

**Bedeutung von DUSP1 und Expression MAPKinasen-spezifischer  
Transkriptionsfaktoren während der zellulären Antwort auf  
Deoxynivalenol**

Maximilian Wilhelm Casteel

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
-Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. E. Märtlbauer-

**Bedeutung von DUSP1 und Expression MAPKinasen-spezifischer  
Transkriptionsfaktoren während der zellulären Antwort auf  
Deoxynivalenol**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von  
Maximilian Wilhelm Casteel  
aus  
Aachen

München 2011

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Märtlbauer

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Breuer  
Univ.-Prof. Dr. Kaspers  
Univ.-Prof. Dr. Matiasek  
Univ.-Prof. Dr. Zerbe

Tag der Promotion: 12. Februar 2011

**Für Resi und Nene**

1	<b>Einleitung</b>	1
2	<b>Schrifttum</b>	3
2.1	Allgemeines	3
2.2	Bildung von DON	3
2.3	Physikalisch-chemische Eigenschaften	4
2.4	Biologische Eigenschaften von DON	4
2.4.1	Toxikokinetik von DON	7
2.5	Zelluläre Wirkungsmechanismen von DON	8
2.5.1	Einfluss von DON auf die Proteinsynthese	8
2.5.2	Einfluss von DON auf die Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signaltransduktionswege	10
2.5.2.1	Einfluss von DON auf die Expression/Aktivierung von MAPKs- spezifischen Transkriptionsfaktoren	13
2.5.2.2	Einfluss von DON auf die Induktion negativer Regulatoren der MAPK- Signaltransduktionswege	14
2.5.3	Apoptotisches Potential von DON	17
3	<b>Publikationen</b>	21
3.1	Induction of MAPK-dependent transcription factors by deoxynivalenol in human cell lines	21
3.2	Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2	35
4	<b>Diskussion</b>	54
4.1	Expression MAPKinasen-abhängiger Transkriptionsfaktoren durch DON in verschiedenen humanen Zelllinien	54
4.2	Bedeutung der DUSP1 für das apoptotische Potential von DON in der human epithelialen Leberzelllinie HepG2	59
5	<b>Zusammenfassung</b>	66
6	<b>Summary</b>	68
7	<b>Literaturverzeichnis</b>	70

## Abkürzungsverzeichnis

---

15-AcDON	15-Acetyldeoxynivalenol
3-AcDON	3-Acetyldeoxynivalenol
AP-1	Activated protein 1
ATF3	Activating transcription factor 3
CREB	cAMP responsive element-binding protein
CXCL-8	CXC chemokine ligand 8
DOM-1	De-epoxy-deoxynivalenol
DON	Deoxynivalenol
DUSP1	Dual specificity phosphatase 1
EGR-1	Early growth response protein 1
ERK	Extracellular signal regulated kinase
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
FOSL2	Fos-like antigen 2
GTPase	Guanidine triphosphatase
HCK	Hemopoietic cellular kinase
HSP27	Heat shock protein 27
IGF	Insulin-like growth factor
IGFALS	Insulin-like growth factor acid-labile subunit
iNOS	Inducible nitric oxide synthase
JNK	C-Jun N-terminal kinase
JUN	Jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog
LD	Letale Dosis
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases

## Abkürzungsverzeichnis

---

MAPKAPK2 (MK2)	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2
MEK1/2	Mitogen-activated protein kinase kinase 1/2
MKP-1	Mitogen-activated protein kinase phosphatase 1
PAK	p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase
PI	Propidiumiodid
PKR	Double-stranded RNA-dependent protein kinase
PSI	Protein synthesis inhibition
RSK	Ribosomal S6 kinase
SCF	Scientific Committee on Food of the European Commission
siRNA	Short interfering RNA
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
TDI	Tolerable daily intake
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$

# 1 Einleitung

Deoxynivalenol (DON) ist das weltweit am häufigsten nachgewiesene Mykotoxin in Nahrungs- und Futtermitteln (Canady et al. 2001). Es gehört zu den Typ B Trichothecenen, die während des Sekundärstoffwechsels einer Reihe von pflanzenpathogenen Pilzen gebildet werden. Die größte Bedeutung spielt hierbei die Gattung *Fusarium*, in Europa vornehmlich *F. culmorum* und *F. graminearum*, die während der Blüte, begünstigt durch feucht-warmes Wetter, Getreidepflanzen befallen und hohe Mengen an DON produzieren können (Rocha et al. 2005). In den letzten Jahren konnte eine steigende Inzidenz der partiellen Taubährigkeit beim Weizen und der Kolbenfäule beim Mais beobachtet werden (Marchand et al. 2008). Verantwortlich hierfür scheinen sowohl klimatische als auch veränderte agrarwirtschaftliche Anbauverfahren zu sein (Paterson und Lima 2009; Hope et al. 2005). Dies führt neben den hierbei entstehenden wirtschaftlichen Verlusten auch zu einer zunehmenden Toxinbelastung von getreidehaltigen Lebensmitteln und somit zu einer verstärkten chronischen Exposition des Verbrauchers (Pestka 2010).

Berichte über akut verlaufende Vergiftungen beim Menschen hervorgerufen durch die Aufnahme DON belasteter Lebensmittel stammen überwiegend aus Asien. Unter den heutigen Lebensbedingungen können akute Intoxikationen in industrialisierten Staaten jedoch ausgeschlossen werden. Bei DON handelt es sich um ein chemisch-physikalisch sehr stabiles Molekül, das während der Verarbeitung von Getreide, sowie bei der Lebensmittelherstellung nicht zerstört wird. Somit ist das Risiko einer chronischen Exposition des Menschen auf geringem Konzentrationsniveau sehr hoch (Hazel und Patel 2004). Um den Verbraucher zu schützen, wurden innerhalb der EU Höchstmengenregelungen für DON in Getreide verabschiedet. Die derzeitigen Höchstmengen in getreidehaltigen Lebensmitteln liegen zwischen 1250 und 1750 µg DON/kg (Verordnung 1126/2007).

*In vivo* Studien an Tieren konnten zeigen, dass die chronische Aufnahme DON-kontaminierten Futters vor allem zu Störungen des Immunsystems und Wachstumsdepression führt (Dänicke et al. 2004; Pestka und Amuzie 2008). Auf molekularer Ebene konnte mittels *in vitro* Studien sowohl eine Proteinsynthese-hemmende Wirkung als auch eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs) nachgewiesen werden (Ehrlich und Daigle 1987; Shifrin und Anderson 1999). Die MAPKs nehmen über die Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Regulation der Proliferation, Differenzierung,



Migration, Apoptose, sowie Chemokin- und Zytokinsynthese und sind somit ein essentieller Bestandteil der stimulusspezifischen Zellantwort (Johnson und Lapadat 2002).

Um die Bedeutung der MAPK-Pathways in der zellulären Antwort auf DON zukünftig besser einschätzen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, sowohl die Rolle der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren als auch die Rolle negativer Regulatoren der MAPK-Pathways näher zu beleuchten. Bislang sind nur wenige Daten über die Expression MAPKs-spezifischer Transkriptionsfaktoren unter DON-Exposition verfügbar (Nielsen et al. 2009). Dabei sind letztlich diese Faktoren verantwortlich dafür, dass transiente Signale der Zellmembran in langfristige Änderungen der Genexpression umgesetzt werden (Barnes 2006) und stellen somit wichtige Faktoren in der adäquaten Zellantwort dar. Durch die Transkriptionsfaktoren wird auch die Expression negativer Regulatoren der MAPK-Pathways eingeleitet und somit ein Überschießen der zellulären Antwort auf externe Stimuli verhindert. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zum einen die DON-induzierte Expression von MAPKs-abhängigen Transkriptionsfaktoren in verschiedenen humanen Zelllinien unterschiedlicher geweblicher Herkunft detaillierter zu untersuchen und zum anderen zu überprüfen, welche Rolle negative Regulatoren des MAPK-Pathways, insbesondere Dual-spezifische Phosphatasen, bei der zellulären Antwort auf eine DON-Exposition spielen.

---

Die Arbeit wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs „Funktionale Genomforschung in der Tiermedizin“ (GRK1029) durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.

## 2 Schrifttum

### 2.1 Allgemeines

Deoxynivalenol (DON) ist das weltweit am häufigsten nachgewiesene Mykotoxin in Nahrungs- und Futtermitteln. Um hieraus resultierende Risiken für den Verbraucher besser einschätzen zu können, besteht seit der erstmaligen Isolierung von DON Anfang der siebziger Jahre ein großes Interesse an der Aufklärung seiner biologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften. Trotz umfangreicher Gutachten und Risikobewertungen durch nationale und internationale Gremien wie das gemeinsame FAO/WHO Expertenkomitee (JOINT FAO/WHO EXPERT COMMITTEE ON FOOD ADITIVES; JECFA, 2001) oder dem SCF (SCIENTIFIC COMMITTEE ON FOOD; 1999 und 2003) sind zahlreiche biologische Eigenschaften, insbesondere Details zum Wirkungsmechanismus auf zellulärer Ebene bislang ungeklärt.

### 2.2 Bildung von DON

DON wird in Europa von potenten pflanzenpathogenen Fusarien, insbesondere *Fusarium graminearum* und *Fusarium culmorum*, gebildet, die während der Blüte begünstigt durch Niederschläge vorwiegend Weizen und Mais befallen (Hope et al. 2005; Lacey et al. 1999). Neben ihrer Fähigkeit hohe Konzentrationen von Toxinen zu produzieren und der daraus resultierenden Gefahr für den Verbraucher, führen sie zu großen wirtschaftlichen Verlusten in der Agrarwirtschaft als Verursacher der partiellen Taubährigkeit beim Weizen und der Kolbenfäule beim Mais. Aufgrund seiner Anpassung an kühle bis gemäßigte Klimazonen war *F. culmorum* lange Zeit die dominierende Fusarium-Spezies in Mittel- und Nordeuropa. Die klimatischen Veränderungen der letzten Jahre mit zunehmend feucht-warmen Frühsommer-Monaten führten jedoch zu einer rasanten Ausbreitung von *F. graminearum*, dessen Vorkommen lange Zeit auf den südlichen Teil Europas beschränkt war (Xu und Berrie 2005; Xu et al. 2008). Ein weiterer wichtiger Faktor für die rasche Ausbreitung von *F. graminearum* ist die hohe Empfänglichkeit der in Mitteleuropa angebauten Weizen-Kultivaren und Mais-Hybriden. So können in Abhängigkeit von den klimatischen Bedingungen Konzentrationen von mehr als 5 mg/kg DON in Weizen und Mais nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass es sich bei DON um ein chemisch-physikalisch sehr stabiles Molekül handelt, welches während Lagerung, Mahlprozessen, Erhitzen und weiteren Produktionsschritten von

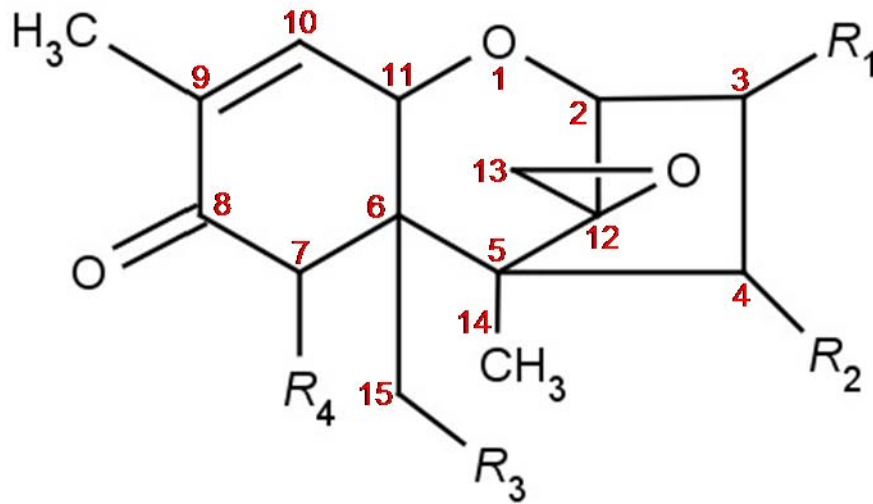
Lebens- und Futtermitteln nicht zerstört wird (Hazel und Patel 2004), scheint die Entwicklung von resistenten Weizen-Kultivaren und Mais-Hybriden gegen *F. graminearum* und *F. culmorum* ein entscheidender Schlüssel für die Reduktion von DON in getreidehaltigen Lebens- und Futtermitteln zu sein (Schmolke et al. 2005).

### **2.3 Physikalisch-chemische Eigenschaften**

DON ( $3\alpha,7\alpha,15$ -trihydroxy-12,13-epoxytrichothec-9-en-8-on) ist ein chemisch und physikalisch stabiles Molekül, welches während der verschiedenen Produktionsschritte von Lebens- und Futtermitteln nicht zerstört wird (Bretz et al. 2006; Hazel und Patel 2004). Es gehört zu den Trichothecen, einer großen Gruppe von Mykotoxinen, die eine gemeinsame 12,13-Spiroepoxy-Sesquiterpenoid-Grundstruktur (Abb. 1) aufweisen. Die Epoxidgruppe ist verantwortlich für die biologische Wirksamkeit der Verbindung, insbesondere für die Proteinsynthese-hemmende Wirkung (Pestka 2008). Aufgrund unterschiedlicher Substituenten lassen sich die bisher isolierten 180 Trichothecene in vier Gruppen einteilen (Typ A-D). DON zählt aufgrund seiner Carbonylgruppe an C<sub>8</sub> zu den Typ B Trichothecen. Weiterhin lassen sich zu dieser Gruppe seine biosynthetischen Vorstufen 3- bzw. 15-AcetylDON, sowie Nivalenol und Fusarenon X zählen. Einen Überblick über die Strukturformel wichtiger Typ B Trichothecene, sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften von DON gibt Abb. 1.

### **2.4 Biologische Eigenschaften von DON**

DON konnte erstmalig 1972 von japanischen Wissenschaftlern aus Getreide im Zusammenhang mit einer Lebensmittelintoxikation beim Menschen isoliert werden (Morooka et al. 1972). Kurze Zeit später wiesen amerikanische Wissenschaftler ein von seiner Struktur her identisches Toxin in mit *F. graminearum* kontaminiertem Mais nach, das bei Schweinen starkes Erbrechen ausgelöst hatte und gaben ihm den Namen Vomitoxin (Vesonder et al. 1973). Der Name Vomitoxin findet bis heute als Trivialbezeichnung für DON Verwendung.



Toxin	R1	R2	R3	R4
DON	OH	H	OH	OH
3-AcetylDON	OCOCH <sub>3</sub>	H	OH	OH
15-AcetylDON	OH	H	OCOCH <sub>3</sub>	OH
3,15-DiacetylDON	OCOCH <sub>3</sub>	H	OCOCH <sub>3</sub>	OH
Nivalenol	OH	OH	OH	OH
Fusarenon X	OH	OCOCH <sub>3</sub>	OH	OH

Summenformel:	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> O <sub>6</sub>
Molekulargewicht:	296,3
Schmelzpunkt:	151-153°C
Absorptionsmaximum:	218 nm
Molarer Extinktionskoeffizient (ε): in Methanol (218 nm)	6400

**Abbildung 1:** Strukturformel wichtiger Typ B Trichothecene, sowie physikalisch-chemische Eigenschaften von DON

In den folgenden Jahren wurden regelmäßig Lebensmittelintoxikationen beschrieben, für die DON verantwortlich gemacht wurde. Einer der größten Ausbrüche fand 1991 in China statt.

Von Juni bis Oktober erkrankten insgesamt 130 000 Menschen nach der Aufnahme von verdorbenem Mais, Weizen und Gerste. Als Leitsymptome wurden Abdominalschmerz, Nausea, Vomitus, Apathie und Fieber beschrieben. Eine anschließende Untersuchung des verdorbenen Getreides ergab eine hohe Belastung mit DON. Die höchsten Konzentrationen wurden im Mais (Mittelwert 10728 µg/kg, Maximalwert 21200 µg/kg) gefolgt von Weizen (Mittelwert 7044 µg/kg, Maximalwert 51450 µg/kg) und Gerste (Mittelwert 1827 µg/kg, Maximalwert 3521 µg/kg) gefunden. Neben DON konnten zwei weitere Fusarien-Toxine (Zearalenon und Fumonisin) nachgewiesen werden, jedoch in weitaus geringeren Konzentrationen (Li et al. 1999). Zudem konnten bei einem Ausbruch in Indien weitere Symptome wie Schlundirritationen und blutiger Stuhl beobachtet werden. Auch hier wurden im belasteten Weizen weitere Fusarien-Toxine, wiederum in wesentlich geringeren Konzentrationen, identifiziert (Bhat et al. 1989; Miller 2008). Den bisher beschriebenen Ausbrüchen ging immer ein verregneter Frühsommer voraus, wodurch das Wachstum Trichothecen-bildender Fusarien stark begünstigt wurde. Fraglich bleibt, inwieweit DON allein für die beschriebenen Symptomatiken verantwortlich gemacht werden kann. Synergistische Wechselwirkungen sind aufgrund der Tatsache, dass Fusarien verschiedene Toxine gleichzeitig produzieren können, nicht auszuschließen. Bis heute sind wenige Studien bekannt, die Kombinationen von häufig gemeinsam auftretenden Mykotoxinen auf den Organismus untersuchten (Speijers und Speijers 2004). Um diese Frage klären zu können, müssen zunächst die Toxizitätsmechanismen der Einzeltoxine genauer erforscht werden, damit zukünftig sinnvolle Rückschlüsse auf synergistische Wechselwirkungen getroffen werden können. Allerdings veröffentlichte das SCF im Jahre 2002 ein Gutachten, das einen Synergismus von Einzeltoxinen als unwahrscheinlich einstufte, dabei wurde jedoch auch die limitierte Datenlage bemängelt.

Akut verlaufende Intoxikationen, die hohe Konzentrationen von DON erfordern, treten beim Menschen unter den heutigen Lebensbedingungen in industrialisierten Staaten nicht mehr auf. Eine umfangreiche Studie (SCOOP 2003) kam jedoch zu dem Ergebnis, dass in Abhängigkeit von vielen Faktoren – wie z.B. Verzehrsgewohnheiten, geographische Herkunft – in der europäischen Bevölkerung der TDI von 1 µg/kg KGW bei Erwachsenen um bis zu 46,1 % und bei Kindern um bis zu 95,9 % überschritten wird.

Die in zahlreichen Fütterungs- und anderen Tierversuchen erhobenen Daten zur Toxizität der Trichothecene sind in den bereits erwähnten Monographien des SCF (1999, 2002) und des

JEFCA (2001) detailliert und umfassend dargestellt. Ein Überblick zur Toxizität von DON ist auch in den am Lehrstuhl angefertigten Dissertationen von Spindelböck (2004) und Nielsen (2009) zu finden. Weitere Informationen zur *in vivo* Toxizität von DON geben zudem die Übersichtsarbeiten von Pestka und Smolinski (2005) und Pestka (2008).

#### Akute/subakute Toxizität

Charakteristisch für akute Intoxikationen mit DON sind bei empfindlichen Spezies wie z. B. dem Schwein Vomitus, Anorexie, Salivation und Diarrhoe (Pestka und Smolinski 2005). Die orale Aufnahme von 100 µg/kg KGW führt bei Schweinen innerhalb weniger Minuten nach Futteraufnahme zu Erbrechen. Ab einer Dosis von 1-2 mg DON/kg Futter zeigen juvenile Schweine Anorexie, wahrscheinlich als Folge einer erhöhten zentralen Serotoninausschüttung (Prelusky 1996).

#### Subchronische/chronische Toxizität

Schweine, die über einen längeren Zeitraum mit DON-kontaminiertem Futter (2-4 mg/kg) gefüttert wurden, zeigten nach 8 Wochen verglichen mit der Kontrollgruppe deutliche Wachstumsdepression (Bergsjö et al. 1992 und 1993). Diese Beobachtungen konnten auch in neueren Arbeiten bestätigt werden (Döll 2003; Dänicke 2004).

