

Neuartige oxidative Metaboliten von Zearalenon und α -Zearalanol: Strukturen und Reaktivitäten

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
Karlsruher Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Andreas A. Hildebrand

aus Mannheim

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Manfred Metzler

Korreferent: Prof. Dr. Mirko Bunzel

Tag der mündlichen Prüfung: 2012/04/20

Für meine Familie.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zearalenon (ZEN) und Zearalenol (ZEL)	1
1.1.1	Nomenklatur	2
1.1.2	Chemische Eigenschaften von ZEN	2
1.1.3	Vorkommen und Höchstmengen	2
1.1.4	Biosynthese von ZEN	3
1.1.5	ZEN-Kongenerere aus Fusarien	4
1.1.6	Säugermetabolismus von ZEN	6
1.2	α -Zearalanol (α -ZAL)	9
1.2.1	Chemische Eigenschaften von α -ZAL	9
1.2.2	Säugermetabolismus von α -ZAL	9
1.3	Toxizität	10
1.4	Estrogene Eigenschaften	11
2	Problemstellung	13
3	Ergebnisse und Diskussion	15
3.1	Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten	15
3.1.1	ZEN- und ZEL-Metaboliten aus mikrosomaler Umsetzung	17
3.1.2	ZEN-Kongenerere aus Pilzkultur	27
3.1.3	Bildung von ZEN-Kongeneren auf verschimmeltem Feldmais	34
3.2	Vergleich des oxidativen Metabolismus von ZEN und α -ZAL mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen	36
3.2.1	Metaboliten mikrosomaler Umsetzungen von ZEN	36
3.2.2	Aktivitäten von Mikrosomen verschiedener Spezies	38
3.2.3	Phase I-Metabolismus von α -ZAL im Säuger	40
3.2.4	Oxidation der RALs durch humane Cytochrom-P450-Isoenzyme	43
3.3	Phase II-Metabolismus und Inaktivierungsreaktionen	45
3.3.1	Glucuronidierung	45
3.3.1.1	Strukturaufklärung	45
3.3.1.2	<i>In vitro</i> -Glucuronidierung der RALs	47
3.3.2	Reaktivität der Catechole	51

3.3.2.1	Methylierung der Catechole	53
3.3.2.2	NAC-Adduktbildung der Catechole	55
3.3.3	Präzisionsgewebeschnitte von α -ZAL	58
4	Zusammenfassung	61
5	Material und Methoden	65
5.1	Verwendete Geräte	65
5.2	Chemikalien	65
5.3	Biologisches Material	66
5.4	Puffer	67
5.5	Medien	68
5.6	Methoden	69
5.6.1	Pilzkultur	69
5.6.2	Maisextraktion	71
5.6.3	Enzymatische Methoden	72
5.6.3.1	Mikrosomale Umsetzung	72
5.6.3.2	Oxidation/Reduktion mit HSD	75
5.6.4	Reaktion der Catechole mit NAC	76
5.6.5	Präparation und Inkubation von Rattenleberschnitten	77
5.6.6	Chemische Synthesen aus ZEN	79
5.6.6.1	Synthese der RAL-Catechole	79
5.6.6.2	ZEN-Epoxid-Synthese	79
5.6.6.3	ZEN-Dihydrodiol-Synthese	80
5.6.6.4	6-HO-ZEN- und 8-HO-ZEN-Synthese	80
5.6.7	Chemische Modifikationen von Metaboliten	81
5.6.7.1	Keto-Endiol-Umlagerungen	81
5.6.7.2	Reduktion mit Natriumborhydrid	81
5.6.7.3	Hydrierung	82
5.6.7.4	Hydrierung mit Deuterium	82
5.6.7.5	Mangandioxid-Oxidation	83
5.6.7.6	Epoxidhydrolyse	83
5.7	Analytik	84
5.7.1	Analytische HPLC mit DAD	84
5.7.2	Präparative HPLC mit UV-Detektor	85

5.7.3 Analytische HPLC mit DAD und MS	87
Literaturverzeichnis	91
A Anhang	103
A.1 Überblick über die MS/MS-Spektren der identifizierten RAL-Metaboliten	103
A.2 Externe Kalibrierungen	107
A.3 MS-Geräteparameter	107
B Publikationsliste	109

Abkürzungsverzeichnis

8-Oxo-dG	8-Oxo-2'-desoxyguanosin
bidest	bidestilliert
COMT	Catechol- <i>O</i> -Methyltransferasen
CYP	Cytochrom P450-haltige Monooxygenasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E1	Estron
E2	17 β -Estradiol
ER	Estrogenrezeptor
ESI	Elektrospray-Ionisation
GSH	Glutathion
HBSS	Hank´s Buffered Salt Solution
HLC	Humanes Lebercytosol
HLM	Humane Lebermikrosomen
HO	Hydroxy
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HSD	Hydroxysteroiddehydrogenase
IBX	2-Iodoxybenzoesäure
LOEL	Lowest Observed Effect Level
mCPBA	meta-Chlorperbenzoesäure
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladung-Verhältnis
NAC	N-Acetylcystein

NADPH Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduzierte Form

NMR Kernspinresonanzspektroskopie

NOEL No Observed Effect Level

RAL Resorcylsäurelacton

RLM Rattenlebermikrosomen

RT Retentionszeit

SAM *S*-Adenosyl-L-methionin

SD Sprague-Dawley

TDI Tolerierbare tägliche Aufnahmemenge

KG Körpergewicht

UDPGA Uridin-5'-diphosphoglucuronsäure

UGT UDP-Glucuronosyltransferasen

UV Ultraviolett

WRLM Lebermikrosomen der Wistarratte

α -ZAL α -Zearalanol

β -ZAL β -Zearalanol

ZAN Zearalanon

α -ZEL α -Zearalenol

β -ZEL β -Zearalenol

ZEN Zearalenon

1 Einleitung

Zearalenon (ZEN, Abb. 1.1) ist eines der am weitesten verbreiteten Mykotoxine und zählt zur Gruppe der Fusarientoxine. ZEN und seine reduktiven Derivate α - und β -Zearalenol (α - und β -ZEL), α - und β -Zearalanol (α - und β -ZAL) sowie Zearalanon (ZAN) gehören zur Substanzklasse der Resorcyssäurelactone (resorcylic acid lactones; RALs) und zeigen starke estrogene Eigenschaften. α -ZAL weist die höchste Estrogenität auf und wird in einigen Ländern zur Tiermast eingesetzt. Bisherige Studien zum ZEN-Metabolismus befassten sich mit der Umwandlung von ZEN in die übrigen RALs und die damit verbundene Veränderung der Estrogenität. Über den oxidativen Metabolismus ist bislang nur sehr wenig bekannt.

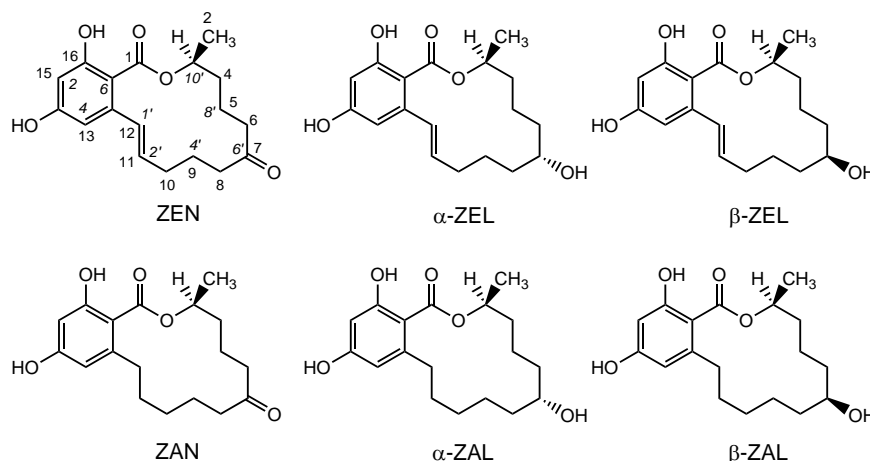


Abbildung 1.1: Chemische Strukturen der RALs. Für ZEN sind die alte (innen) und die neue (außen) Zählweise dargestellt (Metzler, 2011).

1.1 Zearalenon (ZEN) und Zearalenol (ZEL)

Die chemische Struktur von ZEN wurde erstmals durch Urry et al. (1966) aufgeklärt. Das Toxin wird beispielsweise von Fusarien der Gattungen *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. semitectum* und *F. sporotrichioides* produziert (Kuiper-Goodman et al., 1987). Die Pilze befallen Mais, aber auch Getreidesorten wie Gerste, Hafer, Roggen, Weizen, Reis und Sorghum (Tanaka et al., 1988). Die Infektion findet dabei während des Feldwachstums statt. Fusariumwachstum und Toxinbildung können aber auch während der Lagerung nach der Ernte erfolgen (Kuiper-Goodman et al., 1987).

Die ZEN-Bildung wird nicht nur unter optimalen Mycelwachstumsbedingungen beobachtet, sondern hat ein Maximum bei 12-18°C (Sherwood und Peberdy, 1972; Sherwood und Peberdy, 1974). Häufig wird die Toxinproduktion durch einen Kälteschock ausgelöst. ZEN besitzt geringe antimykotische und antibakterielle Eigenschaften (Zhao et al., 2008; Arunpanichlert et al., 2011).

1.1.1 Nomenklatur

In der Literatur finden sich unterschiedliche Nomenklaturen für ZEN. So wird ZEN häufig mit den Abkürzungen ZEA, ZEN und ZON bezeichnet. Ebenso existieren für die reduzierten Metaboliten ZEL, ZAN und ZAL unterschiedliche Abkürzungen. Des Weiteren werden in der Literatur zwei unterschiedliche Zählweisen verwendet. Eine einheitliche Nomenklatur und Zählweise wurde 2011 von Metzler vorgeschlagen. Diese werden in der vorliegenden Arbeit verwendet (Abb. 1.1).

1.1.2 Chemische Eigenschaften von ZEN

Bei ZEN handelt es sich um eine weiße, kristalline Verbindung, die einen Schmelzpunkt von 164-165°C besitzt (Urry et al., 1966). In Wasser ist ZEN unlöslich, zeigt jedoch Löslichkeit in Petrolether und Hexan. Eine gute Löslichkeit besitzt ZEN in Essigsäureethylester, Acetonitril und Alkoholen (Urry et al., 1966). ZEN hat in Methanol drei UV-Maxima bei den Wellenlängen 236 nm, 274 nm und 316 nm (Urry et al., 1966). Das Molekulargewicht der Verbindung liegt bei 318 g/mol. ZEN ist hitzestabil und hohe Temperaturen führen nicht zu seiner Abnahme. Außerdem zeigt ZEN eine hohe Stabilität während Lagerung, Konservierung, Kochen und Mahlung (Galaverna et al., 2009). Die Doppelbindung zwischen Position 11 und 12 kann durch UV-Licht von der trans- in die cis-Form umgewandelt werden (Peters, 1972).

1.1.3 Vorkommen und Höchstmengen

Ein Übersichtsartikel von Placinta et al. (1999) zeigt das Vorkommen von ZEN in vielen europäischen Ländern wie Deutschland, Polen, Niederlande, Bulgarien und Finnland. Aber das Vorkommen von ZEN ist nicht auf Europa beschränkt, sondern weite Teile der Welt sind betroffen. So wurde ZEN zum Beispiel auch in Südafrika, Indien, Thailand, Japan, Neuseeland, Kanada und Brasilien nachgewiesen.

Dabei wurden Werte bis zu 15 mg/kg in einer Gerstenprobe gemessen (Placinta et al., 1999). Betroffen sind Mais, Weizen, Hafer, Gerste und Roggen. Ein weiterer Übersichtsartikel von Maragos (2010) befasst sich mit dem Auftreten und der humanen Exposition von ZEN. Aus dieser Arbeit geht ebenfalls hervor, dass die Belastung von Getreide weltweit vorkommt. Die stärkste Kontamination tritt in Mais auf. Weizen und Gerste sind häufig weniger belastet und Hafer sowie Roggen zeigen meist nur eine geringe Belastung. Hohe Konzentrationen an ZEN wurden in Erdnüssen und Erdnussmehl nachgewiesen, wobei hierzu nur wenige Studien existieren. Gewürze wiesen nur eine geringe Belastung auf.

Für ZEN wurden zwei tolerierbare tägliche Aufnahmemengen (TDI) veröffentlicht. Die europäische Kommission schlägt einen temporären TDI von 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht (KG) vor (SCF, 2000). Dieser Wert wurde von einem 'No Observed Effect Level' (NOEL) von 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG und einem 'Lowest Observed Effect Level' (LOEL) von 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG aus einer 15-tägigen Fütterungsstudie zu estrogenen Effekten an Schweinen abgeleitet. Die JECFA (Gemeinsame FAO/WHO-Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe) gibt eine vorläufig maximal tolerierbare tägliche Aufnahmemenge von 0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG vor (JECFA, 2000).

Die europäische Union hat Höchstwerte für ZEN in Lebensmitteln festgelegt, die den Verbraucher vor zu hoher ZEN-Aufnahme schützen sollen. Die Spanne der Höchstgrenzen für verarbeitetes und unverarbeitetes Getreide reicht von 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Getreidebeikost für Säuglinge und Kleinkinder) bis 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (unverarbeiteter Mais und Maisprodukte zum unmittelbaren Verzehr) (EG-Kommission, 2006).

1.1.4 Biosynthese von ZEN

Bei ZEN handelt es sich um einen sekundären Metaboliten von *Fusarien*. Sekundäre Metaboliten sind nicht-essentiell für Pilze. In der Pilzkultur zeigt sich häufig eine ausgeprägte Wachstumsphase des Pilzes, gefolgt von einer Phase der Metabolitenproduktion (Demain, 1986).

Die Biosynthese von ZEN erfolgt über den Acetat-Polymalonatweg. Damit handelt es sich bei ZEN um ein Polyketid, das vollständig aus Acetat-Malonat-Einheiten gebildet wird (Lysoe et al., 2006; Dewick, 2003). Dieser Syntheseweg wurde bereits von Steele et al. (1974) und Pathre et al. (1989) gezeigt.

In ihren Arbeiten erhielten die Pilze ^{13}C - bzw. ^{14}C -markiertes Acetyl als Substrat. Dabei zeigte sich ein gleichmäßiger Einbau der markierten Kohlenstoffatome in das ZEN-Molekül. Für die Biosynthese wird eine Kopf zu Schwanz Kondensation von 9 Acetat-Einheiten vermutet (Steele et al., 1974). Richardson et al. (1984) konnte zeigen, dass eine Zugabe von ^{14}C -markiertem ZEN zu einer *F. roseum*-Kultur keine Umwandlung zu den ZEL-Derivaten bewirkt. Die Inkubation von α - und β -ZEL jedoch führte zur Bildung von ZEN. Daher wurde vorgeschlagen, dass ZEL eine Vorstufe in der Synthese von ZEN ist und es sich bei ZEL nicht um ein Abbauprodukt von ZEN handelt (Richardson et al., 1984).

1.1.5 ZEN-Kongenere aus Fusarien

ZEN wird von Pilzen der Gattung *Fusarium spp.* gebildet. In der Literatur wird von einigen ZEN-Kongeneren berichtet, die aus Pilzextrakten extrahiert wurden und deren Strukturen aufgeklärt werden konnte. Zu den nachgewiesenen Verbindungen gehören α -ZEL (Stipanovic und Schroeder, 1975; Hagler et al., 1979), β -ZEL (Stipanovic und Schroeder, 1975; Richardson et al., 1985), α -ZAL (Richardson et al., 1985), β -ZAL (Richardson et al., 1985), sowie die cis-Isomeren von ZEN und α/β -ZEL (Richardson et al., 1985).

Neben diesen reduktiven Derivaten wurden auch hydroxylierte Verbindungen von ZEN identifiziert. Häufig in *F. roseum* gefundene Kongenere sind die beiden Epimeren des 5-HO-ZEN (Bollinger und Tamm, 1972; Jackson et al., 1974; Steele et al., 1976; Pathre et al., 1980). Ebenso sind die Epimeren von 10-HO-ZEN aus einer *F. roseum*-Kultur isoliert worden (Pathre et al., 1980). Als weitere ZEN-Kongenere konnten 13-Formyl-ZEN und 5,6-Dehydro-ZEN nachgewiesen werden (Bollinger und Tamm, 1972).

Die Bildung von ZEN und seinen Kongeneren ist jedoch nicht auf nutzpflanzenbefallende *Fusarien* beschränkt. In einer neueren Arbeit konnte durch Kultivierung eines aus dem Seegrass *Thalassia hemprichii* isolierten *Fusarium sp.* PSU-ES73 Kongenere von ZEN isoliert werden (Arunpanichlert et al., 2011). Neben ZEN und seinen bekannten Kongeneren 5-HO-ZEN, 5,6-Dehydro-ZEN und β -ZEL, wurden 8-HO-ZEN und 8-HO-ZEL identifiziert. 8-HO-ZEL konnte ebenfalls von Zhao et al. (2008) nach Kultivierung des marinen Pilzes *Fusarium sp.* 05ABR26 isoliert werden.

1.1. Zearalenon (ZEN) und Zearalenol (ZEL)

Neben diesen oxidativen Kongeneren sind auch sog. 'maskierte Metaboliten' von ZEN bekannt. Die Bildung des ZEN-14-Sulfats (Plasencia und Mirocha, 1991; El-Sharkawy et al., 1991) und des ZEN-14-Glucosids (Poppenberger et al., 2006; Bertiiller et al., 2009) durch Pilze konnte gezeigt werden. Auch Pflanzen sind in der Lage ZEN zu metabolisieren. So konnte gezeigt werden, dass ZEN von einer Mais-Zellsuspension in ZEN-14-Glucosid umgewandelt werden kann (Engelhardt et al., 1988). ZEN-Konjugate können allerdings durch konventionelle analytische Methoden nicht detektiert werden. Im Verdauungstrakt kann jedoch eine Hydrolyse der Konjugate stattfinden (Poppenberger et al., 2006). Somit kann der ZEN-Gehalt in Futter- und Nahrungsmitteln unterschätzt werden. Die Strukturen der aus *Fusarien* extrahierten ZEN-Kongeneren sind in Abb. 1.2 dargestellt.

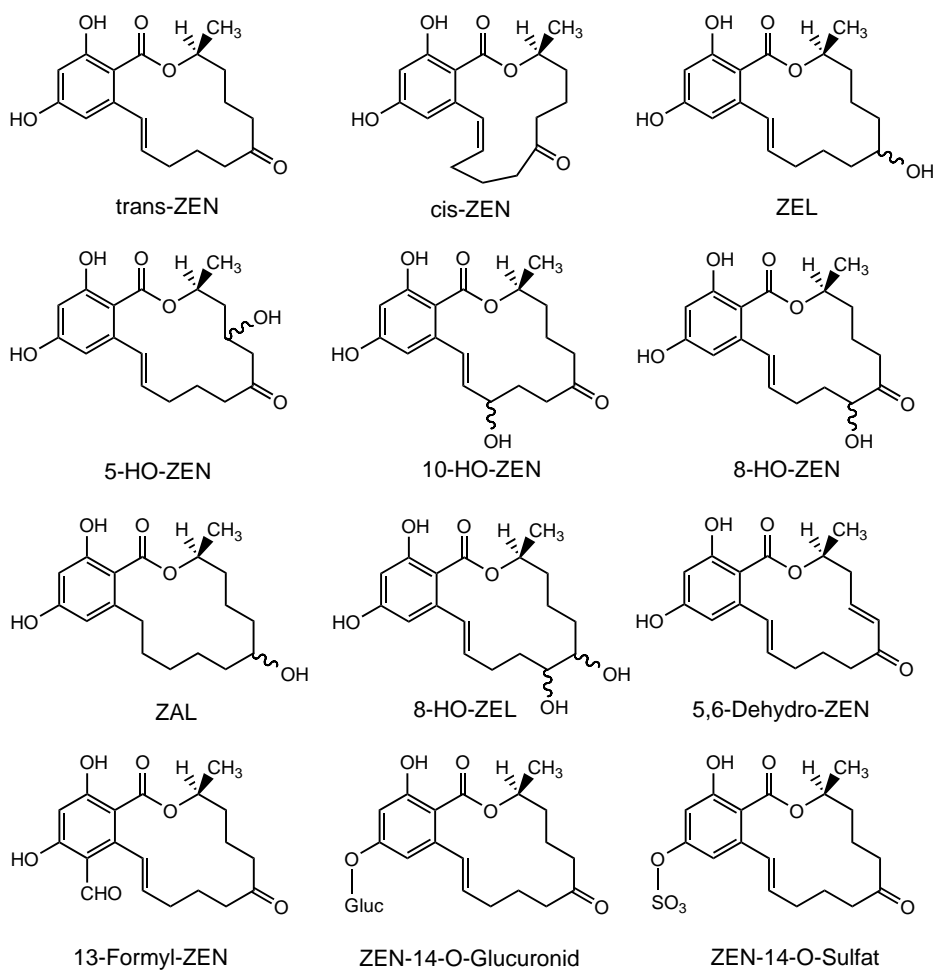


Abbildung 1.2: In der Literatur beschriebene ZEN-Kongeneren. Für ZEL und ZAL, sowie 5-HO-ZEN und 10-HO-ZEN sind beide Epimere bekannt.

1.1.6 Säugermetabolismus von ZEN

Für den Säugermetabolismus von ZEN sind schon seit langem Reaktionen zu reduktiven Derivaten bekannt (Abb. 1.3). Zusätzlich konnte die Bildung von hydroxylierten Metaboliten in einer ersten Arbeit im Arbeitskreis Metzler gezeigt werden (Pfeiffer et al., 2007). Auch Phase II-Reaktionen von ZEN werden im Säuger beobachtet.

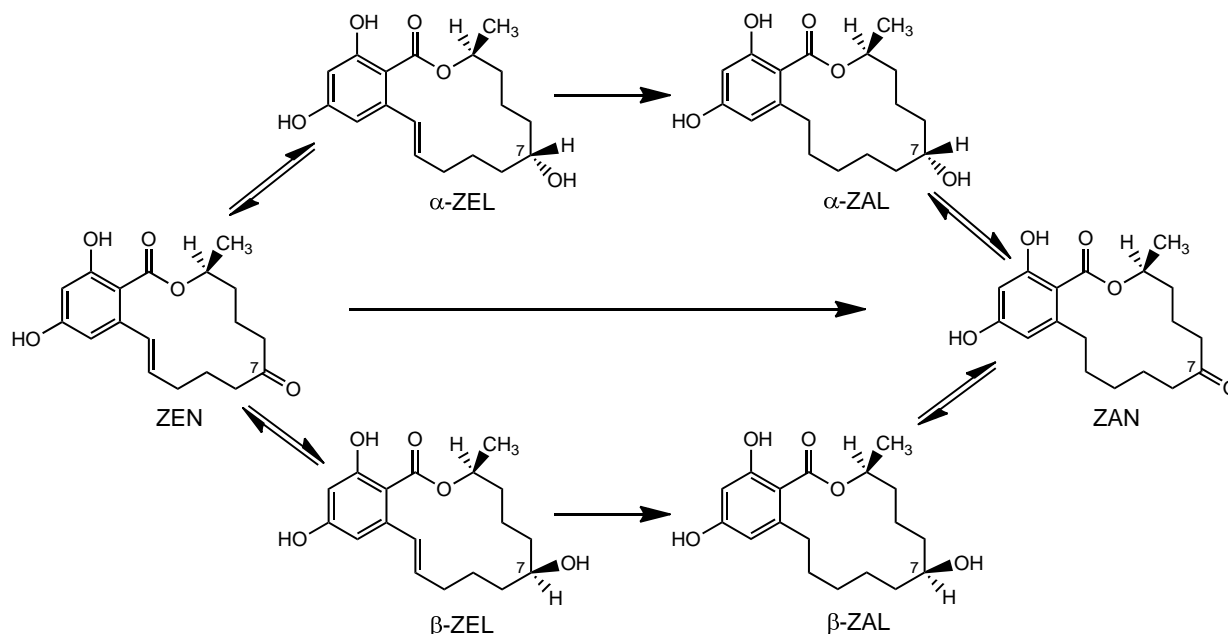


Abbildung 1.3: In der Literatur beschriebene Umwandlungsreaktionen der RALs.

Phase I-Metabolismus

Erste Untersuchungen zum Metabolismus von ZEN wurden mit Homogenaten und S9-Fractionen verschiedener Gewebe unterschiedlicher Spezies durchgeführt. Diese *in vitro*-Untersuchungen zeigten für einige Spezies die Bildung der reduktiven Metaboliten α - und β -ZEL. S9-Fractionen von Ratte (Kiessling und Petterson, 1978; Uneo et al., 1983), Kuh, Maus, Schwein, Kaninchen, Meerschwein und Hamster reduzierten ZEN in Abhängigkeit von pH-Wert, Gewebe und Geschlecht unterschiedlich stark zu den ZELs (Uneo et al., 1983). Eine Beteiligung der 3α -Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD) an der Reduktion von ZEN in Ratten wurde durch Olsen et al. (1981) gezeigt. Malekinejad et al. (2006) konnten eine Beteiligung der 3α - und 3β -HSDs am reduktiven Metabolismus in Schweinen bestätigen.

Auch für die humane Prostata konnte durch *in vitro*-Versuche mit Homogenaten eine Reduktion zu den ZELs nachgewiesen werden (Thouvenot et al., 1981). Eine weitere Studie zum reduktiven Metabolismus zeigte die Reduktion von ZEN zu α - und β -ZEL durch Darm-Homogenat weiblicher Schweine (Olsen et al., 1987). Die Autoren beschreiben eine geringere Aktivität des Darms im Vergleich mit der Leber ($<1/5$). Allerdings ist aufgrund der großen Darmoberfläche auch der Metabolismus in Darmzellen zu beachten.

Neben *in vitro*-Untersuchungen wurden verschiedene *in vivo*-Studien zum Phase I-Metabolismus durchgeführt. In einer Untersuchung von Urin und Fäces von Schweinen, Rindern, Ratten, Kaninchen und einem Menschen konnten die reduktiven Metaboliten α - und β -ZEL nach ZEN-Verabreichung nachgewiesen werden (Mirocha et al., 1981).

Zusätzlich gibt es *in vivo*-Studien, die eine Reduktion der Doppelbindung und damit die Bildung von α - und β -ZAL belegen. In einer Belastungsstudie mit ZEN wurden α - und β -ZAL im Urin verschiedener Tiere (Ziege, Reh, Lamm, Schaf, Pferd und Rind) nachgewiesen (Erasmuson et al., 1994). In dieser Studie konnte allerdings nicht geklärt werden, ob das ZAL bereits im Futter vorhanden war, durch Mikroorganismen gebildet oder von den Tieren selbst metabolisiert wurde. In einem weiteren *in vivo*-Versuch an neuseeländischen Schafen konnte gezeigt werden, dass diese ZEN zu α - und β -ZAL metabolisieren können. Hierzu wurde den Tieren Deuteriummarkiertes ZEN verabreicht und dieses später als deuteriertes ZAL wiedergefunden (Miles et al., 1996). Damit konnte gezeigt werden, dass Schafe die Fähigkeit zur Reduktion der Doppelbindung im ZEN-Molekül besitzen. In einer Arbeit von Zöllner et al. (2002) konnte nach ZEN-Gabe ZAN, α - und β -ZAL im Urin von Schweinen nachgewiesen werden. Die ZALs waren jedoch nur in Spuren im Urin enthalten. *In vitro*-Studien konnten bisher keine Reduktion zu den ZALs zeigen. Auch über den Mechanismus oder die an dieser möglichen Reaktion beteiligten Enzyme ist bisher nichts bekannt.

Neben den reduktiven Metaboliten wurde zum ersten Mal auch die Existenz von hydroxylierten Metaboliten nachgewiesen (Pfeiffer et al., 2007). Dabei konnte gezeigt werden, dass ZEN durch Mikrosomen der Ratte in Anwesenheit von Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form, NADPH) zu verschiedenen hydroxylierten Metaboliten von ZEN und ZEL metabolisiert werden kann.

Die Strukturen der Metaboliten konnten allerdings nur tentativ angegeben werden. Einen Hinweis auf die Bildung catecholischer Verbindungen von ZEN gab es schon früher. Li et al. (1985) zeigten, dass bei der Umsetzung von ZEN mit Mikrosomen aus Leber und Niere eines syrischen Goldhamsters ein Metabolit entsteht, der durch Catechol-O-Methyltransferase (COMT) methyliert werden kann. Da die COMT nur catecholische Strukturen methyliert, musste hier eine Verbindung mit zusätzlicher Hydroxylgruppe am aromatischen Ring gebildet worden sein.

Phase II-Metabolismus

Neben den reduktiven und oxidativen Metaboliten sind auch Phase II-Metaboliten von ZEN bekannt. Nach Gabe von ZEN konnten im Urin von Schwein, Kuh, Ratte, Kaninchen und Mensch ZEN sowie seine reduktiven Metaboliten glucuronidiert und sulfatiert nachgewiesen werden (Mirocha et al., 1981; Zöllner et al., 2002). Auch der Urin junger Puten enthielt nach ZEN-Gabe Glucuronid- und Sulfat-Konjugate (Olsen et al., 1986).

Ausscheidung

In Schweinen erfolgt die ZEN Ausscheidung hauptsächlich über den Urin, obwohl ein großer Teil glucuronidiert in die Galle gelangt. In einer Studie von Dänicke et al. (2005) wurde die Gallenflüssigkeit ZEN-behandelter Tiere über 12 Stunden gesammelt und unbehandelten Tieren verabreicht. Hierbei konnte eine beträchtliche Aufnahme in das Blut der ursprünglich unbehandelten Tiere gezeigt werden. Diese Studie bestätigt eine hohe Ausscheidung von ZEN über die Galle und hohe (Rück-)Resorption im Darm. Damit konnte ein enterohepatischer Kreislauf von ZEN in Schweinen gezeigt werden. Der enterohepatische Kreislauf in jungen Schweinen wurde ebenfalls von Biehl et al. (1993) beobachtet. Ebenso wurde ein starker enterohepatischer Kreislauf in Ratten nachgewiesen (Mallis et al., 2003).

1.2 α -Zearalanol (α -ZAL)

Bei α -ZAL (Abb. 1.1) handelt es sich um ein reduktives Derivat von ZEN. α -ZAL, auch als Zeranol bezeichnet, wird in der Literatur als reduktiver Pilzkongener beschrieben und in einigen Staaten als Masthilfsmittel in der Rinderzucht eingesetzt (Handelsname: RALGRO), beispielsweise in Amerika und Kanada. Dagegen ist in der EU der Einsatz aller Substanzen, die eine hormonale Wirkung haben, zur Wachstumsförderung seit 1988 (88/146/EEC ersetzt durch 96/22/EC; EG, 1988) verboten. Aus Ländern, in denen der Gebrauch dieser Hormone erlaubt ist, ist der Import von Tieren, Fleisch oder Fleischprodukten in die EU verboten oder unterliegt strengen Regelungen.

Die Behandlung der Rinder erfolgt durch Injektion eines α -ZAL-Pellets, durch das eine langfristige Abgabe der Substanz gewährleistet ist. Den Tieren wird dabei eine einmalige Dosis von 36 mg verabreicht (Baldwin et al., 1983).

