

4547 - 970 6

**Zum molekularen Wirkungsmechanismus
des Mykotoxins Patulin:
Charakterisierung der spontanen Reaktivität gegenüber
nucleophilen Modellsubstanzen und biologischen
Makromolekülen *in vitro***

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

DISSERTATION

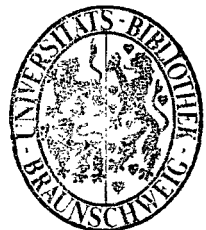
von
Diplom-Lebensmittelchemiker

Ralph J. Fliege

aus Mannheim

Betreuer: Prof. Dr. Dr. M. Metzler

Karlsruhe, Oktober 1999



INHALT

WISSENSCHAFTLICHE ABKÜRZUNGEN	V-VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 VORKOMMEN UND BEDEUTUNG VON PATULIN	1
1.2 TOXIKOLOGIE VON PATULIN	3
1.3 ELEKTROPHILREAKTIVITÄT ALS MÖGLICHER WIRKMECHANISMUS	10
2 PROBLEMSTELLUNG UND VORGEHEN	13
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	15
3.1 BIOTECHNOLOGISCHE GEWINNUNG VON PATULIN	15
3.1.1 Auswahl und Inkulturnahme geeigneter Pilzstämmen	16
3.1.2 Optimierung der Kulturbedingungen	18
3.1.2.1 Medientyp	18
3.1.2.2 Glucosegehalt	20
3.1.2.3 Temperatur	20
3.1.3 Kultur im präparativen Maßstab	21
3.1.4 Isolierung und Reinigung des Patulins	22
3.1.5 Darstellung von O-Acetyl-Patulin	23
3.2 REAKTIVITÄT GEGENÜBER NUCLEOPHIL-MODELLSUBSTANZEN	24
3.2.1 4-Bromthiophenol als aromatisches Modell-Thiol	24
3.2.1.1 HPLC-Verfolgung der Reaktion und Isolierung der Produkte	26
3.2.1.2 Strukturaufklärung der Produkte	29
3.2.1.3 Ableitung von Reaktionswegen	32

3.2.2	2-Mercaptoethanol als aliphatisches Modell-Thiol	36
3.2.2.1	HPLC-Verfolgung der Reaktion	36
3.2.2.2	Produktstrukturen	37
3.2.2.3	Abgeleitete Reaktionswege	39
3.2.3	4-Bromanilin als aromatisches Modell-Amin	40
3.2.3.1	HPLC-Verfolgung der Reaktion	40
3.2.3.2	Produktstrukturen und Reaktionswege	41
3.2.4	Gemischte Thiol-Amin-Addukte	41
3.2.4.1	HPLC-Verfolgung der Reaktionen	41
3.2.4.2	Produktstrukturen	44
3.2.5	Zusammenstellung wichtiger Addukt-Typen und Reaktionswege	45
3.3	REAKTIVITÄT GEGENÜBER BIOLOGISCHEN THIOLN	46
3.3.1	Adduktbildung mit N-Acetylcystein	46
3.3.2	Adduktbildung mit Glutathion	51
3.3.3	Adduktbildung mit Cystein	56
3.3.4	Diskussion der Reaktivität von Patulin gegenüber niedermolekularen Nucleophilen	58
3.4	REAKTIVITÄT VON PATULIN GEGENÜBER PROTEINEN	61
3.4.1	Protein-Protein-quervernetzendes Potential	61
3.4.1.1	Nachweis kovalenter Protein-Protein-Vernetzungen	62
3.4.1.2	Vernetzung von Rinderserumalbumin	64
3.4.1.3	Vernetzung von Hühnereiweiß-Lysozym	67
3.4.1.4	Vernetzung von Rinderserumalbumin und Lysozym	67
3.4.2	Charakterisierung der Vernetzungsreaktionen mittels fluoreszenzmarkierter Nucleophile	68
3.4.2.1	Methode des Fluoreszenz-Inkorporationstests	69
3.4.2.2	Ergebnisse	70
3.4.3	Tertiär- und Quartärstruktur-Abhängigkeit der Vernetzungsreaktion am Beispiel Tubulin	74
3.4.3.1	Kontrollierbarkeit der Quartärstruktur von Tubulin	74