### **2.4.1 Toxikokinetik von DON**

Zahlreiche Fütterungsversuche konnten in den letzten Jahren zeigen, dass zwischen verschiedenen Tierarten große Unterschiede in der Toxikokinetik bestehen. So ließen sich beim Schwein bis zu 82% des oral aufgenommenen DONs nach 15-30 min im Plasma nachweisen (Rotter et al. 1996; Eriksen et al. 2003). Vergleichbare Ergebnisse erbrachten Studien an Mäusen (Amuzie et al. 2008), in denen nach oraler Verabreichung von 25 mg DON/kg KGW innerhalb von 30 min hohe Konzentrationen von DON in verschiedenen Organen mittels ELISA nachgewiesen werden konnten (Niere > Herz > Plasma > Leber > Thymus > Milz > Gehirn). Bei einer chronischen Exposition, in der Schweine über einen Zeitraum von elf Wochen mit DON-haltigem Futter (0-1,23 mg/kg) gefüttert wurden, konnten v.a. Rückstände in der Galle gefolgt von Niere > Serum > Leber = Muskel (Döll et al. 2008) gefunden werden. Die nachweisbaren Konzentrationen lagen hierbei im Bereich von 144 ng/ml (Galle) bis 3 ng/g (Leber). Im Gegensatz hierzu sind die gemessenen DON-Konzentrationen im Plasma von Wiederkäuern und Wirtschaftsgeflügel während

Fütterungsversuchen wesentlich geringer. Sowohl bei Huhn und Pute als auch bei Rind und Schaf konnten nach oraler Aufnahme von DON nur 1% anschließend wieder im Plasma nachgewiesen werden (Prelusky et al. 1986; Gauvreau 2000). Der Grund hierfür scheint die Mikroflora des Gastrointestinaltraktes von Geflügel und Wiederkäuern zu sein, die einen Großteil des DONs über Deepoxidation zu De-epoxy-DON (DOM-1) detoxifizieren. Beim Schwein liegt das Verhältnis von toxischen DON zum atoxischen DOM-1 im Urin bei etwa 18 zu 1 (Razzazi-Fazeli et al. 2003). Ein Großteil des Toxins wird innerhalb von 24 h über den Urin und Faeces ausgeschieden (Eriksen et al. 2003).

## **2.5 Zelluläre Wirkungsmechanismen von DON**

### **2.5.1 Einfluss von DON auf die Proteinsynthese**

Das primäre zytotoxische Potential der 12,13-Epoxytrichothecene basiert auf ihrer Fähigkeit, die Proteinsynthese zu inhibieren (McLaughlin 1977; Ueno 1977). Eine Unterscheidung ist nach der Art ihrer Proteinsynthese-Inhibierung in drei Gruppen möglich (Cundliffe und Davis 1977). Trichothecene der ersten Gruppe (z. B. T-2 Toxin) inhibieren die Initiationsphase, wohingegen Trichothecene der zweiten und dritten Gruppe (z. B. DON) die Proteinsynthese auf Ebene der Elongation bzw. Termination blockieren. Des Weiteren unterscheiden sie sich deutlich in ihrer Potenz. Verantwortlich hierfür kann die große Diversität ihrer Seitenketten sein (Ueno 1973). Sie entscheiden letztlich über die physikochemischen Eigenschaften eines Moleküls und somit über die Fähigkeit der intrazellulären Akkumulation. Beispielhaft kann das potente Typ A Trichothecen T-2 Toxin genannt werden, das die Proteinsynthese in der Initiationsphase inhibiert (Thompson und Wannemacher 1986). Aufgrund seines Isovaleryl-Restes an C<sub>8</sub> und den beiden Acetoxygruppen an C<sub>4</sub> und C<sub>15</sub> handelt es sich um ein relativ unpolares Molekül, das in hohen Konzentrationen über die äußere Zellmembran in das Zytoplasma diffundieren kann (Ueno 1973). T-2 Toxin zählt neben den makrozyklischen Typ D Trichothecenen, Verrucarin A und Roridin A zu den potentesten, die Proteinsynthese inhibierenden Trichothecenen (Thompson und Wannemacher 1986). Beim Typ B Trichothecen DON handelt es sich hingegen aufgrund der Keto-Gruppe an C<sub>8</sub> und den freien Hydroxyl-Gruppen an C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub> und C<sub>15</sub> um ein deutlich polareres Molekül (Abb. 1). Vergleichende Studien ergaben, dass DON im Verhältnis zu T-2 Toxin (Protein synthesis inhibition 50 (PSI<sub>50</sub>) 6,7 ng/ml) ein deutlich geringeres Potential besitzt, die Proteinsynthese zu inhibieren (PSI<sub>50</sub> 444 ng/ml) (Thompson und Wannemacher 1986). Eine jüngst

durchgeführte Studie unter Verwendung von ausdifferenzierten Caco-2 Zellen bestätigte das geringe Proteinsynthese-hemmende Potential von DON. Geringe Konzentrationen (50 ng/ml) führten sogar zu einer Steigerung der Proteinsynthese, wohingegen eine Inhibition der Proteinsynthese um 50 % (PSI<sub>50</sub>) erst ab einer Konzentration von 5 µg/ml beobachtet werden konnte (De Walle et al. 2010). Fraglich bleibt, ob das zytotoxische Potential der Trichothecene einzig und allein auf ihre Fähigkeit die Proteinsynthese zu inhibieren, zurückgeführt werden kann. So zeigte das ebenfalls zu den Typ B Trichothecenen zählende Nivalenol *in vitro*, verglichen mit DON, eine noch geringere Fähigkeit die Proteinsynthese zu inhibieren. Die LD<sub>50</sub> in Mäusen nach intraperitonealer oder subkutaner Injektion war jedoch bei Nivalenol um ein fünffaches geringer als bei DON (Thompson und Wannemacher 1986). Dies würde dafür sprechen, dass neben den Proteinsynthese-hemmenden Effekten weitere Toxizitätsmechanismen vorliegen.

Im Jahre 1997 entdeckten Iordanov et al., dass Proteinsynthese-Inhibitoren wie Anisomycin, Blastidicin S, Ricin A und  $\alpha$ -Sarcin, die spezifisch mit der 28S rRNA eukaryotischer Zellen interagieren - die Proteinsynthese also auf Stufe der Elongation hemmen - zu einer Aktivierung der MKK4 und JNK führen. JNK (c-Jun N-terminale Kinase) stellt als eine der drei mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPKs) einen essentiellen Bestandteil der MAPK-Signaltransduktionswege dar und wird unter anderem als Indikator einer zellulären Stressantwort angesehen. Iordanov et al. bezeichneten diese Zellantwort daraufhin als „Ribotoxic stress response“ (Iordanov et al. 1997). In Ihrer Studie untersuchten sie auch die Proteinsynthese-hemmenden Eigenschaft von T-2 Toxin. T-2 Toxin besaß zwar die Fähigkeit, die Proteinsynthese rasch und vollständig zu blockieren, eine Aktivierung von JNK blieb jedoch aus. Aufgrund dieser Tatsache und weiteren Versuchsansätzen, in denen durch T-2 Toxin trotz Kombination mit JNK-aktivierenden Proteinsynthese-Inhibitoren keine Phosphorylierung von JNK induziert wurde, schlussfolgerten Iordanov et al., dass funktional aktive Ribosomen eine Grundvoraussetzung für die Aktivierung des JNK-Pathways sind. Dies wiederum würde bedeuten, dass Trichothecene, welche die Proteinsynthese auf Ebene der Elongation und Termination inhibieren, zu einer Aktivierung von JNK führen. Ungeklärt blieb jedoch, ob bei der Interaktion von Proteinsynthese-Inhibitoren mit der 28S rRNA und der Aktivierung des JNK-Pathways weitere Signaltransduktions-Schritte zwischengeschaltet sind.

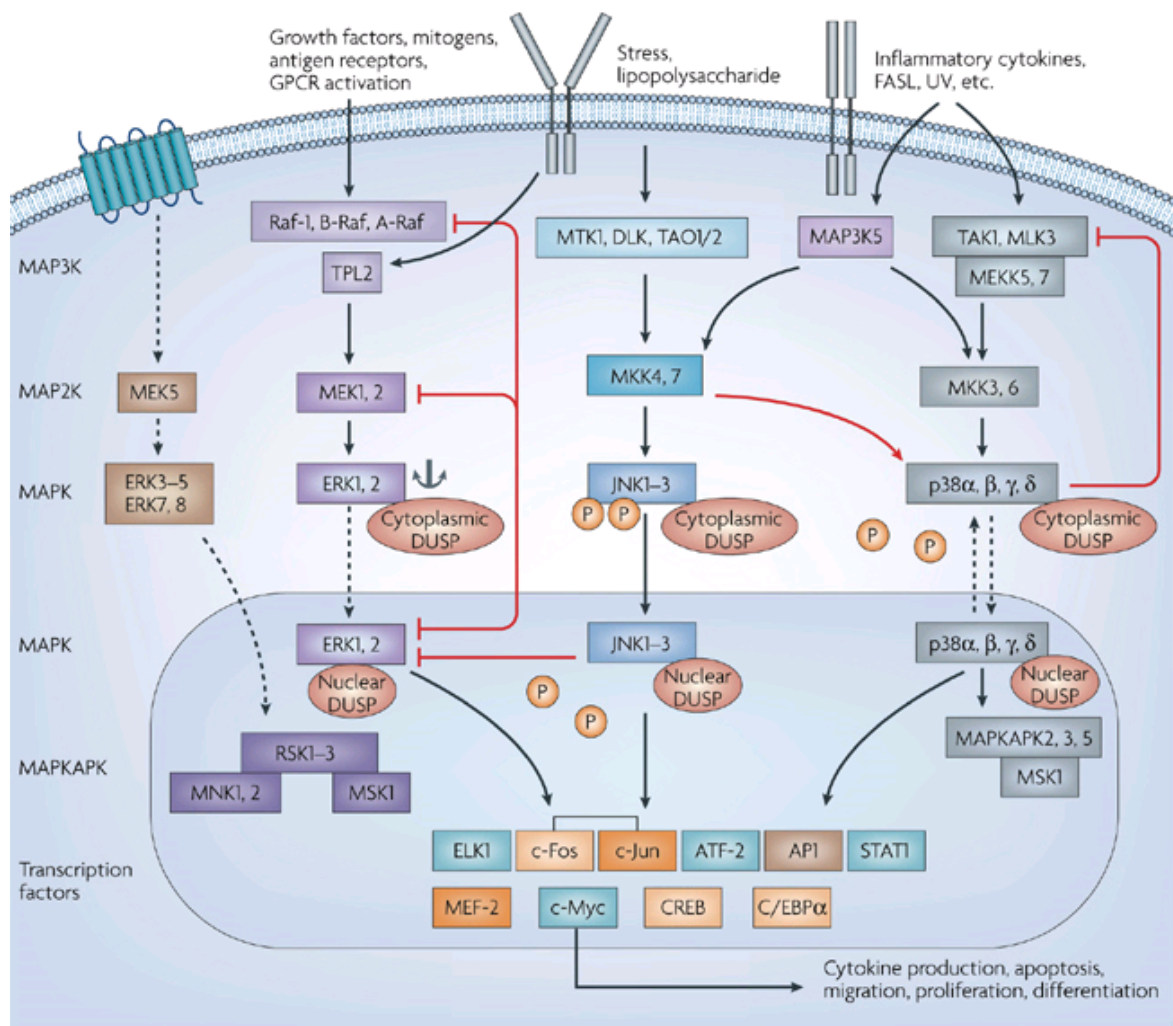


Shifrin und Anderson waren 1998 die ersten, die verschiedene Trichothecene gezielt auf ihre Fähigkeit hin untersuchten, den JNK-Pathway aktivieren zu können. Unter Verwendung von T-2 Toxin behandelten Zellen, bei denen nachweislich zu 98% keine funktional aktiven Ribosomen mehr vorlagen, kam es konzentrationsabhängig unter Anisomycin zu einer Aktivierung von JNK. Somit widerlegten sie die Hypothese von Jordanov et al., dass funktional aktive Ribosomen eine Grundvoraussetzung für die Aktivierung von JNK durch Proteinsynthese-Inhibitoren sind. Bei allen drei untersuchten Trichothecenen (Nivalenol, Scirpenol, T2-Toxin) konnten JNK-induzierende und nicht induzierende Derivate identifiziert werden. Beispielhaft seien hier T-2 Toxin, sowie seine Derivate T-2 Triol und T-2 Tetraol genannt. Sowohl T-2 Toxin als auch T-2 Triol inhibieren die Proteinsynthese auf Ebene der Initiation innerhalb von 20 min zu 95 - 98%. Unter T-2 Triol kommt es zeitgleich zu einem deutlichen Anstieg der JNK-Aktivität (12 fach), wohingegen eine Aktivierung unter T-2 Toxin ausbleibt (1,2 fach). Ein weiteres Derivat von T-2 Toxin, T-2 Tetraol, besitzt hingegen nur schwache Proteinsynthese-hemmende Wirkung (7%), führt aber zu einer deutlichen Aktivierung von JNK. Aus diesem Ergebnis kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass unterschiedliche Strukturbereiche der Toxine für die Proteinsynthese-Hemmung und JNK-Aktivierung verantwortlich sind. Fasst man die gewonnenen Erkenntnisse aus den verschiedenen Versuchsansätzen zusammen, deutet vieles darauf hin, dass der Schlüssel in der Diversität der Substituenten zu suchen ist. Sie könnten beispielsweise spezifisch mit ribosomalen Molekülen (z.B. Elongationsfaktoren) interagieren oder zu Konformationsänderungen der 28S rRNA führen. Aufgrund der wichtigen Funktion von JNK in der adäquaten Zellantwort auf externe Stimuli konzentrierten sich in der Folge viele Studien auf die Frage, welche Bedeutung den MAPK-Pathways in der zellulären Antwort auf Trichothecene zukommt (Junttila et al. 2008; Pestka 2010).

### **2.5.2 Einfluss von DON auf die Mitogen-aktivierten Proteinkinase Signaltransduktionswege**

Die MAPK-Pathways stellen ein zentrales molekulares Netzwerk einer jeden eukaryotischen Zelle dar (Dong et al. 2002; Johnson und Lapadat, 2002). Eine schematische Darstellung der Signalkaskaden ist Abb. 2 zu entnehmen. Sie regulieren eine Vielzahl von physiologischen Prozessen. Hierzu zählen Wachstum, Differenzierung, Proliferation und programmierter Zelltod (Junttila et al. 2008). Des Weiteren spielen sie eine bedeutende Rolle in der zellulären Antwort auf eine Vielzahl von physikalischen, chemischen und biologischen Noxen (Into und

Shibata 2005; Karahashi et al. 2009; Staples et al. 2010; Zhou et al. 2010). Man unterscheidet zwischen drei Haupt-Signaltransduktionswegen, deren zentrale Enzyme die MAPKs ERK1/2, JNK1/2 und p38 darstellen. Die Aktivierung der drei Pathways erfolgt meist über membranständige Rezeptoren. Der hierbei entstandene Ligand/Rezeptor-Komplex führt zu einer Autophosphorylierung von Tyrosin-Kinasen, die die Aktivierung von p21-aktivierten Kinasen (PAKs) oder niedermolekularen GTP-bindenden Proteinen einleiten (Hofmann et al. 2004; Pawson und Scott 1997). Es schließt sich eine Aktivierungskaskade von drei hintereinander geschalteten Kinasen an (MAPKK-Kinase → MAPK-Kinase → MAPK-Kinase). Hierbei kann jede MAPK-Kinase durch mehr als eine MAPKK-Kinase aktiviert werden, was ein Grund für die Komplexität und Diversität dieser Signaltransduktionswege ist. Die Kaskaden münden letztlich in der dualen Phosphorylierung eines Tyrosins und Threonins



Nature Reviews | Drug Discovery

**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der drei wichtigsten MAPK-Signaltransduktionswege ERK1/2, JNK1/2 und p38 (aus Jeffrey et al. 2007)

innerhalb des TXY-Motivs der entsprechenden MAPK. Diese aktivieren wiederum ihre Substrate durch Phosphorylierung eines Serins und Threonins. Zu den Substraten zählen Transkriptionsfaktoren (ATF/CREB, AP-1), Kinasen (Mapkapk2/MK2, RSK), mRNA-Stabilität vermittelnde Proteine und die Translation kontrollierende Proteine. Aufgrund ihrer zahlreichen Downstream-Targets nehmen sie entscheidenden Einfluss auf eine Vielzahl von bedeutenden Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen.

Der ERK1/2-Pathway kann durch eine Vielzahl von Faktoren induziert werden. Hierzu zählen in erster Linie Wachstumsfaktoren und Zytokine. Die meisten Studien konnten zeigen, dass ihm eine wichtige Rolle bei Wachstum, Proliferation und Induktion anti-apoptotischer Signalkaskaden zukommt (Ballif und Blenis 2001; Johnson and Lapadat 2002; Rubinfeld und Seger 2005). Der JNK- und p38-Pathway werden hingegen überwiegend durch pro-inflammatorische Zytokine, Mitogene und zahlreiche Formen von Stress induziert (Kyriakis und Avruch 2001), weshalb sie häufig auch als Stress-aktivierte Protein Kinasen (SAPKs) bezeichnet werden. Im Fall von p38 sind bis heute vier Isoformen nachgewiesen worden, wobei p38 $\alpha$  bisher die größte Bedeutung beigemessen wurde (Coulthard et al. 2009). Im JNK-Pathway sind vor allem die Isoformen 1 und 2 von Bedeutung. Die meisten Stimuli führen zu einer simultanen Aktivierung beider Pathways (Cuevas et al. 2007). Der Grund hierfür liegt in der geringen Spezifität der MAPKK-Kinasen, wodurch eine klare Trennung beider Pathways nicht immer möglich erscheint. Des Weiteren besitzt auch die MAPK-Kinase MEK4 (Abb. 2) eine Affinität sowohl gegenüber JNK1/2 als auch gegenüber p38 $\alpha$  (Ganiatsas et al. 1998). Beide regulieren über die Aktivierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren sowohl die Zellproliferation und -differenzierung als auch den programmierten Zelltod. Allein der p38-Pathway hat Einfluss auf die Regulation von nahezu 100 Genen (Ono und Han 2000). Durch Induktion der Synthese zahlreicher Chemo- und Zytokine spielen sie zudem eine entscheidende Rolle in der zellulären Abwehr (Chen et al. 2001). Des Weiteren besitzen sie - unabhängig von der Induktion zahlreicher Transkriptionsfaktoren - die Fähigkeit, direkten Einfluss auf die Zellhomöostase zu nehmen. Beispielsweise konnten verschiedene Studien zeigen, dass JNK mittels Phosphorylierung die Aktivität von pro- und anti-apoptotischen mitochondrialen Proteinen reguliert. Hierbei wird das Gleichgewicht zugunsten der pro-apoptotischen Proteine verschoben und dadurch eine intrinsische mitochondriale Apoptose ausgelöst (Letai et al. 2002; Marani et al. 2002; Donovan et al. 2002).

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Studien konnten zeigen, dass DON zu einer raschen Aktivierung aller drei MAPKs-Kaskaden führt (Moon und Pestka 2002; Zhou et al. 2003b). Der Serin/Threonin Protein Kinase R (PKR) wird hierbei eine große Bedeutung beigemessen. PKR wird von einer Vielzahl von Geweben exprimiert und fungiert als Signal-Integrator der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Pathways (Balachandran und Barber 2007; Williams 2001). Zhou und Kollegen (2003b) konnten mittels einer *in vitro* Studie zeigen, dass die Aktivierung der MAPKs durch DON unter Inhibition der PKR deutlich reduziert ist. Pestka (2010) sieht sie als entscheidendes Bindeglied zwischen der Schädigung ribosomaler RNA und der Aktivierung der MAPK-Pathways. Ein weiteres wichtiges Protein für die Aktivierung der MAPKs von immunkompetenten Zellen durch DON ist die Hämatopoetische Zell-Kinase (Hck) (Zhou et al. 2005; Bae et al. 2010). Auch hier kommt es nach Inhibition der Hck mittels short interfering RNA (siRNA) zu einer Reduktion der DON-induzierten MAPKs Aktivierung.

Trotz Unterschieden in der Empfindlichkeit verschiedener Zelltypen gegenüber DON bestehen große Gemeinsamkeiten in dem zeitlichen Verlauf der MAPKs Aktivierung. Sowohl in immunkompetenten Zellen als auch in Zellen epithelialen Ursprungs kommt es unter DON zu einer lange anhaltenden Aktivierung von ERK1/2 und p38. Die Aktivität von JNK1/2 unter DON unterliegt hingegen einer strikten zellulären Regulation und ist nur transient nachweisbar (Moon and Pestka 2002; Nielsen et al. 2009; Sergent et al. 2006). Welche Bedeutung diesem für DON spezifischen Induktionsmuster in der zellulären Antwort zukommt, ist bis heute weitgehend ungeklärt.

