*, 263(8):3772–3777, 1988.
- L. Escoula, M. Thomsen, D. Bourdiol, B. Pipy, S. Peuriere, and F. Roubinet. Patulin immunotoxicology: effect on phagocyte activation and the cellular and humoral immune system of mice and rabbits. *Int.J Immunopharmacol.*, 10(8):983–989, 1988.
- M. Faust, R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi, and L.H. Grimme. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat.Toxicol.*, 56(1):13–32, 2001.
- M. Faust, R. Altenburger, T. Backhaus, H. Blanck, W. Boedeker, P. Gramatica, V. Hamer, M. Scholze, M. Vighi, and L.H. Grimme. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat.Toxicol.*, 63(1):43–63, 2003.
- A. Filali, A.M. Betbeder, I. Baudrimont, A. Benayad, R. Soulaymani, and E.E. Creppy. Ochratoxin a in human plasma in morocco: a preliminary survey. *Hum.Exp.Toxicol.*, 21(5):241–245, 2002.
- B. Flannigan, E.M. McCabe, and F. McGarry. Allergenic and toxigenic microorganisms in houses. *Soc.Appl Bacteriol.Symp.Ser.*, 20:61S–73S, 1991.
- R. Fliege and M. Metzler. The mycotoxin patulin induces intra- and intermolecular protein crosslinks in vitro involving cysteine, lysine, and histidine side chains, and alpha-amino groups. *Chem.Biol.Interact.*, 123(2):85–103, 1999.
- R. Fliege and M. Metzler. Electrophilic properties of patulin. n-acetylcysteine and glutathione adducts. *Chem Res Toxicol*, 13(5):373–81, 2000.

- L. Friedmann. Patulin: mycotoxin or fungal metabolite? *Biodeterioration Research*, 3:21–54, 1990.
- R. Froquet, Y. Sibiril, and D. Parent-Massin. Trichothecene toxicity on human megakaryocyte progenitors (cfu-mk). *Hum.Exp.Toxicol.*, 20(2):84–89, 2001.
- Y. Fukui, K. Hoshino, Y. Kameyama, T. Yasui, C. Toda, and H. Nagano. Placental transfer of ochratoxin a and its cytotoxic effect on the mouse embryonic brain. *Food Chem.Toxicol.*, 25(1):17–24, 1987.
- E. Geiger, R. Magerstaedt, J.H. Wessendorf, S. Kraft, D. Hanau, and T. Bieber. Il-4 induces the intracellular expression of the alpha chain of the high-affinity receptor for ige in in vitro-generated dendritic cells. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 105(1 Pt 1): 150–156, 2000.
- M. Gekle, G. Schwerdt, R. Freudinger, S. Mildenerger, D. Wilflingseder, V. Pollack, M. Dander, and H. Schramek. Ochratoxin a induces jnk activation and apoptosis in mdck-c7 cells at nanomolar concentrations. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 293(3): 837–844, 2000.
- J.F. Gent, P. Ren, K. Belanger, E. Triche, M.B. Bracken, T.R. Holford, and B.P. Leaderer. Levels of household mold associated with respiratory symptoms in the first year of life in a cohort at risk for asthma. *Environ.Health Perspect.*, 110(12): A781–A786, 2002.
- T.D. Gilmore and P.J. Morin. The i kappa b proteins: members of a multifunctional family. *Trends Genet.*, 9(12):427–433, 1993.
- R.P. Glahn, Jr. Wideman, R.F., J.W. Evangelisti, and W.E. Huff. Effects of ochratoxin a alone and in combination with citrinin on kidney function of single comb white leghorn pullets. *Poult.Sci.*, 67(7):1034–1042, 1988.
- L.H. Grimme, R. Altenburger, T. Backhaus, W. Bödeker, M. Faust, and Scholze M. Vorhersagbarkeit und Beurteilung der aquatischen Toxizität von Stoffgemischen. volume 25. UFZ-Bericht, Leipzig, 1998.
- J.P. Groten, O. Tajima, V.J. Feron, and E.D. Schoen. Statistically designed experiments to screen chemical mixtures for possible interactions. *Environ.Health Perspect.*, 106 Suppl 6:1361–1365, 1998.
- M. Gupta, D. Sasmal, S. Bandyopadhyay, G. Bagchi, T. Chatterjee, and S. Dey. Hematological changes produced in mice by ochratoxin a and citrinin. *Toxicology*, 26(1):55–62, 1983.
- S. Gupta, H. Yan, L.H. Wong, S. Ralph, J. Krolewski, and C. Schindler. The sh2 domains of stat1 and stat2 mediate multiple interactions in the transduction of ifn-alpha signals. *EMBO J*, 15(5):1075–1084, 1996.

