



Doctoral Thesis

Trichothecene biologische Eigenschaften und Analytik

Author(s):

Scossa-Romano, Donata Albina

Publication Date:

1988

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000510252> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 8647

TRICHOTHECENE: BIOLOGISCHE EIGENSCHAFTEN UND ANALYTIK

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von
DONATA ALBINA SCOSSA-ROMANO
Dipl. Natw. ETH Zürich
geboren am 5. April 1960
von Malvaglia (TI)

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. Ch. Schlatter, Referent
PD Dr. J. Lüthy, Korreferent

Ch. Schlatter
21. 4. 89

Arti grafiche A. Salvioni & Co. SA
Bellinzona 1988

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war einerseits die Abschätzung der potentiellen Karzinogenität von Verbindungen aus der Trichothecene Gruppe und andererseits die Entwicklung biologischer Nachweismethoden für diese Mykotoxinklasse.

Zur Erfassung der karzinogenen Wirkung wurde als Testsystem ein in vitro DNS-Bindungstest gewählt. Das dazu notwendige radioaktiv markierte Toxin wurde anhand einer Biosynthese hergestellt. Zu diesem Zweck wurden 16 Fusarium Stämme auf mehreren semisynthetischen Medien und bei verschiedenen Temperaturbedingungen gezüchtet.

Mit Hilfe einer dünn-schichtchromatographischen Analyse sowie einer Messung der Protein-Synthese-Aktivität Hemmung in kultivierten Hamster Nieren Fibroblasten, konnte man im Ueberstand von 2 Schimmelpilzkulturen eine Trichothecen-Bildung nachweisen:

- Der Stamm F. tricinctum NRRL 3299 synthetisierte T-2 Toxin nach 2 Wochen Inkubation auf YES-Medium (Hefeextrakt-Saccharose-Bouillon) bei 15° C. In derselben Kultur konnte man 10 Wochen nach Versuchsbeginn auch HT-2 nachweisen.

- Der Stamm F. graminearum DAOM 180378 synthetisierte Deoxinivalenol (DON) sowie Diacetoxiscirpenol (DAS) nach 8 Wochen Inkubation auf Kartoffel-Dextrose-Bouillon (PDB-Medium) bei 28° C.

Der Stamm F. tricinctum NRRL3299 wurde zur Biosynthese von radioaktiv markiertem T-2 verwendet. Mit 1-¹⁴C-Acetat als Vorstufe konnte man 1.8 mg ¹⁴C-T-2 mit einer spezifischen Aktivität von 2.36 µCi/mg isolieren.

95 µg ¹⁴C-T-2 wurden mit 2.7 mg Kalbsthymus DNS während 36 Stunden inkubiert. Nach dieser Zeit konnte man keine signifikant erhöhte Radioaktivität auf der DNS messen. Dieses Resultat deutet auf eine fehlende kovalente Interaktion zwischen T-2 Toxin und DNS hin. Für mehrere bekannte chemische Karzinogene besteht eine gute Korrelation zwischen kovalente DNS-Bindung und Karzinogenität in vivo. Beim Vorscreening auf der genotoxischen Wirkung einer Verbindung gilt ein negatives Resultat bei der Messung der DNS-Bindung in vitro als Hinweis für eine sehr schwache bzw. fehlende

Reaktivität mit der DNS *in vivo*. Demzufolge kann man dem T-2 Toxin keine relevante karzinogene Wirkung zugeordnet werden.

Zum Nachweis der Trichothecene wurde ein Bioassay entwickelt, der auf der Messung der Protein-Synthese-Aktivität einer Hamster-Nieren-Fibroblasten (BHK) Zelllinie beruht. Getestet wurde die 30-minütige Wirkung von T-2, HT-2, Diacetoxiscirpenol (DAS), Deoxinivalenol (DON), Verrucaridin A, Cycloheximid, Ricinus Lectin RCA60, drei Verbindungen der Anthrachinone (Emodin, Luteoskyrin, Tetrahydroxianthrachinon), zwei verschiedenen Mykotoxinen (Ochratoxin A und Aflatoxin B₁), zwei Pyrrolizidin-Alkaloide (Seneciphyllin und Senecionin) sowie die Lösungsmittel Ethanol, Methanol und DMSO. Gemessen wurde die zelluläre Aufnahme von ¹⁴C-Leucin während einer Stunde. Der Protein-Synthese-Hemmung-Test erwies sich als spezifische und empfindliche Methode zur Erfassung der Trichothecene. Die hemmende Wirkung der Trichothecene auf der Protein-Synthese-Aktivität in BHK-Fibroblasten konnte nämlich in einem Konzentrationsbereich von einigen ng/ml (Typ A Trichothecene: 1-10 ng/ml) nachgewiesen werden. Die restliche untersuchte Myko- bzw. Pflanzentoxine beeinträchtigten die Aufnahme von ¹⁴C-Leucin in die Zellen hingegen in einem Konzentrationsbereich, der mindestens 1'000 Mal höher lag.