### **2.5.2.1 Einfluss von DON auf die Expression/Aktivierung von MAPKinasen-spezifischen Transkriptionsfaktoren**

Die Aktivierung der MAPKs unter DON resultiert u. a. in einer signifikanten Hochregulation der Expression und Aktivierung von Transkriptionsfaktoren. Transkriptionsfaktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Zielgenen (z.B. Chemokine und Zytokine). Beispielhaft sei die Studie von Moon et al. (2007) genannt. Sie konnten für die humane Darmepithel-Zell-Linie Int-407 zeigen, dass die DON-induzierte Aktivierung von ERK1/2 zu einer gesteigerten Expression des Transkriptionsfaktors EGR-1 (early growth response 1) führte, der wiederum entscheidenden Einfluss auf die Expression von CXCL-8 hatte (DON → ERK1/2↑ → EGR-1↑ → CXCL-8↑). Zahlreiche Studien der letzten Jahre haben jedoch

gezeigt, dass ein Großteil der Transkriptionsfaktoren unterhalb der MAPK-Pathways meist durch mindestens zwei MAPKs reguliert wird und dies auch immer abhängig von dem verwendeten Zelltyp ist. Nielsen et al. (2009) beobachteten in der permanenten Leberzelllinie HepG2 eine deutliche DON-induzierte Hochregulation der mRNA Expression von JUN (JUN avian sarcoma virus 17 oncogene homolog) und FOS (fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog), wobei JUN der am stärksten und längsten induzierte Transkriptionsfaktor war. *In vivo* Studien von Kinser et al. (2004) erbrachten ähnliche Ergebnisse. Bei den Faktoren handelt es sich um bZIP (basic region-leucine zipper) Proteine, die entweder als Homodimere (z.B. JUN/JUN) oder Heterodimere (z.B. JUN/FOS) den Transkriptionsfaktor AP-1 (activating protein-1) bilden (Shaulin 2010). Die Kombination dieser Proteine, an deren Regulation alle drei MAPKs beteiligt sind, entscheidet hierbei über die Affinität und Spezifität und somit über das Spektrum der Zielgene von AP-1. AP-1 wiederum kann mit weiteren Proteinen (z.B. Proteine der Ets oder Smad Familien) interagieren, wodurch die Affinität und Spezifität gegenüber seinen Zielgenen wiederum beeinflusst wird (Shaulian und Karin 2002; Shaulian 2010). Aufgrund dieser Eigenschaft und der Tatsache, dass immer Zelltyp-spezifische Variationen berücksichtigt werden müssen, ist es schwierig, verallgemeinernde Aussagen über die Rolle von AP-1 zu treffen. Eine wichtige Rolle von AP-1 in der Kontrolle von Proliferation und Apoptose konnte jedoch in einer Vielzahl von *in vivo* und *in vitro* Studien belegt werden.

*In vivo* durchgeführte Studien von Amuzie et al. (2009 und 2010) deuten darauf hin, dass neben den AP-1 Dimeren auch die Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (signal transducer and activator of transcription) eine wichtige Rolle in der DON-induzierten Zellantwort spielen. Sie konnten einen signifikanten Gewebe-spezifischen Anstieg der Expression mehrerer Mitglieder der SOCS-Familie (suppressor of cytokine signaling) nachweisen. SOCS-Proteine fungieren als negative Regulatoren des über Zytokine, Wachstumshormone und Wachstumsfaktoren induzierten JAK/STAT-Pathway (Douglas und Bunn 2009; Piessevaux et al. 2008). Die Expression erfolgt in Form eines klassischen negativen Feedback-Mechanismus durch die Mitglieder der STAT-Familie. Ob den SOCSs - wie von Amuzie et al. (2009 und 2010) postuliert - tatsächlich eine Bedeutung bei der unter Aufnahme von DON-kontaminiertem Futter beobachteten Wachstumsdepression bei Monogastriern beigemessen werden kann, muss in weiteren Studien geklärt werden.

### **2.5.2.2 Einfluss von DON auf die Induktion negativer Regulatoren der MAPK-Signaltransduktionswege**

Aufgrund der oben erwähnten transienten Aktivierung von JNK1/2 unter DON-Exposition sowohl in immunkompetenten als auch in Zellen epithelialen Ursprungs (Moon and Pestka 2002; Nielsen et al. 2009; Sergent et al. 2006) ist es von entscheidender Bedeutung, neben den induzierenden Kinasen die Rolle negativer Regulatoren des MAPK-Pathways im DON induzierten Geschehen näher zu untersuchen. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei die Vertreter der Klasse 1 der dual-spezifischen Phosphatasen (DUSPs), die über Hydrolyse der Phosphoesterbindung des Tyrosins und Threonins innerhalb des konservierten TXY Motif im regulatorischen Loop der MAPKs und der damit verbundenen Inaktivierung entscheidenden Einfluss auf die Stimulus-spezifische Zellantwort nehmen (Wang und Liu 2007). Die Aktivierung der DUSPs erfolgt in Form eines klassischen negativen Feedback-Mechanismus. Hierbei passieren die aktivierten MAPKs die Kernmembran und phosphorylieren die für sie spezifischen Transkriptionsfaktoren, die neben der Transkription von wichtigen zellulären Proteinen und Zytokinen die Expression von DUSPs einleiten (Farooq und Zhou 2004). Bis heute sind zehn DUSPs (Tab. 1) mit einer gemeinsamen MAPKs Bindungs-Domäne in humanen Zellen identifiziert worden (Owens und Keyes 2007), die sich aufgrund ihrer Substratspezifität oder ihrer zellulären Lokalisation in drei Gruppen einteilen lassen (Jeffrey et al., 2007).

Keyes und Emslie konnten den ersten Vertreter dieser Familie 1992, in Form der DUSP1 (CL100, MKP-1), mittels oxidativem Stress und Hitze-Schock in humanen Zellen nachweisen. Die rasche Detektion auf Protein-Ebene - innerhalb von 30-120 min nach Behandlung der Zellen – ließ den Schluss zu, dass es sich um ein „immediate early gene“ handelt. Studien konnten zeigen, dass DUSP1 von nahezu allen Zellen eukaryotischen Ursprungs exprimiert werden kann (Salojin et al. 2006; Misra-Press et al. 1995). Anfänglich war man der Annahme, dass DUSP1 ausschließlich eine Affinität zu ERK1/2 besitzt (Zheng und Guan 1993; Sun et al. 1993). Spätere Studien ergaben jedoch, dass die höchste Affinität gegenüber den MAPKs JNK1/2 und p38 besteht (Chu et al. 1996; Franklin und Kraft 1997; Hammer et al. 2006; Chi et al. 2006). Die Regulation der DUSP1 erfolgt sowohl auf posttranskriptionaler (Kuwano et al. 2008) als auch auf posttranslationaler Ebene (Brondello

**Tabelle 1:** Wichtige Dual-spezifische Phosphatasen (DUSPs) in eukaryotischen Zellen

DUSP	Synonyme	Subzelluläre Lokalisation	Substratspezifität
DUSP1	MKP1, CL100	Nukleus	JNK, p38 > ERK
DUSP2	PAC-1	Nukleus	ERK, p38
DUSP4	MKP2	Nukleus	JNK, p38, ERK
DUSP5	hVH3	Nukleus	ERK
DUSP6	MKP3	Zytoplasma	ERK
DUSP7	MKP-X	Zytoplasma	ERK
DUSP9	MKP4	Zytoplasma	ERK > p38
DUSP8	hVH5	Zytoplasma/Nukleus	JNK, p38
DUSP10	MKP5	Zytoplasma/Nukleus	JNK, p38
DUSP16	MKP7	Zytoplasma/Nukleus	JNK, p38

et al. 1999). Jacobs et al. (1999) identifizierten eine ERK1/2 spezifische Bindungsstelle innerhalb der DUSP1, die nach Komplexbildung (DUSP1/ERK) eine Phosphorylierung der DUSP1 durch ERK1/2 ermöglicht (Brondello et al. 1999), wodurch eine frühzeitige Degradierung über das Ubiquitin-Proteasom-System verhindert wird (Choi et al. 2006). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass über die Bindung mit ihren Substraten (JNK1/2, p38, ERK1/2), die katalytische Aktivität der DUSP1 um ein 6 bis 8-faches gesteigert wird (Hutter et al. 2000; Slack et al. 2001). Die Bindung ihrer Substrate erfolgt über die Bindungsdomäne KIM (kinase interaction motif) im N-terminalen Bereich des Proteins. Für die sich anschließende Dephosphorylierung der MAPKs ist die katalytische Domäne im C-terminalen Bereich von entscheidender Bedeutung (Farooq und Zhou 2004). Aufgrund ihrer hohen Affinität gegenüber JNK1/2 und p38 (JNK1/2, p38 > ERK1/2) wurde die DUSP1 schnell als Schlüsselregulator dieser Signaltransduktionswege angesehen.

Shepherd et al. (2004) studierten mittels Peptidoglykanen in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 den Einfluss der DUSP1 auf die Aktivität der MAPKs und die Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Sie konnten zeigen, dass eine Degradierung der DUSP1 mRNA mittels siRNA zu einer verlängerten Aktivierung der MAPKs (JNK1/2 und p38) und einer gesteigerten Expression der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  führte. Eine Vektorvermittelte DUSP1 Überexpression führte hingegen zu einer ausbleibenden Aktivierung der MAPKs (JNK1/2 und p38) und einer deutlich verminderten Expression von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Hammer et al. (2006) untersuchten die Bedeutung der DUSP1 als Regulator der LPS-

vermittelten Immunantwort mittels einer *in vivo* Studie. Hierbei zeigten DUSP1 knock-out Mäuse, verglichen zum Wildtyp, unter subletalen Dosen von LPS (25 mg/kg KGW) eine überschießende Expression der Zytokine IL-6 und TNF- $\alpha$ . Nach 48 h lag die Letalität durch Endotoxin-Schock in der DUSP1 knock-out Gruppe bei 100%, während in der Kontrollgruppe über 90% der Tiere überlebten. Verschiedene Studien, welche die anti-inflammatorischen Wirkungen des Glukokortikoids Dexamethason untersuchten, ergaben, dass Dexamethason eine rasche und anhaltende Aktivierung der DUSP1 induziert (Clark 2003). Knock-out Studien belegen, dass die DUSP1 entscheidenden Einfluss auf die Dexamethason vermittelte Regulation zahlreicher inflammatorischer Mediatoren hat (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , CXCL1, COX-2) (Abraham et al. 2006). Neben der DUSP1-abhängigen konnte jedoch auch eine DUSP1-unabhängige anti-inflammatorische Wirkung von Dexamethason nachgewiesen werden. So inhibierte Dexamethason unter DUSP1 knock-out die LPS-induzierte Expression der Zytokine CSF2 und IL-12p40. Wang et al. (2008) führten *in vivo* Studien mit Dexamethason vorbehandelten DUSP1 knock-out Mäusen unter LPS Verabreichung durch. Hierbei zeigte sich, dass die Letalität von DUSP1 knock-out Mäusen, trotz intra-peritonealer Vorbehandlung mit Dexamethason nach LPS Applikation (20 mg/kg KGW i.p) signifikant höher war als in der entsprechenden Kontrollgruppe. Sie konnten somit die Ergebnisse von Abraham et al. (2006) bestätigen, dass die Expression der DUSP1 eine wichtige Rolle in der Dexamethason-vermittelten Regulation der Immunantwort spielt. Salojin et al. (2006) konnten anhand eines etablierten Mausmodells für rheumatoide Arthritis zeigen, dass DUSP1 knock-out Mäuse wesentlich anfälliger für Kollagen-induzierte Arthritis waren als der Wildtyp. Aufgrund der Tatsache, dass es unter Fütterung einer fettreichen Diät und der hieraus resultierenden Ausbildung einer Adipositas bei Mäusen zu einer deutlich verstärkten Aktivierung der drei MAPKs kommt (Hirosumi et al. 2002; Leng et al. 2004; Gum et al. 2003; Bost et al. 2005), untersuchten Wu et al. (2006) den Einfluss der DUSP1 auf die Regulation von Fett-Diät induzierter Adipositas mittels eines DUSP1 knock-out-Mausmodells. Die Studien ergaben, dass DUSP1 knock-out Mäuse resistent gegenüber einer Fett-Diät induzierten Adipositas sind, wobei eine verminderte Größe der Adipozyten beobachtet wurde. Dies könnte darauf hindeuten, dass der DUSP1 eine wichtige Kontrollfunktion in der Lipid-Homöostase zukommt.

Bis heute gibt es keine Studien über die Bedeutung der DUSPs für die zelluläre Antwort auf DON, mit Ausnahme einer Microarray-Studie, in der eine signifikante Hochregulation der



DUSP1 mRNA Expression in der Milz von B6C3F1 Mäusen nach oraler Fütterung von hohen Dosen DON nachgewiesen wurde (Kinser et al. 2004).

### **2.5.3 Apoptotisches Potential von DON**

Untersuchungen zum apoptotischen Potential von Trichothecenen waren zentraler Bestandteil zahlreicher *in vivo* Studien (Ihara et al. 1997; Islam et al. 1998; Miura et al. 1998; Shinozuka et al. 1997). Immunkompetente Zellen weisen, verglichen mit Zellen epithelialen Ursprungs, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber DON auf (Shifrin und Anderson 1998; Pestka et al. 1994; Pestka et al. 2005; Bensassi et al. 2009; Maresca et al. 2002; Königs et al. 2008). So wurde in den Colonkarzinom-Zelllinien HT29 (Bensassi et al. 2009) bzw. CaCo-2 (Konadio et al. 2007) erst ab Konzentrationen von 3 µg/ml DON die Induktion von Apoptose nachgewiesen (Bensassi et al. 2009). Im Gegensatz hierzu konnten Zhou et al. (2003b und 2005) in der murinen Makrophagen-Zelllinie RAW264.7 schon ab Konzentrationen von 250 ng/ml DON eine deutliche Aktivierung der Apoptose-Kaskade beobachten. Jedoch bestehen auch innerhalb der immunkompetenten Zellen deutliche Unterschiede bezüglich des apoptotischen Potentials von DON. So zeigten B-Zellen isoliert aus der Milz von Mäusen schon unter geringen Konzentrationen von DON (1 µg/ml) eine deutliche Apoptose-Induktion, wohingegen bei T-Zellen selbst unter Verwendung hoher Konzentrationen von DON (100 µg/ml) kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate nachzuweisen war (Pestka et al. 1994). Des Weiteren konnten deutliche gewebespezifische Unterschiede bezüglich des apoptotischen Potentials von DON gezeigt werden. So waren B-Zellen der Milz deutlich empfindlicher gegenüber DON verglichen mit B-Zellen von Peyerschen Platten (Pestka et al. 1994). Aufgrund der Tatsachen, dass MAPKs über die Regulation sowohl von pro- als auch von anti-apoptotischen Schlüsselenzymen entscheidenden Einfluss auf die Stress-induzierte Zellantwort haben (Allan und Clarke 2009; Dhanasekaran und Reddy 2008; Cagnol und Chambard 2010) und DON sowohl in immunkompetenten als auch in Zellen epithelialen Ursprungs zu einer raschen konzentrationsabhängigen Aktivierung der MAPKs führt (Moon und Pestka 2002; Nielsen et al., 2009; Sergent et al. 2006), konzentrierte sich eine ganze Reihe von jüngeren Studien auf die Bedeutung der MAPKs im DON-induzierten Apoptose-Geschehen (Shifrin und Anderson 1998; Pestka et al. 2005; Zhou et al. 2005; Yang et al. 2000).

Erstmals stellten Shifrin und Anderson (1998) einen kausalen Zusammenhang zwischen dem apoptotischen Potential von Trichothecenen und der MAPKs-Aktivierung her. Für ihre Studien verwendeten sie Jurkat-Zellen, eine T-Lymphozyten Zelllinie. Die Studie ergab, dass die Induktion der MAPKs JNK1/2 und p38 neben der Proteinsynthese-inhibierenden Wirkung einen entscheidenden Einfluss auf das apoptotische Potential von Trichothecenen hat. So zeigten Trichothecene, die sich durch eine rasche und vollständige Proteinsynthese-Inhibierung auszeichnen, jedoch zu keiner Aktivierung der MAPKs führen (z. B. T-2 Toxin), nur ein geringes apoptotisches Potential. DON hingegen, das eine wesentlich geringere Proteinsynthese-inhibierende Wirkung besitzt (Ehrlich und Daigle 1987; Thompsen und Wannemacher 1986), sich aber durch eine rasche und anhaltende Aktivierung der MAPKs JNK1/2 und p38 auszeichnet, zeigte in den Studien ein deutlich höheres apoptotisches Potential als T-2 Toxin (Shifrin und Anderson 1998). Dies deutet darauf hin, dass JNK1/2 und p38 eine entscheidende Rolle bei der Trichothecen-induzierten Apoptose spielen. Das stärkste apoptotische Potential besaßen jedoch Trichothecene wie Scirpentriol und T-2 triol, die sowohl eine rasche und vollständige Proteinsynthese-Hemmung, als auch eine deutliche Aktivierung von JNK1/2 und p38 induzierten.

Unter Verwendung von Inhibitoren - die entweder die Aktivierung oder die katalytische Aktivität der MAPKs blockieren – wurde im Detail die individuelle Bedeutung der MAPKs für das apoptotische Potential der Trichothecene untersucht (Pestka et al. 2005; Zhou et al. 2005; Yang et al. 2000). In den beiden immunkompetenten Zelllinien Jurkat T-Zellen und RAW264.7 führte die Inhibition der katalytischen Aktivität von p38 zu einer signifikanten Reduktion des apoptotischen Potentials von DON (Pestka et al. 2005; Zhou et al. 2005). Dies spricht dafür, dass der p38 eine wichtige Rolle in der DON induzierten Apoptose-Kaskade, zumindest von immunkompetenten Zellen, zukommt. Die Inhibierung der ERK1/2-Achse führte hingegen in RAW264.7 Zellen zu einer deutlichen Steigerung der Apoptoserate unter DON, was darauf hindeutet, dass ERK1/2 eine anti-apoptotische Rolle in der DON-induzierten Zellantwort spielt (Zhou et al. 2005). Dieser Effekt konnte hingegen bei Jurkat T-Zellen nicht beobachtet werden. Sowohl die Blockierung der katalytischen Aktivität von JNK1/2 als auch die Blockierung der Phosphorylierung von ERK1/2 hatte keinen Einfluss auf das apoptotische Potential von DON (Pestka et al. 2005). Dies verdeutlicht die Zelltyp-spezifischen Unterschiede, die in der Funktion der MAPKs bestehen.

Bei Satratoxin, ein hoch toxisches makrozyklisches Trichothecen, konnte nach Blockierung der p38-Aktivität in RAW264.7 Zellen keine Inhibition der Apoptose beobachtet werden (Yang et al. 2000). Dies deutet darauf hin, dass neben der Zelltyp-spezifischen auch eine Stimulus-spezifische Funktion der MAPKs vorliegt. Sie ist womöglich eine Grundvoraussetzung für eine adäquate Zellantwort.

Über die Bedeutung von JNK1/2, bezogen auf das apoptotische Potential von DON, ist bis heute wenig bekannt (Shifrin und Anderson 1998). Zhou und Kollegen (2005) konnten p53 - einen zentralen Regulator des programmierten Zelltodes - als Substrat von p38 unter DON identifizieren. Hierbei korrelierte die Inhibition der DON-induzierten Apoptose - mittels Blockierung der p38 Aktivierung - mit einer signifikant reduzierten DNA-Bindungsaktivität der p53. Dies spricht dafür, dass p38 sein pro-apoptotisches Potential u.a. über p53 reguliert. Des Weiteren konnte unter DON eine BAX- und Cytochrom C-Translokation gezeigt werden (Zhou et al. 2005).

## **3 Publikationen**

### **3.1 Induction of MAPK-dependent transcription factors by deoxynivalenol in human cell lines**

Maximilian Casteel, Carina Nielsen, Andrea Didier, Richard Dietrich, Erwin Märtlbauer

Department of Veterinary Sciences, Ludwig Maximilians-Universität München,  
Schönleutnerstraße 8, 85764 Oberschleißheim, Germany.

#### **Abstract**

Contamination of cereals with the trichothecene deoxynivalenol (DON) is a global problem in agriculture. DON-related cytotoxicity results from inhibition of translation preceded by a ribotoxic stress response, which is characterized by phosphorylation of the mitogen-activated protein kinases and activation of downstream transcription factors. In this study, we measured the expression of AP-1 associated transcription factor mRNA levels in six human cell lines (Hep-G2, A549, U937, A204, Jurkat and CaCo-2) by using real-time RT-PCR. Previous work suggested that transcription factors mRNA and protein levels are affected by DON in Hep-G2 cells. In this study, we found significant cell-specific differences in mRNA levels for the transcription factors JUN, JUND, FOS, FOSL2, ATF3, and EGR1. After exposure to 1  $\mu\text{mol/l}$  DON for 3 h, the induction of the transcription factor JUN was highest in the Jurkat (342-fold) and Hep-G2 (84-fold) cell lines. JUND expression was mainly affected in the immunocompetent cell-lines U937 (11-fold) and Jurkat (12-fold), whereas significant FOSL2 induction (5-fold) was only found in Jurkat cells. DON-induced expression of FOS was mainly observed in Hep-G2 (96-fold) and U937 cells (59-fold). In contrast, response of A549 cells to DON was characterized by a distinct induction of ATF3 (44-fold) and EGR1 (92-fold). Time and concentration dependent induction of the transcription factors by DON was studied in detail for Hep-G2, A549, A204, and U937 cells. Considering the chronic dietary exposure of humans, broader investigations on DON influence on cell signalling pathways are required to understand the impact of this mycotoxin on human health.

## Introduction

The *Fusarium* mycotoxins are natural contaminants in agricultural products, occur regularly in food supplies worldwide, and particularly DON is frequently detected at high concentrations in cereals (Clear and Patrick 2000; Canady et al. 2001; Curtui et al. 2005; Gottschalk et al. 2007). In the European Union, 57 % of the cereal based foods were found to be contaminated with DON (SCOOP 2003). Data from the United Kingdom indicated that the majority of adults appeared to be exposed to DON, as concluded from urine testing (Turner et al. 2008).