- H. Hadeiba and R.M. Locksley. Lung cd25 cd4 regulatory t cells suppress type 2 immune responses but not bronchial hyperreactivity. *J.Immunol.*, 170(11):5502–5510, 2003.
- B. Hald. Ochratoxin a in human blood in european countries. (115):159–164, 1991.
- M. Hanelt, M. Gareis, and B. Kollarczik. Cytotoxicity of mycotoxins evaluated by the mtt-cell culture assay. *Mycopathologia*, 128(3):167–174, 1994.
- A.W. Hayes, R.D. Hood, and H.L. Lee. Teratogenic effects of ochratoxin a in mice. *Teratology*, 9(1):93–97, 1974.
- O. Herbarth, G.J. Fritz, J.C. Behler, M. Rehwagen, J.L. Puliafito, M. Richter, U. Schlink, J. +Sernaglia, E. Puliafito, C. Puliafito, M. Schilde, and W. Wildführ. Epidemiologic risk analysis of environmentally attributed exposure on airway diseases and allergies in children. *Central european Journal of public Health*, 7(2): 72–76, 1999.
- H. Herfarth, K. Brand, H.C. Rath, G. Rogler, J. Scholmerich, and W. Falk. Nuclear factor-kappa b activity and intestinal inflammation in dextran sulphate sodium (dss)-induced colitis in mice is suppressed by gliotoxin. *Clin.Exp.Immunol.*, 120 (1):59–65, 2000.
- C.A. Herrick and K. Bottomly. To respond or not to respond: T cells in allergic asthma. *Nat.Rev.Immunol.*, 3(5):405–412, 2003.
- J.A. Hinson and D.W. Roberts. Role of covalent and noncovalent interactions in cell toxicity: effects on proteins. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.*, 32:471–510, 1992.
- J. Horejs-Hoeck and A. Duschl. Die Rolle von Zytokinen bei Allergien und Asthma. *Bundesgesundheitsbl.-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz*, 46:211–216, 2003.
- W.E. Huff, L.F. Kubena, R.B. Harvey, Jr. Hagler, W.M., S.P. Swanson, T.D. Phillips, and C.R. Creger. Individual and combined effects of aflatoxin and deoxynivalenol (don, vomitoxin) in broiler chickens. *Poult.Sci.*, 65(7):1291–1298, 1986.
- F.L. Jahnsen, E.D. Moloney, T. Hogan, J.W. Upham, C.M. Burke, and P.G. Holt. Rapid dendritic cell recruitment to the bronchial mucosa of patients with atopic asthma in response to local allergen challenge. *Thorax*, 56(11):823–826, 2001.
- B.B. Jarvis and J.D. Miller. Mycotoxins as harmful indoor air contaminants. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*, 66(4):367–372, 2005.
- P. Jeswal. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of mus musculus. *Cytobios*, 86(344):29–33, 1996.

- L.N. Johannessen, A.M. Nilsen, and M. Lovik. The mycotoxins citrinin and gliotoxin differentially affect production of the pro-inflammatory cytokines tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6, and the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. *Clin. Exp. Allergy*, 35(6):782–789, 2005.
- H. Jonuleit, E. Schmitt, H. Kakirman, M. Stassen, J. Knop, and A.H. Enk. Infectious tolerance: human cd25(+) regulatory t cells convey suppressor activity to conventional cd4(+) t helper cells. *J. Exp. Med.*, 196(2):255–260, 2002.
- K. Jorgensen. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for ochratoxin a. *Food Addit. Contam.*, 15(5):550–554, 1998.
- S. Jovanovic, A. Felder-Kennel, T. Gabrio, B. Kouros, B. Link, V. Maisner, I. Piechotowski, K.H. Schick, M. Schrimpf, U. Weidner, I. Zollner, and M. Schwenk. Indoor fungi levels in homes of children with and without allergy history. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 207(4):369–378, 2004.
- S. Kagami, H. Saeki, M. Komine, T. Kakinuma, Y. Tsunemi, K. Nakamura, K. Sasaki, A. Asahina, and K. Tamaki. Interleukin-4 and interleukin-13 enhance ccl26 production in a human keratinocyte cell line, hacat cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 141(3):459–466, 2005.
- P. Kalinski, C.M.; Hilkens, E.A.; Wierenga, and M.L.; Kapsenberg. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 20(12):561–567, 1999.
- H.G. Kamp, G. Eisenbrand, J. Schlatter, K. Wurth, and C. Janzowski. Ochratoxin a: induction of (oxidative) dna damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology*, 206(3):413–425, 2005.
- M. Kanisawa. Synergistic effect of citrinin on hepatorenal carcinogenesis of oa in mice. *Toxigenic fungi: their toxins and health hazard*, pages 245–254. Elsevier, Tokio, Kodansha and Amsterdam, 1984.
- M. Kanisawa, S. Suzuki, Y. Kozuka, and M. Yamazaki. Histopathological studies on the toxicity of ochratoxin a in rats. i. acute oral toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 42(1):55–64, 1977.
- M.H. Kaplan, U. Schindler, S.T. Smiley, and M.J. Grusby. Stat6 is required for mediating responses to il-4 and for development of th2 cells. *Immunity.*, 4(3):313–319, 1996.
- M. Karin and Y. Ben-Neriah. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of nf- κ b activity. *Annu. Rev. Immunol.*, 18:621–663, 2000.
- G.G. Khachatourians. Metabolic effects of trichothecene t-2 toxin. 68(7):1004–1008, 1990.