1.2.1 Chemische Eigenschaften von α -ZAL

α -ZAL besitzt eine S-Konfiguration an C3 und eine R-Konfiguration (α -Konfiguration) an Position 7. Sein Schmelzpunkt liegt bei 181-183°C (Baldwin et al., 1983). α -ZAL kann durch Synthese aus ZEN gewonnen werden. Hierzu erfolgt eine Reduktion mit Raney-Nickel, wobei sowohl die Doppelbindung, als auch die Keto-Gruppe reduziert werden. Bei der Reaktion entsteht neben α -ZAL auch sein β -Epimer, das anschließend abgetrennt werden muss.

1.2.2 Säugermetabolismus von α -ZAL

Für den Phase I-Metabolismus von α -ZAL wurde die Oxidation zu ZAN als Hauptreaktionsweg nachgewiesen (Migdalof et al., 1983). Als weiterer Metabolit von α -ZAL wurde β -ZAL in geringem Umfang gefunden. Möglicherweise entsteht β -ZAL über die Zwischenstufe ZAN. Bei *in vivo*-Studien mit weiblichen Ratten, Kaninchen, Hunden, Rhesus-Affen und Menschen wurde diesen α -ZAL oral verabreicht. Alle Spezies resorbierten α -ZAL und zeigten eine Oxidation zu ZAN. Kaninchen und Mensch schieden die Substanzen bevorzugt über den Urin aus, die anderen Spezies über die Galle.

Der Anteil der Konjugate in den Ausscheidungsprodukten reichte von 99% (Mensch) bis 1% (Hund). In der gleichen Studie wurde zudem bei Menschen die Bildung eines Hydroxylierungsprodukts von α -ZAL nachgewiesen, dessen Struktur allerdings nicht aufgeklärt werden konnte.

1.3 Toxizität

ZEN besitzt nur eine geringe akute Toxizität. Der LD₅₀-Wert bei oraler Aufnahme liegt bei >2 g/kg KG für Mäuse, >4 g/kg KG bei Ratten, >5 g/kg KG bei Meer-schweinchen und >15 g/kg KG bei Hühnern (Kuiper-Goodman et al., 1987). Auch die akute Toxizität von α -ZAL ist mit einem LD₅₀-Wert von >40 g/kg KG für orale Aufnahme bei Ratte und Maus sehr gering (Baldwin et al., 1983).

Eine Langzeitstudie des National Toxicology Programs (NTP, 1982) zur Kanzerogenität von ZEN in Ratten zeigte keine erhöhte Tumorinzidenz. Hyperplastische Effekte wurden auf die estrogenen Eigenschaften des ZEN zurückgeführt. Untersuchungen an B6C3F1-Mäusen in der gleichen Studie zeigten hyperplastische Effekte und eine erhöhte Tumorraten in der Hypophyse für beide Geschlechter (NTP, 1982). ZEN wurde von der 'International Agency for Research in Cancer' in Kategorie 3 eingestuft (nicht klassifizierbar für Kanzerogenität gegenüber Menschen) (IARC, 1993). Untersuchungen zur Genotoxizität zeigten bei Verwendung der RALs negative Ergebnisse für den Ames-Test, sowohl ohne als auch mit Aktivierung durch Lebermikrosomen der Ratte (Kuiper-Goodman et al., 1987). Pfohl-Leszkowicz et al. (1995) führten einen ³²P-Postlabeling-Assay zur Untersuchung auf Desoxyribonucleinsäure (DNA)-Addukte durch. Nach oraler ZEN-Gabe konnten bei Mäusen sowohl in der Leber als auch in der Niere DNA-Addukte nachgewiesen werden.

In Knochenmarkzellen von Mäusen wurde in einem *in vivo*-Versuch Chromosomenaberration nach ZEN-Verabreichung gezeigt (Ouanes et al., 2005). Chromosomenaberration wurde auch bei Inkubation von ZEN mit Ovarienzellen chinesischer Hamster beobachtet. Ebenso zeigte sich hier ein Schwesterchromatidaustausch (Galloway et al., 1987).

1.4 Estrogene Eigenschaften

ZEN wird häufig nicht nur als Mykotoxin, sondern auch als Mykoestrogen bezeichnet. Dies liegt an den estrogenen Eigenschaften von ZEN und seinen fünf RAL-Derivaten. Estrogene Eigenschaften, das heißt biologische Wirkungen wie die endogenen weiblichen Sexualhormone 17β -Estradiol (E2) und Estron (E1), konnten sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* gezeigt werden.

Bei E2 und E1 handelt es sich um Hormone, die an Genexpressionen beteiligt sind. E1 und E2 binden an die Estrogenrezeptoren (ER), $ER\alpha$ und $ER\beta$, im Zellkern. Nach Dimerisierung und Bindung an die estrogenresponsiven Elemente der DNA wird die mRNA-Synthese estrogen regulierter Gene gestartet. Substanzen, die in den Estrogenstoffwechsel eingreifen, werden als endokrine Disruptoren bezeichnet. Eine Möglichkeit des Eingriffs besteht dabei durch Bindung an den ER mit agonistischer Wirkung. Die Bindung an die beiden ERs konnte für die RALs durch *in vitro*-Versuche gezeigt werden (Takemura et al., 2007; Müller et al., 2004). In Struktur-Molekül-Modellen wurde gezeigt, dass ZEN und α -ZAL ähnlich dem E2 in die Bindungstasche passen (Takemura et al., 2007). Eine etwas höher Bindungsaffinität von E2 lässt sich erklären, weil E2 ohne Konformationsänderung im aktiven Zentrum des ER binden kann, während die RALs eine geringe Konformationsänderung zur Bindung benötigen. Die Bindungsaffinität zum ER sagt jedoch nichts über die estrogenen Eigenschaften einer Substanz aus, da diese sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaften besitzen kann.

In einigen *in vitro*-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei den RALs um Agonisten handelt. Agonisten stimulieren die Proliferation humaner MCF-7 Brustkrebszellen. Für die Proliferation in MCF-7-Zellen wurde folgende Reihenfolge erhalten: $E2 \approx \alpha\text{-ZEL} > \alpha\text{-ZAL} > \beta\text{-ZAL} > ZAN > ZEN > \beta\text{-ZEL}$ (Malekinejad et al., 2005; Shier et al., 2001). Eine weitere Testmethode ist die Messung der alkalischen Phosphatase-Aktivität in Ishikawa-Zellen, die aus einem Adenokarzinom des menschlichen Endometriums isoliert wurden. Die alkalische Phosphatase wird über den ER reguliert und ist konzentrationsabhängig stimulierbar. Dabei ergab sich eine Wirkstärke von $E2 \approx \alpha\text{-ZEL} > \alpha\text{-ZAL} > ZAN > ZEN \approx \beta\text{-ZAL} > \beta\text{-ZEL}$ (Esch, 2003). Die Reihenfolgen in den *in vitro*-Testsystemen unterscheiden sich nur geringfügig.

Bei *in vitro*-Untersuchungen zur Estrogenität muss man jedoch beachten, dass die Zellen möglicherweise unterschiedliche Enzyme besitzen bzw. verloren haben. So fehlt den meisten kultivierten Zellen eine Cytochrom-P450-Monooxygenase (CYP)-Aktivität. Andererseits besitzen sie möglicherweise unterschiedliche HSDs und Phase II-Enzyme wie Glucuronyltransferasen, Sulfotransferasen oder COMT.

Durch *in vivo*-Versuche können die estrogenen Effekte im intakten Organismus gezeigt werden. *In vivo*-Versuche zum Uterusgewicht wurden in verschiedenen Spezies durchgeführt. An geschlechtsreifen Mäusen kann nach intraperitonealer Gabe eine Erhöhung des Uterusgewichts in der Reihenfolge $E2 \gg \alpha\text{-ZAL} > \alpha\text{-ZEL} > \beta\text{-ZAL} > \text{ZEN} > \beta\text{-ZEL}$ gezeigt werden (Ueno und Tashiro, 1981). Eine Studie zur Uterusgewichtserhöhung in Ratten lieferte folgendes Ergebnis: $E2 \gg \alpha\text{-ZAL} > \text{ZEN} > \beta\text{-ZAL}$ (Katzenellenbogen et al., 1979).

Die Untersuchungen zur Estrogenität der RALs zeigen in den unterschiedlichen *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen bei verschiedenen Spezies übereinstimmend, dass die α -Epimere der RALs die stärksten und die β -Epimere die schwächsten estrogenen Eigenschaften besitzen. Unterschiede können zum Beispiel auf dem unterschiedlichen Metabolismus in den einzelnen Testsystemen beruhen. In jungen Schweinen konnte bei ZEN-Verabreichung über längere Zeit ein Hyperestrogenismus nachgewiesen werden (Gajecka et al. 2011). Eine weitere Studie mit vorpubertären Schweinen zeigte eine Erhöhung des Reproduktionstraktgewichts und eine Vergrößerung des Vulvavolumens durch ZEN (Teixeira et al., 2011).

ZEN und α -ZAL werden zudem als endokrine Disruptoren mit verfrühter Pubertät von Kindern in Puerto-Rico zwischen 1976 und 1984 in Verbindung gebracht (Saenz de Rodriguez et al., 1985).

2 Problemstellung

Zearalenon (ZEN) wird von Schimmelpilzen der Gattung *Fusarium* gebildet. Die Toxinbildung findet dabei auf Mais oder anderen Getreidearten wie Weizen, Hafer, Gerste und Roggen statt. ZEN besitzt eine estrogenische Wirkung, die auch seine reductiven Derivate α - und β -Zearalenol (α - und β -ZEL), Zearalanon (ZAN), α - und β -Zearalanol (α - und β -ZAL) zeigen. α -ZAL wird in einigen Staaten in der Tiermast eingesetzt. Somit können die Substanzen sowohl in pflanzlichen als auch in tierischen Lebensmitteln enthalten sein.

Zum reductiven Metabolismus von ZEN und zu den estrogenen Eigenschaften bei Tier und Mensch sind bereits zahlreiche Studien bekannt. Im Gegensatz dazu wurde der oxidative Metabolismus von ZEN bislang kaum untersucht. Einzig eine Studie im Arbeitskreis Metzler konnte die Bildung hydroxylierter Metaboliten im Säugerorganismus zeigen, diesen allerdings nur tentativ Strukturen zuordnen. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit eine möglichst umfassende Charakterisierung und Strukturaufklärung der Hydroxylierungsprodukte erfolgen.

In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass auch Pilze hydroxylierte ZEN-Verbindungen bilden können. Daher sollten aus einer Pilzkultur ZEN-Kongenere isoliert und ebenfalls charakterisiert werden. Ein Vergleich mit den Säugermetaboliten sollte zeigen, ob von Säuger und Pilz identische Verbindungen gebildet werden.

Anschließend sollten die Reaktivitäten der gebildeten catecholischen Hydroxylierungsprodukte von ZEN und seinen Derivaten bestimmt werden. Diese sollten mit den Reaktivitäten der catecholischen Metaboliten der endogenen Steroidestrogene 17β -Estradiol (E2) und Estron (E1) verglichen werden. Die Bildung oxidativer Metaboliten unter *in vitro*-Bedingungen kann nur erste Hinweise auf die tatsächliche Bildung im Organismus geben, da hier metabolische Konkurrenzreaktionen ablaufen. Zur Überprüfung einer *in vivo*-Relevanz der oxidativen Säugermetaboliten sollte α -ZAL mit Präzisionsgewebeschnitten der Rattenleber inkubiert werden. Bei der Behandlung von Präzisionsgewebeschnitten findet eine *in vivo*-ähnliche Konkurrenzsituation wie im Organismus statt.

Schließlich interessierte die metabolische Inaktivierung der ZEN-Catechole durch Methylierung, wiederum im Vergleich zu den E2-Catecholen.

3 Ergebnisse und Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse gliedern sich in mehrere Teile. Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Strukturaufklärung mikrosomal gebildeter RAL-Metaboliten und aus *F. graminearum* extrahierter ZEN-Kongenerere. Die Metaboliten werden dabei charakterisiert und ihre chemischen Strukturen aufgeklärt. Neben der Bildung von ZEN-Kongeneren aus Pilzkultur unter Laborbedingungen wird auch der Extrakt eines im Freiland auf Mais gewachsenen Pilzes untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wird der Phase I-Metabolismus der RALs *in vitro* bei verschiedenen Spezies verglichen. Anschließend wird der Phase II-Metabolismus untersucht. Dabei wird auf Entgiftungsmöglichkeiten der gebildeten RAL-Catechole und deren Einfluss auf die Toxizität der Metaboliten eingegangen. Im letzten Teil der Arbeit wird die *in vivo*-Relevanz der oxidativen Metaboliten untersucht.

3.1 Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, können RALs durch mikrosomale Umsetzung an Position 7, je nach funktioneller Gruppe, oxidiert oder reduziert werden (Abb. 1.3). Über weitere Oxidationen in Form von Hydroxylierungen der RALs als Säugermetaboliten wurde erstmals in einer Arbeit aus dem Arbeitskreis Metzler berichtet (Pfeiffer et al., 2007). Dabei wurden Hydroxylierungsprodukte von ZEN und ZEL als Metaboliten aus mikrosomalen Umsetzungen von ZEN mit Rattenlebermikrosomen (RLM) nachgewiesen. Den Metaboliten konnten allerdings nur tentative Strukturen zugeordnet werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Strukturaufklärung mikrosomaler Metaboliten und aus Pilzkultur extrahierter ZEN-Kongenerere. Die Charakterisierung und Strukturzuordnung erfolgt dabei durch synthetische und enzymatische Modifikation sowie durch chemische Synthese. Die Strukturaufklärung der mikrosomalen ZEN-Metaboliten (Pfeiffer et al., 2009; Hildebrand et al., 2012) und der Pilzkongenerere (Pfeiffer et al., 2010 b) wurde kürzlich veröffentlicht.

Zur Strukturaufklärung wurden die Metaboliten aus mikrosomalen Umsetzungen (vgl. 5.6.3.1) und Pilzkultur (vgl. 5.6.1) extrahiert und fraktioniert. In Abb. 3.1 ist oben das HPLC-DAD-Chromatogramm einer mikrosomalen Umsetzung von ZEN mit Lebermikrosomen einer Wistarratte (WRLM) dargestellt. Abb. 3.1 zeigt unten das HPLC-DAD-Chromatogramm eines Pilzextraktes. Die Metaboliten der mikrosomalen Umsetzungen werden im Weiteren als MA-D sowie M1-10, die aus Pilzkultur extrahierten Kongenere als P1-16 bezeichnet.

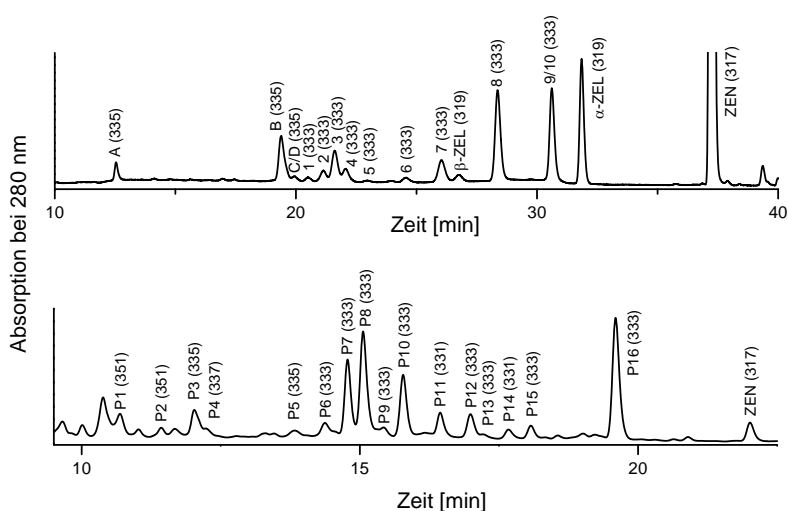


Abbildung 3.1: HPLC-DAD-Chromatogramm einer mikrosomalen Umsetzung von ZEN ($50 \mu\text{M}$) mit WRLM (1 mg Protein/mL) für 60 min (oben, vgl. 5.6.3.1). HPLC-DAD-Chromatogramm eines Pilzextraktes (*Fusarium graminearum*) nach Entfernung der größten Menge ZEN mittels Säulenchromatographie (unten). Die Metaboliten (aus mikrosomalen Umsetzungen) und Kongenere (aus dem Pilzextrakt) sind nummeriert. In Klammer finden sich die m/z -Werte der Substanzen. Die unterschiedlichen HPLC-Trennbedingungen sind in 5.7.3 zusammengefasst.

Eine erste Charakterisierung erfolgte über Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS)-Untersuchung im Negativ-Mode (vgl. 5.7.3). Durch diese Untersuchungen werden die Masse/Ladungs-Verhältnisse (m/z) der Verbindungen erhalten. Im Negativ-Mode entspricht der m/z -Wert dem Molekülion -1 . Die gemessenen m/z -Werte sind in Klammern angegeben. Bei der mikrosomalen Umsetzung von ZEN werden neben hydroxylierten ZEN-Verbindungen (m/z 333) auch hydroxylierte ZEL-Verbindungen (m/z 335) gebildet. Die MS/MS-Spektren der einzelnen Peaks zeigten deutliche Unterschiede (vgl. Tab. A.1). MS/MS-Spektren von α - und β -ZEL sind jedoch nahezu identisch. Auch während der chemischen Synthese entstandene hydroxylierte Stereoisomere zeigten unter den gewählten MS/MS-Bedingungen (vgl. 5.7.3) eine sehr ähnliche Fragmentierung.

Daher wurden im Folgenden Substanzen mit vergleichbaren MS/MS-Fragmentierungen als Stereoisomere angesehen.

Charakteristika der mikrosomal gebildeten Metaboliten wie Retentionszeit (RT) und ESI-MS-Massen sind in Tab. 3.1 dargestellt. Eine Zusammenfassung von RTs und ESI-MS-Massen der Pilzkongenere ist in Tab. 3.2 gezeigt. Ein Überblick über die MS/MS-Fragmentierung aller hydroxylierter Verbindungen findet sich in Anhang A.

3.1.1 ZEN- und ZEL-Metaboliten aus mikrosomaler Umsetzung

Eine erste Charakterisierung der mikrosomal gebildeten Metaboliten erfolgte mit Hilfe dreier unterschiedlich deuterierter ZEN-Verbindungen (13,15-D₂-ZEN (D₂-ZEN); 6,6,8,8,13,15-D₆-ZEN (D₆-ZEN-1) und 2,2,2,3,4,4-D₆-ZEN (D₆-ZEN-2); Abb. 3.2).

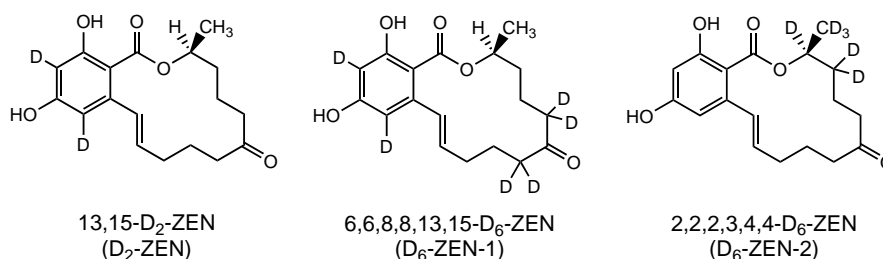


Abbildung 3.2: Chemische Strukturen von ZEN mit unterschiedlicher Deuteriummarkierung. Die deuterierten Verbindungen wurden als Substrat für mikrosomale Umsetzungen eingesetzt. Deuteriumverluste in Hydroxylierungsprodukten gaben Hinweise für die Strukturaufklärung.

Mit Hilfe der deuterierten ZENs können aus den Molekulargewichten der Metaboliten Rückschlüsse auf die Position einer Hydroxylierung gezogen werden. Jedes Deuterium im Molekül erhöht das Molekulargewicht und damit den m/z -Wert um eine Masse. Erfolgt jedoch eine Hydroxylierung an einer Position im Molekül, die ein Deuterium trägt, geht das Deuterium sowie die Massenerhöhung verloren. So kann mit Hilfe der drei deuterierten ZEN-Verbindungen eine erste Zuordnung erfolgen. D₂-ZEN führt zu einer Massenerhöhung um zwei, D₆-ZEN-1 und D₆-ZEN-2 führen jeweils zu einer Massenerhöhung um sechs. Die Massenerhöhungen der mikrosomalen Metaboliten, bei Einsatz der deuterierten Verbindungen, sind in Tab. 3.1 dargestellt.

M9, M10, MC und MD

Mikrosomale Umsetzungen mit den deuterierten ZEN-Verbindungen zeigten, unter Verwendung von D₂-ZEN und D₆-ZEN-1, für M9, M10, MC und MD den Verlust eines Deuteriums. Das m/z von 333 für M9 und M10 aus undeutertem ZEN entspricht der Masse monohydroxylierter ZEN-Verbindungen. Für die beiden Metaboliten MC und MD deutet ein m/z von 335, bei undeutertem ZEN, auf monohydroxylierte ZEL-Verbindungen hin. Aufgrund eines Deuteriumverlustes bei der Bildung aus D₂-ZEN und D₆-ZEN-1 muss die Hydroxylierung an Position 13 oder 15 stattgefunden haben. Eine Hydroxylierung sowohl an Position 13 als auch an Position 15 führt zur Bildung eines ZEN- beziehungsweise ZEL-Catechols. Zur genauen Zuordnung wurden 13-HO-ZEN und 15-HO-ZEN synthetisiert (Pfeiffer et al, 2009).

Durch Vergleich der RT und der HPLC-MS/MS-Daten mit den Syntheseprodukten konnte M9 als 13-HO-ZEN und M10 als 15-HO-ZEN identifiziert werden. In einer früheren Diplomarbeit im Arbeitskreis (Becker, 2008) konnte bereits gezeigt werden, dass ZEN-Verbindungen mit Hilfe von Hydroxysteroiddehydrogenase (HSD) und NADH zu ihren α -ZEL-Verbindungen reduziert werden können (vgl. 5.6.3.2). Eine Reduktion von 13-HO-ZEN beziehungsweise 15-HO-ZEN mit HSD führte zu MD beziehungsweise MC.

Somit handelt es sich bei MC um 15-HO- α -ZEL, bei MD um 13-HO- α -ZEL, bei M9 um 13-HO-ZEN und bei M10 um 15-HO-ZEN.

M3, M8, MA und MB

Neben den aromatisch hydroxylierten ZEN-Metaboliten waren in der mikrosomalen Umsetzung mit WRLM weitere Metaboliten enthalten (Abb. 3.1). Ein Deuteriumverlust bei Einsatz von D₆-ZEN-1, nicht aber bei D₂-ZEN bedeutet, dass die Metaboliten 3, 8, A und B an Position 6 oder 8 ein Deuterium verloren haben. Die m/z -Werte von 333 (M3 und M8), sowie 335 (MA und MB) deuten auf hydroxylierte ZENs und ZELs hin. Da die Metaboliten A und B, sowie 3 und 8 vergleichbare MS/MS-Spektren besitzen (Tab. A.1) werden diese als Stereoisomere angesehen.

3.1. Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

Der Einsatz der deuterierten Verbindungen konnte die Hydroxylierungspositionen dieser Metaboliten nicht weiter eingrenzen. Zur Identifizierung der Hydroxylierungspositionen erfolgte eine chemische Synthese. Ein Gemisch aus 6-OH-ZEN und 8-HO-ZEN wurde unter Verwendung von Nitrosobenzol und D-Prolin oder L-Prolin synthetisiert (Abb. 3.3; vgl. 5.6.6.4; Hildebrand et al., 2012).

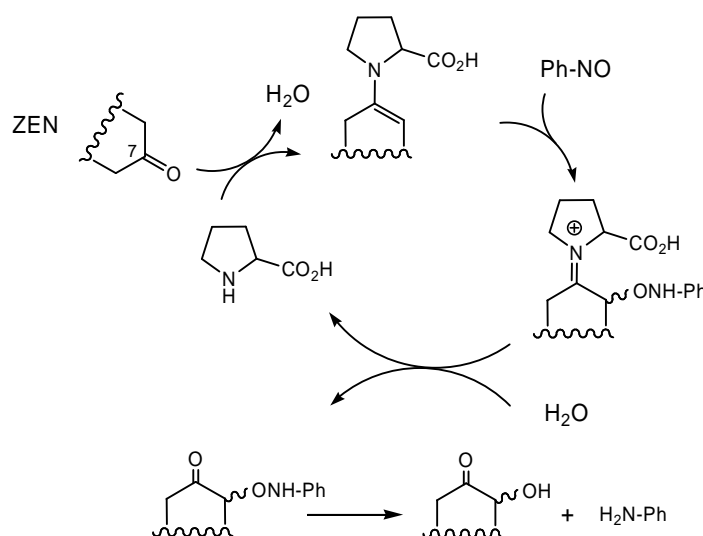


Abbildung 3.3: Reaktionsschema der Synthese von 6-HO-ZEN und 8-HO-ZEN mit Nitrosobenzol und Prolin aus ZEN (vgl. 5.6.6.4).

Der Einsatz, sowohl von D-Prolin, als auch von L-Prolin, lieferte je 2 Produkte mit dem Molekulargewicht einer Hydroxy-ZEN-Verbindung. Die Produkte wurden dabei jeweils im Verhältnis 10:1 gebildet (Abb. 3.4). Die MS/MS-Spektren der bevorzugt gebildeten (Abb. 3.4, II und III) und der nicht bevorzugt gebildeten Substanzen (Abb. 3.4, I und IV) waren vergleichbar, besaßen jedoch unterschiedliche RTs. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei Molekülen mit vergleichbarem MS/MS-Spektrum und unterschiedlicher RT mit hoher Wahrscheinlichkeit um Stereoisomere. Da für D-Prolin und L-Prolin jeweils ein 6-HO-ZEN und ein 8-HO-ZEN erwartet wurde, entsprach dies den Erwartungen. Die Trennung der Substanzen erfolgte mittels präparativer HPLC (vgl. 5.7.2).

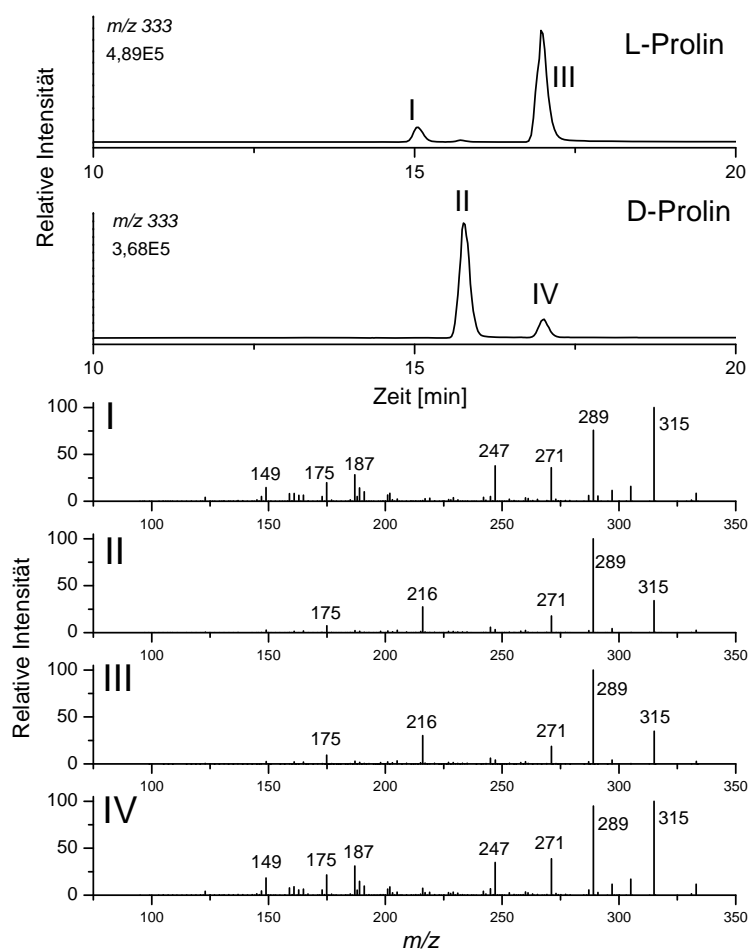


Abbildung 3.4: Produkte der chemischen Synthese von 6-HO-ZEN und 8-HO-ZEN aus ZEN mit Nitrosobenzol und D-Prolin oder L-Prolin. Oben sind HPLC-DAD-Chromatogramme der Umsetzung mit L-Prolin und D-Prolin dargestellt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die zugehörigen MS/MS-Spektren der gebildeten Produkte (I, II, III und IV).

Da Peak IV und M8 vergleichbare RTs und MS/MS-Spektren besaßen, wäre eine Untersuchung dieser Fraktion vorteilhaft gewesen. Aufgrund der geringeren Ausbeute von Fraktion IV wurde stattdessen Fraktion II im Institut für Organische Chemie (Dr. Andreas Rapp) einer $^1\text{H-NMR}$ -Untersuchung unterzogen. Daraus ergab sich für Fraktion II die Struktur von 6-HO-ZEN (Hildebrand et al., 2012). Wie bereits beschrieben, wurde bei der Synthese jeweils ein 6-HO- und ein 8-HO-Produkt erwartet. Bei Fraktion IV handelt es sich somit um ein 8-HO-ZEN. Aufgrund vergleichbarer MS/MS-Spektren von II und III handelt es sich bei Fraktion III um das Stereoisomer zu Fraktion II (6-HO-ZEN) und bei Fraktion I um das Stereoisomer zu Fraktion IV (8-HO-ZEN).

Da Fraktion I eine vergleichbare RT und ein vergleichbares MS/MS-Spektrum wie M3 besitzt, handelt es sich bei M3 ebenfalls um eine 8-HO-ZEN-Verbindung.

Eine Methode zur Reduktion von ZEN besteht in der Behandlung mit NaBH₄ (vgl. 5.6.7.2). Dabei findet eine Reduktion der Keto-Gruppe an Position 7 und damit die Bildung beider möglicher ZEL-Stereoisomere statt (Urry et al., 1966). Die Reduktion von M8 mit NaBH₄ lieferte zwei Stereoisomere, wobei eines vergleichbar mit MB war. Die Reaktion von Fraktion I mit NaBH₄ lieferte ebenso zwei Produkte. Eines dieser Produkte war vergleichbar mit MA.

Damit konnte gezeigt werden, dass es sich bei M3 und M8 jeweils um 8-HO-ZEN-Metaboliten und bei MA und MB um 8-HO-ZEL-Metaboliten handelt.

M2

M2 besitzt mit einem m/z von 333 das Molekulargewicht einer HO-ZEN-Verbindung. Das MS/MS-Spektrum von M2 ist den Spektren von M3 und M8 sehr ähnlich.

In einem Versuch sollte bestätigt werden, dass es sich bei M3 und M8 um Stereoisomere handelt. Hierfür wurde isolierter M8 mit K₂CO₃-Lösung in Tetrahydrofuran behandelt (vgl. 5.6.7.1). Die Reaktionsbedingungen sind nahezu identisch mit denen der Reaktion zur Bildung von D₆-ZEN-1 (Pfeiffer et al., 2009). Allerdings wurde hier D₂O durch H₂O ersetzt. Die D₆-ZEN-1-Synthese erfolgt durch eine Keto-Endiol-Tautomerie (Miles et al., 1996). Auch bei Verwendung von 8-HO-ZEN wird eine Gleichgewichtsreaktion zwischen der Keto- und der Endiol-Form erwartet (Abb. 3.5).