DON is supposed to disrupt normal cell function by inhibition of protein synthesis (Ueno 1984) via binding to the ribosome and by activating cellular kinases involved in signal transduction. However, the cellular mode of action underlying these effects is not yet fully understood. Most of the previous investigations focussed on immunomodulatory effects of DON indicating that early alterations in cell signalling, particularly mitogen-activated protein kinases (MAPKs), are critical to trichothecene toxicity (Shifrin and Anderson 1999; Yang et al. 2000; Pestka et al. 2004). New insights concerning activated cell signalling pathways through gene induction and activation of MAPK pathways by DON could be demonstrated in a human hepatoma cell line (Nielsen et al. 2009a). Furthermore, influence on several basic metabolic parameters in human primary hepatocytes was shown (Königs et al. 2008). In addition, a comprehensive study indicated comparable high levels of DON toxicity between nine different human cell lines (Nielsen et al. 2009b). These data suggest that the current research focus on lymphoid cell lines may lead to an underestimate of the toxic potential of DON. Considering the chronic dietary exposure of humans, broader investigations on DON influence on cell signalling pathways are required to understand the impact of this mycotoxin on human health.

Consequently, the objective of this study was to compare the potential of DON to activate MAPK dependent transcription factors in different human cell lines. For this purpose, the expression of downstream genes such as JUN, JUND, FOS, FOSL2, ATF3 and EGR1 in six permanent human cell lines of different histological origin was studied.

## Materials and methods

DON toxin standard was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Standards were dissolved in 96% ethanol and stored at -20 °C prior to further dilution for required working concentrations.

### Cell lines and general culture conditions

Permanent human cell lines (Hep-G2, A549, CaCo-2, A204, U937 and Jurkat) used in this study were obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) and cultured in media recommended by the supplier. In detail, hepatoma cell line Hep-G2, TH<sub>1</sub>-lymphocytic cell line Jurkat, and monocytic cell line U937 were cultured in RPMI 1640 medium. Colon carcinoma cell line CaCo-2 was cultured in MEM-Earle medium, rhabdomyosarcoma cell line A204 in Mc Coy's 5A modified medium and lung carcinoma cell line A549 in Dulbecco's MEM. All media were supplemented with FCS and, if requested, with 2 mM L-glutamine or 1 % non-essential amino acid (NEAA). Cells were maintained in a humidified incubator at 37 °C in an atmosphere of 7% CO<sub>2</sub> in air. For DON exposure and subsequent RNA isolation 2.5 x 10<sup>5</sup> cells per well were plated on 24 multi-well culture dishes and incubated for 24 h prior to treatment.

### DON treatment of cells

To screen the general responsiveness of transcription factors (JUN/JUND, FOS/FOSL2, ATF3, and EGR1) mRNA expression due to DON treatment cell lines were exposed to 1 µmol/l DON for 3 h. Detailed analyses of six different target genes included DON concentrations of 1 µmol/l and 10 µmol/l as well as exposure times of 3 and 24 h.

### RNA isolation and reverse transcription for real-time RT-PCR

Total RNA was isolated using the E.Z.N.A. Total RNA kit (PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Germany) according to the manufacturers' recommendations. Quantity and purity was determined spectrophotometrically. The RNA was reversely transcribed from 1 µg

starting input using the QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and subjected to real-time RT-PCR.

#### Real-time RT-PCR

RT-PCR reactions for target genes in the different cell lines were performed on a LightCycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Samples were assayed in a 10  $\mu$ l reaction volume containing 5  $\mu$ l of 2 x LightCycler SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany), in a total volume of 10  $\mu$ l. Cyclic amplification was preceded by incubating the reaction mixtures for 10 min at 95 °C. Steps and temperatures during amplification were as follows: denaturation 15 s at 95 °C, annealing 10 s at 60 °C and extension 10 s at 72 °C, with single fluorescence acquisition at 72 °C after each cycle. Finally, a melting curve was generated. Expression levels of HMBS (hydroxymethylbilane synthase) and 28S rRNAs were used as housekeeping-genes. LightCycler experiments further included a calibrator sample and a standard curve for determination of amplification efficiency. Relative expression of target genes was calculated after normalization by the housekeeping genes. Data were analyzed by LC480 software (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Relative increase or decrease of RNA was expressed as  $\log_2$  ratio calculated by comparing relative expression levels in controls to treatment groups.

#### Primer design

The RT-PCR primers were designed using IDT SciTools PrimerQuest (<http://eu.idtdna.com>) or Primer3 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Primers were located in the coding region. Primer sequences for ATF3, EGR1, JUN, FOS, 28S rRNA and HMBS have been published elsewhere (Nielsen et al., 2009a). Information on primer used for this study is summarized in Table 1.

**Table 1.** Primer pairs applied in real-time RT-PCR for determination of transcription factor expression levels

Transcription factor	5'-3' Sequence	GenBank ID	Amplicon (Size)
ATF3	for: ttg cta acc tga cgc cct ttg rev: tct gtc gct gac agt gac tg	NM_001674	107
EGR1	for :agg aca gga gga gga gat gg rev: gga agt ggg cag aaa gga ttg	NM_001964	129
JUN	for: aaa cag agc atg acc ctg aac c rev: gat tat cag gcg ctc cag ct	NC_002228	139
FOS	for: tct gtg gct tcc ctt gat ctg a rev: tca tca aag ggc tcg gtc ttc a	NM_005252	168
JUND	for: tga aga ccc tca aga gtc aga ac rev: ttg acg tgg ctg agg act ttc t	NM_005354	99
FOSL2	for : tag ata tgc ctg gct cag gc rev: gga agt ggg cag aaa gga tg	NC_005253	109
28S rRNA	for: ccc act aat agg gaa cgt gag- rev: gcc aag cac ata cac caa atg tc	M27830	142
HMBS	Housekeeping-Gene, QuantiTect Primer Assays		

## Results and discussion

Due to the frequent occurrence of DON in cereal-based foods, the risk of exposure is also very high, as shown by previous studies (SCOOP, 2003). In contrast to clinical toxic effects which have been documented and studied in different animal models, the mechanisms at the molecular level caused by subacute trichothecene exposure are not yet clear. The cell lines included in this study were selected because of the following reasons: CaCo-2, Jurkat and

U937 represent, at least for DON, the most commonly used human cell lines for toxicological studies addressing gastro-intestinal and immunomodulatory effects. Considering recently raised concerns about health risks associated with airborne mycotoxins (Mayer et al. 2007; Mayer et al. 2008), effects of trichothecenes on A549 cells, originating from the epithelium of



the lung, were analyzed. Hep-G2 have been used in several recent papers (Bouaziz et al. 2008; Königs et al. 2008; Nielsen et al. 2009a) to investigate toxin-induced activation of cellular pathways. Finally, toxic effects on mesenchymal cells such as the myocyte A204 have been poorly studied, although they seem to be interesting targets for trichothecenes.

In this study, we investigated the specific induction profile of six transcription factors (JUN, JUND, FOS, FOSL2, ATF3 and EGR1), which all belong to the AP-1 family, under DON exposure in six different cell lines. DON is a known inducer of the MAPK-pathway via a mechanism known as “ribotoxic stress response” (Pestka 2008). Activation of MAPKs due to phosphorylation is one main up-stream event triggering AP-1 family of transcription factors which couple short-term signals to long-term cellular responses by acting as transcription factors and regulating gene expression (Shaulian and Karin 2001). This family plays a pivotal role in cell proliferation and transformation (Meyer-ter-Vehn et al. 2000). AP-1 complexes consist of homo- and heterodimers of the families FOS (FOS, FOSB, FOSL1, and FOSL2), JUN (JUN, JUNB, and JUND), and ATF (ATF2, ATF3/LRF1, and B-ATF). All are members of the bZIP (basic region leucine zipper) family of DNA-binding proteins. The proteins are inactive in quiescent cells but are rapidly activated by a variety of extracellular stimuli, including growth factors, cytokines, and cellular stress signals such as DON (Meyer-ter-Vehn et al. 2000; Pestka 2008). Two of the best characterized transcription factors are JUN and FOS. They regulate a wide range of cellular processes including cell proliferation, cell survival and differentiation (Shaulian and Karin 2002).

**Table 2.** Gene regulation of transcription factors induced by treatment of human cell lines with 1  $\mu\text{mol/l}$  DON for 3 h. All results are representative of three independent measurements, and represent the x-fold increase of gene expression.

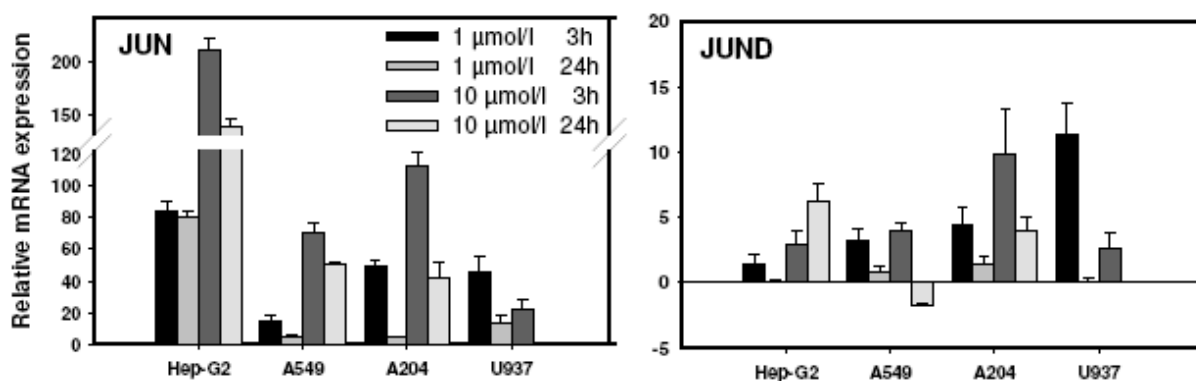
<b>Factor</b>	<b>Hep-G2</b>	<b>A549</b>	<b>CaCo-2<sup>a</sup></b>	<b>A204</b>	<b>U937</b>	<b>Jurkat</b>
JUN	84.6	15.1	15.6	49.1	45.5	343.4
JUND	1.4	3.1	6.1	4.4	11.3	12.8
FOS	96.2	1.59	14.4	1.56	59.3	1.88
FOSL2	1.7	2	1.1	1.1	0.6	5.1
ATF3	6.25	44.2	4.8	13.3	4.7	5.1
EGR1	3.6	92.6	13.9	2.9	1.8	0.8

In a first screening the induction of six transcription factors on mRNA level by a low toxic DON concentration (1  $\mu\text{mol/l}$ ) for 3 h was investigated (Table 2). Treatment of cell lines with 1  $\mu\text{mol/l}$  DON for 3 h resulted in different increase of JUN /JUND as well as FOS/FOSL2 mRNA. The transcription factor JUN was highest induced in the Jurkat and Hep-G-2 cell lines by 343- and 84-fold increase, respectively. The epithelial cell lines A549 and CaCo-2 showed much weaker expression whereas U937 and A204 cells exhibited moderate activity. Considering JUND expression immunocompetent cell lines (U973 and Jurkat) which have been determined to be highly susceptible to DON treatment as measured by cytotoxicity tests (Nielsen et al. 2009b), respond differently compared to the more resistant Hep-G2 and A204 cells. Distinct increased FOS levels, induced by treatment of cells with 1  $\mu\text{mol/l}$  DON for 3 h, were observed in Hep-G2 and U937 cells (Table 2), whereas significant FOSL2 gene induction was only found in Jurkat cells.

One of the transcription factors under study was stress-inducible ATF3, which is known to regulate several downstream activities related to cell proliferation (Tamura et al. 2005), apoptosis (Fawcett et al. 1999) and survival (Nakagomi et al. 2003). Regulation of the ATF3 expression by DON after activation of the MAPK-pathway has been shown for the first time in a preceding study using Hep-G2 cells (Nielsen et al. 2009a). In this study, ATF3 mRNA expression upon DON challenge was highest in A549 cells (Table 2), which also reveal a

distinct response in EGR1 expression (Table 2). Thus, the response of the A549 cells is unique under all cell lines tested. The early growth response 1 protein (EGR1) has been studied by Moon et al. (2007) in DON-treated epithelial intestine 407 cells, in which this gene modulates the IL-8 expression dependent on ERK1/2 activity. Transcription factors like JUN and EGR1 are often induced in the same cluster as ATF3 (Lu et al. 2007) due to a variety of stress signals in different cell types (Fawcett et al. 1999; Allen-Jennings et al. 2002; Nakagomi et al. 2003).

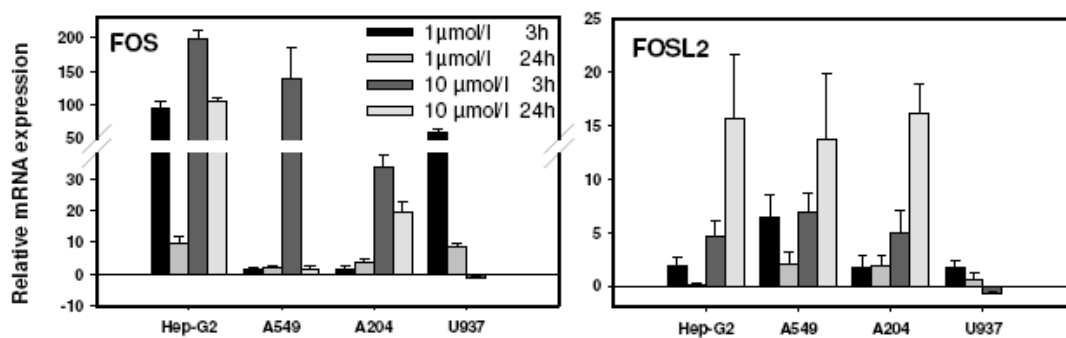
In the second part of the study time and concentration dependent expression of transcription factors was studied in more detail for four cell lines. Hep-G2 (liver), A549 (lung), U937 (monocyte) and A204 (muscle) cells were exposed to high (10  $\mu\text{mol/l}$ ) and low (1  $\mu\text{mol/l}$ ) concentrations of DON for 3 h and 24 h (Fig. 1-4). However, due to the high susceptibility of U937 cells no meaningful data could be collected after high-dose treatment of this cell-line for 24 h.



**Fig. 1** Transcriptional regulation of JUN and JUND by DON in permanent human cell lines (Hep-G2, A549, A204 and U937). Human cell lines were treated with 1  $\mu\text{mol/l}$  and 10  $\mu\text{mol/l}$  DON for 3 h and 24 h. The mRNA level was analyzed for transcription factor expression using real-time RT-PCR method. Expression levels were normalized to HMBS expression level. All results are representative of three independent measurements.

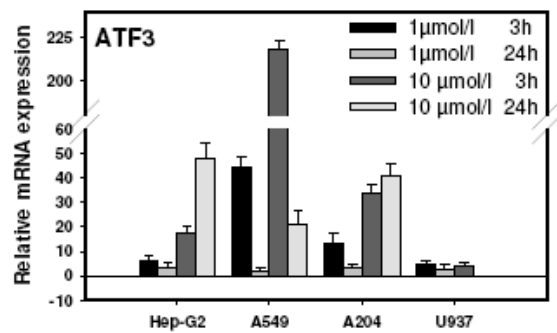
In principle, the detailed expression analysis revealed that mRNA levels are influenced both by exposure time and by DON concentration (Fig. 1-4) and showed that other cell lines are also responsive but need higher toxin concentrations or longer incubation times to reach maximum transcription factor expression. All cell lines showed a marked up-regulation of JUN, and this effect lasted for up to 24 h after exposing cells to high DON-concentrations. This was accompanied by an increase of JUND mRNA expression (Fig. 1), which has been considered as a negative regulator of cell proliferation and cell cycle control by several

authors (Weitzman et al. 2000; Jochum et al. 2001; Zenz and Wagner 2006). This effect is particularly pronounced in immunocompetent cells (Table 2). In less susceptible cell lines such as Hep-G2 induction of JUND is detectable only after prolonged incubation or higher toxin amounts. The A549 and CaCo-2 cells, representing an epithelial cell type with medium susceptibility for DON did not show prominent increase in JUN/JUND levels after low dose treatment for 3 h. Thus JUN/JUND expression might be associated with higher cytotoxic potential of DON particularly in U973 and Jurkat cells.

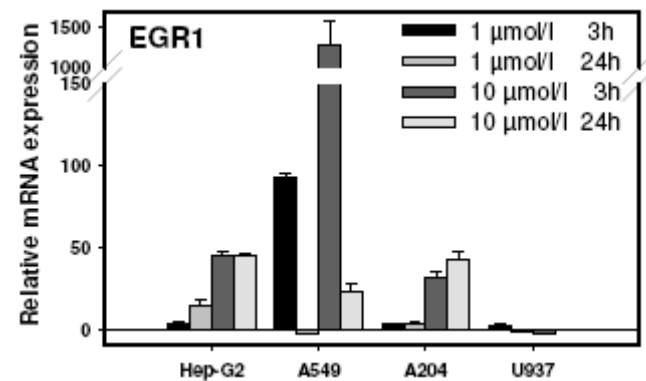


**Fig. 2** Transcriptional regulation of FOS and FOSL2 by DON in cell lines (Hep-G2, A549, A204 and U937). Human cell lines were treated with 1 µmol/l and 10 µmol/l DON for 3 h and 24 h. The mRNA level was analyzed for transcription factor expression using real-time RT-PCR method. Expression levels were normalized to HMBS expression level. All results are representative of three independent measurements

Increasing levels of FOS mRNA were visible by toxic DON concentrations for the cell lines A549 and A204 (Fig. 2). After 24 h exposure to high-dose DON concentrations a distinct FOSL2 expression represents the predominate signal in all cell lines under study. This may indicate that cellular repair/survival mechanisms are exhausted after high-dose and long-term DON exposure. FOSL2 a member of the FOS-family plays a pivotal role in cell death and cell damage by distinct change in JUN and FOSL2 mRNA expression (Goodenough et al. 1997). In contrast to FOS, FOSL2 expression is induced later and for prolonged times (Foletta 1996).



**Fig. 3** Transcriptional regulation of ATF3 by DON in cell lines (Hep-G2, A549, A204 and U937). Human cell lines were treated with 1 µmol/l and 10 µmol/l DON for 3 h and 24 h. The mRNA level was analyzed for transcription factor expression using real-time RT-PCR method. Expression levels were normalized to HMBS expression level. All results are representative of three independent measurements



**Fig. 4** Transcriptional regulation of EGR1 by DON in cell lines (Hep-G2, A549, A204 and U937). Human cell lines were treated with 1 µmol/l and 10 µmol/l DON for 3 h and 24 h. The mRNA level was analyzed for transcription factor expression using real-time RT-PCR method. Expression levels were normalized to HMBS expression level. All results are representative of three independent measurements.

A prominent up-regulation of ATF3 (Fig. 3) and EGR1 (Fig. 4) mRNA levels was found in A549 cells thus indicating activation of different signal transduction pathways in the cell-lines under study. Typical target genes expressed via the EGR1 pathway are proinflammatory cytokines especially IL-8 (Moon et al. 2007).

In conclusion, this study presents data on mRNA level for MAPK-pathway dependent transcription factors induced by DON in six permanent human cell lines. The AP-1 members display both similarities and differences concerning the kinetic rates of induction in parts of the cell cycle, regulation of expression, dimerization and DNA binding capacities (Foletta 1996). To understand the role of AP-1 in DON related toxicity and its function in the signal transduction pathway, each transcription factor needs to be further investigated for each cell

type on the protein level. Time and concentration dependent AP-1 transcription factor expression seems to be related to overall susceptibility towards DON (Pestka 2008). Especially the kinetics of survival to death associated transcription factors (JUN/JUND and FOS/FOSL2) may be the underlying mechanism. Taken together the present study underlines the importance of investigation of different cell lines. As human exposure to DON is assumed to be systemic, and clinical symptoms are manifold, the present focus of toxicological studies on lymphoid cell lines may, therefore, underestimate the potential hazard which this mycotoxin may pose on human health.

### **Acknowledgement**

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK-1029) and from the “Brigitte and Wolfram Gedek-Stiftung für Mykotoxinforschung”. We thank Brunhilde Minich und Christine Ehlich for excellent technical assistance.