- M. Kilpelainen, E.O. Terho, H. Helenius, and M. Koskenvuo. Home dampness, current allergic diseases, and respiratory infections among young adults. *56(6): 462-467 J - Thorax*, 2001.
- N. Kitabatake, E. Doi, and A.B. Trivedi. Toxicity evaluation of the mycotoxins, citrinin and ochratoxin a, using several animal cell lines. *Comp Biochem. Physiol C.*, 105(3):429-433, 1993.
- M. Kroll, F. Arenzana-Seisdedos, F. Bachellerie, D. Thomas, B. Friguet, and M. Conconi. The secondary fungal metabolite gliotoxin targets proteolytic activities of the proteasome. *Chem Biol.*, 6(10):689-698, 1999.
- T. Kuiper-Goodman and P.M. Scott. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin a. *Biomed. Environ. Sci.*, 2(3):179-248, 1989.
- T. Lea, K. Steien, and F.C. Stormer. Mechanism of ochratoxin a-induced immunosuppression. *Mycopathologia*, 107(2-3):153-159, 1989.
- S. Lebrun and W. Follmann. Detection of ochratoxin a-induced dna damage in mdck cells by alkaline single cell gel electrophoresis (comet assay). *Arch. Toxicol.*, 75(11-12):734-741, 2002.
- M.G. Lee, S. Li, B.B. Jarvis, and J.J. Pestka. Effects of satratoxins and other macrocyclic trichothecenes on il-2 production and viability of el-4 thymoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 57(7):459-474, 1999.
- I. Lehmann, A. Müller, U Diez, M. Richter, S. Wallach, G. Sierig, A. Seiffart, H. Wetzig, M Borte, and O. Herbarth. Indoor mould exposure reduces th1 reactivity in early childhood. *Indoor and Built Environment*, 12:231-233, 2003.
- D.J. Lenschow, T.L. Walunas, and J.A. Bluestone. Cd28/b7 system of t cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.*, 14:233-258, 1996.
- D.Y. Leung. Molecular basis of allergic diseases. *Mol. Genet. Metab*, 63(3):157-167, 1998.
- C.W. Lewis, J.E. Smith, J.G. Anderson, and R.I. Freshney. Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome p450 expression using the mtt bioassay. *Mycopathologia*, 148(2):97-102, 1999.
- L.A. Linehan, W.D. Warren, P.A. Thompson, M.J. Grusby, and M.T. Berton. Stat6 is required for il-4-induced germline ig gene transcription and switch recombination. *J. Immunol.*, 161(1):302-310, 1998.
- B.H. Liu, F.Y. Yu, T.S. Wu, S.Y. Li, M.C. Su, M.C. Wang, and S.M. Shih. Evaluation of genotoxic risk and oxidative dna damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 191(3):255-263, 2003.

- Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, and D. Schubert. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (mtt) reduction. *J.Neurochem.*, 69(2):581–593, 1997.
- S Loewe. Die Mischarznei. Versuch einer allgemeinen Pharmakologie der Arzneikombinationen. *Klin. Wochenschr*, 6:1077–1085, 1927.
- S Loewe. The problem of synergismus and antagonismus of combined drugs. *Arzneim-Forsch/Drug Res*, 3:285–290, 1953.
- S Loewe and H. Muischnek. Über Kombinationswirkungen. 1. Mitteilung: Hilfsmittel der Fragestellung. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 144: 313–326, 1926.
- M.I. Luster, D.R. Germolec, G.R. Burleson, C.W. JFmeson, M.F. Ackermann, K.R. Lamm, and H.T. Hayes. Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin a. *Cancer Res.*, 47(9):2259–2263, 1987.
- R. Mahfoud, M. Maresca, N. Garmy, and J. Fantini. The mycotoxin patulin alters the barrier function of the intestinal epithelium: mechanism of action of the toxin and protective effects of glutathione. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 181(3):209–218, 2002.
- S. Malek, T. Huxford, and G. Ghosh. Ikappa balpha functions through direct contacts with the nuclear localization signals and the dna binding sequences of nf-kappab. 273(39):25427–25435.
- M.L. Marin, J. Murtha, W. Dong, and J.J. Pestka. Effects of mycotoxins on cytokine production and proliferation in el-4 thymoma cells. *J Toxicol.EnvIRON.Health*, 48 (4):379–396, 1996.
- S. Matsukura, C. Stellato, S.N. Georas, V. Casolaro, J.R. Plitt, K. Miura, S. Kurosawa, U. Schindler, and R.P. Schleimer. Interleukin-13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a stat6-dependent mechanism. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.*, 24(6):755–761, 2001.
- T. Matsura, M. Kai, Y. Fujii, H. Ito, and K. Yamada. Hydrogen peroxide-induced apoptosis in hl-60 cells requires caspase-3 activation. *Free Radic.Res.*, 30(1):73–83, 1999.
- K. Mayura, R. Parker, W.O. Berndt, and T.D. Phillips. Effect of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin a and citrinin in the rat. *J.Toxicol.EnvIRON.Health*, 13(4-6):553–561, 1984.
- A.J. McAdam, A.N. Schweitzer, and A.H. Sharpe. The role of b7 co-stimulation in activation and differentiation of cd4+ and cd8+ t cells. *Immunol.Rev.*, 165: 231–247, 1998.