3.4.3.2	Ergebnisse	75
3.4.4	Diskussion der Reaktivität von Patulin gegenüber Proteinen	79
3.5	REAKTIVITÄT VON PATULIN GEGENÜBER DNA	81
3.5.1	Basenmodifizierung	81
3.5.1.1	HPLC-Analytik des Basenmusters nach Ameisensäurespaltung	82
3.5.1.2	Einfluß von Patulin auf das Basenmuster	82
3.5.2	DNA-DNA-vernetzendes Potential	84
3.5.2.1	Agarose-Gelmethode nach HARTLEY ET AL.	84
3.5.2.2	Vergleich Patulin / Melphalan	86
3.5.3	Labilität des DNA-Rückgrates nach Patulin-Inkubation	88
3.5.4	DNA-Protein-quervernetzendes Potential	89
3.5.4.1	SDS-K ⁺ -Präzipitationsverfahren nach ZHITKOVICH & COSTA ...	90
3.5.4.2	Vergleich Patulin / Formaldehyd	92
3.5.5	Diskussion der Reaktivität von Patulin gegenüber DNA	94
4	ZUSAMMENFASSUNG	96
5	MATERIAL UND METHODEN	99
5.1	WICHTIGSTE GERÄTE, CHEMIKALIEN UND BIOLOGISCHE MATERIALIEN	99
5.2	BIOTECHNOLOGISCHE GEWINNUNG VON PATULIN	104
5.2.1	Kultur von <i>Penicillium expansum</i>	104
5.2.2	Extraktion und Reinigung von Patulin	105
5.2.3	Darstellung von Acetylpatulin	106
5.3	CHARAKTERISIERUNG VON NUCLEOPHIL-ADDUKTEN	107
5.3.1	Durchführung der Umsetzungen	107
5.3.2	Präparative Trennung und Isolierung der Addukte	108
5.3.3	Strukturaufklärung	109

5.4 CHARAKTERISIERUNG DER REAKTIVITÄT GEGENÜBER PROTEINEN ..	111
5.4.1 Proteinbestimmung (BCA-Methode)	111
5.4.2 Thiolgruppenbestimmung (DTNB-Methode)	111
5.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	113
5.4.4 Western-Blot und Immundetektion von Tubulin	115
5.4.5 Modifizierung des Thiolstatus von Rinderserumalbumin	118
5.4.6 Protein-Protein Vernetzungsexperimente mit BSA und HEL	119
5.4.7 Polymerisationsabhängige Vernetzung von Tubulin	120
5.5 CHARAKTERISIERUNG DER REAKTIVITÄT GEGENÜBER DNA	121
5.5.1 HPLC-Analytik des Basenmusters nach Ameisensäurespaltung ...	121
5.5.2 Agarose-Gelelektrophorese.	122
5.5.3 Nachweis von Interstrangvernetzungen (Agarose-Gelmethode) ..	123
5.5.4 Labilität des DNA-Rückgrates nach Patulin-Inkubation	125
5.5.5 Nachweis von DNA-Protein-Vernetzungen (SDS-K ⁺ -Methode)	125
6 SPEKTROSKOPISCHE DATEN	130
6.1 NMR-DATEN WICHTIGER THIOLADDUKT-GERÜSTSTRUKTUREN	130
6.2 PATULIN / ACETYL-PATULIN	133
6.3 MODELLNUCLEOPHIL-ADDUKTE: BTP / ME / BA / EA	136
6.4 NAC-ADDUKTE	168
6.5 GSH-ADDUKTE	177
6.6 CYS-ADDUKT	196
7 LITERATUR	198

VERÖFFENTLICHUNGEN AUS DIESER ARBEIT

DANK

LEBENS LAUF