### **References**

- Allen-Jennings AE, Hartman MG, Kociba GJ, Hai TW (2002) The roles of ATF3 in liver dysfunction and the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *J Biol Chem* 277: 20020-20025
- Bouaziz C, Sharaf El Dein O, El Golli E, Abid-Essefi S, Brenner C, Lemaire C, Bacha H (2008) Different apoptotic pathways induced by zearalenone, T-2 toxin and ochratoxin A in human hepatoma cells. *Toxicology* 254: 19-28
- Clear RM, Patrick SK (2000) Fusarium head blight pathogens isolated from fusarium-damaged kernels of wheat in western Canada, 1993 to 1998. *Can J Plant Pathol* 22: 51-60
- Curtui V, Brockmeyer A, Dietrich R, Kappenstein O, Klaffke H, Lepschy J, Märtlbauer E, Schneider E, Seidler C, Thielert G, Usleber E, Weber R, Wolff J (2005) Deoxynivalenol in food. *Mycotoxin Res* 21: 83-88

Fawcett TW, Martindale JL, Guyton KZ, Hai T, Holbrook NJ (1999) Complexes containing activating transcription factor (ATF)/cAMP-responsive-element-binding protein (CREB) interact with the CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP)-ATF composite site to regulate Gadd153 expression during the stress response. *Biochem J* 339: 135-141

Foletta VC (1996) Transcription factor AP-1, and the role of Fra-2. *Immunol Cell Biol* 74: 121-133

Goodenough S, Davidson M, Chen WB, Beckmann A, Pujic Z, Otsuki M, Matsumoto I, Wilce P (1997) Immediate early gene expression and delayed cell death in limbic areas of the rat brain after kainic acid treatment and recovery in the cold. *Exp Neurol* 145: 451-461

Gottschalk C, Barthel J, Engelhardt G, Bauer J, Meyer K (2007) Occurrence of type A trichothecenes in conventionally and organically produced oats and oat products. *Mol Nutr Food Res* 51: 1547-1553

Jochum W, Passegue E, Wagner EF (2001) AP-1 in mouse development and tumorigenesis. *Oncogene* 20: 2401-2412

Königs M, Schwerdt G, Gekle M, Humpf HU (2008) Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes. *Mol Nutr Food Res* 52: 830-839

Lu D, Chen J, Hai T (2007) The regulation of ATF3 gene expression by mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* 401: 559-567

Mayer S, Curtui V, Usleber E, Gareis M (2007) Airborne mycotoxins in dust from grain elevators. *Mycotoxin Res* 23: 94-100

Mayer S, Engelhart S, Kolk A, Blome H (2008) The significance of mycotoxins in the framework of assessing workplace related risks. *Mycotoxin Res* 24: 151-164

Meyer-ter-Vehn T, Covacci A, Kist M, Pahl HL (2000) *Helicobacter pylori* activates mitogen-activated protein kinase cascades and induces expression of the proto-oncogenes c-fos and c-Jun. *J Biol Chem* 275: 16064-72

Moon Y, Yang H, Lee SH (2007) Modulation of early growth response gene I and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 362: 256-262

Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo S, Kiyama H (2003) Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation. *J Neurosci* 23: 5187-5196

Nielsen C, Lippke H, Didier A, Dietrich R, Martlbauer E (2009a) Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells. *Mol Nutr Food Res* 53: 479-91

Nielsen C, Casteel M, Didier A, Dietrich R, Märtlbauer E (2009b) Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines. *Mycotoxin Res* 25: 77-84

Pestka JJ (2008) Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. *Food Addit Contam* 25: 1128-40

Pestka JJ, Zhou HR, Moon Y, Chung YJ (2004) Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol Lett* 153: 61-73

Shaulian E, Karin M (2001) AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 20: 2390-2400

Shaulian E, Karin M (2002) AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol* 4: E131-E136

Shifrin VI, Anderson P (1999) Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J Biol Chem* 274: 13985-13992



Tamura K, Hua BY, Adachi S, Guney I, Kawauchi J, Morioka M, Tamamori-Adachi M, Tanaka Y, Nakabeppu Y, Sunamori M, Sedivy JM, Kitajima S (2005) Stress response gene ATF3 is a target of c-myc in serum-induced cell proliferation. *EMBO J* 24: 2590-2601

Turner PC, Rothwell JA, White KLM, Gong Y, Cade JE, Wild CP (2008) Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom. *Environ Health Perspect* 116: 21-25

Ueno Y (1984) Toxicological features of T-2 toxin and related trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol* 4: S124-S132

Weitzman JB, Fiette L, Matsuo K, Yaniv M (2000) JUND protects cells from p53-dependent senescence and apoptosis. *Mol Cell* 6: 1109-1119

Yang GH, Jarvis BB, Chung YJ, Pestka JJ (2000) Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: Relationship to ERK, p38 MARK, and SAP/JNK activation. *Toxicol Appl Pharmacol* 164: 149-160

Zenz R, Wagner EF (2006) JUN signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1043-9

### **3.2 Impact of DUSP1 on the apoptotic potential of deoxynivalenol in the epithelial cell line HepG2**

Maximilian Casteel<sup>1</sup>, Carina Nielsen<sup>1</sup>, Sonja Kothlow<sup>2</sup>, Richard Dietrich<sup>1</sup>, Erwin Märtlbauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Chair of Hygiene and Technology of Milk, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Germany; <sup>2</sup>Chair of Physiology, Department of Veterinary Sciences, University of Munich, Germany

#### **Abstract**

The trichothecene deoxynivalenol (DON) is the most common mycotoxin contaminant of cereal-based food products. Several studies revealed DON as a potent inducer of the three major mitogen-activated protein kinases (MAPKs). Until now, little is known about the role of negative regulators of MAPK pathway in the cellular response to DON. In this report we evaluated, for the first time, the impact of mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs), particularly dual specific phosphatase 1 (DUSP1), on the toxic potential of DON in the epithelial cell line HepG2. Our results indicate that both low and high concentrations of DON trigger a strong and sustained DUSP1 mRNA and protein expression, mediated by the sustained activation of MEK/ERK pathway. Furthermore, the expression of DUSP1 protein correlates with the inactivation of JNK1/2, whereas a sustained activation of p38 and ERK1/2 was observed in the presence of DON. In contrast, treatment of DUSP1 knock-down cells with DON triggers a prolonged activation of JNK1/2, which leads to the induction of apoptosis. Taken together, we propose DUSP1 as a novel target gene of DON, which is essential for the prevention of DON induced apoptosis in the epithelial cell line HepG2.

## Introduction

The mycotoxin deoxynivalenol (DON), a member of the type B trichothecenes, is a biologically active secondary metabolite of several *Fusarium* strains, like *F. culmorum* and *F. graminearum*. DON is one of the most common mycotoxin contaminants of wheat, barley, and maize (Rotter et al., 1996). Due to the high contamination rate of crops along with only marginal elimination during processing procedures (Hazel and Patel, 2004), DON appears to be one of the most important mycotoxins in cereal-based food products. A large collaborative study in the European Union (SCOOP Task 3.2.10 Final Report) revealed that 57% of cereal based foods were contaminated with DON.

Based on these facts, numerous *in vivo* and *in vitro* studies were performed to evaluate the impact of DON on animal and human health. Dependent on dose, exposure frequency and species DON causes a broad spectrum of toxic effects in experimental animals, including growth suppression and dysregulation of the immune system (Pestka, 2008). Cell-based studies revealed DON to be a potent translational inhibitor (Ehrlich and Daigle, 1986), by binding to the 60S ribosomal subunit of eukaryotic cells. This event triggers a ribotoxic stress response that activates the three major mitogen-activated protein kinases (MAPKs), *i.e.* the extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2), c-Jun N-terminal kinases (JNK1/2) and p38 (Shifrin and Anderson, 1999).

The MAPK pathway is a major signalling pathway and is present in all eukaryotes. MAPKs are fundamental regulators of cell proliferation, differentiation and apoptosis (Chang and Karin, 2001). *In vitro* studies, evaluating the impact of MAPK signalling on the immunomodulatory and apoptotic potential of DON, showed that the phosphorylation of p38 is an important step in the induction of intrinsic apoptosis, whereas phosphorylation of ERK1/2 seems to be an essential survival signal in response to DON (Zhou et al., 2005). Until now, the impact of JNK1/2 in the cellular stress response to DON is largely unclear. In case of the macrocyclic trichothecene satratoxin G, a concentration-dependent correlation between the activation of JNK1/2 and the induction of apoptosis has been shown (Yang et al., 2000). However, considering the complex web of reversible phosphorylated kinases controlled by many feedback loops and intense crosstalk with other pathways, many questions are still unanswered. The fact that the phosphorylation of MAPKs, particularly JNK1/2, is reversible

in the continued presence of DON indicates that negative regulators provide an important mechanism for MAPK control and consequently for cell survival.

The objective of this study was to evaluate the impact of the class I family of dual specific phosphatases (DUSPs), known as mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs). MKPs are acting as negative feedback regulators of MAPK signalling by dephosphorylating JNK1/2, p38 and ERK1/2, depending on their substrate specificity (Camps et al., 2000; Liu et al., 2007). Due to this, MKPs seem to be the most efficient negative regulators of MAPK signalling in mammalian cells. A computational analysis of the MAPK system suggests that the MKPs, and not the kinases, dictate the extent of MAPK phosphorylation following cellular activation (Bhalla et al., 2002). This study focussed on the immediate early gene and archetypal member of MKPs, DUSP1. DUSP1 plays a pivotal role in this complex web of MAPK regulation by rapidly inactivating JNK1/2, p38 and to a lesser extent ERK1/2 depending on cell type and stimulus (Wang and Liu, 2007).

Based on the results of a previous study (Nielsen et al., 2009a), the experiments were performed in the well established human hepatoblastoma cell line HepG2. Our study indicates that DON triggers a strong and sustained phosphorylation of ERK1/2, which is responsible for the significantly elevated levels of DUSP1 protein. The time-dependent expression of DUSP1 protein correlates with the inactivation of JNK1/2, whereas p38 and ERK1/2 are constantly activated. In contrast, DUSP1 knock-down results in prolonged and strong activation of JNK1/2 in response to DON, indicating that DUSP1 controls the duration of JNK1/2 activation. The prolonged activation of JNK1/2 in DUSP1 knock-down cells mediated by low concentrations of DON is accompanied by the induction of early apoptotic events, whereas in control cells concentrations up to 5  $\mu$ M DON are not sufficient to induce early-stage apoptosis. In summary, our results propose DUSP1 as a key regulator in the prevention of DON induced apoptosis in the epithelial cell line HepG2 by rapidly inactivating JNK1/2.

## Materials and methods

### Cell culture

The hepatoma cell line HepG2 was obtained from DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany). Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v FBS and maintained at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were used for up to 20 passages. All experiments were performed in RPMI 1640 medium supplemented with 10% v/v FBS.

### Reverse-transcription polymerase chain reaction

Real-Time PCR was used to quantitate the relative gene expression levels of DUSPs in HepG2 cells exposed to DON. Cells were seeded in 96-well plates at a density of  $1 \times 10^4$  cells/well and were incubated overnight to allow them to adhere to the bottom. The following day, cells were treated with DON (1 or 10 µM) or vehicle (0.4% EtOH) for 3 h. Total RNA was isolated using the E.Z.N.A. total RNA kit (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) according to the manufacturer's protocol. RNA quantity and purity were determined spectrophotometrically by measuring the absorbance at 260 nm and 280 nm. Reverse transcription was performed using a QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Amplification was assessed by SYBR Green I Master Mix using the LightCycler 480 (both Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) at default thermal cycling conditions: 10 min at 95 °C, followed by 15 s at 95 °C, 10 s at 60 °C and 10 s at 72 °C for each of 40 cycles. HMBS (QuantiTect Primer Assay, QIAGEN, Hilden, Germany) was used as an endogenous control for normalisation of target genes. Results were analysed using the LC 480 software.

### Primer

The RT-PCR primers were designed using IDT SciTools PrimerQuest or Primer3 software and were located in the coding region (for details see Table 1).

### Small interfering RNA transfection

The experiments were performed in 6-well plates, using  $5 \times 10^5$  cells/well. HepG2 cells were reverse transfected with siControl or siRNA targeting DUSP1 (SMARTpool) at a concentration of 100 nM using Dharmafect-4 transfection reagent (both Dharmacon, ThermoFischer Scientific, Epsom, UK). Forty eight hours post transfection, medium was discarded, cells were washed with PBS and subsequently treated with DON for the indicated time periods. Afterwards, cells were harvested as described below, and assayed for protein expression by Western blotting or externalization of phosphatidylserine by flow cytometry.

### Western blot

Following DON treatment, the medium was replaced, and the cells were washed twice with ice cold PBS. Cell lysates were prepared with cell lysis buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  and 1  $\mu\text{g/ml}$  leupeptin). Equal amounts of total protein (40  $\mu\text{g}$ ) were resolved by SDS-PAGE, transferred to a PVDF membrane, blocked with TBS containing 5% nonfat milk and 0.05-0.1% Tween-20. Afterwards the membranes were probed with the following antibodies, according to the manufacturer's protocols. Phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-SAPK/JNK (Thr183/185), SAPK/JNK, cleaved caspase-3, cleaved PARP-1, GAPDH, and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated (horse anti-mouse, goat anti-rabbit) antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA). The antibody against phospho-p38 was purchased from BD Biosciences (San Diego, CA, USA). Anti-DUSP1 was obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Proteins were visualized using SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA). The quantification of Western blots was done by densitometry analysis using TotalLab Nonlinear Dynamics Image Analysis Software (Nonlinear, USA).

### Immunofluorescence

The effect of the MEK1/2 inhibitor PD98059 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) on the regulation and localisation of DUSP1 in DON-treated cells was examined by

immunofluorescence. HepG2 cells ( $4 \times 10^5$ ) were plated on chamber slides (Nunc, Wiesbaden, Germany) in growth medium and left to adhere overnight. Cells were pretreated with PD98059 for 1 h and subsequently treated with 2  $\mu$ M of DON for 3 h. The cells were fixed in 3% formaldehyde for 15 min and ice-cold methanol for 10 min, blocked with inactive goat serum for 60 min, probed with anti-DUSP1 antibody for 1 h, and incubated with the Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Invitrogen GmbH, Darmstadt, Germany) for 1 h. Nuclei were counterstained with DAPI and slides were examined with a KEYENCE immunofluorescence microscope.

#### Flow cytometry

The induction of early apoptotic events was assessed by annexin V (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) staining of externalized phosphatidylserine using flow cytometry, according to the manufacturer's instructions. The transfected and treated (DON) cells were collected by Accutase (Sigma-Aldrich, Munich, Germany), washed twice with cold PBS, resuspended in binding buffer (10 mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ ), and incubated with 5  $\mu$ l of FITC-conjugated annexin V and propidium iodide. After incubation at room temperature for 10 min in the dark, an additional 400  $\mu$ l of binding buffer was added, and the cells were immediately analyzed by flow cytometry using the BD FACSCanto II and DIVA software.

#### Statistical analysis

Student's *t*-test was used to evaluate statistical significance. Values of  $P < 0.05$  were considered to be significant. Data are expressed as means  $\pm$  S.D.

## Results

### Effects of DON on DUSPs mRNA expression

The mRNA expression of DUSPs in DON induced HepG2 cells was measured by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). For this purpose, HepG2 cells were treated with low (1  $\mu$ M) and high (10  $\mu$ M) concentrations of DON for 3 hours. At both concentrations, DON significantly enhanced the mRNA levels of all tested DUSPs (except for DUSP8 at 1  $\mu$ M DON) in a concentration-dependent manner (Fig. 1A). Among all tested DUSPs, the highest up-regulation was detected for DUSP1. At low DON-concentrations we observed a moderate increase of DUSP1 expression (2.5-fold), whereas a treatment with high concentration of DON resulted in a strong increase (42.5-fold).

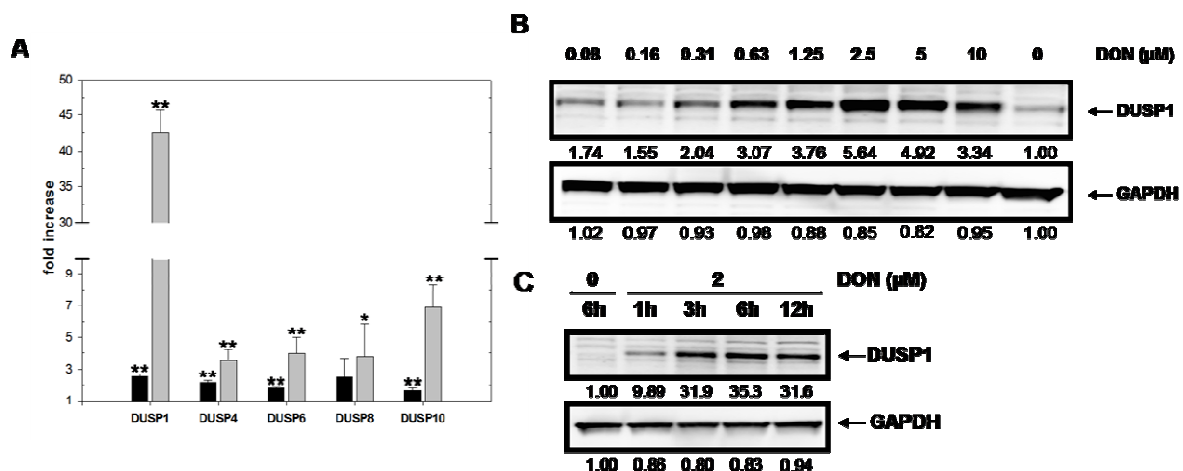


Fig.1. Effect of DON on DUSP1 mRNA and protein expression

(A) Concentration-dependent effects of DON on the mRNA expression of various DUSPs in HepG2 cells, measured by quantitative PCR. Cells were treated with low (1  $\mu$ M, black bars) or high (10  $\mu$ M, grey bars) concentrations of DON for 3 h. Values are presented as the means  $\pm$  SD of four independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$  compared to cells treated with vehicle). (B) Concentration-dependent up-regulation of DUSP1 protein in HepG2 cells treated for 3h with increasing concentrations of DON (0.08-10  $\mu$ M). (C) Time-dependent up-regulation of DUSP1 protein in DON treated HepG2 cells. Cells were treated with a fixed concentration of DON (2  $\mu$ M) for 1, 3, 6 or 12h. In both experiments, cells were harvested at the indicated time points. Subsequently, cell lysates were prepared, and Western Blot analysis was performed for the detection of DUSP1. The blots were then stripped and reprobed in order to measure the content of GAPDH, used as a control for protein loading. The results are representative of three independent experiments.



Table 1. Genes and their primer sequences used in qRT-PCR amplification.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	GenBank Acc. No.	Product size (bp)
<i>DUSP1</i>	for: CGA AGC GTT TTC GGC TTC C rev: CAC CCT GAT CGT AGA GTG G	NC_004417	142
<i>DUSP4</i>	for: GCA TCA CGG CTC TGT TGA ATG TCT rev: TCG GCC TTG TGG TTA TCT TCC ACT	NM_001394	100
<i>DUSP6</i>	for: CTT GGT ACA TTG CTT GGC TGG CAT rev: GCA GCT GAC CCA TGA AGT TGA AGT	NM_001946	155
<i>DUSP8</i>	for: GTG AAA AAC TGC TGC CCT GG rev: ATG GTC TTC ATG ATG TAG GCG AT	NM_004420	138
<i>DUSP10</i>	for: GCG GCA GTA CTT TGA AGA GGC TTT rev: AGT CAT GGT CAT CCG AGT GTG CTT	NM_144728	148

---

#### Effects of DON on DUSP1 protein expression

To examine the concentration- and time-dependent effect of DON on DUSP1 protein expression, HepG2 cells were incubated with different concentrations of DON for 3 h, or with a fix concentration of 2  $\mu$ M DON for up to 12 h. Using Western blot analyses, increased DUSP1 protein levels were observed at DON concentrations  $\geq 0.31$   $\mu$ M (Fig. 1B). Markedly elevated levels of DUSP1 protein were observed at a concentration of 0.63  $\mu$ M. Furthermore, HepG2 cells treated with 2.5  $\mu$ M and 5  $\mu$ M DON showed the highest levels of DUSP1 protein. In the time-dependent experiment, DUSP1 protein levels were slightly increased within 1 h, and substantially elevated at 3, 6 and 12 h (Fig. 1C) in cells treated with 2  $\mu$ M of DON.

#### Effects of ERK1/2 inhibition on DON-induced DUSP1 expression

To evaluate the role of ERK1/2 on DON-induced DUSP1 up-regulation, HepG2 cells were preincubated with a specific inhibitor of MEK1/2 (PD98059; 40  $\mu$ M), and subsequently treated with 2  $\mu$ M of DON for different periods of time. Protein levels of total ERK1/2, phosphorylated ERK1/2 and DUSP1 were examined by Western blotting. HepG2 cells treated

with vehicle showed a moderate ERK1/2 activation (Fig. 2A and 2B), whereas ERK1/2 was substantially activated in cells treated with DON for up to 12 h (Fig. 2B). Treatment of cells with PD98059, completely abolished the activation of ERK1/2 and induction of DUSP1 by DON for up to 12 h, indicating that the expression of DUSP1 depends on MEK/ERK pathway activation (Fig. 2A). The results were confirmed by immunofluorescence analyses (Fig. 2C).