- W. Mücke and C. Lemmen. *Schimmelpilze Vorkommen - Gesundheitsgefahren - Schutzmaßnahmen*. Ecomed Verlagsgesellschaft AG u. Co.KG, Landsberg, 1999.
- F.A. Meky, L.J. Hardie, S.W. Evans, and C.P. Wild. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. *Food Chem. Toxicol.*, 39(8):827-836, 2001.
- M.A. Meraz, J.M. White, K.C. Sheehan, E.A. Bach, S.J. Rodig, A.S. Dighe, D.H. Kaplan, J.K. Riley, A.C. Greenlund, D. Campbell, K. Carver-Moore, R.N. DuBois, R. Clark, M. Aguet, and R.D. Schreiber. Targeted disruption of the stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the jfk-stat signaling pathway. *Cell*, 84(3):431-442, 1996.
- C. Micco, M. Miraglia, L. Benelli, R. Onori, A. Ioppolo, and A. Mantovani. Long term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 2. residues of ochratoxin a and aflatoxins in broilers and laying hens after combined administration of ochratoxin a and aflatoxin b1. *Food Addit. Contam.*, 5(3):309-314, 1988.
- F. Minervini, F. Fornelli, G. Lucivero, C. Romano, and A. Visconti. T-2 toxin immunotoxicity on human b and t lymphoid cell lines. *Toxicology*, 210(1):81-91, 2005.
- S. Miura, K. Hasumi, and A. Endo. Inhibition of protein prenylation by patulin. *FEBS Lett.*, 318(1):88-90, 1993.
- A. Müller, I. Lehmann, A. Seiffart, U. Diez, H. Wetzig, M. Borte, and O. Herbarth. Increased incidence of allergic sensitisation and respiratory diseases due to mould exposure: results of the leipzig allergy risk children study (lars). *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 204(5-6):363-365, 2002.
- T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological methods*, 65: 55-63. TY - JOUR Year = 1983.
- A. Mullbacher and R.D. Eichner. Immunosuppression in vitro by a metabolite of a human pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(12):3835-3837, 1984.
- A. Mullbacher, P. Waring, U. Tiwari-Palni, and R.D. Eichner. Structural relationship of epipolythiodioxopiperazines and their immunomodulating activity. *Mol. Immunol.*, 23(2):231-235, 1986.
- M. Muller, J. Briscoe, C. Laxton, D. Guschin, A. Ziemiecki, O. Silvennoinen, A.G. Harpur, G. Barbieri, B.A. Witthuhn, C. Schindler, and . The protein tyrosine kinase jak1 complements defects in interferon- alpha/beta and -gamma signal transduction. *Nature*, 366(6451):129-135, 1993.