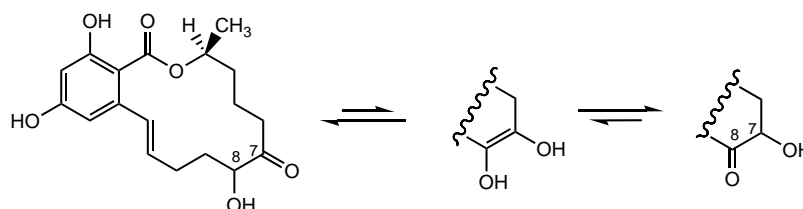


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der postulierten Keto-Endiol-Tautomerie von 8-HO-ZEN in alkalisch wässriger Lösung.

Aus der Endiol-Form kann die Reaktion zur Keto-Form sowohl an Position 8 als auch an Position 7 erfolgen. Somit kann das entsprechende Stereoisomer zur eingesetzten Verbindung gebildet werden (Abb. 3.5).

Insgesamt sollte sich, da die Keto-Form stabiler ist, ein Gleichgewicht aus Edukt und drei weiteren Hydroxy-Keto-Verbindungen einstellen. Das Chromatogramm dieser Reaktion, mit M8 als Ausgangssubstanz, ist in Abb. 3.6 dargestellt. Wie erwartet konnten mittels HPLC-DAD-MS vier Peaks mit entsprechenden Molekulargewichten nachgewiesen werden. Peak iii zeigte vergleichbare RT und MS/MS-Fragmente wie M3. Die Eigenschaften von Peak iv waren vergleichbar mit der eingesetzten Substanz M8 (8-HO-ZEN). Damit musste es sich bei Peak i und Peak ii um die beiden 8-Keto-ZEL-Verbindungen handeln. Peak ii besaß die gleiche RT und ein vergleichbares MS/MS-Spektrum wie M2.

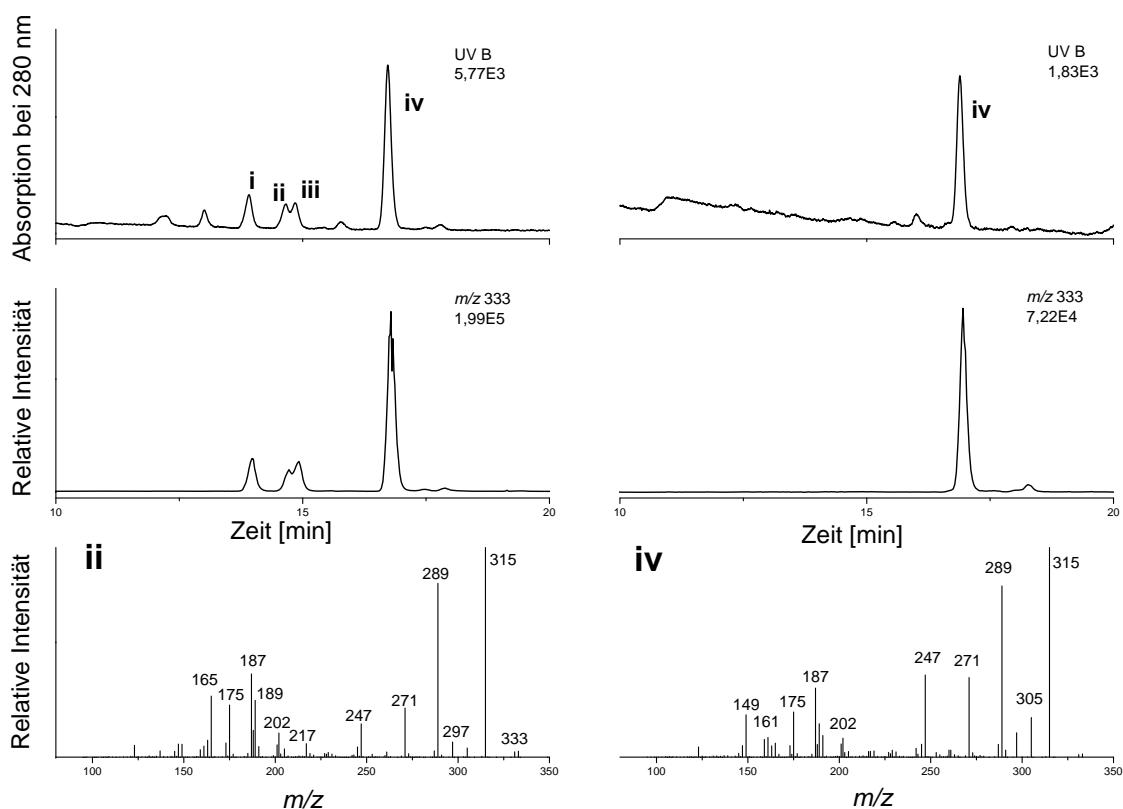


Abbildung 3.6: Reaktionsgemisch von 8-HO-ZEN in alkalisch wässriger Lösung (vgl. 5.6.7.1). Im oberen Teil ist das Reaktionsgemisch vor (rechts) und nach (links) der Reaktion dargestellt. Die mittleren Chromatogramme zeigen die HPLC-MS-Chromatogramme bei m/z 333. Der untere Teil der Abbildung zeigt die MS/MS-Spektren der Substanzen ii (links) und iv (rechts).

Damit konnte bestätigt werden, dass es sich bei M3 und M8 um die Stereoisomere von 8-HO-ZEN handelt und M2 eine 8-Keto-ZEL-Struktur besitzt.

M6 und P10

Untersuchungen von M6 mit den deuterierten ZEN-Verbindungen lieferten für keine der deuterierten Verbindungen einen Deuteriumverlust. Wie in Abb. 3.1 zu erkennen ist, wird M6 bei mikrosomaler Umsetzung nur in geringem Umfang gebildet. Der Pilzextrakt enthielt mit P10 einen Peak mit vergleichbaren Eigenschaften (RT und MS/MS-Fragmentierung). Da P10 in größerem Umfang gebildet wurde, konnte dieser durch Isolierung aus dem Pilzextrakt gewonnen werden. Anschließend wurde P10 zur Positionsbestimmung der Hydroxylgruppe eingesetzt. Hierfür wurde die Doppelbindung des Metaboliten reduziert. Die Reduktion erfolgte durch Hydrierung mit Wasserstoff und Palladium auf Aktivkohle als Katalysator (vgl. 5.6.7.3; Urry et al., 1966). Das reduzierte Produkt wurde anschließend mit der von Yang et al. (2008) zur Verfügung gestellten Referenzsubstanz 5-HO-ZAN verglichen. Dabei wurde eine Übereinstimmung von RT und MS/MS-Spektren zwischen dem Reduktionsprodukt und 5-HO-ZAN beobachtet.

Somit handelt es sich bei M6 sowie P10 um 5-HO-ZEN-Verbindungen.

M4, P8 und P11

Untersuchungen mit den deuterierten ZEN-Verbindungen lieferten bei keiner deuterierten Verbindung für M4 einen Deuteriumverlust. Abb. 3.1 ist zu entnehmen, dass M4 bei mikrosomalen Umsetzungen nur in geringem Umfang gebildet wird. Dieser Metabolit besitzt jedoch eine vergleichbare RT und ein vergleichbares MS/MS-Spektrum wie P8. Da P8 in größerem Umfang durch den Pilz gebildet wurde, wurde dieser für die Identifizierung eingesetzt. Zur Identifizierung wurde eine Oxidation mit aktiviertem MnO_2 durchgeführt (vgl. 5.6.7.5). Bei dieser Reaktion werden bevorzugt allylische Hydroxylgruppen oxidiert (Bharucha, 1956). Die Reaktion eines Gemisches von P8 und P10 (5-HO-ZEN) führte, unter Abnahme von P8, zur Bildung eines Produkts mit einer um zwei Masseneinheiten reduzierten Masse (Abb. 3.7). Diese Masse entspricht dem Molekulargewicht einer Keto-ZEN-Verbindung, die als Reaktionsprodukt erwartet wurde. Da Position 10 die einzige allylische Position im Molekül ist, kann es sich bei P8 und M4 somit nur um 10-HO-ZEN handeln. Daraus ergibt sich, dass es sich bei dem Oxidationsprodukt von P8 um 10-Keto-ZEN handelt. Dieses besaß das gleiche m/z , eine ähnliche RT und ein vergleichbares MS/MS-Spektrum wie P11.

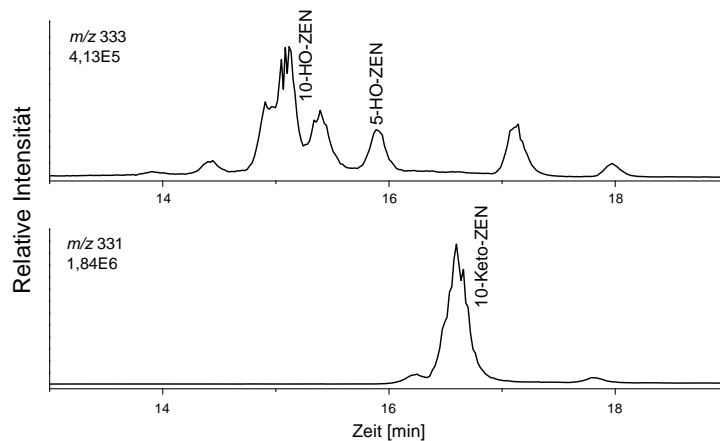


Abbildung 3.7: Oxidation eines Gemisches aus 5-HO- und 10-OH-ZEN mit Mangandioxid (vgl. 5.6.7.5). Massenspur von m/z 333 vor der Reaktion (oben) und Massenspur von m/z 331 nach der Reaktion (unten).

Damit konnten M4 und P8 als 10-HO-ZEN- und P11 als 10-Keto-ZEN-Verbindungen identifiziert werden.

M1

Untersuchungen mit den deuterierten ZEN-Verbindungen zeigten, dass M1 bei der Bildung aus D_6 -ZEN-2 den Verlust eines Deuteriums aufwies. Dies spricht für eine Hydroxylierung an Position 2, 3 oder 4. Eine genauere Identifizierung war nicht möglich.

M5 und M7

Keine der deuterierten Verbindungen zeigte bei der Bildung von M5 und M7 den Verlust eines Deuteriums (Tab. 3.1). Die Metaboliten 5 und 7 besitzen charakteristische und vergleichbare MS/MS-Spektren (Tab. 3.1), so dass es sich bei diesen um Stereoisomere handelt. Die Identifizierung dieser Isomere erfolgte über Ausschluss möglicher Hydroxylierungspositionen. Eine Hydroxylierung an den Positionen 2, 3, 4, 6, 8, 13 und 15 konnte durch die deuterierten ZEN-Verbindungen ausgeschlossen werden. Da sich die MS/MS-Spektren deutlich von den Spektren der bereits aufgeklärten Metaboliten und Syntheseprodukten unterscheiden, schieden auch die Positionen 5 und 10 aus.

3.1. Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

Ein Überblick über alle, bis zu diesem Zeitpunkt, aufgeklärten Metaboliten und die damit einzig verbliebene Position ist in Abb. 3.8 dargestellt.

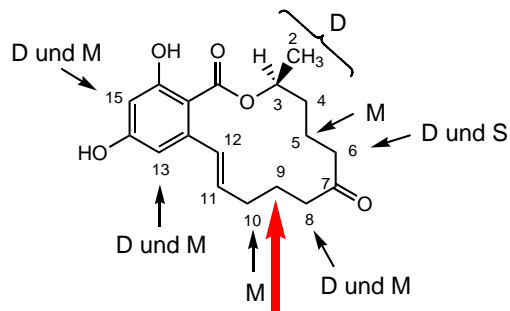


Abbildung 3.8: Mögliche Hydroxylierungspositionen von ZEN und bereits identifizierte Metaboliten oder Deuterierungspositionen. M: Metabolit; S: Syntheseprodukt; D: Deuterierung. Die einzig verbliebene Hydroxylierungsposition ist mit einem roten Pfeil markiert.

Damit kann es sich bei M5 und M7 nur um 9-HO-ZEN-Metaboliten handeln.

In Tab. 3.1 sind die Ergebnisse der Strukturaufklärung der Säugermetaboliten zusammengefasst. Im Anhang finden sich darüber hinaus die MS/MS-Spektren der Metaboliten (Tab. A.1).

Tabelle 3.1: Mikrosomal gebildete Metaboliten von ZEN. Dargestellt sind charakteristische Eigenschaften der Metaboliten aus HPLC-DAD-MS/MS-Untersuchungen.

Meta- bolit	RT	ESI-MS	Massenerhöhung für			Stereo- isomer	Struktur
			D ₂	D ₆₋₁	D ₆₋₂		
A	12,5	335	+2	+5	+6	B	8-HO-ZEL
B	19,3	335	+2	+5	+6	A	8-HO-ZEL
C	20,0	335	+1	+5	+6		15-HO-ZEL
D	20,1	335	+1	+5	+6		13-HO-ZEL
1	20,5	333	+2	+6	+5		2-, 3-, oder 4-HO-ZEN
2	21,2	333	+2	+5	+6		8-Keto-ZEL
3	21,6	333	+2	+5	+6	8	8-HO-ZEN
4	22,0	333	+2	+6	+6	P6	10-HO-ZEN
5	22,9	333	+2	+6	+6	7	9-HO-ZEN
6	24,6	333	+2	+6	+6	P7	5-HO-ZEN
7	26,0	333	+2	+6	+6	5	9-HO-ZEN
8	28,4	333	+2	+5	+6	3	8-HO-ZEN
9	30,6	333	+1	+5	+6		13-HO-ZEN
10	30,6	333	+1	+5	+6		15-HO-ZEN

3.1.2 ZEN-Kongenere aus Pilzkultur

Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über die, durch *Fusarium graminearum*-Kultivierung gewonnen, Kongenere von ZEN. Ein Teil der Ergebnisse dieser Untersuchungen wurde bereits veröffentlicht (Pfeiffer et al., 2010 b).

In einer vorangegangenen Diplomarbeit (Becker, 2008) wurden drei *Fusarium*-Stämme (*F. roseum* DSM 3019, *F. roseum* DSM 3020 und *F. graminearum* DSM 4528) bei unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (Flüssigkultur, Reiskultur und Vermiculitkultur) auf ihre ZEN-Produktion und Bildung von ZEN-Kongeneren untersucht. Dabei konnte, unter den gewählten Bedingungen, nur in der *F. graminearum*-Kultur ZEN nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden bei dieser Kultivierung ZEN-Kongenere gebildet. In der Literatur sind bisher einige Kongenere von ZEN bekannt, die von Pilzen gebildet werden. Bei den bekannten ZEN Kongeneren handelt es sich um α -ZEL, β -ZEL, α -ZAL, β -ZAL, cis-ZEN, cis- α -ZEL, cis- β -ZEL, ZEN-Sulfat, ZEN-Glucuronid, 5-HO-ZEN, 10-HO-ZEN, 8-HO-ZEN, 8-HO-ZEL, 13-Formyl-ZEN und 6-Dehydro-ZEN (Abb. 1.2).

Die Kultivierung des *F. graminearum* DSM 4528 in einem Flüssigmedium auf Vermiculit lieferte eine gute ZEN-Ausbeute. Zur Gewinnung von ZEN, welches für Synthesen verwendet werden sollte, wurde die Kultivierung im großen Maßstab wiederholt (vgl. 5.6.1). Da ca. 90% der gebildeten Substanzen ZEN war, musste dieses von den übrigen Kongeneren abgetrennt werden. Die Abtrennung des ZENs konnte dabei sowohl über Säulenchromatographie, als auch über präparative HPLC (vgl. 5.7.2) erfolgen. Abb. 3.1 (unten) zeigt den Gesamtextrakt einer Kultivierung von *F. graminearum* DSM 4528 auf expandiertem Vermiculit und Hidy-Medium nach ZEN-Abtrennung.

P8, P10 und P11

In Abschnitte 3.1.1 konnten die mit Säugermetaboliten identischen Pilzkongenere bereits aufgeklärt werden. So wurde P10 als 5-HO-ZEN, P8 als 10-HO-ZEN und P11 als 10-Keto-ZEN identifiziert. Mit 5-HO-ZEN und 10-HO-ZEN konnten somit bereits aus der Literatur bekannte Pilz-Kongenere auch als ZEN-Kongenere von *F. graminearum* DSM 4528 bestätigt werden.

P16

Bei P16 handelt es sich um ein nur durch den Pilz gebildetes Kongener. Ein mikrosomaler Metabolit mit vergleichbaren Eigenschaften konnte nicht beobachtet werden. HPLC-MS-Analysen zeigten für P16 ein m/z von 333. Somit besitzt P16 ein gegenüber ZEN um 16 Masseneinheiten erhöhtes Molekulargewicht. Dies könnte für ein hydroxyliertes ZEN sprechen. P16 besitzt jedoch ein ungewöhnliches MS/MS-Spektrum, das eine besonders starke Fragmentierung aufweist (Tab. A.3). Da die meisten möglichen Hydroxylierungspositionen schon besetzt sind, wäre auch eine andere Struktur mit zusätzlichem Sauerstoff denkbar. Erste Hinweise auf die Struktur ergaben sich durch eine chemische Synthese, bei der ein Epoxid des ZEN gebildet werden sollte. Für diese Synthese wurde ZEN mit meta-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) in Dichlormethan umgesetzt (vgl. 5.6.6.2; Pfeiffer, 2010 b). Bei den gebildeten Reaktionsprodukten handelte es sich um ein Gemisch der beiden bereits bekannten ZEN-Catechole 13-HO-ZEN und 15-HO-ZEN, sowie einer weiteren Verbindung mit m/z 333 (Abb. 3.9).

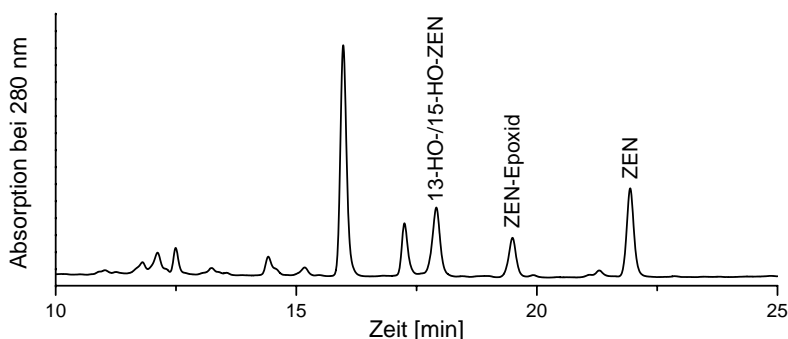


Abbildung 3.9: Chromatogramm einer Umsetzung von ZEN mit mCPBA in Dichlormethan (vgl. 5.6.6.2).

Zur Überprüfung, ob es sich bei P16 um ein Epoxid handelt, wurde die isolierte Verbindung mit verdünnter HCl versetzt. Dies sollte zur Hydrolyse des Epoxids führen. Die Säurebehandlung lieferte unter anderem 2 Produkte mit einem m/z von 351 (Abb. 3.10). Dies entspricht der Masse eines ZEN-Dihydrodiols. Die Fähigkeit zur sauren Hydrolyse spricht dafür, dass es sich bei P16 um ein Epoxid handelt. Ebenfalls besaß P16 eine vergleichbare RT und ein MS/MS-Spektrum wie das Syntheseprodukt der Epoxidsynthese. Somit kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei P16 um ein Epoxid handelt.

3.1. Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

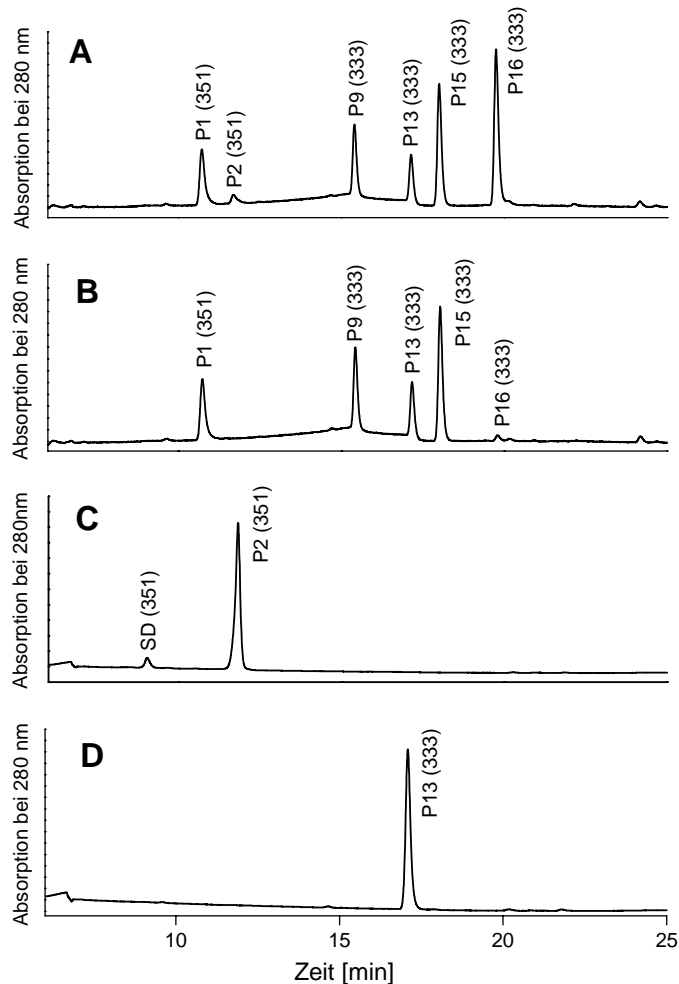


Abbildung 3.10: Chromatogramm und m/z -Werte einer sauren Hydrolyse von P16 nach 30 min (A) und 90 min (B) (vgl. 5.6.7.6). Chromatogramm einer Synthesereaktion von ZEN mit Osmiumtetroxid vor (C) und nach (D) Behandlung mit Säure (vgl. 5.6.6.3).

Die Bestätigung der Epoxidstruktur für P16 erfolgte durch NMR-Untersuchung. Mit Hilfe von NMR-Untersuchungen im Institut für Organische Chemie (Dr. Andreas Rapp) konnte gezeigt werden, dass es sich bei P16 um ein ZEN-Epoxid handelt (Pfeiffer et al., 2010 b).

P1, P2, P9, P13 und P15

Wie beschrieben konnte das Epoxid durch Säure hydrolysiert werden. Bei der Hydrolyse entstanden 5 Produkte, die jeweils einem ZEN-Kongener entsprachen (Abb. 3.10 A und B). So entstanden durch die Hydrolyse 2 Produkte mit einem m/z von 351 (P1 und P2) und 3 Produkte mit einem m/z von 333 (P9, P13 und P15). Zunächst wurden diese Kongenere auf ihre Reaktionsfähigkeit getestet. Die Zugabe von NaBH_4 zu ZEN-Metaboliten führt zu einer Reduktion der Carbonylgruppe an Position 7 (vgl. 5.6.7.2), so dass ein Gemisch der beiden möglichen Alkohole (α - und β -ZEL) gebildet wird (Urry et al., 1966). Einzig die Zugabe von NaBH_4 zu P2 führte zu einer Reaktion und der Bildung zweier Produkte. Die übrigen Kongenere besaßen somit keine reduzierbare Carbonylgruppe.

Zur Identifizierung eines möglichen Diols wurde eine Umsetzung von ZEN mit Osmiumtetroxid durchgeführt (vgl. 5.6.6.3; Pfeiffer et al., 2010 b). Dabei wurden zwei Produkte mit einem m/z von 351 gebildet (Abb. 3.10 C). Beide besaßen vergleichbare MS/MS-Spektren und ließen sich mit NaBH_4 erfolgreich reduzieren. Eines der beiden Produkte besaß vergleichbare Eigenschaften wie P2 (RT und MS/MS-Fragmentierung). Somit handelt es sich bei P2 vermutlich um ein ZEN-Dihydrodiol. Für das zweite Syntheseprodukt wird ebenfalls die Struktur eines ZEN-Dihydrodiols angenommen („synthetisches ZEN-Dihydrodiol“, SD). Eine Behandlung des Synthesegemisches mit Säure (vgl. 5.6.6.3) führte zu P13 (Abb. 3.10 D). Aus der Literatur ist bekannt, dass chemisch synthetisiertes ZEN-Dihydrodiol instabil ist und im Sauren zu cyclischen Spiroacetalen reagiert (Abb. 3.11; Jensen et al., 1972).

Aufgrund der ähnlichen und charakteristischen Eigenschaften von P9, P13 und P15 (keine freie Ketogruppe an Position 7, sehr ähnliche, charakteristische MS/MS-Spektren), wurden diese als stereoisomere Formen angesehen. Zur Identifizierung dieser Kongenere wurde P15 aus einer Pilzfraktion mittels präparativer HPLC isoliert. Anschließend wurde eine NMR-Untersuchung des isolierten P15 im Institut für Organische Chemie (Dr. Andreas Rapp) durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es sich bei P15 um eine Spiro-Acetal-Struktur handelt (Pfeiffer et al., 2010 b).

Die Entstehung von P1 erfolgte, ebenso wie P9, P13 und P15, im Sauren aus dem ZEN-Epoxid. Er besitzt die Masse eines Dihydrodiols und hat keine freie Ketogruppe an C7. Daher wird vermutet, dass es sich um ein Halbacetal handelt (Abb. 3.11).

3.1. Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

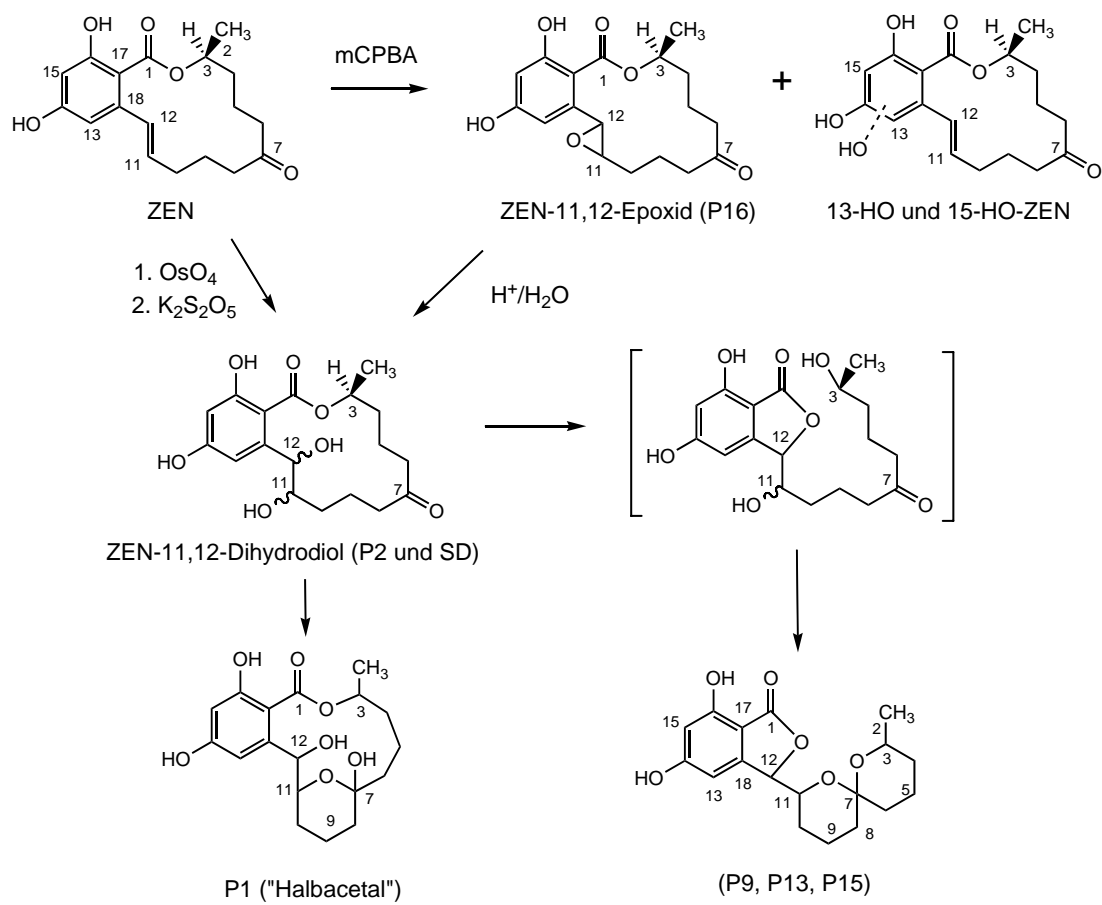


Abbildung 3.11: Postulierte Abbauwege des ZEN-Epoxids im Sauren

In Tab. 3.2 sind die ZEN-Kongeneren und ihre Strukturen nochmals zusammengefasst. Abb. 3.12 zeigt den Gesamtextrakt einer *F. graminearum* Kultivierung und die aufgeklärten Kongeneren. Ein Überblick über die MS/MS-Fragmentierung der ZEN-Kongeneren findet sich in Tab. A.3.

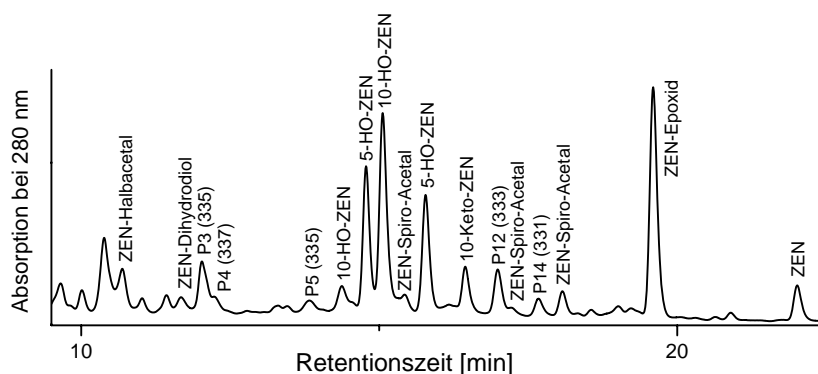


Abbildung 3.12: Gesamtextrakt aus einer *F. graminearum*-Kultur auf Vermiculit und Hidy-Medium nach Aufarbeitung und Abtrennung des ZEN mittels Säulenchromatographie.

Damit konnten neben den bereits bekannten Kongeneren 5-HO- und 10-HO-ZEN ein ZEN-Epoxid (Abb. 3.11) und ein zugehöriges ZEN-Dihydrodiol (Abb. 3.11) als neue Kongeneren identifiziert werden. Des Weiteren wurden die ebenfalls neuen Cyclisierungsprodukte des Dihydrodiols nachgewiesen (Abb. 3.11). Dem Epoxid kommt eine besondere Bedeutung zu, da es sich bei Epoxiden um elektrophile Substanzen handelt, die leicht nucleophil angegriffen werden können (Eisenbrand et al., 2005). Eine schädigende Wirkung auf den Organismus kann beispielsweise durch Reaktion mit DNA-Basen zustande kommen. Beispiele für DNA-Adduktbildung durch Epoxide sind das Benzo(a)pyren-Epoxid und das Aflatoxin B₁ 8,9-Epoxid (Eisenbrand et al., 2005).