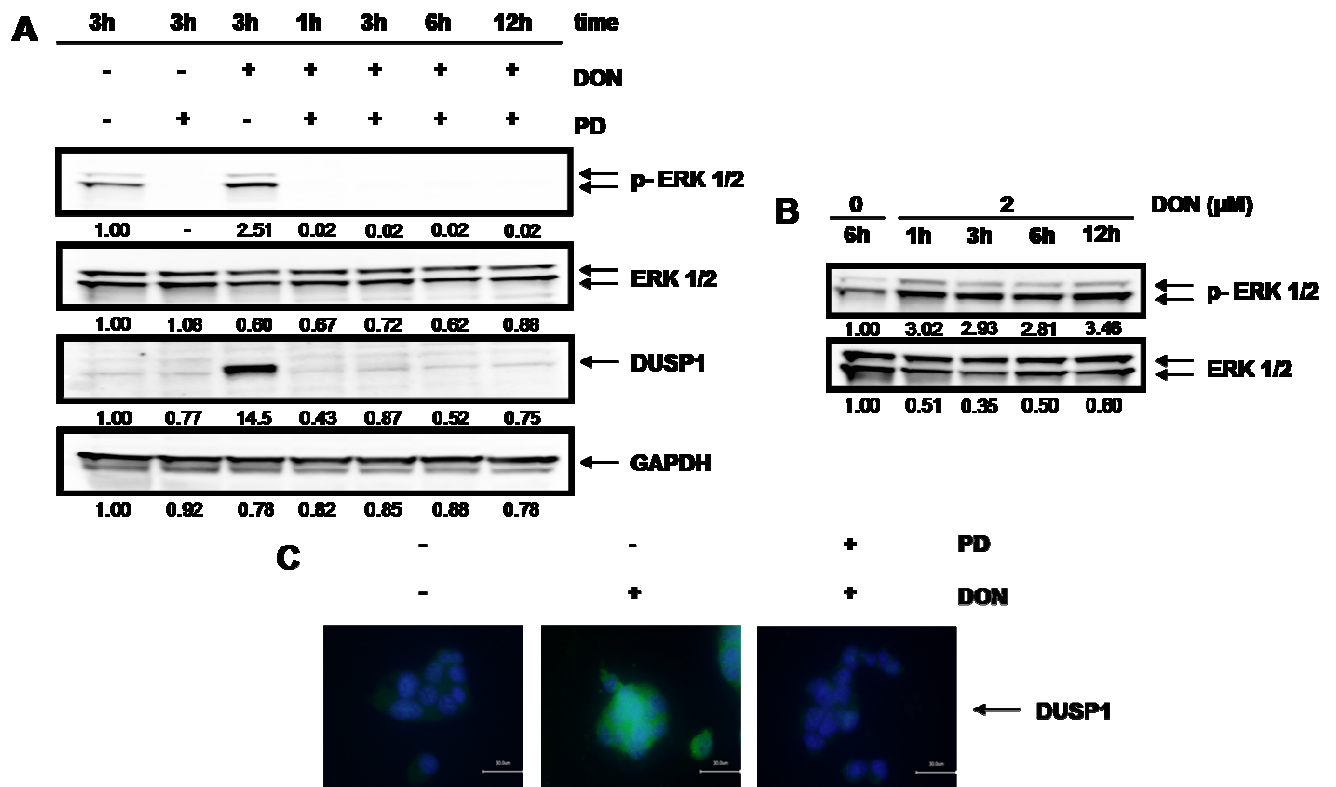


Fig.2. Effects of ERK1/2 inhibition on DON induced DUSP1 protein expression

(A) Time-dependent effects of ERK1/2 inhibition on DON induced DUSP1 expression. HepG2 cells were pretreated with or without PD98059 (40 μM), following stimulation with or without DON (2 μM). At the indicated time points, cells were harvested and the extracts were then analyzed for the contents of phospho-ERK1/2 and DUSP1. Afterwards the blots were stripped and reprobred for the detection of total ERK1/2 and GAPDH. The results are representative of three independent experiments. (B) Effects of DON on the time-dependent activation of ERK1/2 in HepG2 cells. Cells were treated with DON (2 μM) and harvested at the indicated times. Whole cell lysates were examined for phospho-ERK1/2 and total ERK1/2 content by Western blotting. The results are representative of three independent experiments. (C) Effects of ERK1/2 inhibition on DON induced DUSP1 expression and localisation by immunofluorescence. Cells were pretreated with PD98059 for 1 h and subsequently exposed to 2 μM of DON. Immunofluorescence staining was performed as described in Materials and Methods. The results are representative of three independent experiments.

### Effects of DUSP1 knock-down on DON-induced MAPKs activity

To clarify the impact of DUSP1 on ERK1/2, JNK1/2 and p-38 regulation, HepG2 cells were transfected with siRNA against DUSP1 (siDUSP1), control siRNA (siControl) or vehicle. Following transfection-time cells were exposed to 2  $\mu$ M, 5  $\mu$ M DON or vehicle for 3 h (data not shown) and 6 h (Fig. 3A). Total protein was analyzed by Western blotting. At both concentrations and time points ERK1/2 and p-38 activation was significantly increased in cells treated with vehicle/DON and siControl/DON. Cells treated with siDUSP1/DON 2  $\mu$ M showed a slightly higher activation of ERK1/2 and p-38, whereas no difference was observed in cells treated with siDUSP1/DON 5  $\mu$ M, compared to controls (Fig. 3A). However, significant differences were observed in the time course of JNK1/2 activation. JNK1/2 activation was only detectable for 1 h in cells treated with vehicle/DON (Fig. 3B), whereas JNK1/2 were still activated after 6h in cells treated with siDUSP1/DON (Fig. 3A).

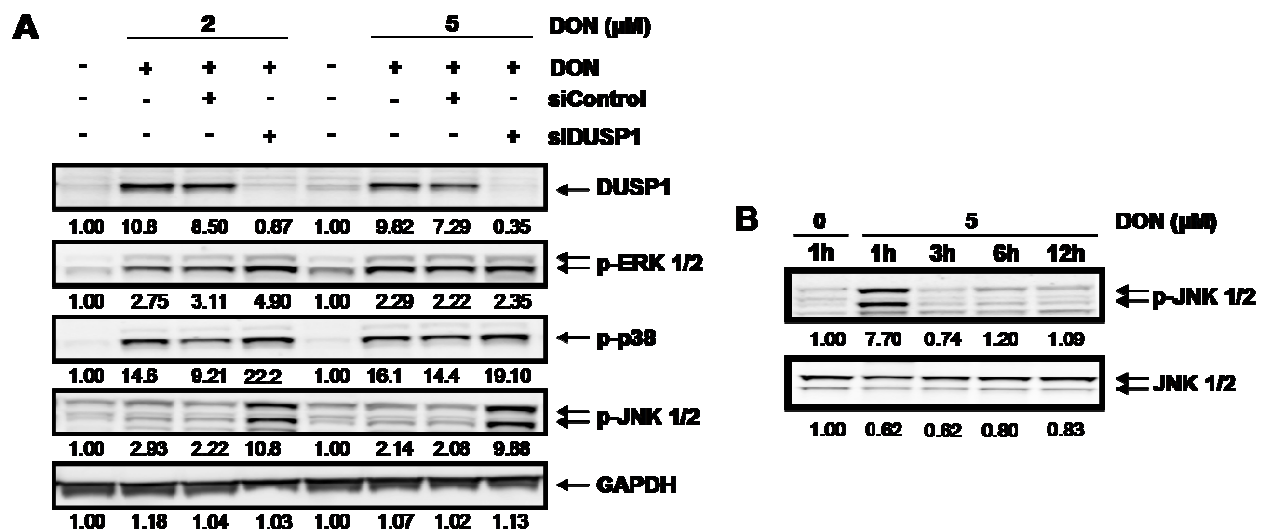


Fig.3. Effects of DUSP1 knock-down on DON induced MAPKs activation

(A) Concentration-dependent effects of DUSP1 knock-down on MAPKs activation in DON treated HepG2 cells. Cells were transfected with siRNA against DUSP1 (siDUSP1), non-target (siControl) or vehicle for 48 h and subsequently exposed to DON (2  $\mu$ M or 5  $\mu$ M) for another 6 h. The extracts were then analyzed for the presence of phospho-ERK1/2, phospho-p38, phospho-JNK1/2 and DUSP1. The blots were stripped and reprobbed for the detection of GAPDH, used as control. The results show one representative experiment of three independent experiments. (B) Effects of DON on the time-dependent activation of JNK1/2 in HepG2 cells. Cells were treated with DON (5  $\mu$ M) and harvested at the indicated times. Whole cell lysates were examined for phospho-JNK1/2 and total JNK1/2 content by Western blotting. The results are representative of three independent experiments.

### Effects of DUSP1 knock-down on the apoptotic potential of DON

Due to the fact that prolonged activation of JNK1/2 is critical for the induction of apoptosis, we determined the impact of DUSP1 on the early apoptotic potential of DON in HepG2 cells by Western blotting and flow cytometry. For Western blot analyses, cells were transfected with siDUSP1, control siRNA or vehicle followed by treatment with 2  $\mu$ M DON, 5  $\mu$ M DON or vehicle for up to 12 h. After DON treatment of cells transfected with siDUSP1, a significant up-regulation of apoptosis markers (cleaved PARP-1, active caspase-3) was detected. In contrast, only marginal levels of apoptotic marker proteins were observed in cells treated with control siRNA/DON 5  $\mu$ M. In case of cleaved PARP-1, a time dependent increase was observed in cells treated with siDUSP1/DON 5  $\mu$ M from 3 up to 12 h. This effect was not seen for activated caspase 3 (Fig. 4A). In contrast, treatment of DUSP1 knock-

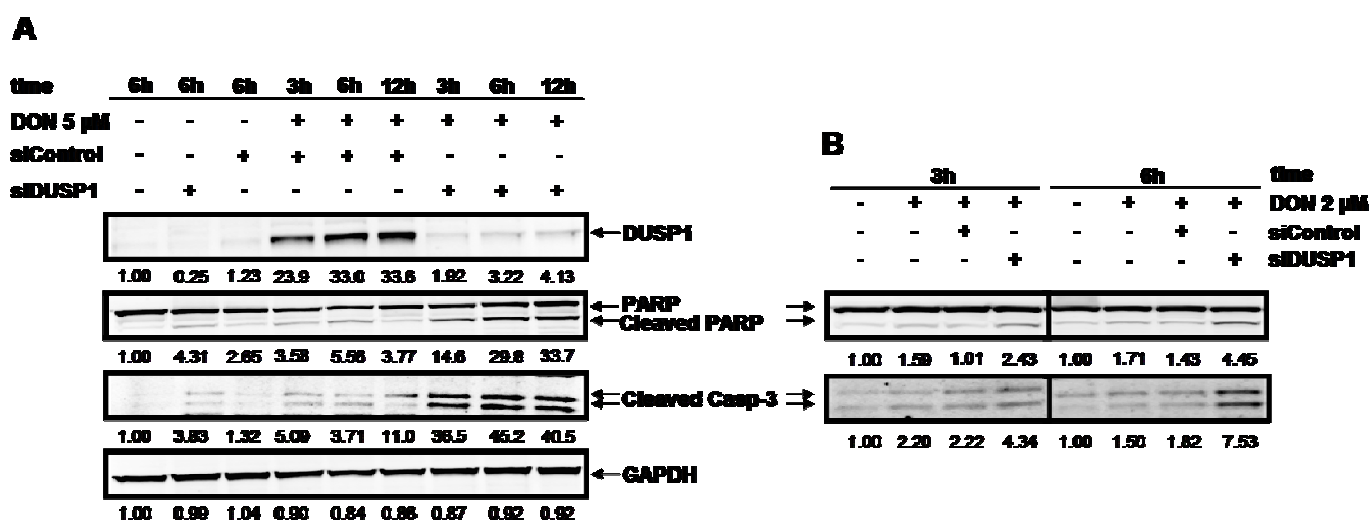


Fig.4. Effects of DUSP1 knock-down on the early apoptotic potential of DON

(A) HepG2 cells were transfected with or without siRNA against DUSP1 (siDUSP1) or non-target (siControl) for 48 h, followed by treatment with DON (5  $\mu$ M). The time-dependent activation of caspase-3 and the cleavage of one of its targets (PARP-1) were analyzed by Western blotting. Afterwards the blots were stripped and reprobed for the detection of DUSP1 and GAPDH. (B) Time-dependent activation of caspase-3 and cleavage of PARP-1 in cells treated with or without siRNA (siDUSP1 or siControl) and DON (2  $\mu$ M) for 3 and 6h. Each experiment was performed three times and the results are from one representative experiment

down cells with lower DON-concentrations (2  $\mu$ M) resulted in a time-dependent increase of both caspase-3 activation and PARP-1 cleavage. While at 3 h, only marginal levels of apoptosis markers were detected, a significant up-regulation of both markers were found at 6 h (Fig. 4B).

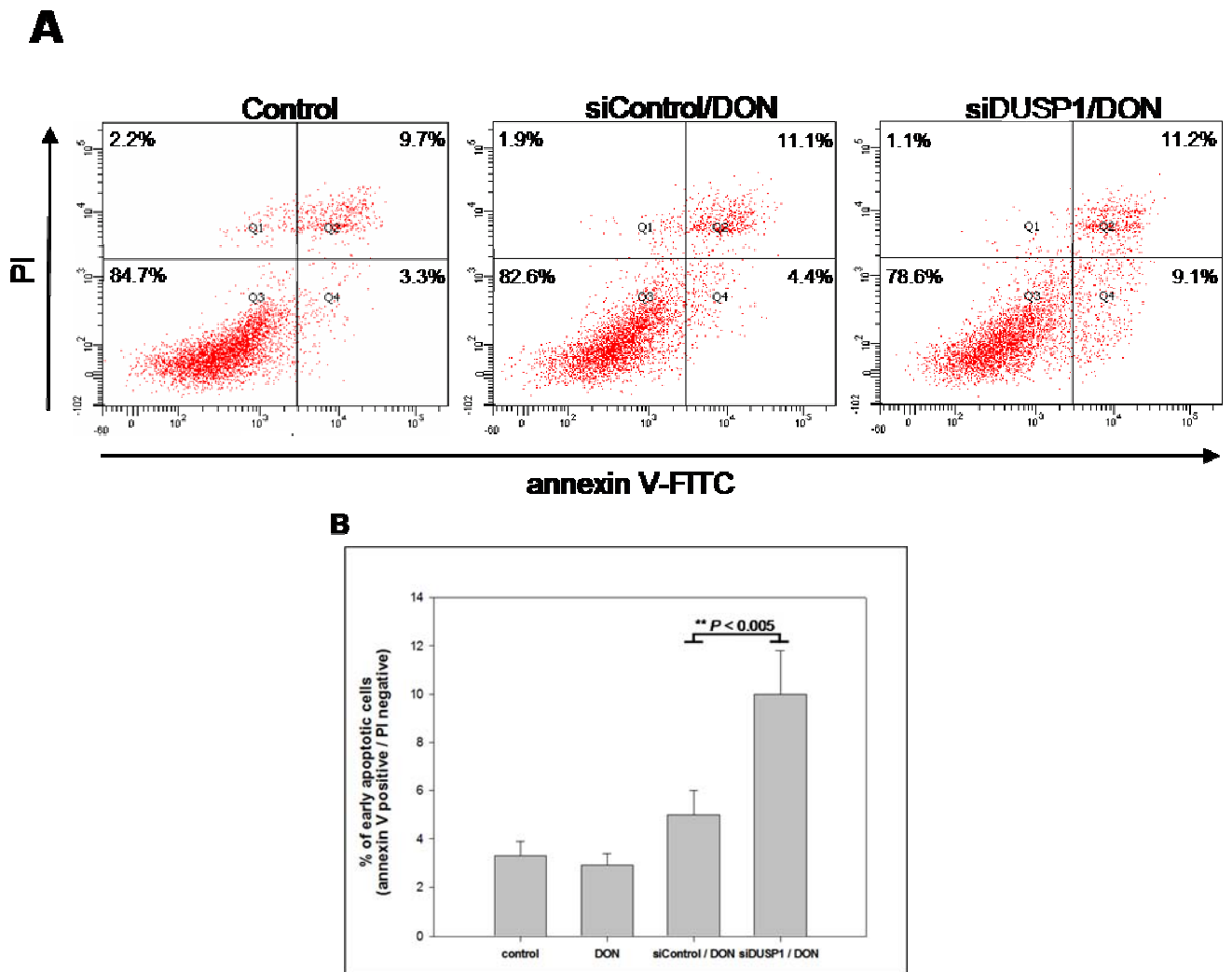


Fig.5. Effects of DUSP1 knock-down on the early apoptotic potential of DON

(A) HepG2 Cells were transfected with siRNA against DUSP1 (siDUSP1) or non-target (siControl) for 48 h and subsequently exposed to DON (5  $\mu$ M) for 12 h. For the detection of early-stage apoptosis cells were stained with annexin V/PI and analyzed by flow cytometry. Results are representative of at least four separate experiments. (B) Quantification of early apoptotic cells (annexin V positive/PI negative). Data were obtained from annexin V/PI assays and represent the means  $\pm$  SD of four independent experiments. Statistical analysis was performed using Student's *t* test (\*\*  $P < 0.005$ ).

To confirm these results, the translocation of the early apoptosis marker phosphatidylserine from the inner to the outer side of the membrane was measured by flow cytometry. Transfected cells were treated with 5  $\mu$ M DON for 12 h and stained with PI and annexin V. Early-apoptosis (annexin V positive/PI negative) was detectable in 10% of cells treated with siDUSP1/DON 5  $\mu$ M, while only 5% of cells, treated with control siRNA/DON 5  $\mu$ M showed early-apoptotic signs (Fig. 5A and 5B). Furthermore only a slight increase in the quantity of late apoptotic cells (annexin V positive/PI positive) was observed (Fig. 5A).

## **Discussion**

Numerous studies revealed DON as a potent and rapid inducer of the three major MAPKs, besides its ability to inhibit protein synthesis (Shifrin and Anderson, 1999; for review, see Pestka 2008). Despite concentration-dependent differences in cell sensitivity to DON (Nielsen et al., 2009b), the comparison of several studies shows striking similarities in the mode and duration of MAPK activation between different cell types. In detail, the treatment of immunocompetent as well as epithelial cells triggers a prolonged activation of ERK1/2 and p38, while only a transient phosphorylation is observed for JNK1/2 (Moon and Pestka, 2002; Nielsen et al., 2009a; Sergent et al., 2006). In order to clarify the impact of this stimulus specific mode and duration of MAPK activation for the cellular response, it is essential to shed light on the role of negative regulators, especially the mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs), which are the key enzymes of MAPK signalling by regulating the duration and strength of kinase activation. However, up to now, there is no information available about the role of MKPs in cellular response to DON apart from one microarray study in which a significant up-regulation of DUSP1 mRNA in spleens collected from B6C3F1 mice was observed after oral treatment with high doses of DON (Kinser et al., 2004). Here we present, for the first time, data clarifying the role of MPKs in the cellular response to DON, with a particular focus on DUSP1.

First, we analysed the mRNA expression of several MKPs by qRT-PCR. The results revealed that DON triggers a concentration-dependent expression of several MKPs (Fig. 1A), which is most clearly observed for DUSP1. This finding and the fact that low concentrations of DON cause a considerable increase of DUSP1 protein for up to 12 h (Fig. 1B; Fig. 1C) indicate that DUSP1 seems to be an essential component in the rapid response of cells to DON.

Furthermore, specific inhibitors of MEK1/2, JNK1/2 and p38 (data for JNK1/2 and p38 are not shown) were used to investigate the mode of interaction between DUSP1 and its substrates. Our results suggest that the induction of DUSP1, in response to DON, depends on the activation of MEK/ERK pathway. These results are in accordance with studies performed in RAW246.7 macrophages, in which LPS-induced DUSP1 expression was attenuated by U0126, a different MEK1/2 inhibitor (Chen et al., 2002). In contrast, the inhibition of the catalytic activity of JNK1/2 and p38 had no influence on DON induced DUSP1 expression (data not shown). In principle, different mechanisms are involved in DUSP1 expression, but the main regulator seems to be ERK1/2 by inducing DUSP1 gene expression and additionally stabilizing DUSP1 protein by phosphorylation (Brondello et al., 1997; Brondello et al., 1999).

To further characterize the impact of DUSP1 on the network of MAPK pathways in response to DON we used short interfering RNA against DUSP1. In case of ERK1/2 and p38 a strong DON-induced phosphorylation was observed in the presence as well as in the absence of DUSP1 protein. In absence of DUSP1 protein lower DON-concentrations led to a slight increase of phosphorylated ERK1/2 and p38 as compared to controls. This effect disappeared with increasing concentrations of DON (Fig. 3A). However, the major difference between DUSP1 knock-down cells and controls in response to DON was the duration of JNK1/2 activation. The absence of DUSP1 led to a prolonged and robust activation of JNK1/2 for up to 6 h (Fig. 3A), whereas the activation of JNK1/2 in control cells treated with vehicle/DON returned after 60 min to basal levels (Fig. 3B). The deactivation of JNK1/2 correlates closely with the accumulation of DUSP1 (Fig. 1C). Taken together, these results indicate that JNK1/2 seems to be the primary target of DUSP1 in the early response of HepG2 cells to DON. This is in accordance with the results of Slack and colleagues (2001), demonstrating that JNK1/2 may be the preferred substrate for DUSP1 *in vivo*. However, *in vitro* studies of Chen and colleagues (2002) performed with LPS stimulated RAW264.7 cells showed the ability of DUSP1 to dephosphorylate JNK1/2 as well as p38 indicating that the regulation of JNK1/2 and p38 by DUSP1 seems to be cell-type and/or stimulus specific.