- K.B. Nguyen, W.T. Watford, R. Salomon, S.R. Hofmann, G.C. Pien, A. Morinobu, M. Gadina, J.J. O'Shea, and C.A. Biron. Critical role for stat4 activation by type 1 interferons in the interferon-gamma response to viral infection. *Science*, 297 (5589):2063–2066, 2002.
- R. Nishikomori, R.O. Ehrhardt, and W. Strober. T helper type 2 cell differentiation occurs in the presence of interleukin 12 receptor beta2 chain expression and signaling. *J.Exp.Med.*, 191(5):847–858, 2000.
- R.F. Omar, B.B. Hasinoff, F. Mejilla, and A.D. Rahimtula. Mechanism of ochratoxin a stimulated lipid peroxidation. *Biochem.Pharmacol.*, 40(6):1183–1191, 1990.
- Y.L. Ouyang, J.I. Azcona-Olivera, and J.J. Pestka. Effects of trichothecene structure on cytokine secretion and gene expression in murine cd4+ t-cells. *Toxicology*, 104 (1-3):187–202, 1995.
- H.L. Pahl, B. Krauss, K. Schulze-Osthoff, T. Decker, E.B. Traenckner, M. Vogt, C. Myers, T. Parks, P. Warring, A. Muhlbacher, A.P. Czernilofsky, and P.A. Baeuerle. The immunosuppressive fungal metabolite gliotoxin specifically inhibits transcription factor nf-kappab. *J.Exp.Med.*, 183(4):1829–1840, 1996.
- E. Papadimitriou and P.I. Lelkes. Measurement of cell numbers in microtiter culture plates using the fluorescent dye hoechst 33258. *J Immunol.Methods*, 162(1):41–45, 1993.
- J.J. Pestka and G.S. Bondy. Alteration of immune function following dietary mycotoxin exposure. *Can.J.Physiol Pharmacol.*, 68(7):1009–1016, 1990.
- E. Pfeiffer, T.T. Diwald, and M. Metzler. Patulin reduces glutathione level and enzyme activities in rat liver slices. *Mol.Nutr.Food Res.*, 49(4):329–336, 2005.
- R. Reddy, M. Taylor, and R.P. Sharma. Evaluation of citrinin toxicity on the immune functions of mice. *J Food Protect*, 51:32–36, 1988.
- N. Reider, D. Reider, S. Ebner, S. Holzmann, M. Herold, P. Fritsch, and N. Romani. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in il-12 production. *J.Allergy Clin.Immunol.*, 109(1):89–95, 2002.
- J. Reiss. *Schimmelpilze - Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1997.
- S.M. Ribeiro, G.M. Chagas, A.P. Campello, and M.L. Kluppel. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. v. effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. *Cell Biochem.Funct.*, 15(3):203–209, 1997.
- N.R. Rice and M.K. Ernst. In vivo control of nf-kappa b activation by i kappa b alpha. *EMBO J.*, 12(12):4685–4695, 1993.

- J.L. Richard, R.D. Plattner, J. May, and S.L. Liska. The occurrence of ochratoxin a in dust collected from a problem household. *Mycopathologia*, 146(2):99–103, 1999.
- B. Rio, S. Lautraite, and D. Parent-Massin. In vitro toxicity of trichothecenes on human erythroblastic progenitors. *Hum.Exp.Toxicol.*, 16(11):673–679, 1997.
- A. Ritieni. Patulin in italian commercial apple products. *J.Agric.Food Chem.*, 51(20):6086–6090, 2003.
- L. Rogge, D. D'Ambrosio, M. Biffi, G. Penna, L.J. Minetti, D.H. Presky, L. Adorini, and F. Sinigaglia. The role of stat4 in species-specific regulation of th cell development by type i ifns. *J.Immunol.*, 161(12):6567–6574, 1998.
- S. Romagnani. Biology of human th1 and th2 cells. *J.Clin.Immunol.*, 15(3):121–129, 1995.
- S. Romagnani. Development of th 1- or th 2-dominated immune responses: what about the polarizing signals? *Int.J.Clin.Lab.Res.*, 26(2):83–98, 1996a.
- S. Romagnani. Th1 and th2 in human diseases. *Clin.Immunol.Immunopathol.*, 80(3 Pt 1):225–235, 1996b.
- S. Romagnani. T-cell subsets (th1 versus th2). *Ann.Allergy Asthma Immunol.*, 85(1):9–18, 2000.
- P.P. Roux and J. Blenis. Erk and p38 mapk-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.*, 68(2):320–344, 2004.
- A.S. Russell. Immune modulation (th1 and th2 responses) in pregnancy. *Scand.J.Rheumatol.Suppl.*, 107:14-7:14–17, 1998.
- G.A. Sansing, E.B. Lillehoj, R.W. Detroy, and M.A. Miller. Synergistic toxic effects of citrinin, ochratoxin a and penicillic acid in mice. *Toxicon*, 14(3):213–220, 1976.
- G.J. Schaaf, S.M. Nijmeijer, R.F. Maas, P. Roestenberg, E.M. de Groene, and J. Fink-Gremmels. The role of oxidative stress in the ochratoxin a-mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochim.Biophys.Acta*, 1588(2):149–158, 2002.
- T. Schäfer, U. Kramer, D. Dockery, D. Vieluf, H. Behrendt, and J. Ring. What makes a child allergic? analysis of risk factors for allergic sensitization in preschool children from east and west germany. *Allergy Asthma Proc.*, 20(1):23–27, 1999.
- C.W. Schindler. Series introduction. jak-stat signaling in human disease. *J.Clin.Invest*, 109(9):1133–1137, 2002.