Im Hinblick auf die Entwicklung eines Enzyme-Linked-Immuno-Assay (ELISA) zum Nachweis von Trichothecene, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Versuche durchgeführt:

- Synthese des Carboximethyloxim-Derivats des T-2 Toxins bzw. des Diacetoxiscirpenols (DAS).
- Koppelung der obenerwähnten Oxime mit einem Trägerprotein (Bovine Serum Albumin, BSA; Immunglobulin G Goat, IgG-Goat).
- Immunisierung von BALB/c Mäusen.
- Entwicklung eines ELISA-Tests zum spezifischen Nachweis der Antikörper im Serum der immunisierten Tiere.

Nach 4-maliger Applikation des entsprechenden Toxin-Immunoogens konnte man bei 9 von 20 immunisierten Tieren eine erhöhte Antikörper-Bildung im Serum nachweisen.

SUMMARY

The aim of the present work was to evaluate the carcinogenic potency of trichothecenes and to develop bioassays as sensitive screening methods for the detection of these mycotoxins.

As a measure of the carcinogenic potency, the covalent binding of T-2 toxin to DNA was studied in vitro. The required radiolabeled compound was biosynthesized. To this end, 16 Fusarium strains were tested for the production of trichothecenes. They were grown on several different semisynthetic liquid media at various temperatures. The mould cultures were analyzed for trichothecenes by thin-layer-chromatography (tlc) and by a protein synthesis inhibition assay with baby hamster kidney (BHK) fibroblasts. The following trichothecenes production levels were detected:

- the strain F. tricinctum NRRL 3299 produced T-2 toxin when incubated on YES-Medium (Yeast-Extract-Sucrose) at 15° C for 2 weeks. In the same culture HT-2 toxin was also detected after 10 weeks of incubation.

- The strain F. graminearum DAOM 180378 produced deoxynivalenol (DON) and diacetoxyscirpenol (DAS) after 8 weeks of incubation on PDB-Medium (Potato-dextrose-broth) at 28° C.

The biosynthesis of radiolabeled T-2 was carried out through the incorporation of 1-¹⁴C-Acetate precursor in a culture of F. tricinctum NRRL 3299. After growing for three weeks at 15° C on YES-Medium, F. tricinctum NRRL 3299 yielded 1.8 mg ¹⁴C-T-2 with a specific activity of 2.36 µCi/mg.

95 µg ¹⁴C-T-2 were incubated with 2.7 mg calf-thymus DNA for 36 hours. After this time no radioactivity could be detected covalently bound to the DNA. Covalent binding to DNA in target organs is known to correlate with the carcinogenic potency of a great number of organic chemical carcinogens. A lack of covalent binding to DNA in vitro gives a preliminary indication of a very weak or even a failing genotoxicity in vivo. Therefore, T-2 toxin does not seem to have a relevant carcinogenic potency.

A bioassay for the detection of trichothecenes was developed, using a protein synthesis inhibition assay in cultured baby hamster fibroblasts (BHK). The cells were exposed to the pure toxins for 30 min. The mixture was then incubated with ^{14}C -leucine for an additional 60 min. At the end of the incubation, the radioactivity incorporated into the washed cells was determined. We tested five trichothecenes (T-2, HT-2, diacetoxyscirpenol (DAS), deoxynivalenol (DON), verrucaric acid), cycloheximide, ricinus lectin RCA60, three anthraquinones (tetrahydroxyanthraquinone, emodin, luteoskyrin), two mycotoxins (ochratoxin A, aflatoxin B₁), two pyrrolizidine alkaloids (seneciophyllin and senecionin), ethanol, methanol and DMSO. The sensitivity of this assay for trichothecenes was found to be in the range of a few ng/ml. At least 1'000 fold higher concentrations of non-trichothecene mycotoxins and plant toxins were necessary to cause an inhibition of protein synthesis in the cells. Therefore, the described bioassay is a specific and sensitive method for detection of trichothecenes.

With the purpose of developing an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for analysis of trichothecenes, the following experiments were performed:

- synthesis of a carboxymethyl oxime derivative of T-2 toxin and diacetoxyscirpenol (DAS).
- Conjugation to a carrier protein (Bovine serum albumin, BSA; Immunoglobulin G Goat; IgG-Goat).
- Immunization of BALB/c Mice.
- Development of an ELISA-Test for the screening of immune sera by antibody production.

After three booster injections with the toxin-immunogen, 9 mice out of 20 showed increased antibody levels in the serum.