Due to the facts that (i) sustained activation of JNK1/2 is critical for the induction of apoptosis (Chen and Tan, 2000; Sánchez-Perez et al., 1998); (ii) DUSP1 knock-down results in sustained activation of JNK1/2 (Fig. 3A) and (iii) moderate concentrations of DON do not induce cellular apoptosis in epithelial cells (Sergent et al., 2006; Yang et al., 2008), in contrast

to immunocompetent cells (Zhou et al., 2005), we further elucidated the importance of DUSP1 on the prevention of apoptosis in response to DON. At all selected time points (3 h, 6 h, 12 h) a considerable increase of activated caspase-3 was seen in DUSP1 knock-down cells treated with 5  $\mu$ M of DON, compared to controls. The activation of caspase-3 was accompanied by the cleavage of its substrate PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase-1), confirming DUSP1 as a key regulator of cell survival signalling in response to DON (Fig. 4A). Further on, significance of these results was corroborated by the detection of phosphatidylserine translocation from the inner to the outer side of the cell membrane (Fig. 5B). At lower concentrations of DON a time-dependent induction of apoptosis was observed. The treatment of DUSP1 knock-down cells with 2  $\mu$ M DON for 6 h resulted in a considerable increase of activated caspase-3, compared with results obtained from the 3 h time point (Fig. 4B). These results indicate that cells lacking DUSP1 protein are able to delay but not to prevent the induction of apoptosis when treated with low concentrations of DON. This finding confirms the importance of DUSP1 in the prevention of DON induced early-stage apoptosis in the epithelial cell line HepG2.

In addition, our results suggest that p38 seems to play a negligible role in the induction of early apoptosis by DON in epithelial cells. The strong and sustained activation of p38 did not correlate with the induction of apoptosis at all tested concentrations and time points (Fig. 3A, 4A, 4B). This is in contrast to immunocompetent cells (Pestka, 2008; Zhou et al., 2005), indicating that despite similarities in the mode and duration of MAPKs activation, the sensitivity of cells against sustained p38 activation for the induction of apoptosis differs between immunocompetent and epithelial cells. The predominance of p38-mediated survival signals over its apoptotic potential could be an explanation for this observation in epithelial cells. According to this hypothesis, a considerable and sustained increase of heat shock protein Hsp27 was detected in cells treated with DON (data not shown). The activation of Hsp27 is catalysed by MAPKAPK2/3, which in turn are phosphorylated by p38. Hsp27 has been shown to prevent cell death caused by a wide variety of apoptotic agents (Concannon et al., 2003). Furthermore, previous studies of our laboratory (Nielsen et al., 2009a) and Yang and colleagues (2009) revealed ATF3 as a target of DON in epithelial cells. Yang and colleagues showed that p38 is a main regulator of ATF3 production and the stimulation of antisense ATF3-transfected cells by DON leads to the induction of apoptosis, suggesting that p38-mediated ATF3 expression and stabilisation act as a survival signal in response to DON.



However, the response of cells to external stimuli represents a complex web of survival and apoptotic signalling pathways. The observation, that cells lacking DUSP1 protein are not able to prevent DON induced apoptosis by other pro-survival mediators emphasizes the role of DUSP1 as a key regulator of survival signalling in this complex web.

Further studies will evaluate the impact of DUSP1 on the immunotoxic effects of DON. Due to the finding that (i) DUSP1 overexpression resulted in decreased LPS-induced iNOS expression and consequently decreased NO production in macrophages (Nelin et al., 2007); (ii) DON inhibits LPS-induced NO production in macrophages (Sugiyama et al., 2010) and (iii) DON triggers a strong and prolonged activation of DUSP1 in epithelial cells as shown here, it is highly probable that DUSP1 plays a pivotal role in the inhibition of LPS-induced NO production mediated by DON.

In summary, our results indicate that the expression and stabilisation of DUSP1 mediated by ERK1/2 is essential for the prevention of DON induced early-stage apoptosis in the epithelial cell line HepG2 through its ability to rapidly inactivate JNK1/2.

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (GK-1029). We thank Brunhilde Minich for excellent technical assistance.

### **References**

Bhalla, U.S., Ram, P.T., Iyengar, R., 2002. MAP kinase phosphatase as a locus of flexibility in a mitogen-activated protein kinase signaling network. *Science* 297, 1018-1023.

Brondello, J.M., Brunet, A., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., 1997. The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J. Biol. Chem.* 272, 1368-1376.

Brondello, J.M., Pouyssegur, J., McKenzie, F.R., 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science* 286, 2514-2517.

Camps, M., Nichols, A., Arkininstall, S., 2000. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.* 14, 6-16.

Chang, L., Karin, M., 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Chen, P., Li, J., Barnes, J., Kokkonen, G.C., Lee, J.C., Liu, Y., 2002. Restraint of proinflammatory cytokine biosynthesis by mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *J. Immunol.* 169, 6408-6416.

Chen, Y.R., Tan, T.H., 2000. The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review). *Int. J. Oncol.* 16, 651-662.

Concannon, C.G., Gorman, A.M., Samali, A., 2003. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* 8, 61-70.

Ehrlich, K.C., Daigle, K.W., 1987, Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes. *Biochim. Biophys. Acta.* 923(2), 206-213

Hazel, C.M., Patel, S., 2004. Influence of processing on trichothecene levels. *Toxicol. Lett.* 153, 51-59.

Kinser, S., Jia, Q., Li, M., Laughter, A., Cornwell, P., Corton, J.C., Pestka, J., 2004. Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets. *J. Toxicol. Environ. Health A.* 67, 1423-1441.

Liu, Y., Shepherd, E.G., Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases--regulating the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 202-212.

Moon, Y., Pestka, J.J., 2002. Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases. *Toxicol. Sci.* 69, 373-382.

Nelin, L.D., Wang, X., Zhao, Q., Chicoine, L.G., Young, T.L., Hatch, D.M., English, B.K., Liu, Y., 2007. MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 293, C632-640.

Nielsen, C., Lippke, H., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., 2009a. Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 53, 479-491.

Nielsen, C., Casteel, M., Didier, A., Dietrich, R., Märtlbauer, E., 2009b. Trichothecene-induced cytotoxicity on human cell lines. *Mycotox. Res.* 25, 77-84.

Pestka, J.J., 2008. Mechanisms of deoxynivalenol induced gene expression and apoptosis. *Food. Addit. Contam.: Part A.*, 1-13.

Rotter, B.A., Prelusky, D.B., Pestka, J.J., 1996. Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health.* 48, 1-34.

Sánchez-Perez, I., Murguía, J.R., Perona, R., 1998. Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death. *Oncogene.* 16, 533-540.

SCOOP (2003): (Scientific Cooperation) Report of experts participating in Task 3.2.10: Collection of occurrence data of *Fusarium* toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

Sergent, T., Parys, M., Garsou, S., Pussemier, L., Schneider, Y.J., Larondelle, Y., 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 164, 167-176.

Shifrin, V.I., Anderson, P., 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* 274, 13985-13992.

Slack, D.N., Seternes, O.M., Gabrielsen, M., Keyse, S.M., 2001. Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J. Biol. Chem.* 276, 16491-16500.

Sugiyama, K., Muroi, M., Tanamoto, K., Nishijima, M., Sugita-Konishi, Y., 2010. Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. *Toxicol. Lett.* 192, 150-154.

Wang, X., Liu, Y., 2007. Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1. *Cell. Signal.* 19, 1372-1382.

Yang, G.H., Jarvis, B.B., Chung, Y.J., Pestka, J.J., 2000. Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 164, 149-160.

Yang, H., Chung, D.H., Kim, Y.B., Choi, Y.H., Moon, Y., 2008. Ribotoxic mycotoxin deoxynivalenol induces G2/M cell cycle arrest via p21Cip/WAF1 mRNA stabilization in human epithelial cells. *Toxicology.* 243, 145-154.

Yang, H., Park, S.H., Choi, H.J., Moon, Y., 2009. Epithelial cell survival by activating transcription factor 3 (ATF3) in response to chemical ribosome-inactivating stress. *Biochem. Pharmacol.* 77, 1105-1115.

Zhou, H.R., Islam, Z., Pestka, J.J., 2005. Induction of competing apoptotic and survival signaling pathways in the macrophage by the ribotoxic trichothecene deoxynivalenol. *Toxicol. Sci.* 87, 113-122.

## 4 Diskussion

Bedingt durch den weltweiten Klimawandel und Veränderungen im Getreideanbau konnte in den letzten Jahren eine zunehmende Belastung von Getreide und getreidehaltigen Lebensmitteln mit Fusarien und Fusarientoxinen beobachtet werden (Prandini et al. 2009; Schaafsma und Hooker, 2007). Eine europaweite Datenerhebung (Scientific cooperation on Questions relating to Food, SCCOP) aus dem Jahre 2003 ergab, dass 75 % der untersuchten Lebensmittel mit DON kontaminiert waren. Hierbei lag die durchschnittliche Belastung in einigen Ländern bei über 1000 µg/kg. Die höchsten Konzentrationen an DON wiesen die Getreidearten Weizen und Mais auf. Deutsche Studien zur Belastung von Lebensmitteln mit DON erbrachten das gleiche Ergebnis bezüglich der Vorkommenshäufigkeit von DON (Curtui et al. 2005). Mittels einer Biomarker-Studie aus England, bei der die DON-Konzentration im Urin von Probanden bestimmt wurde, konnte die hohe Exposition der Verbraucher gegen dieses Toxin verifiziert werden. In 98,7 % der Urinproben konnte DON nachgewiesen werden. Aus den gewonnenen Daten wurde mittels einer groben Schätzung die tägliche Aufnahme von DON pro Kopf abgeleitet. Es zeigte sich, dass ca. 50 % des von dem SCF vorgeschlagenen TDI-Wertes von 1000 ng/kg KGW ausgeschöpft wurde (Turner et al. 2008).

Um die möglichen Risiken der täglichen DON-Exposition für den Verbraucher zukünftig besser einschätzen zu können, ist es erforderlich, die molekularen Mechanismen, die den komplexen *in vivo* Effekten von DON (Pestka 2008) zugrunde liegen, aufzuklären.

### 4.1 Expression MAPKinasen-abhängiger Transkriptionsfaktoren unter DON-Behandlung in verschiedenen humanen Zelllinien

Die Regulation von Transkriptionsfaktoren ist ein essentieller Bestandteil der adäquaten Zellantwort auf externe Stimuli. Sie ermöglichen die Umsetzung transienter Signale der Zellmembran, weitergeleitet über Kinase-Kaskaden, in langfristige Änderungen der Genexpression (Barnes 2006). Die MAPKs-Pathways spielen hierbei eine zentrale Rolle. Sie induzieren sowohl die Expression als auch die post-translationale Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren, die als Homo- bzw. Heterodimere das Aktivator Protein-1 (AP-1) bilden (Shaulian, 2010). In Abhängigkeit von seiner Dimer-Zusammensetzung reguliert AP-1 durch Bindung an die Promoter- und Enhancer-Region zahlreicher Zielgene sowohl die

Proliferation und Differenzierung von Zellen als auch Prozesse im Entzündungsgeschehen und den programmierten Zelltod (Hess et al. 2004).

Um Rückschlüsse auf die Bedeutung der DON-spezifischen MAPKs-Induktion für die Zellhomöostase treffen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, detaillierte Kenntnisse über die Regulation der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren zu gewinnen. Diese entscheiden letztlich durch Aktivierung der Expression ihrer Zielgene über die Stimulus-spezifische Zellantwort (Moon und Pestka 2002; Nielsen et al. 2009; Sergent et al. 2006; Wagner und Eferl 2005). In der vorgestellten Studie wurden sechs permanente humane Zelllinien unterschiedlicher geweblicher Herkunft verwendet. Die permanenten Darmepithel- bzw. Lungenepithel- Zelllinien (CaCo-2; A549) stehen repräsentativ für die Organsysteme, die als erstes mit DON in Kontakt kommen. Die Leber, vertreten durch die humane Leberepithel-Zelllinie HepG2, ist als Primärorgan der Biotransformation von DON ebenfalls von entscheidender Bedeutung (Nielsen et al. 2009). Da sich immunkompetente Zellen als besonders empfindlich gegenüber DON erwiesen haben (Pestka 2008), wurden die humane T-Zelllinie Jurkat und die humane Monozyten-Zelllinie U937 in die Studie aufgenommen. Die AP-1 Komplexe spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Wachstumsvorgängen (Hess et al. 2004; Wagner 2010). So führte eine Dysregulation der AP-1-Signalkaskade in einem Tumor-Modell zu einem signifikanten Muskelschwund (Moore-Carrasco et al. 2006). Fütterungsversuche bei Schweinen konnten zeigen, dass DON zeit- und konzentrationsabhängig zu einer signifikanten Wachstumsdepression führt (Bergsjö et al. 1993; Prelusky et al. 1994). Daher wurde, um erste mögliche Anhaltspunkte für eine Beteiligung von AP-1 an der unter DON-Fütterung auftretenden Wachstumsdepression zu erhalten, die humane Rhabdomyosarkom-Zelllinie A204 in die Studie einbezogen.

Die Ergebnisse der Studie offenbarten signifikante Zelltyp-spezifische Unterschiede im Potential von DON, die Expression der Transkriptionsfaktoren des AP-1 Komplexes zu induzieren. Eine kurzzeitige Behandlung (3 h) der Zellen mit geringen Konzentrationen von DON (1  $\mu$ M) führte in allen sechs untersuchten Zelllinien zu einer deutlich induzierten Expression des Transkriptionsfaktors JUN (Jurkat > HepG2 > A204 > U937 > CaCo-2 > A549), wobei es in Jurkat T-Zellen zu einer besonders deutlichen Hochregulation der mRNA (343 fold) kam. T-Lymphozyten spielen in Abhängigkeit von ihrer Differenzierung, u.a durch die Produktion von Zytokinen, eine wichtige Rolle in der zellulären Antwort auf externe Stimuli (Paul und Seder 1994). Die Expression ist sowohl von NFAT (nuclear factor of

activated T cells) als auch von AP-1 abhängig (Zenz et al. 2008). Dies könnte die hohe Expression von JUN, ein zentraler Baustein von AP-1, in Jurkat T-Zellen unter DON erklären. Bereits frühere Studien in Makrophagen, gewonnen aus der Milz von Mäusen und der Leber von Ratten, konnten eine DON induzierte JUN Aktivierung zeigen (Wong et al. 2002; Zhou et al. 2005, Sahu et al. 2008). Auch Nielsen et al. (2009) konnten in der epithelialen Zelllinie HepG2 eine signifikant erhöhte Expression der JUN unter DON-Behandlung feststellen, was mit den Ergebnissen unserer Studie übereinstimmt. Dies deutet darauf hin, dass JUN einen wichtigen Faktor in der DON-induzierten Zellantwort sowohl von immunkompetenten als auch von epithelialen Zellen darstellt.

Zudem kam es unter DON-Behandlung zu einem deutlichen Anstieg der JUND mRNA in den immunkompetenten Zelllinien Jurkat (12,8 fach) und U937 (11,3 fach). Überexpressions-Studien zeigten, dass JUND sowohl die Proliferation von B- als auch T-Lymphozyten inhibiert. Erste Studien in T-Lymphozyten deuten darauf hin, dass dies auf die verminderte Expression von IL-4 zurückzuführen ist (Meixner et al. 2010). Zudem konnte eine verminderte Expression der Zell-Oberflächenmoleküle CD25 und CD69 beobachtet werden (Meixner et al. 2004 und 2010). Beide stellen für T-Lymphozyten Aktivierungsmarker dar (Sancho et al. 2006). Diese antiproliferativen Eigenschaften von JUND konnten auch in humanen Makrophagen beobachtet werden (Behmoaras et al. 2008), was darauf hindeutet, dass die gesteigerte Expression von JUND einen Regulationsmechanismus der überschießenden pro-inflammatorischen T-Zell Antwort unter DON darstellt.

Zudem induzierte DON in den Zelllinien HepG2 (96,2 fach) und U937 (59,3 fach) die Expression von FOS. Bereits 2004 konnten Kinser et al. eine deutlich verstärkte Expression der FOS mRNA in der Milz von Mäusen nach Fütterung von DON beobachten. Die Rolle von FOS in der frühen zellulären Antwort auf externe Stimuli wird kontrovers diskutiert. So konnten Koga et al. (2009) in LPS-induzierten murinen Makrophagen zeigen, dass die cAMP (cyclic adenosine monophosphate) vermittelte Inhibition der Expression proinflammatorischer Zytokine von aktivem FOS abhängig ist. Eine Behandlung der gleichen Zelllinie mit *Helicobacter pylori* führte hingegen zu einer FOS-vermittelten Apoptose-Induktion (Asim et al., 2010). Weitere Studien konnten belegen, dass FOS eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell Differenzierung und somit in der frühen Immunantwort spielt. In murinen Makrophagen inhibiert FOS die Expression von IL-12 und verschiebt so das Gleichgewicht zugunsten der Th2-Zellen (Roy et al. 1999), was folglich zu einer

gesteigerten Expression von IL-4 und IL-10 führt (Paul und Seder 1994). IL-4 wiederum inhibiert die Expression von FOS in Makrophagen, wodurch das Gleichgewicht wieder zugunsten der Th1-Zellen verschoben wird (Roy et al. 2000). In Hepatozyten spielt FOS als Transkriptionsfaktor für das Akute-Phase-Protein CRP (C-reactive protein) eine weitere wichtige Rolle im Entzündungsgeschehen (Nishikawa et al. 2008).

Des Weiteren konnte im Rahmen der Untersuchungen nachgewiesen werden, dass es unter DON Einwirkung zu einer signifikanten Induktion der ATF3 Expression kommt (A549 > A204 > HepG2 > Jurkat > A204 > U937 > CaCo-2), wobei die höchste mRNA Menge in der Lungenepithel-Zelllinie A549 (44,2 fach) nachgewiesen werden konnte. ATF3 gehört zur CREB Familie der BZip (basic leucine zipper) Transkriptionsfaktoren (Hai und Hartman 2001) und nimmt Einfluss auf die Regulation der zellulären Stressantwort, des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes (Mayr und Montminy 2001; Hartman et al. 2004; Nobori et al. 2002). Studien in Knochenmarksmakrophagen der Maus ergaben, dass ATF3 über Bindung an die Promoterregion von IL-6 und IL-12b, sowie durch die Aktivierung von HDAC1 (Histone Deacetylase 1), ein zentraler Baustein eines Regulationsmechanismus ist, der das Überschießen einer TLR-4 (Toll-like Rezeptor 4) vermittelten Immunantwort unter LPS verhindert (Gilchrist et al. 2006). Zudem konnte in einem murinen Asthma-Model gezeigt werden, dass ATF3 die Expression verschiedener Zytokine (IL-4, IL-5 und IL-13) in Th2-Zellen, gewonnen aus Bronchialsekret, inhibiert und somit einen wichtigen Regulator der allergiebedingten Entzündung des Respirationstraktes darstellt (Gilchrist et al. 2008). ATF3-Überexpressions-Studien in transgenen Mäusen führten zu einer Leberdysfunktion, die sich als gestörte Glucosehomöostase und in einer reduzierten Glykogenspeicherung manifestierte. Interessanterweise konnten nach Fütterungsversuchen von Schweinen mit DON kontaminiertem Futter pathologische Veränderungen in der Leber nachgewiesen werden, die sich unter anderem in einer reduzierten Glykogenspeicherung äußerten (Tiemann et al., 2006).

Eine signifikante Hochregulation der FOSL2 mRNA konnte, verglichen mit der frühen Expression der oben aufgeführten Transkriptionsfaktoren, bei den meisten Zelllinien erst nach 24 h unter DON-Behandlung nachgewiesen werden. Die Exposition der Lungenepithel-Zelllinie (A549) mit geringen Konzentrationen von DON führte jedoch bereits nach drei Stunden zu einer signifikanten Hochregulation von FOSL2 mRNA. Bis heute liegen nur wenige Informationen zu den biologischen Eigenschaften von FOSL2 vor. Aus bisher ungeklärten Gründen führte ein knock-out von FOSL2 bei Mäusen postpartum zum Tode



(Eferl et al. 2007). Hingegen kam es bei FOSL2-überexprimierenden transgenen Mäusen zu einer Fibrosierung zahlreicher Gewebe, wobei die stärksten fibrotischen Veränderungen in der Lunge beobachtet werden konnten. Lungenepithel-Zellen zeigten zudem eine deutlich gesteigerte Expression von Osteopontin, das eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zahlreicher Lungenerkrankungen beim Menschen spielt (Eferl et al. 2008).