- H. Schramek, D. Wilflingseder, V. Pollack, R. Freudinger, S. Mildenberger, and M. Gekle. Ochratoxin a-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with madin-darby canine kidney-c7 cell dedifferentiation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 283(3):1460–1468, 1997.
- T. Schulz, K. Senkpiel, and H. Ohgke. Comparison of the toxicity of reference mycotoxins and spore extracts of common indoor moulds. *Int.J.Hyg.Environ.Health*, 207(3):267–277, 2004.
- K. Shimoda, Deursen J. van, M.Y. Sangster, S.R. Sarawar, R.T. Carson, R.A. Tripp, C. Chu, F.W. Quelle, T. Nosaka, D.A. Vignali, P.C. Doherty, G. Grosveld, W.E. Paul, and J.N. Ihle. Lack of il-4-induced th2 response and ige class switching in mice with disrupted stat6 gene. *Nature*, 380(6575):630–633, 1996.
- K. Shuai, C.M. Horvath, L.H. Huang, S.A. Qureshi, D. Cowburn, and Jr. Darnell, J.E. Interferon activation of the transcription factor stat91 involves dimerization through sh2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell*, 76(5):821–828, 1994.
- M.A. Skaug. Levels of ochratoxin a and ige against conidia of penicillium verrucosum in blood samples from healthy farm workers. *Ann.Agric.Environ.Med.*, 10(1):73–77, 2003.
- M.A. Skaug. Analysis of norwegian milk and infant formulas for ochratoxin a. *Food Addit.Contam*, 16(2):75–78, 1999.
- M.A. Skaug, W. Eduard, and F.C. Stormer. Ochratoxin a in airborne dust and fungal conidia. 151(2):93–98, 2001.
- T.K. Smith, E.G. McMillan, and J.B. Castillo. Effect of feeding blends of fusarium mycotoxin-contaminated grains containing deoxynivalenol and fusaric acid on growth and feed consumption of immature swine. *J.Anim Sci.*, 75(8):2184–2191, 1997.
- P.S. Steyn. Mycotoxins, general view, chemistry and structure. *Toxicol.Lett.*, 82-83: 843–851, 1995.
- F.C. Stormer and T. Lea. Effects of ochratoxin a upon early and late events in human t-cell proliferation. *Toxicology*, 95(1-3):45–50, 1995.
- W. T. Stott and L. B. Bullerman. Patulin: a mycotoxin of potential concern of foods. *J.Milk Fd Technol.*, 38:695–705, 1975.
- Y.K. Suen, K.P. Fung, C.Y. Lee, and S.K. Kong. Gliotoxin induces apoptosis in cultured macrophages via production of reactive oxygen species and cytochrome c release without mitochondrial depolarization. *Free Radic.Res.*, 35(1):1–10, 2001.

- A. Suto, H. Nakajima, S.I. Kagami, K. Suzuki, Y. Saito, and I. Iwamoto. Role of cd4(+) cd25(+) regulatory t cells in t helper 2 cell-mediated allergic inflammation in the airways. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*, 164(4):680–687, 2001.
- P. Sutton, N.R. Newcombe, P. Waring, and A. Mullbacher. In vivo immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infect.Immun.*, 62(4):1192–1198, 1994.
- O. Tajima, E.D. Schoen, V.J. Feron, and J.P. Groten. Statistically designed experiments in a tiered approach to screen mixtures of fusarium mycotoxins for possible interactions. *Food Chem.Toxicol.*, 40(5):685–695, 2002.
- T. Tanaka, Y. Katada, S. Higa, H. Fujiwara, W. Wang, Y. Saeki, S. Ohshima, Y. Okuda, M. Suemura, and T. Kishimoto. Enhancement of t helper2 response in the absence of interleukin (il-)6; an inhibition of il-4-mediated t helper2 cell differentiation by il-6. *Cytokine*, 13(4):193–201, 2001.
- I. Taranu, D.E. Marin, S. Bouhet, F. Pascale, J.D. Bailly, J.D. Miller, P. Pinton, and I.P. Oswald. Mycotoxin fumonisin b1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol.Sci.*, 84(2):301–307, 2005.
- M.G. Theumer, A.G. Lopez, D.T. Masih, S.N. Chulze, and H.R. Rubinstein. Immunobiological effects of aflb1 and aflb1-fb1 mixture in experimental subchronic mycotoxicoses in rats. *Toxicology*, 186(1-2):159–170, 2003.
- A. Thuvander, A. Breitholtz-Emanuelsson, and M. Olsen. Effects of ochratoxin a on the mouse immune system after subchronic exposure. *Food Chem.Toxicol.*, 33(12):1005–1011, 1995.
- A. Thuvander, C. Wikman, and I. Gadhasson. In vitro exposure of human lymphocytes to trichothecenes: individual variation in sensitivity and effects of combined exposure on lymphocyte function. *Food Chem.Toxicol.*, 37(6):639–648, 1999.
- P.W. Trown and J.A. Bilello. Mechanism of action of gliotoxin: elimination of activity by sulfhydryl compounds. *Antimicrob.Agents Chemother.*, 2(4):261–266, 1972.
- L.R. Trusal and L.J. Martin. Effects of sodium fluoride on uptake of t-2 mycotoxin in cultured cells. 25(7):705–711, 1987.
- Y. Ueno, K. Umemori, E. Niimi, S. Tanuma, S. Nagata, M. Sugamata, T. Ihara, M. Sekijima, K. Kawai, I. Ueno, and . Induction of apoptosis by t-2 toxin and other natural toxins in hl-60 human promyelotic leukemia cells. *Nat.Toxins.*, 3(3):129–137, 1995.