Bei dem ZEN-Epoxid handelte es sich um das, neben ZEN, mengenmäßig in der Pilzkultur am stärksten vertretene Kongener (Abb. 3.12). Wie bei der Identifizierung des Dihydrodiols und der Cyclisierungsprodukte gezeigt wurde, ist das ZEN-Epoxid im Sauren nicht stabil. Säure führt dabei zur Hydrolyse und anschließend zur Cyclisierung. Da die Aufarbeitung im Sauren stattfand, wurde möglicherweise ein Teil des Epoxids bereits hydrolysiert, so dass die ursprüngliche Epoxidmenge unterschätzt wird und es sich bei dem Dihydrodiol, dem Halbacetal und den Cyclisierungsprodukten um Artefakte handeln könnte.

3.1. Strukturaufklärung oxidativer ZEN und ZEL-Metaboliten

Tabelle 3.2: Aus *F. graminearum* extrahierte ZEN-Kongenere. Dargestellt sind charakteristische Eigenschaften der Kongenere aus HPLC-DAD-MS/MS-Untersuchungen.

Kongener	RT	ESI-MS	Stereoisomer	Struktur
P1	10,4	351		ZEN-Halbacetal
P2	11,7	351		ZEN-Dihydrodiol
P6	14,4	333	M4/P8	10-HO-ZEN
P7	14,7	333	M6/P10	5-HO-ZEN
P8	15,1	333	M4/P6	10-HO-ZEN
P9	15,4	333	P13/P15	ZEN-Spiro-Acetal
P10	15,7	333	M6/P7	5-HO-ZEN
P11	16,5	331		10-Keto-ZEL
P13	17,1	333	P9/P15	ZEN-Spiro-Acetal
P15	18,0	333	P9/P13	ZEN-Spiro-Acetal
P16	19,4	333		ZEN-Epoxid
ZEN	22,0	317		ZEN

3.1.3 Bildung von ZEN-Kongeneren auf verschimmeltem Feldmais

Da das ZEN-Epoxid bislang noch nicht in der Literatur beschrieben war, stellte sich die Frage, ob die Bildung spezifisch für den gewählten Pilz und die Kultivierungsbedingungen ist. Um einen Hinweis auf die Lösung dieser Frage zu erhalten, wurden Maiskolben, die einen leichten Pilzbefall aufwiesen, in Baden-Württemberg am Tag deren regulärer Ernte im November 2010, gesammelt. Die Maiskolben wurden bis Januar im Dunkeln gelagert und anschließend, nach Aufarbeitung, extrahiert (vgl. 5.6.2). Bei der Untersuchung mit HPLC-MS/MS wurde 5-HO-ZEN, das als Pilzkongener bereits beschrieben ist, nachgewiesen. Außerdem enthielt der Maisextrakt neben ZEN auch das ZEN-Epoxid sowie ein Cyclisierungsprodukt (Abb. 3.13).

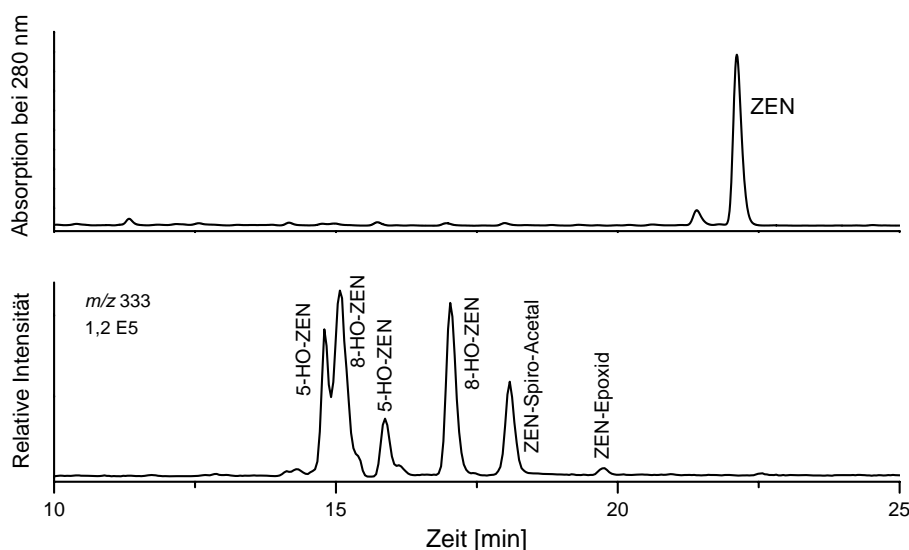


Abbildung 3.13: Extrakt aus verschimmeltem Mais, der im November 2010 gesammelt, für zwei Monate dunkel gelagert und anschließend nach Aufarbeitung extrahiert wurde (vgl. 5.6.2).

Zusätzlich wurde 8-HO-ZEN gefunden, das bisher nur in einem marinen Fusarienstamm unter Kultivierungsbedingungen nachgewiesen wurde (Arunpanichlert et al., 2011). Als Produkt eines Kulturpflanzen befallenden Pilzes war 8-HO-ZEN bisher noch nicht bekannt. Bei 8-HO-ZEN handelt es sich jedoch um den nach den Catecholen wichtigsten Säugermetaboliten.

Somit konnte gezeigt werden, dass *Fusarien* neben ZEN auch Kongenere von ZEN bilden können, über deren toxische Wirkungen und estrogene Eigenschaften bisher nur sehr wenig bekannt ist. Bei einem dieser Kongenere handelt es sich um ein ZEN-Epoxid, das nicht nur unter den gewählten Laborbedingungen, sondern auch unter realen Feldwachstumsbedingungen entstehen kann. Es ist nicht bekannt, ob es sich bei den Kongeneren um Abbauprodukte handelt und ob diese bei der Verarbeitung stabil sind. Da der Futtermais für die Tiermast eingesetzt wird, stellt sich die Frage nach toxischen Eigenschaften für Tier und Verbraucher. Dies gilt besonders, da möglicherweise nicht der komplette ZEN-Gehalt durch konventionelle Bestimmungsmethoden nachgewiesen werden kann. ZEN kann auch in 'maskierter' Form, als Glucuronid oder Sulfat, auftreten (Berthiller et al., 2009).

3.2 Vergleich des oxidativen Metabolismus von ZEN und α -ZAL mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen

Wie bereits gezeigt, entstehen bei mikrosomalen Umsetzungen mit Mikrosomen der Ratte eine Vielzahl von oxidativen Metaboliten. Insbesondere catecholische Strukturen werden gebildet. Neben der Identifizierung dieser oxidativen Metaboliten (vgl. 3.1), sollte auch deren Entstehung in den unterschiedlichen Spezies näher untersucht werden. Hierzu wurden im Laufe dieser Arbeit *in vitro*-Untersuchungen mit Mikrosomen verschiedener Spezies (Ratte, Schwein, Rind und Mensch) durchgeführt. Zusätzlich wurden die im humanen Organismus beteiligten CYPs identifiziert. Diese Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Pfeiffer et al., 2009).

3.2.1 Metaboliten mikrosomaler Umsetzungen von ZEN

Mikrosomale Umsetzungen von ZEN lieferten unabhängig von der Spezies die reduktiven Metaboliten α -ZEL und β -ZEL (Abb. 3.14).

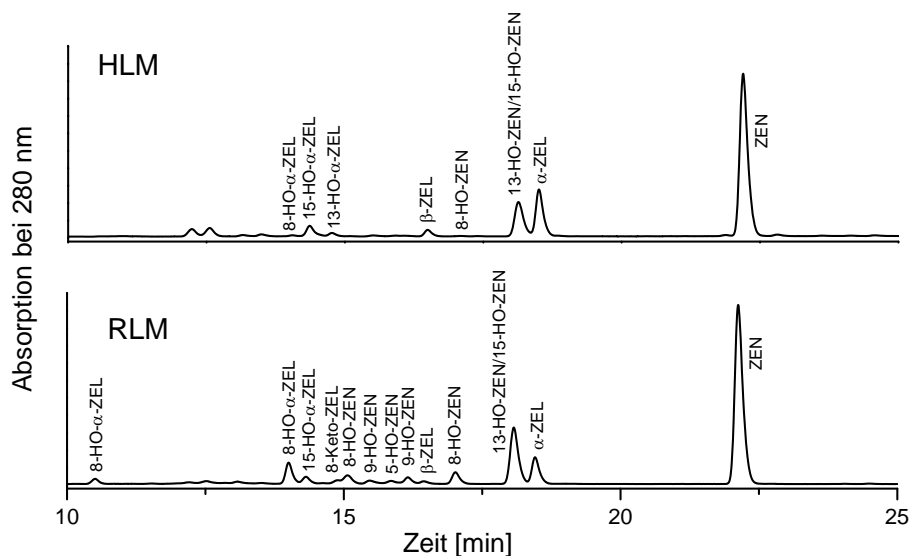


Abbildung 3.14: HPLC-DAD-Chromatogramme der mikrosomalen Umsetzungen von ZEN mit Mikrosomen verschiedener Spezies (vgl. 5.6.3.1). Mikrosomale Umsetzung von ZEN mit HLM für 60 min (oben). Mikrosomale Umsetzung von ZEN mit RLM für 40 min (unten).

3.2. Vergleich des oxidativen Metabolismus von ZEN und α -ZAL mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen

Zusätzlich wurden je nach Spezies unterschiedlich viele oxidative Metaboliten gebildet (Abb. 3.14). In der Literatur wird neben der Reduktion der Keto-Gruppe im ZEN-Molekül auch eine Reduktion der Doppelbindung angenommen (Abb. 1.3). Diese Reduktion als Metabolismusweg geht auf zwei neuseeländische *in vivo*-Studien zurück (vgl. 1.1.6). Alle mikrosomalen Untersuchungen der verschiedenen Spezies wurden auf die Bildung dieser reduktiven Metaboliten hin überprüft. Allerdings konnte keine der im Arbeitskreis durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen mit Mikrosomen oder Cytosol verschiedener Spezies die Bildung von ZAN oder ZAL bestätigen. Eine Reduktion der Doppelbindung ist somit für die gewählten Spezies bei mikrosomaler Umsetzung nicht möglich.

Im Folgenden wird der Metabolismus aus Umsetzungen mit Mikrosomen von Mensch und Ratte miteinander verglichen (Abb. 3.14). Die mikrosomalen Umsetzungen mit humanen Lebermikrosomen (HLM) lieferten nahezu ausschließlich die an Position 13 und 15 aromatisch hydroxylierten Metaboliten von ZEN und ZEL. Außerdem wurden an Position 8 aliphatisch hydroxylierte ZEN- und ZEL-Metaboliten in geringem Umfang gebildet (Abb. 3.14). Bei Inkubation mit RLM entstanden neben den aromatisch hydroxylierten weitere aliphatische Metaboliten. Hierbei handelte es sich um die Metaboliten 2-, 3- oder 4-HO-, 5-HO-, 8-HO-, 9-HO- und 10-HO-ZEN sowie 8-HO- und 8-Keto-ZEL. Die Strukturen der Metaboliten sind in Abb. 3.15 dargestellt.

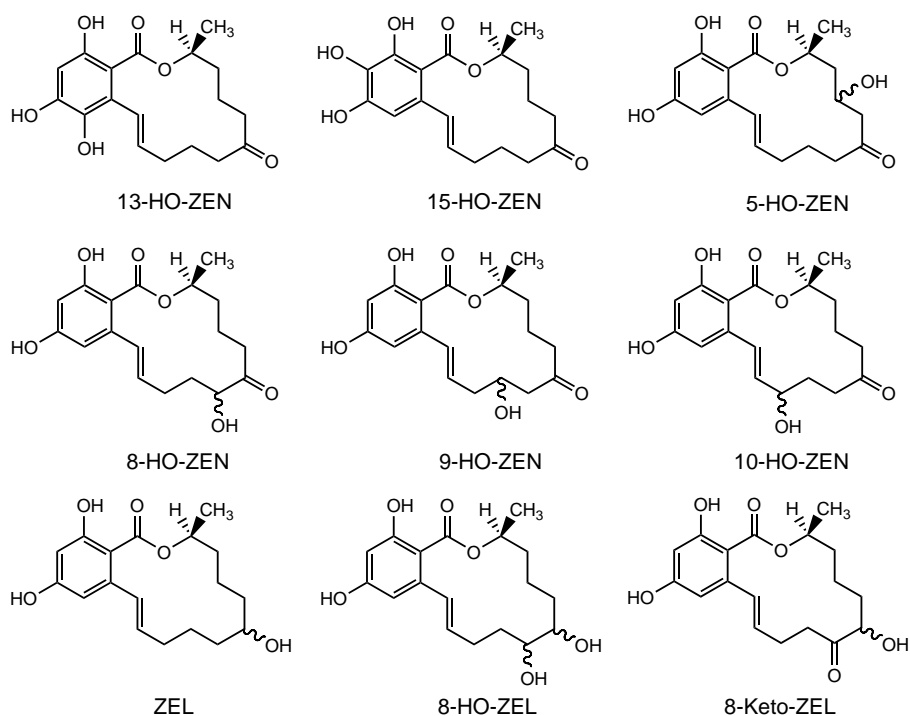


Abbildung 3.15: Überblick über die durch Mikrosomen aus ZEN gebildeten Metaboliten.

3.2.2 Aktivitäten von Mikrosomen verschiedener Spezies

Die Bestimmung von Aktivitäten erlaubt einen Vergleich der Metabolisierungsfähigkeit verschiedener Spezies. Umsetzungen müssen hierfür immer im linearen Bereich durchgeführt werden. Aktivitäten werden dabei meist auf den Proteingehalt der eingesetzten Mikrosomen bezogen. Da die Bildung der hydroxylierten Metaboliten jedoch durch CYPs katalysiert wird, erfolgt hier der Bezug auf den CYP-Gehalt der Mikrosomen. Das Verhältnis von CYP- und Proteingehalt kann je nach Spezies deutlich variieren.

Verglichen wurden die Gesamtaktivitäten, die Aktivitäten der Bildung reduktiver (α - und β -ZEL, sowie hydroxylierte ZELs) und oxidativer Metaboliten (hydroxylierte ZEN- und ZEL-Metaboliten), sowie die Catecholbildung für RLM und HLM. Die Gesamtaktivität bezogen auf den CYP-Gehalt scheint tendenziell für HLM etwas höher. Allerdings entstehen bei Inkubationen mit RLM mehr oxidative Metaboliten. Vergleicht man die Aktivitäten der Bildung oxidativer Metaboliten und Catechole, so wird deutlich, dass durch HLM weniger oxidative Metaboliten gebildet werden. Die Catecholbildung ist tendenziell allerdings etwas höher als bei RLM (Abb. 3.16).

3.2. Vergleich des oxidativen Metabolismus von ZEN und α -ZAL mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen

Für den oxidativen Metabolismus lässt sich zusammenfassen, dass, auf den CYP-Gehalt bezogen, vergleichbare Mengen an Catecholen für beide Spezies gebildet werden. Die etwas höhere Aktivität für die Bildung oxidativer Metaboliten bei RLM lässt sich durch die Bildung aliphatischer Hydroxylierungsprodukte erklären.

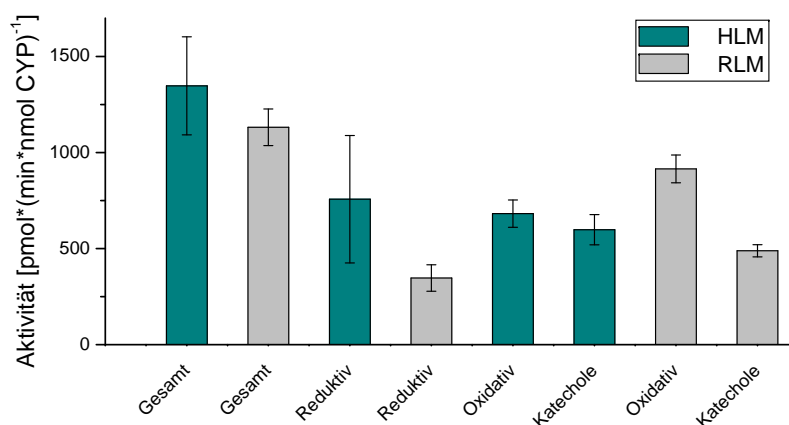


Abbildung 3.16: Überblick über die Aktivitäten mikrosomaler ZEN-Umsetzungen mit HLM und RLM. Aktivitäten für den Gesamtumsatz, die oxidativen Metaboliten, die reduktiven Metaboliten und die Catecholbildung bezogen auf den CYP-Gehalt.

Damit wurde gezeigt, dass HLM und RLM sehr ähnliche Aktivitäten für die Bildung oxidativer Metaboliten aufweisen. Einzig die Variabilität in den oxidativen Strukturen ist bei Inkubationen mit RLM höher. Die Aktivität der Bildung reduktiver Metaboliten ist für RLM, bezogen auf den CYP-Gehalt, geringer. Die Reduktion der Keto Gruppe zu ZELs wird jedoch durch HSDs katalysiert. Berechnet man die Aktivität auf den Proteingehalt, so ergeben sich nahezu identische Aktivitäten für HLM und RLM (Daten nicht gezeigt).

3.2.3 Phase I-Metabolismus von α -ZAL im Säuger

Neben dem Mykotoxin ZEN war für die Arbeit auch der Metabolismus des Masthilfsmittels α -ZAL von Interesse. Daher wurde der Metabolismus von α -ZAL mittels mikrosomaler Umsetzung untersucht. Neben der Strukturaufklärung wurde der Metabolismus von Ratte und Mensch verglichen. Teile der Ergebnisse wurden bereits veröffentlicht (Hildebrand et al., 2010).

Strukturaufklärung

Das Chromatogramm einer mikrosomalen Umsetzung von α -ZAL mit Lebermikrosomen der Wistarratte ist in Abb. 3.17 dargestellt. Charakteristika der gebildeten oxidativen Metaboliten sind in Tab. 3.3 und A.2 zusammengefasst.

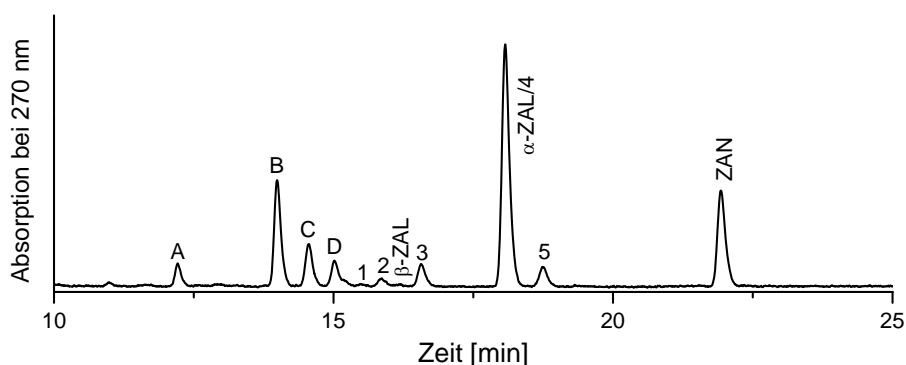


Abbildung 3.17: HPLC-DAD-Chromatogramm einer mikrosomalen Umsetzung von α -ZAL ($50 \mu\text{M}$) mit WRLM (1 mg Protein/mL) für 30 min (vgl. 5.6.3.1).

Die Aufklärung der entstandenen Metaboliten wird im Folgenden erläutert. Hierfür wurden zwei deuterierte Verbindungen, 13,15- D_2 - α -ZAL (D_2 - α -ZAL) und 6,6,8,8,13,15- D_6 - α -ZAL (D_6 - α -ZAL), eingesetzt (Hildebrand et al., 2010).

Die Metaboliten A-D besitzen einen m/z -Wert von 337. Dies entspricht der Masse eines hydroxylierten ZALs. Die Metaboliten 1-5 zeigten in HPLC-MS-Untersuchungen einen m/z -Wert von 335. Dieser ist mit der Masse einer hydroxylierten ZAN-Verbindung identisch.

C, D, 4 und 5

Mikrosomale Umsetzungen mit den beiden deuterierten α -ZAL-Verbindungen, D₂- α -ZAL und D₆- α -ZAL zeigten für die Metaboliten C, D, 4 und 5 jeweils den Verlust eines Deuteriums. Somit müssen sich die Hydroxylierungspositionen dieser Metaboliten am aromatischen Ring befinden.

Eine Synthese im Arbeitskreis zeigte, dass es sich bei MC um 15-HO- α -ZAL, bei MD um 13-HO- α -ZAL, bei M4 um 15-HO-ZAN und bei M5 um 13-HO-ZAN handelt (Hildebrand et al., 2010).

B und 3

Mikrosomale Umsetzungen mit den deuterierten α -ZAL-Verbindungen lieferten für die Metaboliten B und 3 den Verlust eines Deuteriums bei Inkubation von D₆- α -ZAL, jedoch nicht bei Einsatz von D₂- α -ZAL. Damit muss die Hydroxylierung dieser Metaboliten an Position 6 oder 8 erfolgt sein. Die genaue Identifizierung erfolgte unter Verwendung der Syntheseprodukte von ZEN mit Nitrosobenzol und Prolin (vgl. 3.1.1). Die einzeln isolierten Syntheseprodukte wurden in Methanol gelöst und mit Wasserstoff unter Verwendung von Platinoxid als Katalysator zu ihren ZAN-Produkten hydriert. Anschließend erfolgte ein Vergleich der gebildeten Produkte mit den Metaboliten der mikrosomalen Umsetzung. Dabei zeigte sich, dass es sich bei M3 um ein 8-HO-ZAN handelt. Eine anschließende Reduktion mit NaBH₄ lieferte die α - und β -ZAL-Isomere mit Hydroxylgruppe an Position 8. Ein Reduktionsprodukt hatte die gleiche RT und ein vergleichbares MS/MS-Spektrum wie Metabolit B.

Damit handelt es sich bei MB um ein 8-HO-ZAL und bei M3 um ein 8-HO-ZAN.

Weitere Metaboliten

Auf Grund der Ähnlichkeit zwischen dem ZEN- und ZAN-Metabolismus wurde angenommen, dass die Hydroxylierungspositionen denen des ZEN-Metabolismus entsprechen. Daher wurden die Metaboliten mit der Referenzsubstanz 5-HO-ZAN (von Yang et al. (2008) zur Verfügung gestellt) verglichen. Hierbei konnte keine Übereinstimmung festgestellt werden. Auch die Hydrierungen des Syntheseproduktes 6-HO-ZEN und des Pilzkongeners 10-HO-ZEN lieferten keinen der gebildeten Metaboliten.

Die übrigen Metaboliten standen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung um diese zu hydrieren.

Zur Überprüfung einer möglichen Hydroxylierung an Position 11 oder 12 erfolgte eine Synthese von 11,12-D₂-ZAN aus ZEN (vgl. 5.6.7.4). Der Einsatz von 11,12-D₂-ZAN zur mikrosomalen Umsetzung lieferte keinen Metaboliten mit Deuteriumverlust. Damit ist auch die Bildung von 11-HO- oder 12-HO-Verbindungen ausgeschlossen. Die Strukturen von A, 1 und 2 konnten somit nicht abschließend bestimmt werden. In Tab. 3.3 sind die Charakteristika der Metaboliten und ihre Strukturen zusammengefasst. Die MS/MS-Spektren der Metaboliten sind Tab. A.2 dargestellt.

Tabelle 3.3: Zuordnung der durch mikrosomale Umsetzungen aus α -ZAL gebildeten hydroxylierten Metaboliten.

Meta- bolit	RT	ESI-MS	Massenerhöhung für D ₂ D ₆	Struktur
A	12,2	337	+2 +6	nicht abschließend bestimmt
B	14,0	337	+2 +5	8-HO- α -ZAL
C	14,5	337	+1 +5	15-HO- α -ZAL
D	15,0	337	+1 +5	13-HO- α -ZAL
1	15,4	335	+2 +6	nicht abschließend bestimmt
2	15,8	335	+2 +6	nicht abschließend bestimmt
3	16,5	335	+2 +5	8-HO-ZAN
4	18,1	335	+1 +5	15-HO-ZAN
5	18,7	335	+1 +5	13-HO-ZAN

Säugervergleich

Unterschiede im Metabolismus von α -ZAL für verschiedene Spezies werden am Beispiel der Mikrosomen von Mensch und Ratte erläutert (Abb. 3.18). Der Metabolismus von α -ZAL unterscheidet sich, wie bei ZEN, für die verschiedenen Spezies (Abb. 3.18).

Die Reaktion von α -ZAL zu ZAN konnte bei Mikrosomen beider Spezies beobachtet werden. Auch bei α -ZAL entstanden mit HLM bevorzugt aromatisch hydroxylierte Metaboliten. Zusätzlich zu den Catecholstrukturen wurden die Chinone der 13-HO-ZAN- und 13-HO- α -ZAL-Metaboliten nachgewiesen.

3.2. Vergleich des oxidativen Metabolismus von ZEN und α -ZAL mit Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen

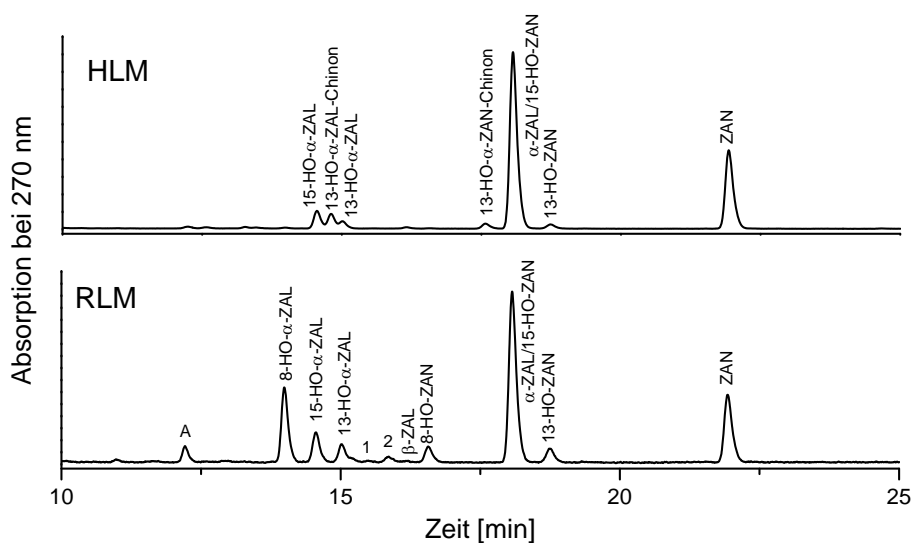


Abbildung 3.18: HPLC-DAD-Chromatogramme der mikrosomalen Umsetzungen von α -ZAL mit Mikrosomen verschiedener Spezies. Mikrosomale Umsetzung von α -ZAL mit HLM für 30 min (oben). Mikrosomale Umsetzung von α -ZAL mit RLM für 15 min (unten).

Die Verwendung von RLM lieferte neben den aromatischen auch einige aliphatische Metaboliten. Hierbei konnten allerdings nur die 8-HO-Verbindungen identifiziert werden. Die Strukturen der drei anderen Verbindungen konnten nicht zweifelsfrei zugeordnet werden (Tab. 3.3).

3.2.4 Oxidation der RALs durch humane Cytochrom-P450-Isoenzyme

Wie gezeigt, können humane Mikrosomen oxidative Metaboliten in Form von Hydroxylierungsprodukten bilden. Hydroxylierungsreaktionen werden durch CYPs katalysiert. Daher war von Interesse, welche humanen CYPs (hCYPs) an der Bildung der Hydroxylierungsprodukte beteiligt sind. Hierfür erfolgten *in vitro*-Untersuchungen von ZEN mit Supersomen. Bei Supersomen handelt es sich um Mikrosomen aus Sf-9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*). Diese werden mit einem Baculovirus-Stamm, der die cDNA des gewünschten Enzyms überträgt, infiziert. Mikrosomale Membranfraktionen dieser Zellen enthalten das gewünschte Enzym und können zur Metabolismusuntersuchung, ähnlich den Lebermikrosomen, verwendet werden (Hood et al., 1998). Es wurden Supersomen mit 10 verschiedenen hCYP-Isoformen eingesetzt.

Die meisten der verwendeten hCYP-Isoformen werden in der Leber (hCYP1A2, 2A6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4) exprimiert (Bieche et al., 2007). Zusätzlich wurden hCYP-Isoformen der Lunge (hCYP1A1, 1B1, 2B6) und des Dünndarms (hCYP2C9, 2C19, 2D6 und 3A4) verwendet.

Nur die beiden hCYPs 1A2 und 3A4 zeigten bei Inkubation von ZEN einen Umsatz. Hierbei war die hCYP1A2-Aktivität ca. 10-fach der hCYP3A4-Aktivität (Pfeiffer et al., 2009). Auch für die übrigen RALs konnte gezeigt werden, dass diese nahezu ausschließlich durch das hepatische hCYP1A2 zu ihren Catecholen hydroxyliert werden. Die Aktivitäten von hCYP1A2 unterscheiden sich je nach RAL. Ein Anstieg der Aktivitäten bei Inkubation mit hCYP1A2 erfolgt in der Reihenfolge ZEN < α -ZEL < ZAN < α -ZAL. Damit zeigt sich, dass α -ZAL vom humanen Organismus am besten zu Catecholen hydroxyliert werden kann.

In einer Untersuchung von Bravin et al. (2009) wurde ZEN ebenfalls auf den oxidativen Metabolismus mit hCYPs untersucht. Hierbei wurde für hCYP3A4, hCYP3A5 und hCYP2C8 eine metabolisierende Aktivität gezeigt. Bei dem detektierten Metaboliten handelt es sich auf Grund des MS/MS-Spektrums vermutlich um 8-HO-ZEN. Eine Aktivität durch hCYP1A2 konnte in deren Untersuchung nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die hCYP1A2-Supersomen von Bravin et al. keine CYP-Aktivität besaßen oder die Catechole während der Aufarbeitung verloren gingen.

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass ZEN den Pregnan-X-Rezeptor induziert und damit die CYP3A aktiviert (Ayed-Boussema et al., 2011; Ding et al., 2006). Dies würde zu einer erhöhten Bildung des aliphatischen 8-HO-ZEN-Metaboliten führen.

3.3 Phase II-Metabolismus und Inaktivierungsreaktionen

Neben dem oxidativen Metabolismus unterliegen die RALs auch dem Phase II-Metabolismus. Hierbei können sowohl die RALs selbst, als auch die oxidativen Metaboliten metabolisiert werden. Im Folgenden werden Untersuchungen zur Glucuronidierung der RALs gezeigt. Außerdem werden die Methylierung und die Bildung von N-Acetylcystein (NAC)-Addukten der RAL-Catechole betrachtet. Die Methylierungsaktivitäten und Adduktbildungsgeschwindigkeiten werden mit den Aktivitäten der Catechole von E1 und E2 verglichen.

3.3.1 Glucuronidierung

Eine wichtige Reaktion im Phase II-Metabolismus von Fremdstoffen ist die Glucuronidierung. In zahlreichen *in vivo*-Studien konnte gezeigt werden, dass RALs im Körper verschiedener Säuger glucuronidiert werden, bevor eine Ausscheidung über den Urin erfolgt (Zöllner et al., 2002).

3.3.1.1 Strukturaufklärung

Die Glucuronidierung der RALs kann an zwei beziehungsweise drei Positionen im Molekül erfolgen. Für die RALs ZEN und ZAN besteht die Möglichkeit der Glucuronidierung an den Positionen 14 und 16 (Abb. 3.19, links). Bei den übrigen RALs, mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an Position 7, kann die Glucuronidierung an den Positionen 7, 14 und 16 erfolgen (Abb. 3.19, rechts).

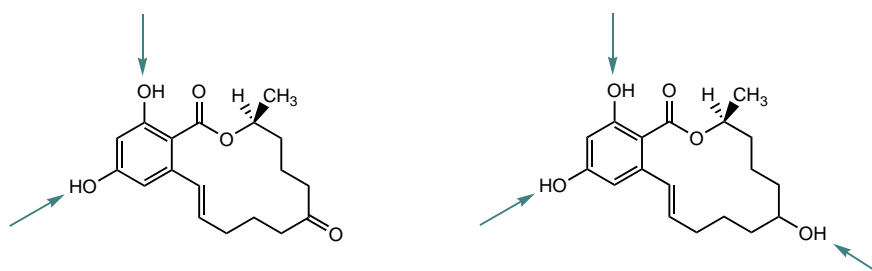


Abbildung 3.19: Mögliche Glucuronidierungspositionen der RALs. Dargestellt sind die Glucuronidierungspositionen am Beispiel von ZEN und ZEL.

Die Identifizierung der einzelnen Glucuronide erfolgte über MS/MS-Untersuchungen. Wie bereits in einer Arbeit von Stevenson et al. (2008) beschrieben, unterscheiden sich die MS/MS-Spektren je nach Glucuronidierungsposition deutlich voneinander (Abb. 3.20). 14-O-Glucuronide der RALs bilden ein Hauptfragment mit dem m/z des Aglycons. Dies konnte mit Hilfe eines ZEN-14-O-Glucuronid-Standards (Referenzsubstanz von Hannes Mikula, Universität Wien) bestätigt werden. Die 7-O-Glucuronide besitzen ein Hauptfragment mit dem m/z nach CO_2 -Abspaltung. 16-Glucuronide zeigen als Hauptfragment das m/z des Aglycons, besitzen allerdings auch ein Fragment nach CO_2 -Abspaltung (Abb. 3.20).

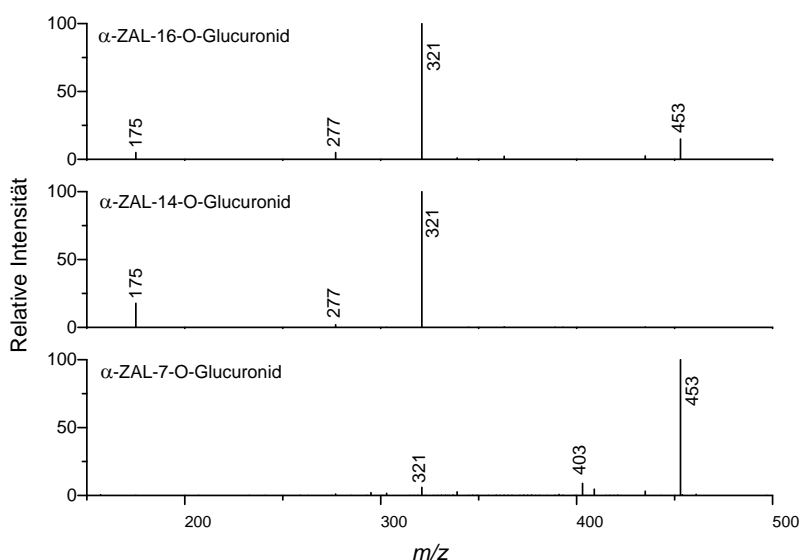


Abbildung 3.20: MS/MS-Fragmentierung eines α -ZAL-16-O-Glucuronids (oben), eines α -ZAL-14-O-Glucuronids (Mitte) und eines α -ZAL-7-O-Glucuronids (unten). Der m/z -Wert der Glucuronide beträgt 497. Die Fragmentionen mit m/z 453 beziehungsweise 321 entsprechen den Ionen nach Abspaltung einer CO_2 -Gruppe beziehungsweise der Glucuronsäure.

Damit zeigt sich, dass aromatische Glucuronide der RALs bevorzugt zu ihren Aglycons fragmentieren. Aliphatische Glucuronide hingegen spalten bevorzugt CO_2 ab. Die Elutionsreihenfolge in der HPLC unter den gewählten Bedingungen (vgl. 5.7.3) ist für alle RALs 16-O-Glucuronid < 14-O-Glucuronid < 7-O-Glucuronid.

Die Fragmentierung der Sulfate verhält sich ähnlich der Glucuronid-Fragmentierung. Auch hier besitzen die Hauptfragmente der 14- und 16-Sulfate MS/MS-Spektren mit den Massen nach Sulfatabspaltung. Bei den 7-Sulfaten besitzen die Hauptfragmente die Masse nach CO_2 -Abspaltung.

Mit Hilfe der Fragmentierungen kann in weiterführenden Untersuchungen zum Beispiel zwischen aliphatischer und aromatischer Glucuronidierung von hydroxylierten RAL-Metaboliten unterschieden werden.

3.3.1.2 *In vitro*-Glucuronidierung der RALs

Die Glucuronidierung der RALs wurde sowohl mit Hilfe von Mikrosomen verschiedener Spezies, als auch mit UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT) enthaltenden Supersomen *in vitro*, untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die zum Teil Ergebnisse meiner Diplomarbeit waren (Hildebrand, 2008), wurden bereits veröffentlicht (Pfeiffer et al., 2010 a).

Glucuronidierung mit Mikrosomen

Bei mikrosomalen Glucuronidierungen wurden die Aktivitäten und die Positionen der gebildeten Glucuronide verschiedener Säugerspezies verglichen. Durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Sauerstoff der Carbonylgruppe an Position 1 und dem Wasserstoff der Hydroxylgruppe an Position 16 kann eine schlechte Glucuronidierung an Position 16 erklärt werden. In Tab. 3.4 sind die Glucuronidierungsaktivitäten der Leber für die Spezies Rind, Schwein, Ratte und Mensch (Leber und Dünndarm) dargestellt. Die Glucuronidierungsaktivitäten sind sehr spezies- und weniger substratabhängig. So ist die Aktivität bei Verwendung aller RALs mit Lebermikrosomen des Schweins deutlich höher als bei allen anderen untersuchten Spezies. Die Aktivitäten sinken von den Mikrosomen des Schweins, über Rind und Ratte zu Mensch. Ein Vergleich der humanen Mikrosomen aus Leber und Darm zeigt, dass sich die Gesamtaktivitäten kaum unterscheiden. Allerdings unterscheiden sich die Verhältnisse der Glucuronidierungspositionen. So bilden intestinale Mikrosomen vermehrt 16-O-Glucuronide (Tab. 3.4).

Tabelle 3.4: Glucuronidierungsaktivitäten für Mikrosomen verschiedener Spezies.

RAL	Schweineleber	Rinderleber	Rattenleber	Humanleber	Humandarm
ZEN	34 ± 10 ^{a)} (99/1/-) ^{b)}	13 ± 2 (91/9/-)	10 ± 1 (96/4/-)	6 ± 1 (96/4/-)	5 ± 1 (91/9/-)
α-ZEL	29 ± 4 (86/0/14)	14 ± 1 (76/5/19)	9 ± 1 (87/1/12)	6 ± 1 (92/0/8)	4 ± 0 (90/5/5)
β-ZEL	29 ± 2 (77/4/19)	11 ± 4 (74/19/7)	11 ± 1 (74/11/15)	5 ± 1 (52/33/15)	4 ± 1 (42/55/3)
ZAN	38 ± 3 (99/1/-)	13 ± 1 (99/1/-)	8 ± 1 (100/0/-)	7 ± 2 (99/1/-)	2 ± 1 (89/11/-)
α-ZAL	28 ± 4 (85/0/15)	11 ± 1 (57/2/41)	10 ± 1 (86/0/14)	4 ± 1 (77/0/23)	3 ± 1 (39/18/43)
β-ZAL	36 ± 6 (95/0/5)	15 ± 1 (64/6/30)	9 ± 1 (43/3/54)	4 ± 1 (75/4/21)	1 ± 0 (57/24/19)

Mittelwerte ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

a) nmol*(min*mg Protein)⁻¹ für die Summe der Glucuronide

b) % (14-O-Glucuronid/16-Glucuronid/7-Glucuronid); -: Position nicht glucuronidierbar

Glucuronidierung mit UGT-Supersomen

Um zu klären, ob diese Positionsunterschiede auf gewebespezifische UGTs zurückzuführen sind, wurden mikrosomale Umsetzungen mit elf verschiedenen UGT-Supersomen durchgeführt. Mit Hilfe der Supersomen konnten die Glucuronidierungspositionen für die einzelnen UGTs bestimmt werden. Durch Einsatz der Supersomen kann allerdings keine Aussage zu den absoluten Aktivitäten getroffen werden, da die UGT-Mengen der Supersomen stark variieren können. Einzig ein Vergleich mit den Aktivitäten der Modelsubstanzen kann eine Aussage zur Glucuronidierungsfähigkeit liefern.

Alle untersuchten UGTs (1A1, 1A3, 1A4, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 und 2B17) katalysierten die RAL-Glucuronidierung. Bei den UGTs 1A1, 1A3 und 1A8 waren die Aktivitäten für die meisten RALs höher als die der entsprechenden Modelsubstrate. Die übrigen UGTs zeigten, mit wenigen Ausnahmen, bei den RALs eine geringere Aktivität als bei den Modelsubstraten (Pfeiffer et al., 2010 a). Ebenfalls wurden deutliche Unterschiede in den Glucuronidierungspositionen durch die unterschiedlichen Isoformen sichtbar. Beispielsweise ließ sich der hohe Anteil an 16-O-Glucuronid des β -ZEL (Tab. 3.4) für Leber und Darm durch die Aktivitäten des UGT1A1 erklären. So weist UGT1A1 ausschließlich für β -ZEL eine höhere Aktivität der Glucuronidierung an Position 16 als an 14 auf (Pfeiffer et al., 2010 a).

Phase II-Metabolismus in Caco2-Zellen

Caco2-Zellen dienen als Modell für die Resorption und den Metabolismus im humanen Darm. Die Zellen werden daher eingesetzt um die humane Resorption *in vitro* zu untersuchen. Dabei kann neben der Resorptionsrate auch der Metabolismus der resorbierten Substanzen bestimmt werden. Im Arbeitskreis wurde deshalb die Resorption und der Metabolismus der RALs mit Caco2-Zellen untersucht (Pfeiffer et al., 2011). Die Untersuchungen zeigten die Bildung von Glucuroniden und Sulfaten der RALs. Auch hier zeigte sich für die β -Formen eine bessere Glucuronidierung an Position 16 als für die anderen RALs (Pfeiffer et al., 2010 a). Die Untersuchung der gebildeten Sulfate zeigte, dass nahezu ausschließlich 14-Sulfate gebildet werden. Das Verhältnis von Glucuroniden zu Sulfaten beträgt in den Caco2-Zellen je nach RAL 2,1 bis 0,9. Konjugierte RALs werden gut aus der Zelle ausgeschieden. Dabei erfolgt bei α -ZAL eine 2 bis 3 mal höhere basolaterale Ausscheidung.

Insgesamt ergibt sich eine gute Resorption der RALs ins Blut, wobei α -ZAL besser als ZEN aufgenommen wird.

Durch die Versuche mit den Caco2-Zellen wurde gezeigt, dass mit einer hohen intestinalen *in vivo*-Bioverfügbarkeit der RALs zu rechnen ist. Eine gute Resorption der RALs über den Darm ins Blut bedeutet, dass diese über die Pfortader in die Leber gelangen können. Daher ist die Bildung von Glucuroniden und Sulfaten zur Ausscheidung von entscheidender Bedeutung. Der Aktivitätsvergleich der Glucuronidierung mit Mikrosomen verschiedener Spezies lieferte den höchsten Wert für die Schweinelebermikrosomen. Eine hohe Glucuronidierungsaktivität wird eigentlich mit einer Inaktivierung und Ausscheidung verbunden und sollte damit die Estrogenität senken. Im Gegensatz zu dieser Annahme reagieren Schweine jedoch am empfindlichsten auf die estrogenen Eigenschaften von ZEN (EFSA, 2004). Bei Schweinen wird allerdings auch ein starker enterohepatischer Kreislauf für ZEN beobachtet, so dass glucuronidiertes ZEN im Schweinedarm wieder gespalten und neu resorbiert werden kann (Dänicke et al., 2005).

Die Aktivität der humanen Mikrosomen (Leber und Darm) war im Vergleich mit den anderen Spezies sehr gering. Die Gesamtaktivitäten von Leber und Darm waren für die RALs ähnlich, jedoch in den Darmmikrosomen etwas geringer. Unterschiede zeigten sich in den Glucuronidierungspositionen. So bildeten die Darmmikrosomen mehr 16-O-Glucuronid. Ein ähnliches Bild ergab sich in den Caco2-Zellen bei den β -Verbindungen.

Damit zeigt sich, dass die Glucuronidierung eine wichtige Rolle im Metabolismus der RALs spielt. Die Glucuronidierungsprofile sind allerdings gewebespezifisch. Eine Aufnahme unkonjugierter RALs in das Blut kann aus den Caco2-Versuchen und den geringen mikrosomalen Glucuronidierungsaktivitäten geschlossen werden. Damit ist zu erwarten, dass RALs im Menschen resorbiert und in der Leber zu Catecholen metabolisiert werden können.

3.3.2 Reaktivität der Catechole

Bisher konnte gezeigt werden, dass RALs gut resorbiert werden und zum Teil unmetabolisiert in die Leber gelangen können. RALs besitzen nicht nur estrogene Eigenschaften, sondern können im Menschen auch durch das hepatische hCYP1A2 zu Catecholen metabolisiert werden. Diese beiden Eigenschaften verbindet sie mit den Steroidestrogenen E1 und E2. Die Catechole der Steroidestrogene sind als krebserregend bekannt. Mögliche Mechanismen hierfür können genotoxische Effekte von 2-HO-E1/E2 und 4-HO-E1/E2 im Zielgewebe sein (Cavalieri und Rogan, 2006). Ein bekannter Mechanismus hierbei ist die Bildung von DNA-Addukten durch die Chinone der Estrogencatechole. Dabei zeigen die Chinone von 4-HO-E1/E2 ein höheres mutagenes Potential, da sie im Vergleich mit den Chinonen von 2-HO-E1/E2 mehr DNA-Addukte bilden, die zu apurinen Stellen führen (Saeed et al., 2005 a). Ein weiterer Faktor für die genotoxischen Eigenschaften der Estrogencatechole kann die Bildung oxidativer DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sein. Diese können durch Redoxcycling der Estrogencatechole entstehen. Cavalieri et al. (2004) machen zusätzlich ein Ungleichgewicht in der Estrogenhomöostase für die mutagenen Eigenschaften der Estrogene mitverantwortlich. Ein Faktor, der zu dem Ungleichgewicht in der Estrogenhomöostase beiträgt, ist eine geringere Methylierungsaktivität für die 4-HO- im Vergleich mit den 2-HO-Estrogencatecholen (Roy et al., 1990), wodurch sich ein höherer 4-HO-E1/E2-Gehalt einstellt.

In Abb. 3.21 sind die Strukturen der RAL- und der Estrogencatechole miteinander verglichen. Dabei wird die Ähnlichkeit der Strukturen deutlich.

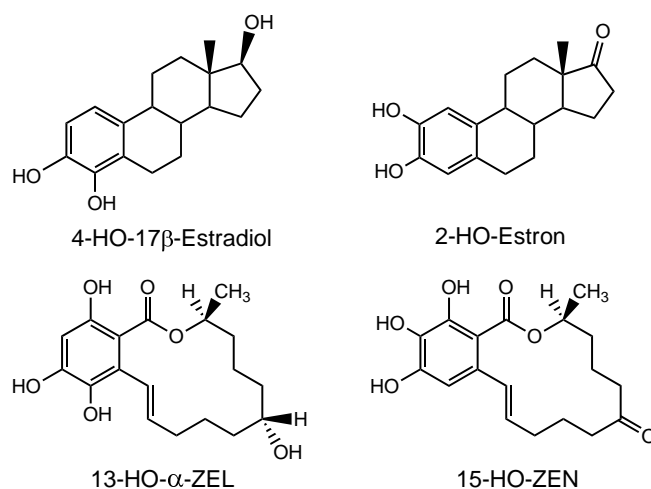


Abbildung 3.21: Vergleich der Strukturen der RAL-Catechole mit den Estrogencatecholen. Gegenübergestellt sind 13-HO- α -ZEL und 4-HO-17 β -Estradiol, sowie 15-HO-ZEN und 2-HO-Estron.

Im Arbeitskreis wurde die genotoxische Wirkung der RAL-Catechole durch Messung oxidativer Schäden anhand der Bildung von 8-Oxo-2'-desoxyguanosin (8-Oxo-dG) in isolierter Kalbsthymus-DNA ermittelt. Ebenso wurde zum Vergleich der, durch die Estrogencatechole verursachte 8-Oxo-dG-Gehalt bestimmt. Die Menge des 8-Oxo-dG war für die RALs von der Hydroxylierungsposition und der funktionellen Gruppe an Position 7 abhängig. So zeigten 15-HO-RALs eine höhere Aktivität zum Redoxcycling als 13-HO-RALs und die ZAN/ZEN-Catechole wiesen eine höhere Redoxcycling-Aktivität als die α -ZAL/ α -ZEL-Catechole auf (Fleck et al., 2012). Für die Estrogencatechole 2-HO- und 4-HO-E1/E2 ergaben sich kaum Unterschiede. Die Redoxcycling-Aktivitäten stiegen in der Reihenfolge 13-HO- α -ZAL < 13-HO- α -ZEL \approx 13-HO-ZEN < 13-HO-ZAN < 15-HO- α -ZEL < 15-HO- α -ZAL \approx 2/4-HO-E1/2 < 15-HO-ZEN < 15-HO-ZAN (Fleck, noch nicht veröffentlicht). Eine mögliche Erklärung für die geringere 8-Oxo-dG-Generierung bei Einsatz von 13-HO-RALs, im Vergleich zu 15-HO-RALs, ist die Bildung stabiler para-Chinone aus 13-HO-RALs. Ein Vergleich mit Modellschubstanzen zeigte, dass die 13-HO-RALs eher hydrochinoide als catecholische Eigenschaften besitzen (Fleck, noch nicht veröffentlicht). Dies würde ein geringeres Redoxcycling und damit einen geringeren ROS-Gehalt erklären.

Eine wichtige Inaktivierungsreaktion von Catecholen besteht in der Bildung ihrer Methylprodukte. Als ein Grund für die stärkere Kanzerogenität der 4-HO- gegenüber den 2-HO-Estrogencatecholen wird deren schlechtere Inaktivierung durch COMT zu ihren Methylethern angenommen. Auf Grund der Ähnlichkeit der RALs und der Steriodesstrogene wurden diese vergleichend untersucht.

3.3.2.1 Methylierung der Catechole

Die Methylierung von Catecholen wird im Organismus durch die COMT katalysiert, als Cosubstrat wird S-Adenosylmethionin (SAM) benötigt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine *in vitro*-Untersuchung zur Fähigkeit der humanen COMT, die RAL-Catechole zu methylieren. Um ein Maß für die Methylierungsaktivität zu bekommen, wurde die Methylierung der Estrogencatechole 2-HO-E2, 4-HO-E2, 2-HO-E1 und 4-HO-E1 unter gleichen Bedingungen bestimmt. Die 4-HO-Estrogencatechole sind als schlechte Substrate der COMT bekannt (Roy et al., 1990). Die geringe COMT-Aktivität trägt zu einem Ungleichgewicht im Estrogenstoffwechsel bei und führt damit zu einer höheren Konzentration der 4-HO-Estrogencatechole im Vergleich mit den 2-HO-Estrogencatecholen. Dies wird als einer der Gründe für die stärkere Kanzerogenität der 4-HO- mit den 2-HO-Estrogencatecholen diskutiert (Cavalieri und Rogan, 2006).

Die Methylierung wurde durch Inkubation des entsprechenden Catechols in Phosphatpuffer, unter Zugabe von humanem Lebercytosol (HLC) und SAM durchgeführt (vgl. 5.6.3.1). Die Catechole wurden hierbei in einer Konzentration von 10 μM eingesetzt, da die Herstellung der RAL-Catechole schwierig ist. 13-HO-RALs können durch Synthese mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX) aus ihren RALs hergestellt und über präparative HPLC aufgereinigt werden (vgl. 5.6.6.1). 15-HO-RALs müssen dagegen mittels mikrosomaler Umsetzung generiert und anschließend ebenfalls über präparative HPLC aufgereinigt werden (vgl. 5.7.2).

Die Methylierungsaktivitäten der Catechole von ZAN und α -ZAL unterscheiden sich je nach Hydroxylierungsposition stark voneinander (Abb. 3.22). So sind die Aktivitäten für die an Position 15 hydroxylierten Substanzen zwischen 10 und 20 mal höher als die der 13-HO-Verbindungen. Die Methylierungsaktivitäten der Catechole von ZEN und α -ZEL hingegen sind sehr ähnlich und es bestehen kaum Unterschiede zwischen den Hydroxylierungspositionen.

Damit zeigt sich eine Abhängigkeit der Methylierungsaktivität sowohl von der Hydroxylierungsposition als auch von der Doppelbindung im Molekül.

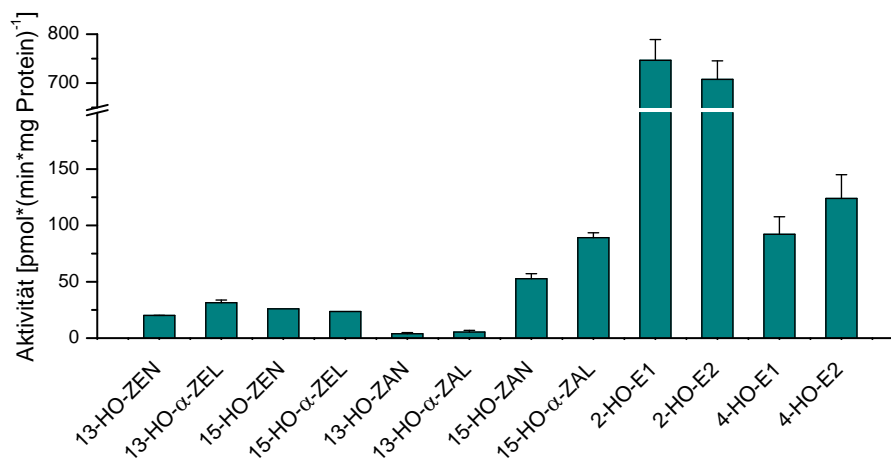


Abbildung 3.22: Aktivitäten der Methylierung von RAL- und Estrogen-Catecholen mit HLC. Dargestellten sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen. Bei 15-HO-ZEN und 15-HO-α-ZEL handelt es sich um Einfachbestimmungen.

Zur Einordnung der Methylierungsaktivitäten von RAL-Catecholen wurden diese mit den Aktivitäten der Estrogencatechole verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass die 2-HO-Catechole von E1 und E2 deutlich höhere Methylierungsaktivitäten besitzen als ihre 4-HO-Regioisomere (Abb. 3.22). Ein Unterschied zwischen E1- und E2-Catecholen besteht dagegen kaum. Betrachtet man die Strukturen der Estrogencatechole und ZEN-Catechole, so entspricht die Anordnung der Hydroxylgruppen am aromatischen Ring von 4-HO-E1/E2, der Anordnung der 13-HO-RALs. Ebenso entsprechen sich die Strukturen von 2-HO-E1/E2 und 15-HO-RALs (Abb. 3.21). Für die ZAN- und α-ZAL-Catechole spiegelt sich dies in den Methylierungsaktivitäten wieder.

Grundsätzlich sind die RAL-Catechole teilweise noch deutlich schlechter methylierbar als die 4-HO-Catechole der Estrogene. Eine Inaktivierung der RAL-Catechole über Methylierung kann im humanen Organismus somit nur in geringem Umfang erfolgen.

Der Vergleich der RAL-Catechole mit den Catecholen von E1 und E2, die als kanzerogen bekannt sind, zeigt eine mögliche Gefahr. So zeigen die RAL-Catechole ähnliche Redoxcycling-Aktivitäten wie die Estrogencatechole. Die 15-HO-Catechole von ZEN und ZAN besitzen sogar höhere Redoxcycling-Aktivitäten. Als ein möglicher Grund für die höhere Kanzerogenität der 4-HO-Estrogencatechole wird deren schlechte Methylierbarkeit und die damit verbundene schlechte Inaktivierung angenommen. Da die RAL-Catechole mit einer zum Teil deutlich geringeren Aktivität methyliert werden, ist deren Inaktivierung über den Weg der Methylierung noch schlechter. Von 15-HO-ZEN und 15-HO-ZAN scheint somit das höchste Gefahrenpotential der RAL-Catechole auszugehen. Zum Einen werden sie durch hCYP1A2 aus ihren RALs gebildet. Zum Anderen entsteht eine höhere 8-Oxo-dG-Menge als bei den Estrogencatecholen. Ebenso zeigen sie eine geringere Inaktivierung durch Methylierung als die schlecht methylierbaren 4-HO-Estrogencatechole.

3.3.2.2 NAC-Adduktbildung der Catechole

Neben der Methylierung wurde auch die Bildung von NAC-Addukten als Entgiftungsreaktion der RAL-Catechole untersucht und mit den Estrogencatecholen verglichen. Eine wichtige Phase II-Reaktion von Catecholen ist die Adduktbildung mit Glutathion (GSH). Diese Reaktion ist von besonderer Bedeutung, da GSH in Zellen in millimolaren Konzentrationen vorliegt und somit als Reaktionspartner in großem Umfang zur Verfügung steht. Die Adduktbildung erfolgt dabei mit der Thiolgruppe des GSH. Vor der Reaktion muss das Catechol allerdings zum entsprechenden Chinon oxidiert werden. Dies kann durch Redoxcycling erfolgen. Für die durchgeführten Untersuchungen wurde GSH durch NAC als Modell ersetzt. NAC besitzt die gleiche an der Reaktion beteiligte funktionelle Cysteingruppe. Bei den NAC-Addukten handelt es sich um Mercaptursäuren, die vom Organismus durch Abbau von GSH-Addukten gebildet werden. Die Ausscheidung aus dem Körper erfolgt als Mercaptursäure häufig über den Harn. Mercaptursäuren können daher als Marker der GSH-Adduktbildung in Tierversuchen verwendet werden.

Die ersten Untersuchungen zur Charakterisierung möglicher Addukte erfolgten durch Zugabe von NAC zu mikrosomalen Umsetzungen von RALs (vgl. 5.6.4). Die gebildeten Metaboliten wurden dabei durch ihre MS/MS-Spektren identifiziert. So weist das NAC-Addukt eines ZAN-Catechols ein m/z von 496 auf.

Am Beispiel eines ZAN-Addukts ist eine MS/MS-Fragmentierung dargestellt (Abb. 3.23, oben). Dabei deuten die Fragmentationen 367 und 333 auf die beidseitige Spaltung der Schwefelbindung hin. MS³-Untersuchungen auf m/z 496 > 367 bestätigten den Bruch der zweiten Schwefelbindung (Abb. 3.23, unten).

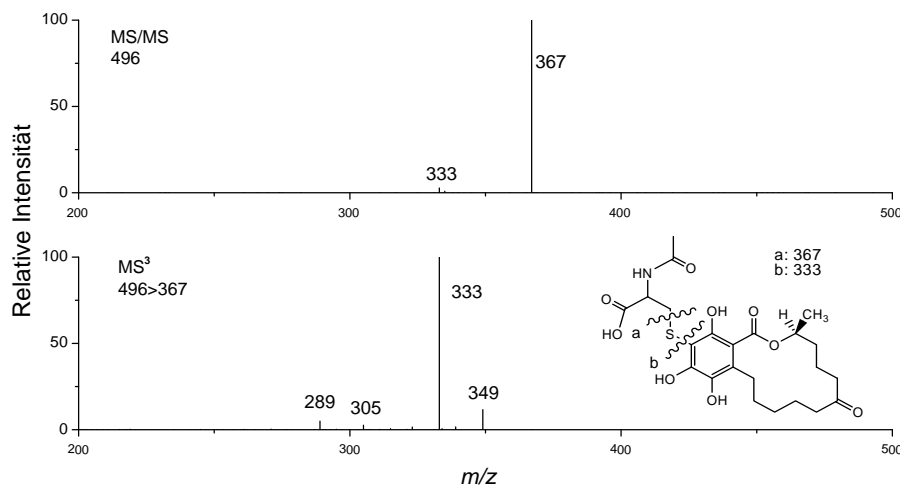


Abbildung 3.23: Fragmentierung eines NAC-HO-ZAN-Addukts. MS/MS-Spektrum (496) auf das NAC-Addukt eines ZAN-Catechols (oben). MS³-Spektrum (496>367) auf das NAC-Addukt eines ZAN-Catechols (unten).

Im Weiteren wurden die Umsatzgeschwindigkeiten der beiden ZEN-Catechole mit NAC bestimmt. Dies erfolgte durch Verwendung der isolierten ZEN-Catechole. Bei Einsatz von 13-HO-ZEN erfolgte eine schnellere Adduktbildung als bei 15-HO-ZEN (Abb. 3.24). Ein Vergleich mit den Geschwindigkeiten der Estron-Catechole zeigt, dass ZEN-Catechole mit einer deutlich höheren Geschwindigkeit NAC-Addukte bilden (Abb. 3.24).

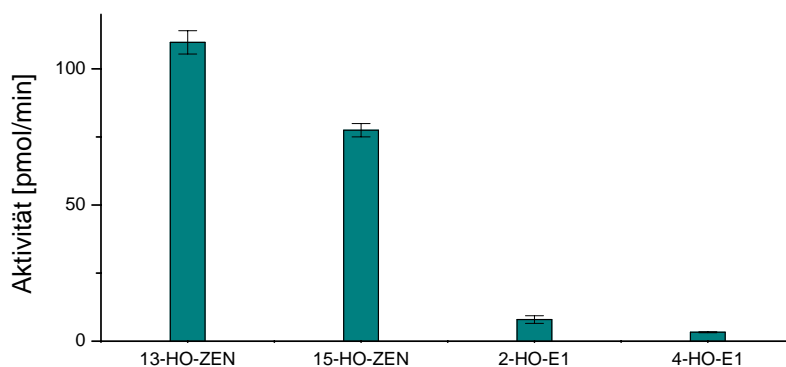


Abbildung 3.24: Aktivitäten der Bildung von NAC-Addukten der ZEN- und Estroncatechole. Dargestellten sind die Mittelwerte und Ranges aus zwei unabhängigen Versuchen.

Dieser Effekt kann durch eine höhere Reaktivität der ZEN-Chinone gegenüber der Thiol-Gruppe des NAC zu Stande kommen. Da für die Reaktion mit NAC ein Chinon vorliegen muss, könnte der Effekt ebenso durch eine bessere Oxidationsfähigkeit der ZEN-Catechole zu den Chinonen erklärbar sein.