- D. Vesela, D. Vesely, and R. Jelinek. Toxic effects of ochratoxin a and citrinin, alone and in combination, on chicken embryos. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45(1):91–93, 1983.
- A. Visconti, F. Minervini, G. Lucivero, and V. Gambatesa. Cytotoxic and immunotoxic effects of fusarium mycotoxins using a rapid colorimetric bioassay. *Mycopathologia*, 113(3):181–186, 1991.
- V. Vujanovic, W. Smoragiewicz, and K. Krzysztyniak. Airborne fungal ecological niche determination as one of the possibilities for indirect mycotoxin risk assessment in indoor air. *Environ. Toxicol.*, 16(1):1–8, 2001.
- H. Walter, F. Consolaro, P. Gramatica, M. Scholze, and R. Altenburger. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (noecs). *Ecotoxicology*, 11(5):299–310, 2002.
- J. Wang, D.W. Fitzpatrick, and J.R. Wilson. Effect of t-2 toxin on blood-brain barrier permeability monoamine oxidase activity and protein synthesis in rats. 36 (11):955–961, 1998.
- P.B. Wangikar, P. Dwivedi, and N. Sinha. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin a and aflatoxin b1. i. maternal toxicity and fetal malformations. *Birth Defects Res. B Dev. Reprod. Toxicol.*, 71(6):343–351, 2004.
- P. Waring and J. Beaver. Gliotoxin and related epipolythiodioxopiperazines. *Gen. Pharmacol.*, 27(8):1311–1316, 1996.
- P. Waring, N. Newcombe, M. Edel, Q.H. Lin, H. Jiang, A. SJFarda, T. Piva, and A. Mullbacher. Cellular uptake and release of the immunomodulating fungal toxin gliotoxin. *Toxicon*, 32(4):491–504, 1994.
- C. Wasternack and J. Weisser. Inhibition of rna- and dna-synthesis by citrinin and its effects on dna precursor-metabolism in v79-e cells. *Comp Biochem. Physiol B*, 101(1-2):225–230, 1992.
- M. Watanabe and H. Shimizu. Detection of patulin in apple juices marketed in the tohoku district, japan. *J. Food Prot.*, 68(3):610–612, 2005.
- D. Watling, D. Guschin, M. Muller, O. Silvennoinen, B.A. Witthuhn, F.W. Quelle, N.C. Rogers, C. Schindler, G.R. Stark, J.N. Ihle, and . Complementation by the protein tyrosine kinase jfk2 of a mutant cell line defective in the interferon-gamma signal transduction pathway. *Nature*, 366(6451):166–170, 1993.
- H.L. Weiner. The mucosal milieu creates tolerogenic dendritic cells and t(r)1 and t(h)3 regulatory cells. 2(8):671–672, 2001.

- A.J. Whitmarsh and R.J. Davis. Transcription factor ap-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J.Mol.Med.*, 74(10):589–607, 1996.
- G. Wichmann, O. Herbarth, and I. Lehmann. The mycotoxins citrinin, gliotoxin, and patulin affect interferon-gamma rather than interleukin-4 production in human blood cells. *Environ.Toxicol.*, 17(3):211–218, 2002.
- G. Wichmann, B. Krumm, K. Drößler, O Herbarth, and I. Lehmann. The effect of gliotoxin and patulin on human t cell function. *Indoor and Built Environment*, 12:255–258, 2003.
- T.S. Wu, F.Y. Yu, C.C. Su, J.C. Kan, C.P. Chung, and B.H. Liu. Activation of erk mitogen-activated protein kinase in human cells by the mycotoxin patulin. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 207(2):103–111, 2005.
- W. Xia, C.E. Pinto, and R.L. Kradin. The antigen-presenting activities of ia+ dendritic cells shift dynamically from lung to lymph node after an airway challenge with soluble antigen. *J.Exp.Med.*, 181(4):1275–1283, 1995.
- H. Xiao, S. Madhyastha, R.R. Marquardt, S. Li, J.K. Vodela, A.A. Frohlich, and B.W. Kempainen. Toxicity of ochratoxin a, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*, 137(2):182–192, 1996.
- D. Xu, V. Trajkovic, D. Hunter, B.P. Leung, K. Schulz, J.A. Gracie, I.B. McInnes, and F.Y. Liew. Il-18 induces the differentiation of th1 or th2 cells depending upon cytokine milieu and genetic background. *Eur.J.Immunol.*, 30(11):3147–3156, 2000.
- T. Yin, M.L. Tsang, and Y.C. Yang. Jak1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4ps/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in t lymphocytes. *J.Biol.Chem.*, 269(43):26614–26617, 1994.
- L.S. Yoshida, S. Abe, and S. Tsunawaki. Fungal gliotoxin targets the onset of superoxide-generating nadph oxidase of human neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 268(3):716–723, 2000.
- T. Yoshimoto, H. Nagase, T. Ishida, J. Inoue, and H. Nariuchi. Induction of interleukin-12 p40 transcript by cd40 ligation via activation of nuclear factor-kappab. *Eur.J.Immunol.*, 27(12):3461–3470, 1997.
- Y. Zhang, R. Apilado, J. Coleman, S. Ben-Sasson, S. Tsang, J. Hu-Li, W.E. Paul, and H. Huang. Interferon gamma stabilizes the t helper cell type 1 phenotype. *J.Exp.Med.*, 194(2):165–172, 2001.