Unabhängig vom Grund der höheren Geschwindigkeit bedeutet dies eine schnellere Reaktion der ZEN-Catechole mit Thiol-Gruppen. Einerseits kann dies durch die Reaktion mit GSH als protektiv gesehen werden, da die ZEN-Catechole schneller abgefangen werden. Auf der anderen Seite bedeutet eine hohe Reaktivität gegenüber Thiol-Gruppen aber auch eine erhöhte Gefahr der Reaktion mit Thiol-Gruppen anderer Moleküle in der Zelle. Dabei ist zu beachten, dass viele aktive Zentren von Enzymen Thiol-Gruppen enthalten. Durch Reaktion mit den Enzymen kann deren Aktivität gestört werden. Da es sich bei Chinonen um elektrophile Substanzen handelt, kann auch eine Reaktion zu DNA-Addukten erfolgen. Die schnellere Reaktion von 13-HO-ZEN gegenüber 15-HO-ZEN kann auf einer höheren Stabilität der 13-Chinone beruhen. So bildet 13-HO-ZEN vermutlich ein stabiles para-Chinon aus, das nicht wieder zum Catechol reduziert wird, womit mehr Chinon für die Reaktion mit NAC zur Verfügung steht.

3.3.3 Präzisionsgewebeschnitte von α -ZAL

Durch die bisherigen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass RALs *in vitro* durch mikrosomale Umsetzung zu Catecholen hydroxyliert werden können. In einer früheren Dissertation wurden Präzisionsgewebeschnitte einer Sprague-Dawley (SD) Ratte mit ZEN inkubiert und auf Metaboliten untersucht (Damm, 2010). Diese Untersuchungen bestätigten die Bildung von ZEN- und α -ZEL-Catecholen in den Gewebeschnitten. Dabei konnten zwar nicht die Catechole selbst, aber ihre Methylierungsprodukte nachgewiesen werden. Es wurde vermutet, dass die nicht-methylierten Catechole entweder mit Zellbestandteilen abreagiert oder die Aufarbeitung (3-stündige Spaltung mit β -Glucuronidase und Sulfatase) nicht überstanden haben.

Präzisionsgewebeschnitte werden als *in vivo*-ähnliches System angesehen und stellen eine Brücke zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Versuchen dar. Bei Präzisionsgewebeschnitten finden Konkurrenzreaktionen zwischen den einzelnen Phase I- und Phase II-Reaktionen wie im intakten Gewebe statt, wohingegen bei mikrosomalen Reaktionen die zu untersuchende Reaktion durch Zugabe bestimmter Co-Enzyme gesteuert wird.

In der vorliegenden Arbeit wurden Präzisionsgewebeschnitte einer SD-Ratte mit α -ZAL inkubiert. Es sollte untersucht werden, ob Catechole auch unter Konkurrenz der Phase II-Reaktionen gebildet werden. Zum Schutz gebildeter catecholischer Strukturen wurde während der enzymatischen Spaltung der Konjugate Ascorbinsäure zugesetzt (vgl. 5.6.5). Ascorbinsäure dient dabei als Oxidationsschutz, damit Catechole nicht zu Chinonen oxidiert werden können.

Der Extrakt eines mit 200 μ M α -ZAL inkubierten, Präzisionsgewebeschnittes ist in Abb. 3.25 dargestellt. Dabei wird α -ZAL zu ZAN und β -ZAL metabolisiert. Zusätzlich werden Produkte mit Hydroxylierung an Position 8 für ZAN und α -ZAL beobachtet. Die Bildung des 15-HO- α -ZAL- und der 13-HO- und 15-HO-ZAN-Catechole zeigt die Catecholbildung unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen. Die Bildung der Methylierungsprodukte von 15-HO-ZAN bestätigt ebenso das Entstehen der Catechole. Vergleicht man das Verhältnis aus Methylierungsprodukt und 15-HO-ZAN-Catechol, so wird ein hoher Methylierungsanteil deutlich.

3.3. Phase II-Metabolismus und Inaktivierungsreaktionen

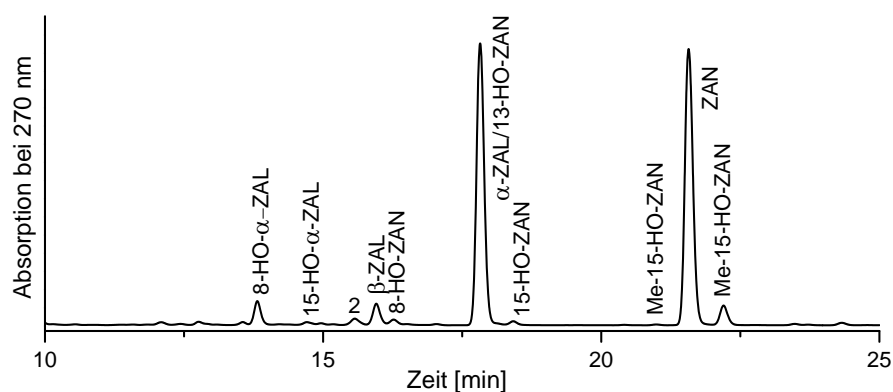


Abbildung 3.25: HPLC-Chromatogramm eines Präzisionsgewebeschnittes einer SD-Ratte inkubiert mit α -ZAL. Die Inkubation erfolgte mit 200 μ M α -ZAL für 24 Stunden. Nach anschließender Spaltung mit β -Glucuronidase und Sulfatase wurde die Lösung extrahiert (vgl. 5.6.5).

Es kann somit vermutet werden, dass ein hoher Anteil der aromatisch hydroxylierten Verbindungen nicht detektiert werden konnte, weil sie zum Beispiel bereits mit Zellbestandteilen oder GSH abreagiert hatten. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass ZAN- und ZAL-Catechole auch bei Konkurrenz mit den Phase II-Reaktionen, unter *in vivo*-ähnlichen Bedingungen, gebildet werden.

4 Zusammenfassung

ZEN ist ein Mykotoxin, das von *Fusarien* auf verschiedenen Getreidearten gebildet wird. Aufgrund seiner estrogenen Eigenschaften wird es häufig auch als Mykoestrogen bezeichnet. Neben ZEN zeigen auch seine Derivate α -ZEL, β -ZEL, ZAN, α -ZAL und β -ZAL estrogene Eigenschaften. Die Verbindungen gehören alle zur Substanzgruppe der Resorcylsäurelactone (RALs). Das am stärksten estrogene RAL ist α -ZAL. Es wird in einigen Staaten als Masthilfsmittel in der Rindermast eingesetzt, ist aber in der EU verboten. Bisherige Studien beschränkten sich auf Untersuchungen der RAL-Umwandlung und der damit verbundenen Estrogenität. Die RALs besitzen nur eine geringe akute Toxizität, allerdings konnten *in vivo*-Studien Chromosomenaberration und Schwesterchromatidaustausch durch ZEN zeigen. Zusätzlich wurde die Bildung von DNA-Addukten in Mäusen beobachtet und eine erhöhte Tumorrates der Hypophyse konnte ebenso bei Mäusen beobachtet werden. Die Mechanismen, die diese Effekte auslösen, sind nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ZEN neben dem reduktiven auch einen oxidativen Phase I-Metabolismus besitzt. Sowohl über die Strukturen als auch über die Eigenschaften und mögliche Beiträge zur Genotoxizität dieser oxidativen Metaboliten war in der Literatur nichts bekannt. Die vorliegende Arbeit hatte somit die Strukturaufklärung und Untersuchung der Reaktivität oxidativer RAL-Säugermetaboliten zum Ziel. Zusätzlich wurden ZEN-Kongenere aus Pilzkulturen gewonnen und deren Strukturen aufgeklärt.

Im Arbeitskreis wurde die Resorption der RALs mit Hilfe von Caco-2-Zellen untersucht. Das Caco-2-Zellsystem stellt ein *in vitro*-Zellsystem für humane intestinale Absorption und Metabolismus dar. Für ZEN und α -ZAL wurde eine hohe Resorptionsrate und ein moderater intestinaler Metabolismus gezeigt. Im Organismus gelangen oral aufgenommene und im Darm resorbierte Substanzen über die Pfortader in die Leber. Der Lebermetabolismus ist daher von entscheidender Bedeutung.

In vitro-Untersuchungen mit Lebermikrosomen zeigten, dass RALs nicht nur an der Keto- bzw. Hydroxylgruppe an Position 7 reduziert bzw. oxidiert werden. Zusätzlich können RALs an anderen Positionen durch Lebermikrosomen hydroxyliert werden. Alle untersuchten Spezies bildeten catecholische Metaboliten.

Humane Mikrosomen produzierten nahezu ausschließlich Catechole. Durch Mikrosomen der Ratte entstanden neben den Catecholen auch aliphatische Hydroxylierungsprodukte. Als verantwortlich für die Bildung der Catechole wurde das hauptsächlich in der Leber vorkommende hCYP1A2 identifiziert. Die Aktivität von hCYP1A2 stieg gegenüber den RALs in der Reihenfolge ZEN < α -ZEL < ZAN < α -ZAL an.

Untersuchungen zur Glucuronidierung, einer der wichtigsten Phase II Reaktionen, zeigte in mikrosomalen Umsetzungen bei den RALs eine hohe Aktivität für Schwein und Rind. Ratte und vor allem Mensch zeigten eine deutlich geringere Aktivität. Die Aktivitäten gegenüber den RALs war innerhalb der gleichen Spezies sehr ähnlich. Humane Darmmikrosomen wiesen eine noch geringere Aktivität als Lebermikrosomen auf. Dies bedeutet, dass die RALs nach der guten Resorption zum Teil unmetabolisiert in die Leber gelangen können und dort durch hCYP1A2 zu Catecholen hydroxyliert werden können.

Zusätzlich wurden Präzisionsgewebeschnitte der Rattenleber für die Untersuchung einer *in vivo*-Relevanz der Catechole durchgeführt. In einer anderen Dissertation im Arbeitskreis konnte die Bildung der ZEN- und ZEL-Catechole durch Untersuchung der Inkubationsmedien mit ZEN inkubierter Schnitte bereits nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden im Medium eines mit α -ZAL inkubierten Schnittes Catechole von α -ZAL und ZAN identifiziert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass die RAL-Catechole auch unter Konkurrenz anderer Metabolismuswege gebildet werden.

Catechole sind als reaktiv bekannt und können Redoxcycling auslösen. Daher wurden die RAL-Catechole im Arbeitskreis auf ihre genotoxischen Eigenschaften untersucht. Hierfür wurde die Bildung von 8-Oxo-dG aus Kalbsthymus-DNA im zellfreien System untersucht. Die Ergebnisse wurden mit denen der Estrogencatechole 2-HO- und 4-HO-E1/E2 verglichen, da diese als kanzerogen bekannt sind und neben DNA-Addukten auch oxidative Schäden auslösen können. Die 4-HO-E1/E2-Catechole besitzen dabei eine höhere genotoxische Wirkung als die 2-HO-Catechole, da sie mehr DNA-Addukte bilden, die zu apurinen Stellen führen. Ebenso ist ihre Inaktivierung aufgrund einer schlechteren Methylierbarkeit geringer als bei den 2-HO-Catecholen.

Für die Redoxcycling-Aktivität der Catechole ergab sich folgende Reihenfolge: 13-HO- α -ZAL < 13-HO- α -ZEL \approx 13-HO-ZEN < 13-HO-ZAN < 15-HO- α -ZEL < 15-HO- α -ZAL \approx 2/4-HO-E1/2 < 15-HO-ZEN < 15-HO-ZAN. Damit wiesen 15-HO-ZAN und 15-HO-ZEN eine höhere Redoxcycling-Aktivität als die Estrogencatechole auf. Die Untersuchung möglicher Abbauwege sollte die Relevanz dieser Ergebnisse zeigen.

Zwei wichtige Abbauwege für Catechole sind die Methylierung und die Reaktion mit GSH. Statt GSH wurde NAC für die Adduktbildung mit Thiol-Gruppen eingesetzt, da hierbei die im Urin nachweisbaren Mercaptursäuren gebildet werden. Ein Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten von ZEN- und E1-Catecholen zeigte eine deutlich höhere Reaktivität der ZEN-Catechole. Eine Adduktbildung mit NAC/GSH spricht neben der Entgiftung jedoch auch für eine höhere Reaktivität gegenüber Thiol-Gruppen. Da viele Enzyme Thiol-Gruppen enthalten, kann eine hohe Reaktivität auch als negativ angesehen werden.

Die Methylierung wurde mit humanem Lebercytosol durchgeführt, das COMT enthält. Die Aktivität zur Methylierung der RAL-Catechole war zum Teil deutlich geringer als für die 4-HO-Estrogencatechole, die bereits als schlechte Substrate der COMT bekannt sind.

Neben den oxidativen Säugermetaboliten wurde ein weiteres möglicherweise toxikologisch interessantes ZEN-Kongener in dieser Arbeit zum ersten Mal beobachtet. Aus einer Kultivierung von *F. graminearum* DSM4528 konnte neben ZEN und einigen anderen Kongeneren ein ZEN-11,12-Epoxid isoliert werden. Das ZEN-Epoxid war nach ZEN im Pilzextrakt in der größten Menge enthalten. Da Epoxide als reaktive Verbindungen häufig DNA-Addukte bilden können, sollte die Toxikologie des ZEN-Epoxids weiter untersucht werden. Dies gilt besonders, da das Epoxid auch in einem vom Acker gesammelten, verschimmelten Maiskolben nachgewiesen werden konnte.

Es konnte somit gezeigt werden, dass RALs gut und zum Teil unmetabolisiert resorbiert werden. Ebenso wurde eine gute Bildung von Catecholen durch das hepatische hCYP1A2 gezeigt. Die entstandenen RAL-Catechole bilden *in vitro* zum Teil mehr oxidative DNA-Schäden als Catechole von Steroidestrogenen. Des Weiteren werden die RAL-Catechole schlechter methyliert, besitzen aber eine höhere Reaktivität gegenüber NAC als die Estrogencatechole.

Aufgrund dieser Befunde scheint ein genotoxisches Potential für RAL-Catechole wahrscheinlich und sollte weiter untersucht werden. Sollte sich die Genotoxizität von ZEN und α -ZAL bestätigen, würde dies die Bedeutung des gesundheitlichen Risikos, die bisher nur auf der estrogenen Wirkung basiert, grundlegend ändern.

5 Material und Methoden

5.1 Verwendete Geräte

Evaporator	SPD 1010 Speedvac Concentrator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
Gewebeschnitt-Apparatur	Vitron Tissue Slicer (Vitron, Tucson, AZ, USA)
Reinstwasseranlage	Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA)
Rotationsinkubator	Dynamic Roller Culture (Vitron)
Ultra Turrax T25	Janke und Kunkel, IKA-Labortechnik

5.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien und Enzyme wurden, sofern nicht anders angegeben, von Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen und waren mindestens „zur Synthese“. Zur Herstellung der Puffer und Pulvermedien sowie als Fließmittel für die HPLC wurde bidestilliertes (bidest.) Wasser verwendet.

RALs und Referenzsubstanzen

Zearalenon	Fermentec, Israel
α -Zearalenol	Sigma/Aldrich
β -Zearalenol	Sigma/Aldrich
Zearalanon	Sigma/Aldrich
α -Zearalanol	Sigma/Aldrich
β -Zearalanol	Sigma/Aldrich
ZEN-14-O-Glucuronid	Hannes Mikula, Universität Wien
ZEN-14-O-Sulfat	Hannes Mikula, Universität Wien
D ₂ -ZEN	Benedikt Cramer, Universität Münster
D ₆ -ZEN-1	Synthese von Prof. Dr. M. Metzler
D ₆ -ZEN-2	Santa Cruz Biotechnology
5-HO-ZAN	Yang et al., 2008

Isolierte Enzyme

β -Glucuronidase	Typ B-1 aus Rinderleber
Isocitrat Dehydrogenase	Typ IV aus Schweineherz in Glycerol-EDTA-Puffer (pH 6)
Sulfatase	aus <i>Helix pomatia</i>
3 α - und 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	Serva Feinbiochemica

5.3 Biologisches Material

Zellfraktionen

Mikrosomen und Cytosol wurden im Arbeitskreis wie bereits beschrieben aus frisch entnommenen Lebern von SD- oder Wistar-Ratten hergestellt (Pfeiffer et al., 2009) und der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Supersomen von BD Gentest (Heidelberg) sind Mikrosomen aus Sf9 Insektenzellen, die mit einem Baculovirus infiziert wurden, welcher die cDNA für je ein humanes CYP-Isoenzym enthält. Der CYP-Gehalt der Suspensionen betrug jeweils 1 nmol/ml. Folgende Isoformen wurden verwendet: CYP1A1, 1A2, 1B1, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6 und 3A4. Des Weiteren wurden Isoformen der folgenden humanen UGTs verwendet: 1A1, 1A3, 1A4, 1A7, 1A8, 1A9, 1A10, 2B4, 2B7, 2B15 und 2B17.

Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt von Zellfraktionen wurde nach der Methode von Bradford (1976) ermittelt. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-250 verwendet. Dieser komplexiert in saurer Lösung mit hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen. Die Komplexbildung führt zur Stabilisierung der unprotonierten Sulfonatform des Farbstoffs. Daraus resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 470 nm zu 595 nm. Die enthaltene Proteinmenge ist dabei proportional zu der bei dieser Wellenlänge gemessenen Extinktion. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer externen Kalibriergerade mit Rinderserumalbumin.

Bradford-Reagenz:

10 mg Coomassie Brilliant Blau G-250 wurden in 5 mL Ethanol gelöst, mit 10 mL 85%iger ortho-Phosphorsäure (v/v) versetzt und mit bidest. Wasser auf 100 mL aufgefüllt. Die Herstellung des Reagenzes erfolgte am Tag vor der Verwendung und das Reagenz wurde lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. Es sollte eine bräunliche Farbe besitzen und wurde unmittelbar vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert.

Durchführung:

Ein Aliquot der Proteinprobe wurde auf 100 μL aufgefüllt und mit 1 mL des Bradfordreagenzes gut durchmischt. Nach 5 min im Dunkeln erfolgte die photometrische Extinktions-Bestimmung in Plastikküvetten bei 595 nm. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde bidest. Wasser verwendet. Eine Kalibrierung mit Rinderserumalbumin wurde im Bereich von 20-160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durchgeführt.

5.4 Puffer

Kaliumphosphat-Puffer

Eine 0,1 M K_2HPO_4 -Lösung wurde vorgelegt und durch Zugabe einer 0,1 M KH_2PO_4 -Lösung auf den gewünschten pH-Wert (7,4) eingestellt.

Tris-Puffer

Eine 0,05 M Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)-Lösung wurde durch Zugabe von 0,1 N HCl auf den gewünschten pH-Wert (7,5) eingestellt.

Glycin/HCl-Puffer zur Extraktion

7,8 g Glycinhydrochlorid wurde in bidest. Wasser gelöst und mit konzentrierter HCl auf den gewünschten pH-Wert (1,2) eingestellt. Anschließend wurde die Lösung auf 100 mL aufgefüllt.

Acetatpuffer

Eine 0,15 M Kaliumacetat-Lösung wurde vorgelegt und durch Zugabe von 0,15 M Essigsäure auf den gewünschten pH-Wert (5,0) eingestellt.

Krebs-Henseleit-Puffer für Gewebekultur

Der Krebs-Henseleit-Puffer (KHP) wurde zur Präparation von Gewebeschnitten eingesetzt.

Zusammensetzung des KHP:

	Konzentration (mM)
NaCl	118
D-Glucose	25
KCl	4,8
KH ₂ PO ₄	1
CaCl ₂	2,9
MgSO ₄	1,2

Alle Komponenten wurden in 90% des Endvolumens gelöst und ein pH-Wert von 7,4 mit 0,1 N NaOH oder HCl eingestellt. Der Puffer wurden nach dem Auffüllen auf das Endvolumen sterilfiltriert. Der Puffer enthielt zusätzlich 50 mg/L Gentamicin.

5.5 Medien

Waymouth-Medium für Gewebekultur

Das Waymouth-Pulvermedium MB 752/1 wurde unter Zugabe von 2,2 g/L NaHCO₃ in bidest. Wasser (90% des Endvolumens) gelöst und ein pH-Wert von 6,8-6,9 eingestellt. Nach Auffüllen auf das Endvolumen wurde sterilfiltriert, wobei sich der pH-Wert auf etwa 7,4 erhöhte.

Gentamicin wurde als Antibiotikum in der Gewebekultur eingesetzt. Es wurde in bidest. Wasser gelöst (50 mg/mL), sterilfiltriert und in Waymouth MB 752/1 Medium auf eine Endkonzentration von 50 mg/L verdünnt.

Hidy-Medium für Pilzkultur

Zur Kultivierung des *Fusarium*-Pilzes wurde das Hidy-Medium verwendet. Das Hidy-Medium enthielt folgende Komponenten:

	Konzentration (g/L)
Glucose	150
Hefeextrakt	1
Ammoniumnitrat	10
Kaliumchlorid	0,5
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	0,5
Natriumnitrat	2
Dikaliumhydrogenphosphat	2

Glucose- und Nährsalzlösung müssen getrennt autoklaviert werden, um ein Karamellisieren des Zuckers sowie eine Maillard-Reaktion zu verhindern.

5.6 Methoden

5.6.1 Pilzkultur

Kultivierung eines *Fusarium graminearum*-Pilzes

Die Kultivierung eines *Fusarium graminearum*-Pilzes DSM 4528 erfolgte zur Gewinnung von ZEN. Zusätzlich konnten Kongenere von ZEN aus der Pilzkultur extrahiert werden.

Die Kultivierung erfolgte auf expandiertem Vermiculit. Bei Vermiculit handelt es sich um ein Aluminium-Eisen-Magnesium-Silikat, das schockartig einer hohen Temperatur ausgesetzt wird und sich dadurch auf ein Vielfaches seines ursprünglichen Volumens aufbläht. Die poröse Struktur des Materials ermöglicht eine ausreichende Sauerstoffversorgung des Pilzes. Auf das Trägermaterial wurde vollsynthetisches Flüssignährmedium nach Hidy gegeben (vgl. 5.5).

Durchführung:

Die Inkubation erfolgte in 5 L-Erlenmeyerkolben. In den Kolben wurden 140 g expandiertes Vermiculit und 500 mL Hidy-Medium gegeben. Zur Vermeidung der Kontamination mit anderen Mikroorganismen wurden Kolben, Vermiculit und Medium für 30 min bei 121°C sterilisiert. Der Pilz wurde auf Kartoffel-Glucose-Agar-Platten gehalten. Vor Versuchsbeginn wurden frische Kartoffel-Glucose-Agar-Platten mit Sporen des Fusarium-Stammes beimpft und für fünf Tage bei 23°C im Inkubationschrank anwachsen gelassen. Unter der Sterilbank wurden mit Hilfe eines Korkbohrers zylindrische Stücke mit 4 mm Durchmesser aus der Agarplatte ausgestanzt und pro Kolben fünf dieser Stücke dem sterilen Medium zugesetzt. Um eine gleichmäßige Verteilung zu erreichen wurden die Kolben nach Zugabe der Starterkultur kräftig geschüttelt. Im Anschluss wurden die Kolben mit Aluminium-Folie umhüllt um eine Lichteinwirkung zu verhindern und im Brutschrank für insgesamt 39 Tage bei 25°C inkubiert. In Abständen von etwa einer Woche wurde das Kultursubstrat mit Hilfe einer Metallkralle aufgelockert und durch Schütteln gleichmäßig im Kolben verteilt.

Aufarbeitung der Pilzkultur

Nach 39 Tagen Inkubation erfolgte die Aufarbeitung des Ansatzes. Diese wurde in Portionen zu ca. 200 g durchgeführt. Zunächst wurden 200 mL Acetatpuffer zugegeben und mit Hilfe eines Handmixers homogenisiert. Im Anschluss wurden 500 mL Methanol zugegeben und zur Extraktion für mindestens eine Stunde gerührt. Der Methanol/Wasser-Extrakt wurde durch Filtration von den festen Bestandteilen abgetrennt. Anschließend wurde das Methanol mittels Rotationsverdampfer aus dem Gemisch entfernt. Die verbliebene wässrige Lösung wurde zweimal mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach dem Abfiltrieren des Magnesiumsulfats wurde der Extrakt am Rotationsverdampfer eingeeengt, bis ein gelber, öliger Rückstand im Kolben zurückblieb. Die Analyse erfolgte nach Zugabe von MeOH mit Hilfe einer HPLC-DAD-MS-Analyse. Für die weitere Aufarbeitung wurde ZEN mittels Säulenchromatographie bzw. über präparative HPLC (vgl. 5.7.2) abgetrennt.

Säulenchromatographie

Der Pilzextrakt wurde in 25 mL eines 8:2-Gemisches (v:v) aus Benzol/Ethylacetat gelöst und in mehreren Portionen auf einer Silicagel-Säule chromatographiert. Für die Fraktionierung wurde eine Glas-Säule mit einem Innendurchmesser von 24 mm verwendet. Diese wurde mit 15 g Silika-Gel gefüllt. Die Säule wurde mit einem Benzol/Ethylacetat-Gemisch (8:2) konditioniert. Die Fraktionierung erfolgte in mehreren Durchgängen. Anschließend wurde ein Teil des Pilzextraktes in Benzol/Ethylacetat (8:2) auf die Säule gegeben. Für die Fraktionierung wurden anschließend nacheinander 50 mL Benzol/Ethylacetat (8:2), 100 mL Benzol/Ethylacetat (2:1) und 50 mL Ethylacetat verwendet. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels HPLC-DAD-MS analysiert und für weitere Untersuchungen eingesetzt.

5.6.2 Maisextraktion

Die Untersuchung eines verschimmelten Feldmaises sollte zeigen, ob auch hier die identifizierten ZEN-Kongenere nachgewiesen werden können.

Durchführung:

26 g stark verschimmelte Maiskörner wurden mit einem Ultra Turrax in 80 mL Acetatpuffer (vgl. 5.4) zerkleinert. Nach Zugabe von 300 mL Methanol wurde die Suspension für 1 h gerührt. Anschließend wurde der Feststoff abfiltriert und das Filtrat am Rotationsverdampfer vom Methanol befreit. Die zurückgebliebene wässrige Phase wurde dreimal mit je 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Nacht über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Ethylacetat wurde am Rotationsverdampfer entfernt und es blieb eine gelbe ölige Flüssigkeit, die mit Methanol verdünnt wurde. Die Untersuchung der Lösung erfolgte mittels HPLC-DAD-MS (vgl. 5.7.3).

5.6.3 Enzymatische Methoden

5.6.3.1 Mikrosomale Umsetzung

Bei der mikrosomalen Umsetzung handelt es sich um ein *in vitro*-Testsystem zur Bestimmung der Aktivitäten von Enzymen in unterschiedlichen Geweben. Hierbei erfolgt eine Inkubation der zu untersuchenden Substanz mit Mikrosomen. Bei Mikrosomen handelt es sich um Bruchstücke des endoplasmatischen Retikulums, die durch Zellfraktionierung gewonnen werden. Durch Zugabe der entsprechenden Cofaktoren können die in den Mikrosomen enthaltenen Enzyme Substanzen metabolisieren.

Oxidative mikrosomale Umsetzung

Oxidative mikrosomale Umsetzungen wurden zur Generierung der oxidativen RAL-Metaboliten eingesetzt. Zum Einen wurden die Metaboliten zur Identifizierung gewonnen. Zum Anderen wurden Aktivitäten der Umsetzungen berechnet. Für die oxidativen Umsetzungen wurden Mikrosomen einer männlichen Wistarratte, eines Schweins, eines Rindes und eines männlichen Menschen eingesetzt. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4) unter Zugabe von NADPH als Cofaktor. Das NADPH wurde durch ein NADPH-generierendes System im Ansatz erzeugt. Die Inkubationen erfolgten dabei in Volumina zwischen 0,5 und 1 mL. Die Dimethylsulfoxid (DMSO)-Konzentration betrug 1%. Als Negativkontrollen wurden Inkubationen verwendet, bei denen das NADPH-generierende System durch Phosphatpuffer ersetzt wurde.

Inkubationsansatz:

	Konzentration
Substrat	50 μ M
mikrosomales Protein	0,5 - 1 mg/mL
Vorinkubation für 5 min bei 37°C	
NADP ⁺	1,2 mM
MgCl ₂ (1 M)	4,3 mM
Isocitrat	9,4 mM
Isocitrat-Dehydrogenase	0,9 U
Inkubation für 30-60 min bei 37°C	

Durchführung:

Substrat und mikrosomales Protein wurden in Kaliumphosphatpuffer für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des NADPH-generierenden Systems, das vor jeder Inkubation frisch hergestellt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit (30-60 min) wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 500 μ L Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Extrakten mittels Evaporator entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und für die HPLC-DAD-MS-Untersuchung eingesetzt (vgl. 5.7.3).

Oxidative Umsetzung mit CYP-Supersomen

Bei Supersomen handelt es sich um Mikrosomen aus Sf-9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*). Diese werden mit einem Baculovirus-Stamm, der die cDNA des gewünschten Enzyms überträgt, infiziert. Mikrosomale Membranfraktionen dieser Zellen enthalten das gewünschte Enzym und können zur Metabolismusuntersuchung, ähnlich den Lebermikrosomen, verwendet werden. Mit Hilfe der CYP-enthaltenden Supersomen können die Aktivitäten der einzelnen CYPs untersucht werden.

Durchführung:

Die Inkubationen erfolgten wie bei der mikrosomalen Umsetzung beschrieben und wurden im linearen Bereich der Supersomen durchgeführt. Als Inkubationspuffer wurde der jeweils im Datenblatt angegebene Puffer (Kaliumphosphatpuffer oder Tris-Puffer) verwendet.

Glucuronidierung mit Mikrosomen und Supersomen

In vitro-Untersuchungen zur Glucuronidierung erfolgten durch Inkubation mit Mikrosomen oder UGT-enthaltenden Supersomen und dem Cofaktor UDPGA. Da die UGTs auf der Innenseite des endoplasmatischen Reticulums lokalisiert sind, muss die Substanz in die Mikrosomen eindringen können. Hierfür wurden die Mikrosomen mit dem Porenbildner Alamethycin vorinkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Vorinkubation mit der Substanz, unter Zugabe von Phosphat- bzw. Tris-Puffer und D-Saccharinsäure-1,4-lacton, das als β -Glucuronidaseinhibitor wirkt. Erst nach Zugabe des Cofaktors UDPGA startet die Umsetzung. Die Umsetzungen finden dabei in 200 μ L-Ansätzen statt.

Inkubationsansatz:

Mikrosomen bzw. UGT-Supersomen	0,02 - 0,2 mg bzw. 50 μg
Alamethycin (125 $\mu\text{g}/\text{mL}$)	40 μL
Inkubation für 10 min auf Eis zur Porenbildung	
Phosphat-Puffer (100 mM; pH 7,4) oder Tris-Puffer (50 mM; pH 7,5)	
MgCl ₂ (0,1 M)	10 μM
D-Saccharinsäure-1,4-lacton (0,1 M)	10 μM
Substanz (10 mM)	100 μM
Vorinkubation für 5 min bei 37°C	
UDPGA (20 mM)	1 mM
Inkubation für 15-60 min bei 37°C	

Durchführung:

Der Ansatz wurde je nach Linearität der Mikrosomen und UGTs für 15 bis 60 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte für Mikrosomen in Phosphatpuffer und für Supersomen je nach Anleitung des Datenblattes in Phosphat- oder Trispuffer. Nach Ablauf der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Inkubationslösung auf Eis gestellt. Die Proteine wurden durch Zugabe von 20 μL 20%iger Trichloressigsäure ausgefällt. Zur Neutralisierung wurden 20 μL 1 M NaOH zugegeben und die Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Für die Bestimmung wurden 50 μL direkt aus dem Reaktionsansatz mittels HPLC-DAD-Untersuchung analysiert.

Bestimmung der COMT-Aktivität mit humanem Leberzytosol

Die Bestimmung der COMT-Aktivität erfolgte durch Inkubation der zu untersuchenden Substanz mit humanem Leberzytosol im zellfreien System. Die Inkubation wurde hierfür in Phosphatpuffer durchgeführt. Weitere Bestandteile der Inkubationslösung waren humanes Leberzytosol und SAM, das als Cofaktor der COMT dient. Das Gesamtvolumen der Inkubationslösung lag bei 200 μL . Als Kontrolle dienten Inkubationen bei denen die SAM-Lösung durch Kaliumphosphatpuffer ersetzt wurde.

Inkubationsansatz:

	Konzentration
Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)	
Substrat in DMSO (1%)	10 μ M
humanes Leberzytosol	0,5 mg/mL
MgCl ₂ (0,1 M)	4 μ M
Vorinkubation für 5 min bei 37°C	
SAM (25 mM)	125 μ M
Inkubation für 15-60 min bei 37°C	

Durchführung:

Substrat, Cytosol und MgCl₂ wurden in Phosphatpuffer für 5 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde SAM zugegeben und der Ansatz zwischen 15 und 60 min inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 500 μ L Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Extrakten mittels Evaporator entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und für die HPLC-DAD-MS-Untersuchung eingesetzt.

5.6.3.2 Oxidation/Reduktion mit HSD

Die Keto- beziehungsweise Hydroxyl-Gruppe an Position 7 kann durch Inkubation mit HSDs und dem entsprechenden Cosubstrat reduziert oder oxidiert werden. ZEL kann dabei zu ZEN oxidiert und ZEN zu ZEL reduziert werden. Als Cosubstrat dient NADH zur Reduktion oder NAD⁺ zur Oxidation. Die oxidative bzw. reduktive Umsetzung fand dabei mit 3 α - und 3 β -HSDs in Kaliumphosphatpuffer mit einem Gesamtvolumen von 1 mL statt.

Inkubationsansatz:

Kaliumphosphatpuffer (0,1 M; pH 7,4)	
Substrat in DMSO (max. 1%)	variabel
HSD	0,06 U
Cofaktor	3,5 mg
Inkubation für 30 min bei 37°C	

Durchführung:

Die zu untersuchende Substanz wurde in den Kaliumphosphatpuffer gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der HSD und des Cofaktors. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37°C wurde der Reaktionsansatz zweimal mit je 500 μ L Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Extrakten mittels Evaporator entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und für die HPLC-DAD-MS-Untersuchung eingesetzt.

5.6.4 Reaktion der Catechole mit NAC

Identifizierung von NAC-Addukten

GSH kann zur Inaktivierung reaktiver Substanzen in der Zelle führen. Ein gebildetes GSH-Addukt wird im Organismus zu seinem NAC-Addukt, der Mercaptursäure abgebaut. Die Ausscheidung erfolgt anschließend häufig über den Urin. GSH und NAC besitzen die gleiche funktionelle Thiol-Gruppe. Die Bildung von NAC-Addukten wurde durch Zugabe von NAC zu mikrosomalen Umsetzungen gezeigt.

Durchführung:

Nach Ablauf der Inkubationszeit mikrosomaler Umsetzungen (vgl. 5.6.3.1) wurde eine NAC-Lösung zugegeben (Endkonzentration 10 mM). Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15-30 min wurde das gleiche Volumen Glycin/HCl-Puffer (pH 1,2) zugegeben und zweimal mit je 500 μ L Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Extrakten mittels Evaporator entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und für die HPLC-DAD-MS-Untersuchung eingesetzt.

Bestimmung der Reaktivität mit NAC

Nach Identifizierung der NAC-Addukte wurde die Reaktivität der Catechole mit NAC untersucht. Hierbei wurde die direkte Reaktivität im Phosphatpuffer ohne Zugabe von Proteinen untersucht. Die Reaktion wurde in einem Volumen von 200 μ L durchgeführt.

Durchführung:

Das zu untersuchende Catechol wurde 50 μM in Phosphatpuffer vorgelegt und eine Konzentration von 10 mM NAC im Puffer hergestellt. Nach 45 min wurde das gleiche Volumen eines Glycin/HCl-Puffers (pH 1,2) zugegeben und zweimal mit je 500 μL Ethylacetat extrahiert. Das Lösungsmittel wurde aus den vereinigten Extrakten mittels Evaporator entfernt. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und für die HPLC-DAD-MS-Untersuchung eingesetzt.

5.6.5 Präparation und Inkubation von Rattenleberschnitten

Präparation

Für die Präparation der Präzisionsgewebeschnitte wurden die Lebern männlicher SD-Ratten verwendet. Die Tiere wurden durch CO_2 -Inhalation getötet und anschließend seziiert. Die frisch entnommenen Lebern wurden sofort weiterverarbeitet. Aus der Leber eines Tiers wurden pro Versuchstag etwa 50-100 Schnitte gewonnen, welche gleichzeitig inkubiert werden konnten.

Die Schnitte wurden mit Hilfe des Vitron Tissue Slicers hergestellt, welcher mit eisgekühltem KHP geflutet und über ein Schlauchsystem mit Carbogen begast wurde. Der Puffer zirkulierte zur Kühlung und Sauerstoffversorgung des Gewebes während des Schneidevorgangs in der Apparatur. Mit Hilfe eines geschärften Hohlzylinders (Durchmesser 8 mm) wurden aus der Leber Gewebekerne gestanzt, welche in KHP zwischengelagert und einzeln in den Schneidearm eingesetzt wurden. Die Präparation der Schnitte erfolgte durch manuelles Bewegen des Schneidearms über ein rotierendes Rasiermesser.

Die gewünschte Schnittdicke konnte dabei über eine Mikrometerschraube eingestellt werden und betrug bei allen durchgeführten Versuchen 250 μm . Die Schnitte wurden durch den zirkulierenden Pufferstrom weggespült, in einem Reservoir gesammelt und der Apparatur durch ein Auslassventil entnommen.

Inkubation

Die Inkubation wurde bei 37°C unter Carbogen-Begasung in einem Rotationsinkubator durchgeführt. Die Vor- und die Substanzinkubation erfolgte in 1,7 ml Waymouth Medium in 20-ml Szintillationsgläsern, wobei der Gasaustausch durch Löcher im Deckel gewährleistet war. In jedes Glas wurde ein Drahtnetz eingesetzt, auf welches ein Schnitt platziert wurde. Im Anschluss an die FKS-freie Vorinkubation (1 h) erfolgte die Inkubation mit der Testsubstanz für 24 h (mit 10% FKS). Die Substanzkonzentrationen betragen 50-200 μM bei 0,1% DMSO. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Schnitte mit einer Pinzette vom Drahtnetz gelöst und gewogen. Das Medium wurde mit 0,1% Ascorbinsäure versetzt. Medium und Schnitt wurden separat in Kryogefäßen mit Hilfe von Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Konjugatspaltung und Extraktion

Der Nachweis der von Leberschnitten gebildeten Metaboliten erfolgte ausschließlich im Inkubationsmedium. Zur Hydrolyse der Glucuronide und Sulfate wurde 1 mL Medium mit dem gleichen Volumen Kaliumacetatpuffer (0,15 M; pH 5,0) gemischt, welcher 300 U/mL β -Glucuronidase, 50 U/mL Sulfatase und 0,2% Ascorbinsäure enthielt. Im Anschluss an die 15-stündige Inkubation bei 37°C erfolgte die Extraktion mit dreimal je 2 mL Ethylacetat. Nach der Entfernung des Lösungsmittels im Evaporator wurden die Rückstände in 100 μL Methanol aufgenommen und 20 μL wurden zur Analyse mittels HPLC-DAD-MS eingesetzt.

5.6.6 Chemische Synthesen aus ZEN

5.6.6.1 Synthese der RAL-Catechole

Eine Methode zur Synthese von Catecholen ist die Umsetzung von Phenolen mit 2-Iodoxybenzoesäure (IBX). Diese Methode wurde beispielsweise für die Synthese von 2-HO-E1/E2 und 4-HO-E1/E2 aus E1/E2 beschrieben (Saeed et al., 2005 b). Bei der Synthese entstehen zunächst die ortho-Chinone der eingesetzten Substanzen. Nach Reduktion mit Ascorbinsäure werden schließlich die entsprechenden ortho-Catechole erhalten. Bei Verwendung der RALs wurde eine selektive Oxidation zu den 13-HO-Verbindungen beobachtet. Die Bildung der 15-HO-Catechole der RALs wurden nur in Spuren beobachtet.

Durchführung:

3 mg eines RALs wurde in 1,5 mL Dimethylformamid gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe von 15 mg IBX und der Ansatz wurde für 3 h im Dunkeln gerührt. Das Reaktionsgemisch hatte sich hierbei orange gefärbt. Durch Zugabe von 500 μ L 10%iger wässriger Ascorbinsäure (w/v) wurde die Lösung hellgelb. Das Reaktionsgemisch wurde mittels HPLC-DAD-MS analysiert und es erfolgte eine Isolierung des gebildeten Catechols aus dem Gemisch über präparative HPLC.

5.6.6.2 ZEN-Epoxid-Synthese

Eine Reaktion von ZEN mit meta-Chlorperbenzoesäure (mCPBA) wurde zur Bildung eines ZEN-Epoxids durchgeführt.

Durchführung:

100 μ mol reine mCPBA wurde in 1 mL CH_2Cl_2 und 50 μ mol ZEN wurde in 1,5 mL CH_2Cl_2 gelöst. Anschließend wurde die mCPBA zur ZEN-Lösung gegeben. Nach 5 h bei 20°C, wurde das gelbe Reaktionsgemisch mit einer 10%igen wässrigen K_2CO_3 -Lösung extrahiert und mit 1 mL H_2O gewaschen. Die Trocknung der organischen Phase erfolgte über wasserfreiem Na_2SO_4 . Die entstandene farblose CH_2Cl_2 -Lösung wurde mit HPLC-DAD-MS untersucht.

Der Extrakt enthielt ca. 55% ZEN, 20% ZEN-11,12-Epoxid und 25% eines Gemisches aus 13- und 15-HO-ZEN.

5.6.6.3 ZEN-Dihydrodiol-Synthese

Die Reaktion von Alkenen mit Osmiumtetroxid führt zu cis-ständigen Diolen. Mit Hilfe dieser Reaktion sollte ein Dihydrodiol des ZEN gebildet werden.

Durchführung:

Eine frische Lösung aus 120 μmol OsO_4 in 1 mL Pyridin wurde zu 100 μmol ZEN, gelöst in 1 mL Pyridin, gegeben. Das Reaktionsgemisch färbte sich innerhalb weniger Minuten dunkel-violett. Das Gemisch wurde für 18 h bei 20°C im Dunkeln belassen. Anschließend wurden 2 mL einer wässrigen Lösung von $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (270 μmol) zugegeben und für 4 h gerührt. Die Extraktion erfolgte mit 5 mL CHCl_3 . Der Extrakt enthielt noch Reste von Pyridin. Die Analyse des Reaktionsgemisches erfolgte mittels HPLC-DAD-MS-Analyse. Der Extrakt enthielt 2 Peaks mit der Masse eines ZEN-Dihydrodiols.

Behandlung mit Säure:

0,5 mL der CHCl_3 -Lösung wurden mit dem gleichen Volumen einer 5 N wässrigen HCl-Lösung für 1 h bei 20°C gerührt um Pyridin zu entfernen. Anschließend wurde zweimal mit jeweils 0,5 mL bidest. Wasser gewaschen. Ein leichter Niederschlag löste sich nach Zugabe von 0,2 mL Ethylacetat. Die anschließende Untersuchung mittels HPLC-DAD-MS zeigte, dass beide Dirole verschwunden und ein Cyclisierungsprodukt entstanden war.

5.6.6.4 6-HO-ZEN- und 8-HO-ZEN-Synthese

Diese Synthese wurde durchgeführt um die Substanzen 6-HO-ZEN und 8-HO-ZEN zu erhalten. Das Reaktionsschema der Synthese ist in Abb. 3.3 dargestellt. Die Synthese soll zu beiden Produkten führen. Je nach eingesetztem Prolin sollen die unterschiedlichen Stereoisomere der eingeführten Hydroxylgruppen gebildet werden.

Durchführung:

350 μmol Nitrosobenzol wurden in 500 μL DMSO gelöst. Ebenso wurden 250 μmol ZEN und 250 μmol D-Prolin oder L-Prolin in 1,5 mL DMSO gelöst. Anschließend erfolgte die Zugabe der Nitrosobenzollösung zu ZEN und Prolin. Der Reaktionsansatz wurde für 15 h bei 20°C gerührt. Anschließend wurde die orange gefärbte Lösung mit 2 mL bidest. Wasser und 1,5 mL 10%iger wässriger NH_4Cl -Lösung versetzt. Die Extraktion erfolgte mit 2x5 mL Ethylacetat.

Das Lösungsmittel wurde soweit möglich am Evaporator entfernt und der Rückstand mit MeOH verdünnt. Die Untersuchung des Reaktionsgemisches erfolgte mittels HPLC-DAD-MS. Anschließend erfolgte die Trennung der erhaltenen Produkte mittels präparativer HPLC.

5.6.7 Chemische Modifikationen von Metaboliten

5.6.7.1 Keto-Endiol-Umlagerungen

Diese Reaktion wurde bereits in etwas abgewandelter Form für die Synthese des D₆-ZEN-1 verwendet (Pfeiffer et al., 2009). Der Ansatz dient der Keto-Endiol-Tautomerie des 8-HO-ZEN. Aus mikrosomalen Umsetzungen fraktioniertes 8-HO-ZEN wurde in 10 μ L THF aufgenommen und mit 40 μ L K₂CO₃-Lösung (125 mg/mL) für 24 h im Dunkeln gerührt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert. Die erhaltene Lösung wurde dreimal mit 200 μ L t-Butylmethylether extrahiert. Nach Abblasen unter dem Stickstoff-Strom wurde der Rückstand in 100 μ L MeOH aufgenommen und mittels HPLC-DAD-MS analysiert.

5.6.7.2 Reduktion mit Natriumborhydrid

Eine Reduktion der Keto-Gruppe in ZEN und ZAN kann durch Behandlung mit NaBH₄ erfolgen (Urry et al., 1966). Dabei entstehen ausschließlich die beiden ZEL- oder ZAL-Verbindungen. Die Reaktion lässt sich ebenso für die hydroxylierten ZEN-/ZAN-Verbindungen anwenden.

Durchführung:

Die zu untersuchende Substanz wurde beispielsweise mittels HPLC-Fraktionierung isoliert und zur Trockene eingedampft. Anschließend wurde sie in einem geringen Volumen MeOH (100-1000 μ L) gelöst. Durch Zugabe einer Spatelspitze NaBH₄ erfolgte die Reduktion der Ketogruppe.

5.6.7.3 Hydrierung

Da sich ZEN und ZAN nur durch eine Doppelbindung unterscheiden, kann ZEN durch Hydrierung in ZAN überführt werden. Die Hydrierung wurde erstmals von Urry et al. (1966) beschrieben. Als Katalysatoren können Platinoxid oder Palladium auf Aktivkohle dienen. Die Hydrierung führt dabei auch in Spuren zur Reduktion der Ketogruppe an Position 7.

Durchführung:

Die zu hydrierende Substanz oder das Substanzgemisch wurde je nach Substanzmenge in 250 bis 1000 μL MeOH gelöst und in einen Zweihalskolben gegeben. Ein mit Wasserstoff gefüllter Luftballon wurde über einen Anschluss mit Hahn auf einem Hals des Kolben angebracht. In den Kolben wurde über den 2. Hals Stickstoff eingeleitet. Anschließend wurde eine Spatelspitze Katalysator (Platinoxid oder Palladium auf Aktivkohle) zugegeben und nochmals Stickstoff in den Kolben eingeleitet. Die Öffnung wurde nun mit einem Stopfen verschlossen und der Wasserstoff durch öffnen des Hahns zugeleitet. Der Reaktionsansatz wurde über Nacht gerührt.

Am nächsten Tag wurde die Wasserstoffzufuhr gestoppt und über eine Öffnung Stickstoff eingeleitet um den Wasserstoff zu vertreiben. Die Aufarbeitung erfolgte durch Abzentrifugieren des Katalysators. Der Katalysator wurde anschließend mit MeOH und/oder Ethylacetat gewaschen. Der Überstand und die Waschlösungen wurden vereinigt und mittels HPLC-DAD-MS analysiert.

5.6.7.4 Hydrierung mit Deuterium

Zur Synthese eines an den Positionen 11 und 12 deuterierten ZAN, erfolgte eine Hydrierung von ZEN mit Deuterium. Die Durchführung erfolgte wie in 5.6.7.3 beschrieben. Einzig anstelle eines mit Wasserstoff gefüllten Ballons wurde ein mit Deuterium gefüllter Ballon verwendet.

5.6.7.5 Mangandioxid-Oxidation

Mit Hilfe von frischem MnO_2 können bevorzugt allylische und benzyllische Hydroxylgruppen in ihre Keto-Form überführt werden (Bharucha, 1956, Kamimura et al., 2011). Die einzige allylische Stelle im Molekül ist Position 10. Eine Oxidation an Position 10 müsste somit bevorzugt ablaufen. Für diese Reaktion wird aktiviertes MnO_2 benötigt (Kamimura et al., 2011).

Synthese von aktiviertem MnO_2 :

Eine Methode zur Herstellung von aktiviertem MnO_2 wurde von Attenburrow et al. (1952) entwickelt. Hierfür wurde eine Lösung aus 1,2 g Mangansulfat in 1,5 mL bidest. Wasser und 1,1 mL 40%ige Natriumhydroxidlösung gleichzeitig innerhalb einer Stunde unter Rühren zu einer heißen Kaliumpermanganatlösung (1 g/6 mL) getropft. Das Reaktionsgemisch wurde weitere 3 h unter Rückfluss gekocht. Anschließend wurde die Lösung in ein 15 mL Reaktionsgefäß überführt und bei 3000 g für 10 min zentrifugiert. Der Kaliumpermanganat enthaltende Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das Mangandioxid wurde so oft mit bidest. Wasser gewaschen, bis die Waschlösung farblos war. Der erhaltene Feststoff wurde im Trockenschrank bei 110°C getrocknet und anschließend für die Oxidation eingesetzt.

Oxidation mit Mangandioxid:

Die zu Oxidierende Substanz wurde in 2 mL Aceton gelöst. Anschließend wurden 100 mg aktiviertes Mangandioxid zugegeben und der Reaktionsansatz für 6 h bei Raumtemperatur auf einem Magnetprüher gerührt. Aus dem Reaktionsansatz wurde das Mangandioxid durch Zentrifugation abgetrennt. Der Niederschlag wurde zweimal mit je 1,5 mL Aceton gewaschen. Überstand und Waschlösungen wurden am Evaporator zur Trockne eingengt und in 1 mL Methanol aufgenommen. Die erhaltene Lösung wurde zur Analysen mittels HPLC-DAD-MS eingesetzt.

5.6.7.6 Epoxidhydrolyse

Durch Säurebehandlung können Epoxide hydrolysiert werden. Nach Isolierung von P16 aus einer Pilzfraktion wurde P16 mit wässriger HCl versetzt und die Reaktionsprodukte mittels HPLC-DAD-MS analysiert.

5.7 Analytik

5.7.1 Analytische HPLC mit DAD

Die analytische HPLC wurde für die Bestimmung der Glucuronidierungsaktivitäten und zur Fraktionierung kleiner Mengen oxidativer Metaboliten verwendet.

Gerät

Hersteller	Agilent Technologies
Gerätebezeichnung	HP 1100
Injektionsart	manuell (Rheodyne 7725i Injektionsventil)
Injektionsvolumen	bis 100 μL
Detektor	DAD
Software	HP Chem Station Version Rev.A.07.01 (Agilent Technologies)

Allgemeine Parameter

Säule	„Luna“-C18-Umkehrphase, Porengröße 5 μm , Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm von Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Vorsäule	C18-Umkehrphase, 4 x 3 mm
Eluent A	bidest. Wasser mit Ameisensäure, pH 3
Eluent B	ACN
Flussrate	1 mL/min
Detektionswellenlänge:	
ZEN und ZEL	280 nm
ZAN und ZAL	260 nm

Gradientenprogramme

- Fraktionierung mikrosomaler Metaboliten

Zeit (min)	0	30	33	39	40	42
Eluent B (%)	30	70	100	100	30	30

- Bestimmung der Glucuronidierungsaktivitäten

Zeit (min)	0	15	20	23	29	30	31
Eluent B (%)	30	50	70	100	100	30	30

5.7.2 Präparative HPLC mit UV-Detektor

Die präparative HPLC wurde zur Aufreinigung größerer Substanzgemische eingesetzt.

Gerät

Hersteller	Shimadzu
Gerätebezeichnung	Prominence
Pumpen	LC-8A
Injektionsart	manuell (Rheodyne 7725i Injektionsventil)
Injektionsvolumen	bis 2 ml
Detektor	UV-Detektor (SPD-20A)
Software	LC Solution 1.22

Allgemeine Parameter

Säule	„Luna“-C18-Umkehrphase, Porengröße 5 μm , Länge 250 mm, Innendurchmesser 15 mm von Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Vorsäule	C18-Umkehrphase, 10 x 10 mm

Parameter der Trennungen

- Fraktionierung der Catecholsynthese mit IBX

Eluent A: bidest. Wasser

Eluent B: ACN

Flussrate 10 mL/min

Detektionswellenlänge: 280 nm

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	0	17	19
Eluent B (%)	40	78	40

- Fraktionierung des Pilzextraktes

Eluent A: bidest. Wasser mit Ameisensäure, pH 3

Eluent B: MeOH

Flussrate: 4 mL/min

Detektionswellenlänge: 270 nm

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	0	20	23	28	30
Eluent B (%)	30	70	100	100	30

- Fraktionierung der 6-HO-/8-HO-ZEN-Synthese

Eluent A: bidest. Wasser

Eluent B: ACN

Flussrate 10 mL/min

Detektionswellenlänge: 280 nm

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	0	15	17	19	22
Eluent B (%)	40	80	100	100	40

- Isolierung von ZEN-Epoxid aus einer Pilzfraktion

Eluent A:	bidest. Wasser
Eluent B:	MeOH
Flussrate	2 mL/min
Detektionswellenlänge:	280 nm

Gradientenprogramm:

Zeit (min)	0	30
Eluent B (%)	50	50

5.7.3 Analytische HPLC mit DAD und MS

Für die Charakterisierung der RAL-Metaboliten und ZEN-Kongenere wurde eine HPLC mit DAD und gekoppeltem Massenspektrometer verwendet. Ebenfalls diente die HPLC-DAD-MS der Aktivitätsbestimmung für die Methylierung und die NAC-Adduktbildung. Ebenso wurde sie für die Charakterisierung der ZEN-Glucuronide und Sulfate verwendet.

Gerät

Hersteller	Thermo Scientific
Gerätebezeichnung	Finnigan Surveyor
Injektionsart	Autosampler
Injektionsvolumen	bis 25 μ L
Detektor	DAD
	MS (LXQ Linear Ion Trap MS ⁿ)
Software	Xcalibur 2.0.7

Allgemeine Parameter

Säule	„Luna“-C18-Umkehrphase, Porengröße 5 μm , Länge 250 mm, Innendurchmesser 4,6 mm von Phenomenex (Torrance, CA, USA)
Vorsäule	C18-Umkehrphase, 4 x 3 mm
Eluent A	bidest. Wasser mit 0,1% Ameisensäure
Eluent B	ACN mit 0,1% Ameisensäure
Flussrate	0,5 ml/min
Detektionswellenlänge:	
ZEN und ZEL	280 nm
ZAN und ZAL	260 nm
Ionisation	ESI im Negativ-Modus
Fragmentierung	Collision Induced Dissociation (CID)
CID-Spannung	als % von 5 Volt

Gradientenprogramme

- Trennung der mikrosomalen Umsetzungen, Synthesen, NAC-Addukte und Pilz-extrakte.

Zeit (min)	0	30	31	32	36
Eluent B (%)	30	100	100	30	30

- Trennung der mikrosomalen Umsetzung in Abb. 3.1, Tab. 3.1 und Tab. A.1.

Zeit (min)	0	10	20	30	40	42	48
Eluent B (%)	30	40	40	60	100	30	30

Für alle Analysen wurde ein Full Scan mit einem CID von 0 V durchgeführt. Dabei wurde der Full-Scan je nach Analyse für m/z -Werte von 100-600 bzw. 100-800 durchgeführt.

MS/MS-Analysen

Für alle relevanten Metaboliten wurden MS/MS-Fragmentierungen der Molekülionen durchgeführt. Der CID-Wert für die Fragmentierungen lag bei 1,75 V. In der folgenden Tabelle sind die m/z -Werte für die MS/MS-Untersuchungen zusammengefasst.

Metabolit	m/z	Metabolit	m/z
HO-ZEN	333	HO-ZEL	335
HO-ZAN	335	HO-ZAL	337
ZEN-Glucuronid	493	ZEL-Glucuronid	495
ZAN-Glucuronid	495	ZAL-Glucuronid	497
NAC-HO-ZEN	494	NAC-HO-ZEL	496
NAC-HO-ZAN	496	NAC-HO-ZAL	498
Me-HO-ZEN	347	Me-OH-ZEL	349
Me-HO-ZAN	349	Me-OH-ZAL	351

Für die Charakterisierung der NAC-Addukte der RAL-Catechole wurden MS³-Fragmentierungen durchgeführt. Die CID-Werte lagen dabei jeweils bei 1,75 V. Die folgende Tabelle fasst die m/z -Werte der MS³-Untersuchungen zusammen.

NAC-Addukt von	MS ³ -Analyse
HO-ZEN	494 > 365
HO-ZEL	496 > 367
HO-ZAN	496 > 367
HO-ZAL	498 > 369

Literaturverzeichnis

- ARUNPANICHLERT, J., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Sukpondma, Y., Supaphon, O. und Sakayaroj, J., 2011. A beta-resorcylic macrolide from the seagrass-derived fungus *Fusarium* sp PSU-ES73. *Archives of Pharmacal Research*, 34, 1633-1637.
- ATTENBURROW, J., Cameron, A. F. B., Chapman, R. M., Evans, R. M., Hems, B. A., Jansen, A. B. A. und Walker, T., 1952. A synthesis of vitamin A from cyclohexanone. *Journal of the Chemical Society*, 1094-1111.
- AYED-BOUSSEMA, I., Pascussi, J. M., Maurel, P., Bacha, H. und Hassen, W., 2011. Zearalenone activates pregnane X receptor, constitutive androstane receptor and aryl hydrocarbon receptor and corresponding phase I target genes mRNA in primary cultures of human hepatocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31, 79-87.
- BALDWIN, R. S., Williams, R. D. und Terry, M. K., 1983. Zeranol: a review of the metabolism, toxicology, and analytical methods for detection of tissue residues. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 3, 9-25.
- BECKER, C., 2008. Nachweis von Zearalenon und Zearalenon-Metaboliten in Fusarien. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe, Institut für Angewandte Biowissenschaften.
- BERTHILLER, F., Schuhmacher, R., Adam, G. und Krska, R., 2009. Formation, determination and significance of masked and other conjugated mycotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 1243-1252.
- BHARUCHA, K. R., 1956. Oxidation by manganese dioxide of some unsaturated alcohols. *Journal of the Chemical Society*, 2446-2447.
- BIECHE, I., Narjoz, C., Asselah, T., Vacher, S., Marcellin, P., Lidereau, R., Beaune, P. und de Waziers, I., 2007. Reverse transcriptase PCR quantification of mRNA levels from cytochrome (CYP)1, CYP2 and CYP3 families in 22 different human tissues. *Pharmacogenet Genomics*, 17, 731-742.

- BIEHL, M. L., Prelusky, D. B., Koritz, G. D., Hartin, K. E., Buck, W. B. und Trenholm, H. L., 1993. Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 121, 152-159.
- BOLLIGER, G. und Tamm, C., 1972. Four new metabolites from *Gibberella zeae*. 5-Formylzearalenone, 7'-dehydrozearalenone, 8'-hydroxy- and 8'-epi-hydroxyzearalenone. *Helvetica Chimica Acta*, 55, 3030-3048.
- BRADFORD, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- BRAVIN, F., Duca, R. C., Balaguer, P. und Delaforge, M., 2009. In vitro cytochrome P450 formation of a mono-hydroxylated metabolite of zearalenone exhibiting estrogenic activities: possible occurrence of this metabolite in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 1824-1837.
- CAVALIERI, E. und Rogan, E., 2006. Catechol quinones of estrogens in the initiation of breast, prostate, and other human cancers - Keynote lecture. *Estrogens and Human Diseases*, 1089, 286-301.
- CAVALIERI, E., Rogan, E. und Chakravarti, D., 2004. The role of endogenous catechol quinones in the initiation of cancer and neurodegenerative diseases. *Quinones and Quinone Enzymes*, 382, 293-319.
- DAMM, G., 2010. Zearalenon: Untersuchungen zum in vitro und in vivo Metabolismus. Dissertation am KIT Karlsruhe.
- DÄNICKE, S., Swiech, E., Buraczewska, L. und Ueberschär, K. H., 2005. Kinetics and metabolism of zearalenone in young female pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 89, 268-276.
- DEMAIN, A. L., 1986. Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure and Applied Chemistry*, 58, 219-226.
- DEWICK, P. M., 2003. The acetate pathway: Fatty acids and polyketides. In: *Medical Natural Products, A Biosynthetic Approach*, Wiley-VCH Verlag, 2. Auflage, 35-120.

- DING, X. S., Lichti, K. und Staudinger, J. L., 2006. The mycoestrogen zearalenone induces CYP3A through activation of the pregnane X receptor. *Toxicological Sciences*, 91, 448-455.
- EISENBRAND, G., Metzler, M. und Hennecke, F. J., 2005. *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren*. Wiley-VCH Verlag, 3. Auflage.
- EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal*, 89, 1-35.
- EG, 1988. Richtlinie des Rates vom 7. März 1988 zum Verbot des Gebrauchs von bestimmten Stoffen mit hormonaler Wirkung im Tierbereich (88/146/EWG). *Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften*, L 70/16.
- EG, 2006. Verordnung (EG) Nr. 1881/2006 der Kommission vom 19. Dezember 2006 zur Festsetzung der Höchstgehalte für bestimmte Kontaminanten in Lebensmitteln. *Amtsblatt der Europäischen Union*, L 364/5.
- EL-SHARKAWY, S. H., Selim, M. I., Affi, M. S. und Halaweish, F. T., 1991. Microbial Transformation of zearalenone to a zearalenone sulfate. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 549-552.
- ENGELHARDT, G., Zill, G., Wohner, B. und Wallnöfer, P. R., 1988. Transformation of the Fusarium mycotoxin zearalenone in maize cell suspension cultures. *Naturwissenschaften*, 75, 309-310.
- ERASMUSON, A. F., Scahill, B. G. und West, D. M., 1994. Natural zearanol (alpha-zearalanol) in the urine of pasture-fed animals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42, 2721-2725.
- ESCH, H., 2003. Ishikawa Zellen als in vitro Testsystem für Estrogenität: Etablierung und Anwendung auf verschiedene Klassen endokrin aktiver Substanzen. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie.

- FLECK, S. C., Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M., 2012. Catechol metabolites of zearanol and 17 β -estradiol: A comparative in vitro study on the induction of oxidative DNA damage and methylation by catechol-O-methyltransferase. *Toxicology Letters*, 210, 9-14.
- GAJECKA, M., Rybarczyk, L., Zwierzchowski, W., Jakimiuk, E., Zielonka, L., Obremski, K. und Gajewski, M., 2011. The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. *Theriogenology*, 75, 1085-1094.
- GALAVERNA, G., Dall'asta, C., Mangia, M. A., Dossena, A. und Marchelli, R., 2009. Masked mycotoxins: an emerging issue for food safety. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, 89-92.
- GALLOWAY, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A. D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B. H., Resnick, M. A., Anderson, B. und Zeiger, E., 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in chinese-hamster ovary cells - evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 10, 1-175.
- HAGLER, W. M., Mirocha, C. J., Pathre, S. V. und Behrens, J.C., 1979. Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 37, 849-853.
- HILDEBRAND, A., 2008. Oxidation und Glucuronidierung von Zearalenon und seinen Derivaten mit humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen und UDP-Glucuronosyltransferasen. Wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe, Institut für Angewandte Biowissenschaften.
- HILDEBRAND, A. A., Pfeiffer, E., Rapp, A. und Metzler, M., 2012. Hydroxylation of the mycotoxin zearalenone at aliphatic positions: novel mammalian metabolites. *Mycotoxin Research*, 28, 1-8.
- HILDEBRAND, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2010. Aromatic hydroxylation and catechol formation: A novel metabolic pathway of the growth promotor zearanol. *Toxicology Letters*, 192, 379-386.

- HOOD, S. R., Shah, G. und Jones, P., 1998. Expression of cytochromes P450 in a baculovirus system. *Methods in Molecular Biology; Cytochrome P450 protocols*, 107, 203-218.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 56. IARC, Lyon, France, 599.
- JACKSON, R. A., Fenton, S. W., Mirocha, C. J. und Davis, G., 1974. Characterization of two isomers of 8'-hydroxyzearalenone and other derivatives of zearalenone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22, 1015-1019.
- JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADDITIVES (JECFA), 2000. 53rd Meeting of JECFA, Safety evaluation of certain food additives and contaminants. WHO Food Additives Series 44. World Health organization, Genva, Switzerland.
- JENSEN, N. P., Brown, R. D., Windholz, T. B., Schmitt, S. M. und Patchett, A. A., 1972. Chemical modifications of zearalenone.1. *Journal of Organic Chemistry*, 37, 1639-1647.
- KAMIMURA, A., Nozaki, Y., Ishikawa, S., Inoue, R. und Nakayama, M., 2011. K-birnessite MnO₂: a new selective oxidant for benzylic and allylic alcohols. *Tetrahedron Letters*, 52, 538-540.
- KATZENELLENBOGEN, B. S., Katzenellenbogen, J. A. und Mordecal, D., 1979. Zearalenones - characterization of the estrogenic potencies and receptor interactions of a series of fungal beta-resorcylic acid lactones. *Endocrinology*, 105, 33-40.
- KIESSLING, K. H. und Pettersson H., 1978. Metabolism of zearalenone in rat liver. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 43, 285-290.
- KUIPER-GOODMAN, T., Scott, P. M. und Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 7, 253-306.

- LI, J. J., Li, S. A., Klich, J. K., Heller, J. A., 1985. Some biological and toxicological studies of various estrogen mycotoxins and phytoestrogens. J.A. McLachlan (Ed.), Estrogens in the Environment II: Influences on Development, Elsevier, New York, 168-183.
- LYSOE, E., Klemsdal, S.S., Bone, K. R., Frandsen, R. J. N., Johansen, T., Thrane, U. und Giese, H., 2006. The PKS4 gene of *Fusarium graminearum* is essential for zearalenone production. Applied and Environmental Microbiology, 72, 3924-3932.
- MALEKINEJAD, H., Maas-Bakker, R. F. und Fink-Gremmels, J., 2005. Bioactivation of zearalenone by porcine hepatic biotransformation. Veterinary Research, 36, 799-810.
- MALEKINEJAD, H., Van Tol, H. T. A., Colenbrander, B. und Fink-Gremmels, J., 2006. Expression of 3 α - and 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines Zearalenone biotransformation. Toxicology in Vitro, 20, 458-463.
- MALLIS, L. M., Sarkahian, A. B., Harris, H. A., Zhang, M. Y. und McConnell, O. J., 2003. Determination of rat oral bioavailability of soy-derived phytoestrogens using an automated on-column extraction procedure and electrospray tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 796, 71-86.
- MARAGOS, C. M., 2010. Zearalenone occurrence and human exposure. World Mycotoxin Journal, 3, 369-383.
- METZLER, M., 2011. Proposal for a uniform designation of zearalenone and its metabolites. Mycotoxin Research, 27, 1-3.
- MIGDALOF, B. H., Dugger, H. A., Heider, J. G., Coombs, R. A. und Terry, M. K., 1983. Biotransformation of zearanol: disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. Xenobiotica, 13, 209-21.
- MILES, C. O., Erasmuson, A. F., Wilkins, A. L., Towers, N. R., Smith, B. L., Garthwaite, I., Scahill, B. G. und Hansen, R. P., 1996. Ovine metabolism of zearalenone to alpha-zearalanol (zearanol). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44, 3244-3250.

- MIROCHA, C. J., Pathre, S. V. und Robison, T. S., 1981. Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food and Cosmetics Toxicology* 19, 25-30.
- MÜLLER, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M. und Korach, K. S., 2004. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER alpha) and ER beta in human cells. *Toxicological Sciences*, 80, 14-25.
- NTP, 1982. Carcinogenesis bioassay of zearalenone (CAS No. 17924-92-4) in F344/N-rats and B6C3F1 mice (feed study). National Toxicology Program Technical Report Series 235, 1-155.
- OLSEN, M., Mirocha, C. J., Abbas, H. K. und Johansson, B., 1986. Metabolism of high concentrations of dietary zearalenone by young male turkey poult. *Poultry Science*, 65, 1905-1910.
- OLSEN, M., Pettersson, H. und Kiessling, K. H., 1981. Reduction of zearalenone to zearalenol in female rat liver by 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, 48, 157-161.
- OLSEN, M., Pettersson, H., Sandholm, K., Visconti, A. und Kiessling, K. H., 1987. Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa in vitro. *Food and Chemical Toxicology*, 25, 681-683.
- OUANES, Z., Ayed-Boussema, I., Baati, T., Creppy, E. E. und Bacha, H., 2005. Zearalenone induces chromosome aberrations in mouse bone marrow: preventive effect of 17beta-estradiol, progesterone and Vitamin E. *Mutation Research*, 565, 139-149.
- PATHRE, S. V., Fenton, S. W. und Mirocha, C. J., 1980. 3'-Hydroxyzearalenones, two new metabolites produced by *Fusarium roseum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 421-424.
- PATHRE, S. V., Khadikar, P.V. und Mirocha, C. J., 1989. Biosynthesis of zearalenone: a simple and efficient method to incorporate [13C]acetate label by using solid cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 1955-1956.
- PETERS, C. A., 1972. Photochemistry of zearalenone and its derivatives. *Journal of medicinal Chemistry*, 15, 867-868.

- PFEIFFER, E., Heyting, A. und Metzler, M., 2007. Novel oxidative metabolites of the mycoestrogen zearalenone in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 51, 867-871.
- PFEIFFER, E., Hildebrand, A., Damm, D., Rapp, A., Cramer, B., Humpf, H.-U. und Metzler, M., 2009. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 1123-1133.
- PFEIFFER, E., Hildebrand, A., Mikula, H. und Metzler, M., 2010 a. Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites in vitro: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1-9.
- PFEIFFER, E., Hildebrand, A. A., Becker, C., Schnattinger, C., Baumann, S., Rapp, A., Goesmann, H., Syldatk, C. und Metzler, M., 2010 b. Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel congeners of zearalenone in cultures of *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12055-12062.
- PFEIFFER, E., Kommer, A., Dempe, J. S., Hildebrand, A. A. und Metzler, M., 2011. Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells in vitro. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 560-567.
- PFOHL-LESZKOWICZ, A., Chekir-Ghedira, L. und Bacha, H., 1995. Genotoxicity of zearalenone, an estrogenic mycotoxin: DNA adduct formation in female mouse tissues. *Carcinogenesis*, 16, 2315-2320.
- PLACINTA, C. M., D'Mello, J. P. F. und Macdonald, A. M. C., 1999. A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Animal Feed Science and Technology*, 78, 21-37.
- PLASENCIA, J. und Mirocha, C. J., 1991. Isolation and characterization of zearalenone sulfate produced by *Fusarium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 146-150.

- POPPENBERGER, B., Berthiller, F., Bachmann, H., Lucyshyn, D., Peterbauer, C., Mitterbauer, R., Schuhmacher, R., Krska, R., Glossl, J. und Adam, G., 2006. Heterologous expression of Arabidopsis UDP-glucosyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae* for production of zearalenone-4-O-glucoside. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4404-4410.
- RICHARDSON, K. E., Hagler, W. M., Jr., Campbell, C. L. und Hamilton, P. B., 1985. Production of zearalenone, T-2 toxin, and deoxynivalenol by *Fusarium* spp. isolated from plant materials grown in North Carolina. *Mycopathologia*, 90, 155-160.
- RICHARDSON, K. E., Hagler, W. M. Jr. und Hamilton, P. B., 1984. Bioconversion of alpha-[14C]zearalenol and beta-[14C]zearalenol into [14C]zearalenone by *Fusarium roseum* 'Gibbosum'. *Applied and Environmental Microbiology*, 47, 1206-1209.
- ROY, D., Weisz, J. und Liehr, J. G., 1990. The O-Methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol - implications for estrogen-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 459-462.
- SAEED, M., Zahid, M., Gunesman, S. J., Rogan, E. und Cavalieri, E., 2005 a. Slow loss of deoxyribose from the N7deoxyguanosine adducts of estradiol-3,4-quinone and hexestrol-3,4'-quinone. Implications for mutagenic activity. *Steroids*, 70, 29-35.
- SAEED, M., Zahid, M., Rogan, E. und Cavalieri, E., 2005 b. Synthesis of the catechols of natural and synthetic estrogens by using 2-iodoxybenzoic acid (IBX) as the oxidizing agent. *Steroids*, 70, 173-178.
- SAENZ DE RODRIGUEZ, C. A., Bongiovanni, A. M. und Conde de Borrego, L., 1985. An epidemic of precocious development in Puerto Rican children. *The Journal of Pediatrics*, 107, 393-396.
- SCF, 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on *Fusarium* Toxins Part 2: Zearalenone (ZEA). 1-11.
- SHERWOOD, R. F. und Peberdy, J. F., 1972. Factors affecting the production of zearalenone by *Fusarium graminearum* in grain. *Journal of Stored Products Research*, 8, 71-75.

- SHERWOOD, R. F. und Peberdy, J. F., 1974. Production of the mycotoxin, zearalenone, by *Fusarium graminearum* growing on stored grain. I. Grain storage at reduced temperatures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 25, 1081-1087.
- SHIER, W. T., Shier, A. C., Xie, W. und Mirocha, C. J., 2001. Structure-activity relationships for human estrogenic activity in zearalenone mycotoxins. *Toxicology*, 39, 1435-1438.
- STEELE, J. A., Lieberman, J. R. und Mirocha, C. J., 1974. Biogenesis of zearalenone (F-2) by *Fusarium roseum* 'Graminearum'. *Canadian Journal of Microbiology*, 20, 531-534.
- STEELE, J. A., Mirocha, C. J. und Pathre, S. V., 1976. Metabolism of zearalenone by *Fusarium roseum* Graminearum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24, 89-97.
- STEVENSON, D. E., Hansen, R. P., Loader, J. I., Jensen, D. J., Cooney, J. M., Wilkins, A. L. und Miles, C. O., 2008. Preparative enzymatic synthesis of glucuronides of zearalenone and five of its metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 4032-4038.
- STIPANOVIC, R. D. und Schroeder H. W., 1975. Zearalenol and 8'-hydroxy-zearalenone from *Fusarium roseum*. *Mycopathologia*, 57, 77-8.
- TAKEMURA, H., Shim, J. Y., Sayama, K., Tsubura, A., Zhu, B. T. und Shimoi, K., 2007. Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zearanol in vivo and in vitro. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 103, 170-177.
- TANAKA, T., Hasegawa, A., Yamamoto, S., Lee, U. S., Sugiura, Y. und Ueno, Y., 1988. Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins Nivalenol, Deoxynivalenol, and Zearalenone.1. Survey of 19 countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36, 979-983.
- TEIXEIRA, L. C., Montiani-Ferreira, F., Locatelli-Dittrich, R., Santin, E. und Alberton, G. C., 2011. Effects of zearalenone in prepubertal gilts. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 31, 656-662.

- THOUVENOT, D., Morfin, R., Di Stefano, S. und Picart, D., 1981. Transformations of zearalenone and alpha-zearalanol by homogenates of human prostate glands. *European Journal of Biochemistry*, 121, 139-45.
- UENO, Y. und Tashiro, F., 1981. Alpha-Zearalenol, a major hepatic metabolite in rats of zearalenone, an estrogenic mycotoxin of *Fusarium* species. *The Journal of Biochemistry*, 89, 563-571.
- UENO, Y., Tashiro, F. und Kobayashi, T., 1983. Species differences in zearalenone-reductase activity. *Food and Chemical Toxicology*, 21, 167-173.
- URRY, W. H., Wehrmeister, H. L., Hodge, E. B., Hidy, P. H., 1966. The structure of Zearalenone. *Tetrahedron Letters*, 7, 3109-3114.
- YANG, X., Khong, T. T., Chen, L., Choi, H. D., Kang, J. S. und Son, B. W., 2008. 8'-Hydroxyzearalanone and 2'-hydroxyzearalanol: resorcylic acid lactone derivatives from the marine-derived fungus *Penicillium* sp. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 56, 1355-1356.
- ZHAO, L. L., Gai, Y., Kobayashi, H., Hu, C. Q. und Zhang, H. P., 2008. 5'-Hydroxyzearalenol, a new beta-resorcylic macrolide from *Fusarium* sp 05ABR26. *Chinese Chemical Letters*, 19, 1089-1092.
- ZÖLLNER, P., Jodlbauer, J., Kleinova, M., Kahlbacher, H., Kuhn, T., Hochsteiner, W. und Lindner W., 2002. Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2494-2501.

A Anhang

A.1 Überblick über die MS/MS-Spektren der identifizierten RAL-Metaboliten

Tabelle A.1: Mikrosomal gebildete Metaboliten von ZEN. Dargestellt sind charakteristische Eigenschaften der Metaboliten aus HPLC-DAD-MS/MS-Untersuchungen.

Metabolit	RT	ESI-MS	MS/MS auf [M-H] ⁻	Struktur
A	12,5	335	335 (26), 333 (11), 317 (68), 299 (100), 273 (23), 247 (4), 229 (4), 189 (68), 175 (15), 163 (25)	8-HO-ZEL
B	19,3	335	335 (20), 333 (9), 317 (66), 299 (30), 291 (100), 273 (28), 247 (5), 229 (5), 189 (58), 175 (20), 163 (21), 149 (4)	8-HO-ZEL
C	20,0	335	335 (100), 317 (63), 307 (31), 299 (11), 291 (349), 279 (4), 273 (9), 219 (40), 203 (90), 201 (11), 190 (45), 175 (19)	15-HO-ZEL
D	20,1	335	335 (62), 317 (21), 307 (12), 291 (100), 273 (5), 247 (3), 219 (5), 203 (10), 190 (18), 175 (6)	13-HO-ZEL
1	20,5	333	315 (7), 289 (100), 271 (6), 161 (6), 149 (24)	2-, 3- oder 4-HO-ZEN
2	21,2	333	315 (100), 305 (4), 297 (8), 289 (90), 271 (24), 247 (16), 217 (10), 202 (11), 189 (27), 187 (34), 175 (24), 173 (8), 165 (27), 147 (7)	8-Keto-ZEL
3	21,6	333	315 (100), 305 (15), 297 (12), 289 (85), 271 (36), 247 (39), 202 (9), 191 (10), 189 (13), 187 (27), 175 (20), 161 (9), 149 (17)	8-HO-ZEN
4	22,0	333	333 (10), 315 (69), 289 (100), 271 (43), 261 (6), 247 (11), 203 (11), 191 (25), 175 (6), 163 (12), 161 (23), 147 (13), 123 (11)	10-HO-ZEN
5	22,9	333	315 (10), 289 (4), 247 (4), 221 (4), 203 (100), 175 (51), 159 (6)	9-HO-ZEN
6	24,6	333	333 (3), 315 (77), 297 (21), 289 (17), 271 (45), 263 (21), 245 (100), 219 (11), 175 (8), 161 (6), 149 (12)	5-HO-ZEN
7	26,0	333	315 (8), 289 (5), 247 (5), 221 (7), 203 (100), 175 (51), 159 (6)	9-HO-ZEN
8	28,4	333	333 (7), 315 (100), 305 (19), 297 (12), 289 (81), 271 (36), 247 (38), 202 (9), 191 (10), 189 (15), 187 (33), 175 (22), 161 (10), 149 (19)	8-HO-ZEN
9	30,6	333	333 (58), 315 (28), 305 (7), 289 (100), 273 (5), 261 (18), 219 (9), 203 (8), 201 (8), 191 (78), 179 (4)	13-HO-ZEN
10	30,6	333	333 (100), 315 (32), 305 (7), 289 (32), 219 (14), 201 (21), 191 (63)	15-HO-ZEN

Tabelle A.2: Mikrosomal gebildete Metaboliten von ZAN und α -ZAL. Dargestellt sind charakteristische Eigenschaften der Metaboliten aus HPLC-DAD-MS/MS-Untersuchungen.

Metabolit	RT	ESI-MS	ESI-MS/MS auf [M-H] ⁻	Struktur
A	12,2	337	337 (3), 319 (29), 293 (100), 275 (23), 221 (33), 177 (14), 161 (5)	nicht abschließend bestimmt
B	14,0	337	337 (13), 319 (21), 293 (100), 275 (33), 257 (7), 249 (5), 233 (3), 231 (10), 193 (9), 177 (24)	8-HO- α -ZAL
C	14,5	337	337 (22), 319 (100), 309 (3), 301 (10), 293 (81), 275 (17)	15-HO- α -ZAL
D	15,0	337	337 (7), 319 (49), 309 (5), 293 (100), 275 (12)	13-HO- α -ZAL
1	15,4	335	335 (3), 317 (100), 307 (7), 291 (58), 273 (18), 247 (3), 205 (32), 203 (3), 177 (3), 161 (21)	nicht abschließend bestimmt
2	15,8	335	317 (16), 291 (100), 273 (7), 249 (5), 247 (3)	nicht abschließend bestimmt
3	16,5	335	317 (100), 291 (88), 273 (28), 249 (3), 247 (5), 221 (3), 203 (3), 161 (8)	8-HO-ZAN
4	18,1	335	335 (11), 317 (100), 291 (45), 273 (6), 221 (8)	15-HO-ZAN
5	18,7	335	335 (15), 317 (54), 307 (11), 291 (100), 289 (5), 273 (13), 249 (4), 221 (11), 203 (6), 193 (4), 177 (4)	13-HO-ZAN

Tabelle A.3: Aus *F. graminearum* extrahierte Kongenere. Dargestellt sind charakteristische Eigenschaften der Metaboliten aus HPLC-DAD-MS/MS-Untersuchungen.

Kongener	RT	ESI-MS	ESI-MS/MS auf [M-H] ⁻	Struktur
P1	10,4	351	333 (4), 307 (3), 165 (100), 137 (7)	ZEN-Halbacetal
P2	11,7	351	333 (8), 307 (3), 165 (100), 147 (4), 137 (5)	ZEN-11,12-Dihydrodiol
P6	14,4	333	333 (2), 315 (72), 289 (100), 271 (43), 261 (8), 247 (10), 191 (30), 163 (13), 161 (27), 147 (15), 123 (10)	10-HO-ZEN
P7	14,7	333	315 (71), 297 (20), 289 (11), 271 (42), 263 (26), 245 (100), 219 (11), 175 (10), 161 (6), 149 (13)	5-HO-ZEN
P8	15,1	333	333 (2), 315 (66), 289 (100), 271 (41), 261 (9), 247 (11), 203 (8), 191 (26), 163 (12), 161 (27), 147 (13), 123 (10)	10-HO-ZEN
P9	15,4	333	333 (100), 315 (79), 289 (4), 271 (19), 247 (8), 203 (4)	ZEN-Spiro-Acetal
P10	15,7	333	315 (71), 297 (23), 289 (14), 271 (44), 263 (23), 245 (100), 219 (11), 175 (7), 161 (7), 149 (13)	5-HO-ZEN
P11	16,5	331	331 (2), 313 (75), 287 (100), 269 (26), 243 (6), 233 (17), 217 (18), 191 (12), 175 (12), 163 (7), 161 (6), 149 (5)	10-Keto-ZEL
P13	17,1	333	333 (100), 315 (31), 289 (3), 271 (8), 247 (4), 191 (30)	ZEN-Spiro-Acetal
P15	18,0	333	333 (100), 315 (40), 289 (3), 271 (9), 247 (4), 191 (8)	ZEN-Spiro-Acetal
P16	19,4	333	333 (3), 315 (61), 305 (23), 289 (100), 277 (53), 271 (20), 261 (8), 247 (34), 246 (16), 245 (12), 235 (9), 233 (11), 203 (18), 191 (23), 175 (30), 165 (42), 164 (25), 147 (32)	ZEN-Epoxid
ZEN	22,0	317	317 (2), 299 (52), 273 (100), 261 (6), 203 (6), 175 (12), 161 (8), 149 (18)	

A.2 Externe Kalibrierungen

Parameter zu den Kalibrierungen der LC-DAD-MS Analyse der Methylierung und NAC-Adduktbildung. Die lineare Regression erfolgte mit Hilfe der OriginPro 8 Software (OriginLab, Northampton, MA, USA). A, Peakfläche; n, Stoffmenge (pmol).

Detektionsart	Substanz	Kalibrierbereich	Geradengleichung	R ²
UV-Absorption	ZEN	20 - 1000 pmol	A = 1025n	0,9993
	α -ZEL	40 - 1000 pmol	A = 971n	0,9997
	ZAN	20 - 1000 pmol	A = 1062n	0,9997
	α -ZAL	20 - 1000 pmol	A = 1303n	0,9997
	4-HO-E2	20 - 1000 pmol	A = 146n	0,9999
	4-HO-E1	20 - 1000 pmol	A = 173n	0,9993
	2-HO-E2	20 - 1000 pmol	A = 240n	0,9997
	2-HO-E1	20 - 1000 pmol	A = 245n	0,9999

A.3 MS-Geräteparameter

Auflistung der Parameter der verwendeten Tune Files der verschiedenen MS-Methoden.

		ZEN und ZEL	ZAN und ZAL
N₂ Flow Rate	Sheath (L/min)	30	35
	Auxiliary (L/min)	15	10
	Sweep (L/min)	0	0
Spray	Voltage (kV)	4,5	4,0
Capillary	Voltage (V)	-45	-35
	Temperatur (°C)	350	360
Tube Lens	Voltage (V)	-124,9	-119,9

B Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E., Damm, G. und Metzler, M., Combination of LC-MS2 and GC-MS as a tool to differentiate oxidative metabolites of zearalenone with different chemical structures. *International Journal of Spectroscopy*, im Druck.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E., Rapp, A. und Metzler, M., 2012. Hydroxylation of the mycotoxin zearalenone at aliphatic positions: novel mammalian metabolites. *Mycotoxin Research*, 28, 1-8.

Pfeiffer, E., Kommer, A., Dempe, J. S., Hildebrand, A. A. und Metzler, M., 2011. Absorption and metabolism of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor zeranol in Caco-2 cells *in vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 55, 560-567.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A. A., Becker, C., Schnattinger, C., Baumann, S., Rapp, A., Goesmann, H., Syltatk, C. und Metzler, M., 2010. Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel congeners of zearalenone in cultures of *Fusarium graminearum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12055-12062.

Metzler, M., Pfeiffer, E., und Hildebrand, A. A., 2010. Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. *World of Mycotoxin Journal*, 3, 385-401.

Hildebrand, A., Pfeiffer, E., Metzler, M., 2010. Aromatic hydroxylation and catechol formation: A novel metabolic pathway of the growth promotor zeranol. *Toxicology Letters*, 192, 379-386.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Mikula, H. und Metzler, M., 2010. Glucuronidation of zearalenone, zeranol and four metabolites *in vitro*: Formation of glucuronides by various microsomes and human UDP-glucuronosyltransferase isoforms. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 1-9.

Pfeiffer, E., Hildebrand, A., Damm, D., Rapp, A., Cramer, B., Humpf, H.-U. und Metzler, M., 2009. Aromatic hydroxylation is a major metabolic pathway of the mycotoxin zearalenone *in vitro*. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53, 1123-1133.

Beiträge auf Kongressen und Fachtagungen

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Metabolism of the growth promoter zearanol in precision-cut rat liver sclices. 77. Toxnet BW Meeting, 13.10.2011 in Konstanz.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Inactivation pathways of the catechol metabolites of zearalenone. Gordon Research Seminar on Discovery and Risk Assessment of Harmful Biotoxins, 11.-12.06.2011 in Waterville, Maine, USA.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel analogs of zearalenone in cultures of *Fusarium graminearum*. Gordon Research Conference on Mycotoxins and Phycotoxins, 12.-17.06.2011 in Waterville, Maine, USA.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Inactivation pathways of the catechol metabolites of zearalenone. 33. Mycotoxin Workshop, 30.05.-1.06.2011 in Freising.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Metabolism of the growth promoter zearanol in precision-cut rat liver sclices. 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), 30.03.-1.04.2011 in Frankfurt am Main, Abstract: Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 383, 92.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E., Becker, C., Schnattinger, C., Baumann, S., Rapp, A., Sylatk, C. und Metzler, M. Identification of an aliphatic epoxide and the corresponding dihydrodiol as novel analogs of zearalenone in cultures of *Fusarium graminearum*. Kurzvortrag am Toxnet BW Meeting, 12.10.2010 in Freiburg.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E., Becker, C., Schnattinger, C., Baumann, S., Rapp, A., Sylatk, C. und Metzler, M. Identifizierung eines aliphatischen Epoxids und seines korrespondierenden Dihydrodiols als Kongenere von Zearalenon in *Fusarium graminearum* Kulturen. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 20.-22.09.2010 in Stuttgart-Hohenheim.

Hildebrand, A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Oxidative metabolism of zearalenone with rat liver microsomes. Mycotoxin Workshop, 14.-16.06.2010 in Kopenhagen, Dänemark.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Formation of mercapturic acids

from catechol metabolites of zearalenone and zearanol *in vitro*. 51. Frühjahrstagung der DGPT, 23.-25.03.2010 in Mainz, Abstract: Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 381, 61.

Hildebrand, A. A., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Glucuronidation of the mycotoxin zearalenone and the growth promotor alpha-zearalanol by human microsomal and recombinant UDP-glucuronosyltransferases. 31. Mycotoxin Workshop, 15.-17.06.2009 in Münster.

Hildebrand, A. A., Schnattinger, C., Pfeiffer, E. und Metzler, M. Catechol formation is a major metabolic pathway of the growth promoter alpha-zearalanol. 50. Frühjahrstagung der DGPT, 10.-12.03.2009 in Mainz, Abstract: Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology 379, 63.

Ich danke...

- Herrn Professor Dr. Dr. Manfred Metzler für die Überlassung des interessanten Themas, die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis und die Unterstützung während der gesamten Arbeit
- Herrn Professor Dr. Mirko Bunzel für die Übernahme des Korreferats
- Erika Pfeiffer für ihre Unterstützung und ihr Vertrauen, die hilfreichen Tipps und Erfahrungen bei Problemen jeglicher Art und das angenehme Arbeitsklima
- Britta Burkhardt, Georg Damm, Julia Dempe, Stefanie Fleck, Silke Gerstner und Simon Göckler für die gute Zusammenarbeit sowie die vielen lustigen Stunden in Labor und Küche
- Christian Schnattinger, Julia Leuthner und Maria Markova für ihre zuverlässige Arbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeiten
- allen Diplomanden des Arbeitskreises Metzler, besonders Anne Kommer, Sabine Jung und Maria Markova für den Spaß im Laboralltag
- Sima Payandeh, Szidönia Gumbel-Mako und Verena Horn für die schöne und lustige Zeit in Labor und Küche
- Britta Burkhardt für das gute Arbeits- und Büroklima, die vielen Ü-Ei-Wetten und die Latex-Vorlage
- Julia Dempe für viele lustige Stunden im Büro, das Einlernen in die Zellkultur und ihr offenes Ohr bei Fragen und Problemen aller Art
- Stefanie Fleck für ihre anpackende Art und gute Gespräche
- den Doktoranden des Arbeitskreises Hartwig sowie Barbara Koch für die gute und lustige Zusammenarbeit
- Doris Honig für ihre Hilfe bei allen technischen Problemen und die Gespräche während der Erledigung der gemeinsamen Aufgaben
- Dr. Andreas Rapp für die NMR-Untersuchungen
- allen Mitarbeitern des Instituts für das gute Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft
- Romy Scheerle und Katja Schmalbach für die gemeinsame Zeit des Studiums und ihre Freundschaft

Besonderer Dank gilt...

- meinen Eltern und meinen Brüdern für ihre Unterstützung während der Zeit des gesamten Studiums und dieser Arbeit

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Andreas Hildebrand
Geburtsdatum	22. November 1983
Geburtsort	Mannheim
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulbildung

1990 - 1994	Alfred-Delp-Grundschule, Mannheim
1994 - 2003	Peter-Petersen-Gymnasium, Mannheim
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

10/2003 - 10/2008	Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
04/2008 - 10/2008	Diplomarbeit an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. M. Metzler „Oxidation und Glucuronidierung von Zearalenon und seinen Derivaten mit humanen Cytochrom P450-Monooxygenasen und UDP-Glucuronyltransferasen“ Abschluss: Diplom-Lebensmittelchemiker

Promotion

seit 11/2008

Wissenschaftlicher Angestellter am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Fakultät für Chemie und Biowissenschaften, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie, im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. M. Metzler

Stipendien

06/2011

Reisestipendium des „Karlsruhe House of Young Scientists“ zur Teilnahme an der Gordon Conference on Mycotoxins and Phycotoxins vom 11.-17. Juni 2011 in Waterville, ME, USA