- B. Zimmerli and R. Dick. Determination of ochratoxin a at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and swiss data. *J Chromatogr.B Biomed.Appl.*, 666(1):85–99, 1995.
- B. Zimmerli and R. Dick. Ochratoxin a in table wine and grape-juice: occurrence and risk assessment. *Food Addit. Contam*, 13(6):655–668, 1996.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich bei der Anfertigung der Arbeit unterstützt haben.

Frau Prof. Dr. K. Nieber und Frau Dr. I. Lehmann für die Überlassung des interessanten Themas, die Übernahme der wissenschaftlichen Betreuung, die allzeitige Diskussionsbereitschaft und die Durchsicht der Manuskripte.

Frau Dr. I. Lehmann für die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente, ihren fachlichen Rat und die anregenden Diskussionen.

Bei der Arbeitsgruppe Allergie und Zytokine (Leiter Prof. Dr. A. Duschl), Fachbereich molekulare Biologie, Institut Chemie und Biochemie der naturwissenschaftlichen Fakultät der Paris-Lodron Universität Salzburg für die Einarbeitung in die Methoden der Molekularbiologie. Mein besonderer Dank gilt dabei Petra Luft und Dr. Jutta Horejes-Höck.

Gundula Fischäder, Clarissa Dägelmann, Gunda Herberth für hilfreiche Ratschläge, für Aufmunterung, Spaß und freundschaftlichen Zuspruch.

Dr. Rolf Altenburger für die Einarbeitung in die Vorhersagekonzepte und den Design der Mischungen.

Anke Rose und Franziska Kohse für die kleinen und großen Hilfen im Labor.

Den Mitarbeitern des Departments Umweltimmunologie für ihre Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen, für die kollegiale und freundliche Atmosphäre. Gern erinnere ich mich an diverse Kuchenrunden und lustiges Beisammensein.

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt hat. Vor allem Michael Tammer für seine unendliche Geduld, für seine Toleranz und seine Hilfe bei der Einarbeitung in das Programm Latex.

Erklärung

Die Promotionsordnung der Fakultät der Biowissenschaften, Pharmazie und Psychologie ist mir bekannt. Diese Arbeit wurde entsprechend den darin enthaltenen Forderungen und Anforderungen erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Zur Durchführung der Arbeit und zur Erstellung der Dissertationsschrift wurden nur die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre, dass ich zuvor weder mit dieser oder mit einer anderen Arbeit erfolglose Promotionsversuche unternommen habe. Diese Arbeit wurde zuvor an keiner anderen Hochschule oder Universität des In- und Auslandes als Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rerum naturalium (Kurzform: Dr. rer. nat.) vorgelegt oder andersweitig publiziert.

Leipzig, den 4. Oktober 2005

Beate Krumm

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Beate Krumm
Geburtsdatum/ort: 26.03.1978; Leipzig
Familienstand: ledig

Schulbildung

1984 - 1986 4. Oberschule, Leipzig
1986 - 1988 Karl-Jungbluth-Schule, Leipzig
1988 - 1992 4. Oberschule, Leipzig
1992 - 1997 Immanuel-Kant-Gymnasium, Leipzig
Abschluss: Abitur, Note 1,5

Wissenschaftlicher Werdegang

1997 - 2002 Biologie-Studium, Universität Leipzig
1999 Vordiplom, Note „gut“
2002 Diplom, Note „sehr gut“
2001 - 2002 Diplomarbeit „Immunmodulation durch Mykotoxine“
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH
2002 - 2005 Dissertation
„Immunmodulation durch Mykotoxine“
Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH