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der unter DON Behandlung signifikant hochreguliert wird, ist EGR-1. Die stärkste Expression konnte in der epithelialen Lungen-Zelllinie A549 (92,6 fach) und Darm-Zelllinie CaCo-2 (13,9 fach) beobachtet werden. EGR-1 wird von zahlreichen Geweben unter dem Einfluss verschiedener Faktoren und Stimuli exprimiert (Yan et al. 2000; Khachigian und Collins 1997) und induziert über spezifische Promoter-Bindungsstellen die Expression zahlreicher Gene (u.a. TNF $\alpha$ , IL-6, TF, ICAM-1, MCP-1) (Yan et al. 2000; Guha et al. 2001; Pawlinski et al. 2003). Bereits Moon et al. (2007) konnten in der epithelialen Darmzelllinie Int-407 eine ausgeprägte Hochregulation der EGR-1 auf Proteinebene unter DON-Behandlung nachweisen. Zudem konnte gezeigt werden, dass EGR-1 in epithelialen Zellen die unter DON deutlich hochregulierte Expression von CXCL8 induziert.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine DON-Exposition konzentrations-, zeit- und zelllinienabhängig zu einer signifikant induzierten Expression von Transkriptionsfaktoren des AP-1-Komplexes führt. Um eine Aussage über die Bedeutung dieser Induktion unter DON für die Zellhomöostase treffen zu können, müssen weitere Versuche sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durchgeführt werden. Von Interesse wäre hierbei die Fragestellung ob DON, bedingt durch die tägliche Aufnahme über die Nahrung, eine Rolle als Cofaktor bei der Entstehung chronisch-entzündlicher Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes spielt. Die Manifestation pathologischer Veränderungen, hervorgerufen durch eine Infektion mit *Helicobacter pylori* basieren u.a. auf dessen Fähigkeit durch Expression von Pathogenitätsfaktoren den Transkriptionsfaktor AP-1 zu aktivieren (Chu et al. 2003; Ding et al. 2008; Allison et al. 2009). Sowohl für immunkompetente als auch für epitheliale Zellen des Gastrointestinaltraktes konnte gezeigt werden, dass die MAPKs/AP-1-Achse neben der NF- $\kappa$ B-Achse essentiell für die Expression von CXCL8 während einer Infektion mit *Helicobacter pylori* ist (Allison und Ferrero 2010; Hisatsune et al. 2008). Zudem ergab die Auswertung klinischer Studien eine Korrelation zwischen der CXCL8-Expression und der Entstehung von Duodenalulzera (Yamaoka et al. 2002). Das Chemokin CXCL8 induziert die

Bildung eines chemotaktischen Gradienten, der entscheidend für die Migration neutrophiler Granulozyten ist, und stellt somit einen wichtigen Faktor in der frühen Phase des Entzündungsgeschehens dar (Mukaida 2000; Ringe et al. 2007). Studien in intestinalen Epithelzelllinien zeigten, dass es unter DON-Exposition ebenfalls zu einer signifikanten konzentrations- und zeitabhängigen Expression von CXCL8 kommt (Instones und Hetland 2004; Moon et al. 2007; Choi et al. 2009). Die Aktivierung der Expression scheint hierbei über den Transkriptionsfaktor EGR-1 zu erfolgen, der wiederum ein Substrat der ERK1/2 ist (Moon et al. 2007). Bisher unveröffentlichte Daten unseres Institutes zeigen, dass DON in Kombination mit Lipopolysacchariden zu einer Superinduktion von CXCL8 mRNA und Protein in verschiedenen Zelllinien führt, wohingegen bei Behandlung mit DON allein oder LPS allein nur eine schwache Expression zu beobachten ist. Zukünftige Studien müssen klären, welche molekularen Mechanismen diesem Phänomen zugrunde liegen.

#### **4.2 Bedeutung der Dual-spezifischen Phosphatase 1 für das apoptotische Potential von Deoxynivalenol in der epithelialen Leberzelllinie HepG2**

Durch die Phosphorylierung spezifischer Transkriptionsfaktoren des AP1-Komplexes wird die Expression zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren reguliert (Moon und Pestka 2002; Shi et al. 2009; Moon et al. 2008; Pestka und Amuzie 2008). Um ein Überschießen der proinflammatorischen Zellantwort zu verhindern, kommt es unter MAPKs-Aktivierung – in Form eines klassischen negativen Feedback Mechanismus – zu einer Expression negativer Regulatoren der MAPKs-Pathways (Chang und Karin 2001; Kristiansen et al. 2010). Von entscheidender Bedeutung sind hierbei die Dual-spezifischen Phosphatasen (DUSPs), die substratspezifisch zu einer raschen Inaktivierung der MAPKs durch Dephosphorylierung führen (Farooq und Zhou 2004; Camps et al. 2000; Liu et al. 2007).

Zahlreiche Studien zeigten, dass DON, neben seinen Proteinsynthese hemmenden Eigenschaften, ein potenter Aktivator der drei wichtigsten Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (ERK1/2, JNK1/2, p38) ist (Shifrin und Anderson 1999; Pestka 2008). Um eine Aussage über die Bedeutung des DON-spezifischen Aktivierungsmusters der MAPKs für die Zellhomöostase treffen zu können (Moon und Pestka 2002; Nielsen et al. 2009; Sergent et al. 2006), ist es notwendig, die Rolle der DUSPs in der zellulären Antwort auf DON zu berücksichtigen.

Da entsprechende detaillierte Studien nicht vorlagen, wurde im Rahmen der eigenen Untersuchungen die Expression verschiedener DUSPs unter DON-Behandlung mittels quantitativer Real-Time PCR (qRT-PCR) ermittelt. Sowohl unter der Verwendung von hohen (10  $\mu\text{M}$ ) als auch von niedrigen (1  $\mu\text{M}$ ) DON-Konzentrationen kam es zu einer signifikanten konzentrationsabhängigen Induktion aller in der Studie untersuchten DUSPs, wobei die DUSP1 am deutlichsten hochreguliert war. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Kinser et al. (2004), die in der Milz von Mäusen nach Aufnahme von DON-kontaminiertem Futter einen signifikanten Anstieg der DUSP1 mRNA beobachten konnten. Der Nachweis der DUSP1 auf Protein-Ebene mittels Western-Blot bestätigte die zuvor gewonnenen Erkenntnisse. Geringe Konzentrationen von DON ( $> 0,31 \mu\text{M}$ ) führten innerhalb von drei Stunden zu einem signifikanten Anstieg der DUSP1, wobei die deutlichste Hochregulation unter der Behandlung mit 2  $\mu\text{M}$  DON beobachtet werden konnte. Auffällig war, dass es unter Verwendung sehr hoher DON-Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) reproduzierbar wieder zu einer Abnahme der DUSP1 auf Protein-Ebene kam, während auf mRNA-Ebene eine Superinduktion festgestellt wurde. Eine plausible Erklärung hierfür wäre die unter hohen Konzentrationen einsetzende Proteinsynthese-Hemmung (Pestka 2008). Die Durchführung einer Zeitkinetik unter DON-Behandlung (2  $\mu\text{M}$ ) zeigte, dass es bereits nach einer Stunde zu einer signifikanten Hochregulation von DUSP1-Protein kam, die sich nach drei Stunden deutlich verstärkte und über einen Zeitraum von zwölf Stunden nachweisbar war. Der deutliche Anstieg der DUSP1 mRNA und die signifikante Hochregulation der DUSP1 auf Protein-Ebene, unter Verwendung geringer Konzentrationen von DON, über einen Zeitraum von zwölf Stunden deuten darauf hin, dass die DUSP1 ein wichtiger Bestandteil der frühen zellulären Antwort auf DON ist. Daher fokussierten sich die weiteren Studien auf die DUSP1, die als „immediate early gene“ eine hohe Affinität gegenüber den MAPKs besitzt und somit als Schlüsselregulator der MAPK-Pathways angesehen wird (Wang und Liu 2007).

Wie im Schrifttum dargestellt erfolgt die Expression der DUSP1 über einen negativen Feedback Mechanismus, basierend auf der Aktivierung ihrer Substrate (MAPKs) und der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren (Farooq und Zhou 2004). Um den individuellen Einfluss der MAPKs auf die Regulation der DUSP1 unter DON detaillierter untersuchen zu können, wurden spezifische Inhibitoren gegen die MEK1/2 (Kinase oberhalb von ERK1/2), JNK1/2 und p38 verwendet. Die Ergebnisse zeigen, dass die DUSP1-Induktion unter DON abhängig von der Aktivierung des MEK/ERK-Pathway ist. Die Inhibition der katalytischen Aktivität von JNK1/2 und p38 hatte hingegen keinen Einfluss auf die Expression der DUSP1.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Hutter et al. (2002), die eine ERK-abhängige Induktion der DUSP1 in LPS-behandelten murinen Makrophagen beobachteten. Frühere Studien von Brondello et al. (1997 und 1999) über die post-transkriptionalen/post-translationalen Mechanismen der DUSP1-Regulation zeigten, dass die ERK1/2 sowohl über die Induktion der Transkription als auch über post-translationalen Modifikation durch Phosphorylierung der bedeutendste DUSP1-Regulator ist. Interessant in diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse einer Studie von Wätjen et al. (2009). Sie untersuchten die molekularen Eigenschaften der Fusarium-Metaboliten Enniatin A1, B und B1 in verschiedenen permanenten Leberzelllinien und kamen zu dem Ergebnis, dass es nach Enniatin-Behandlung konzentrationsabhängig zu einer Inhibition der ERK1/2-Expression kam. Schlussfolgernd müsste dies auch zu einer Inhibition der DUSP1-Expression führen. Zhou und Pestka (2005) beobachteten eine signifikante Zunahme des apoptotischen Potentials von DON unter Inhibition der ERK1/2 mittels eines spezifischen Inhibitors. Die Kombination beider Mykotoxine sollte somit zu einer deutlichen Steigerung des apoptotischen Potentials von DON führen. Hierdurch ließe sich evtl. auch das bei Fütterungsversuchen beobachtete Phänomen erklären, dass künstlich mit DON kontaminiertes Futter eine deutlich geringere klinische Symptomatik verursacht, als natürlich kontaminierte Rationen (Prelusky 1996). Welche Bedeutung die DUSP1 in diesem Zusammenhang spielt, müssen künftige Studien klären. Fraglich bleibt auch, welche molekularen Mechanismen oberhalb der MAPKs entscheidend für deren Aktivierung und somit auch für die Expression der DUSP1 sind. Ein entscheidender Faktor scheint hierbei die Proteinsynthese-Hemmung zu sein (Ehrlich und Daigle 1987; Zhou et al. 2003 und 2005; Bae et al. 2010). Hierfür spricht, dass im Fall von Shiga Toxin 1 und Anisomycin zwei weitere Proteinsynthese-Hemmer eine starke und anhaltende Expression der DUSP1 induzieren (Kojima et al. 2000; Wu und Bennett 2005). Die Bindungsstelle scheint hierbei eine entscheidende Rolle zu spielen. Sowohl DON als auch Shiga Toxin 1 und Anisomycin interagieren mit der 28S rRNA (Sweeney et al. 1991; Oberg et al. 1987; Li und Pestka 2008). Der Proteinsynthese-Hemmer Cycloheximid blockiert hingegen die Translokation der Peptidyl-tRNA und führt zu keiner Induktion der DUSP1 Expression (Felicetti et al. 1966; Kojima et al. 2000).

Um die Bedeutung der DUSP1 in der zellulären Antwort auf DON zu klären, wurde mittels short interfering RNA (siRNA) die DUSP1 mRNA über den im Zytosol lokalisierten RISC-Komplex (RNA-induced silencing complex) degradiert (Caplen und Mousses 2003). Die Behandlung von siDUSP1 transfizierten Zellen mit DON (2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M) führte zu einer

deutlich verlängerten Aktivierung der JNK1/2 von bis zu sechs Stunden. Im Gegensatz hierzu konnte in der Kontrolle (siControl/DON) nur eine Aktivierung über einen Zeitraum von einer Stunde nachgewiesen werden. Die MAPKs ERK1/2 und p38 wiesen hingegen keine deutlichen Veränderungen in ihrem Induktionsprofil auf. JNK1/2 stellt somit das primäre Substrat der DUSP1 in der frühen zellulären Antwort auf DON darstellt. Dies deckt sich mit den Ergebnissen von Slack et al. (2001), die mittels *in vivo* Studien zu dem Ergebnis kamen, dass die höchste Affinität der DUSP1 gegenüber JNK1/2 besteht. Jedoch konnten Chen et al. (2001) in LPS-behandelten Peritoneal-Makrophagen nachweisen, dass die DUSP1 neben der Inaktivierung von JNK1/2 zusätzlich eine hohe Affinität zu p38 besitzt. Dies deutet darauf hin, dass die Inaktivierung von JNK1/2 und p38 durch die DUSP1 Zelltyp- und/oder Stimulus-spezifisch zu sein scheint.

Aufgrund der Erkenntnisse, dass (1) eine anhaltende Aktivierung von JNK1/2 die Induktion intrinsischer mitochondrialer Apoptose einleiten kann (Chen and Tan 2000; Sánchez-Perez et al. 1998); (2) ein DUSP1 knock-down zu einer deutlich verlängerten Aktivierung von JNK1/2 führt; (3) „realistische“ DON-Konzentrationen, im Gegensatz zu immunkompetenten Zellen, bei epithelialen Zellen keine Apoptose-Induktion auslösen (Sergent et al. 2006; Yang et al. Zhou et al. 2005), wurde die Bedeutung der DUSP1 innerhalb der anti-apoptischen Zellantwort genauer untersucht. Zu allen untersuchten Zeiten (3 h, 6 h, 12 h) konnte in DUSP1 knock-down Zellen, nach Behandlung mit 5  $\mu$ M DON, eine deutliche Apoptose-Aktivierung (aktive Caspase-3, proteolytischer Abbau von PARP-1) mittels Western Blot gezeigt werden. In den entsprechenden Kontrollansätzen (siControl/5  $\mu$ M) konnte hingegen keine Induktion von Apoptose nachgewiesen werden. Die Ergebnisse ließen sich quantitativ mittels Durchflusszytometrie basierend auf der Detektion der Phosphatidylserin-Translokation durch Annexin V bestätigen. Hierbei konnte verglichen mit den Kontrollansätzen (siControl/DON 5  $\mu$ M) eine Verdopplung von früh-apoptischen Zellen beobachtet werden. Die Verwendung von geringeren DON-Konzentrationen (2  $\mu$ M) führte unter DUSP1 knock-down ebenfalls zur Induktion von Apoptose. Zwar war die Apoptose-Induktion verglichen mit höheren Konzentrationen von DON verzögert, die deutliche Induktion nach sechs Stunden unterstreicht jedoch die Bedeutung der DUSP1 in der Prävention DON-induzierter Apoptose.

Des Weiteren deuten die Ergebnisse unserer Studie darauf hin, dass p38 in Zellen epithelialen Ursprungs keine entscheidende Rolle in der Induktion von Früh-Apoptose unter DON-

Exposition zukommt. Die Behandlung von Zellen mit DON resultierte immer in einer starken und anhaltenden Aktivierung der p38. Eine Korrelation mit der Induktion von Apoptose konnte jedoch nicht beobachtet werden. Dies widerspricht den Ergebnissen der Studie von Zhou et al. (2005), die unter Verwendung immunkompetenter Zellen die p38 als entscheidenden Faktor im DON-induzierten Apoptose-Geschehen sehen, was dafür spricht, dass trotz Stimulus-spezifischer Übereinstimmungen im zeitlichen Verlauf der MAPKs-Aktivierung Zelltyp-spezifische Unterschiede in der Funktion der einzelnen MAPK-Pathways bestehen. Neben seiner pro-apoptotischen Wirkung aktiviert p-38 auch eine Reihe von anti-apoptotischen Signalkaskaden. So wurde in den eigenen Untersuchungen eine signifikante Hochregulation der HSP27 (heat shock protein 27) auf Protein-Ebene unter DON-Exposition beobachtet (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung der HSP27 erfolgt über die MAPKAPK2/3, die ihrerseits ein spezifisches Substrat der p38 darstellt (Concannon et al., 2003). Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass HSP27 ein wichtiger anti-apoptotischer Faktor in der zellulären Antwort auf eine Vielzahl von Apoptose induzierenden Agenzien ist (Übersicht bei Concannon et al. 2003).

Ein weiterer Faktor, für den ein anti-apoptotisches Potential in Zellen epithelialen Ursprungs unter DON-Behandlung nachgewiesen werden konnte, ist ATF3 (Nielsen et al. 2009; Yang et al. 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen des Expressionsprofils MAPKs-abhängiger Transkriptionsfaktoren unter DON bestätigen ATF3 als Target in der zellulären Antwort verschiedener epithelialer Zelllinien. Yang et al. (2009) konnten zeigen, dass p38 der wichtigste Regulator der ATF3-Expression unter DON-Behandlung ist. In dieser Studie führte die DON-Behandlung von ATF3-Antisense exprimierenden Zellen epithelialen Ursprungs zu einer deutlich verstärkten Apoptose-Aktivierung. Prinzipiell stellt die zelluläre Antwort auf externe Stimuli ein komplexes Netzwerk pro- und anti-apoptotischer Signalkaskaden dar (Kurokawa und Kornbluth 2009). Die Erkenntnis, dass DON in DUSP1 knock-down Zellen epithelialen Ursprungs Apoptose auslöst, und dies durch weitere anti-apoptotische Faktoren nicht kompensiert werden kann, untermauert die Bedeutung der DUSP1 als entscheidender Regulator der anti-apoptotischen Zellantwort auf DON.

Die im Rahmen dieser Arbeit erstmals gezeigte Hochregulation der DUSP1-Expression unter DON-Einfluss könnte auch weitere *in vitro* und *in vivo* beobachtete Effekte dieses Toxins erklären. So konnten zahlreiche Studien zeigen, dass DON - in Abhängigkeit von Dosis und

Dauer der Exposition – ein breites Spektrum sowohl an immunstimulatorischen als auch immunsupprimierenden Effekten auslöst (Pestka 2010). So inhibiert DON u. a. in Makrophagen die durch LPS-Behandlung induzierte Expression von iNOS (inducible nitric oxide synthase) und blockiert somit die Produktion von Stickoxiden (Sugiyama et al. 2010). Die Studie von Nelin et al. (2007) in der eine Überexpression der DUSP1 in Makrophagen zu einer Inhibition der iNOS führte, könnte darauf hindeuten, dass DUSP1 auch für die bei DON-Behandlung von Makrophagen beobachtete Reduktion der NO-Bildung verantwortlich ist.

Ein weiteres bisher ungeklärtes Phänomen ist die während subchronischer und chronischer DON-Exposition in Fütterungsversuchen beobachtete Wachstumsdepression (Forsell et al. 1986; Iverson et al. 1995; Rotter et al. 1994). Erste Anhaltspunkte der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen lieferte eine in juvenilen Mäusen durchgeführte Studie von Amuzie et al. (2009). Hierbei führte die tägliche Aufnahme DON-kontaminierten Futters (40 µg/kg KGW) über einen Zeitraum von acht Wochen zu einer signifikant reduzierten Gewichtszunahme verglichen mit der Kontrollgruppe. Dies korrelierte mit einer deutlich verminderten Expression der IGFALS mRNA (insulin-like growth factor acid-labile subunit) in der Leber und signifikant reduzierten Plasmaspiegeln. Im Gegensatz hierzu konnte eine signifikant gesteigerte Expression von IGF1 (insulin-like growth factor 1) nachgewiesen werden. Die Konzentration von zirkulierendem IGF1 im Plasma war hingegen deutlich reduziert. Die Erklärung hierfür könnte in der Funktion von IGFALS begründet sein. IGFALS bildet im Plasma einen Tertiär-Komplex mit IGF1 und seinem Bindungsprotein (IGFBP3), wodurch die Halbwertszeit von IGF1-IGFBP3 deutlich verlängert wird (Domené et al. 2009). Eine Reduktion von zirkulierendem IGFALS führt somit auch immer zu einer Verminderung des IGF1-IGFBP Dimers im Plasma. In Maus-Modellen konnte gezeigt werden, dass IGF eine entscheidende Rolle sowohl während des pränatalen als auch postnatalen Wachstums spielt (Lupu et al. 2001).

Wachstum unterliegt der Kontrolle von Hormonen und Wachstumsfaktoren, die über die Bindung an spezifische Rezeptoren die Aktivierung zahlreicher interagierender Signaltransduktionswege einleiten. Zu diesen Signaltransduktionswegen gehören unter anderem die MAPKs Pathways, die über die Aktivierung zahlreicher Transkriptionsfaktoren (u.a. Elk-1, c-Myk) direkten Einfluss auf das Wachstum von Zellen nehmen (Junttila et al. 2008). Hierbei konnten - in Abhängigkeit des jeweils untersuchten Gewebes - sowohl

inhibitorische als stimulatorische Effekte auf das Wachstum nachgewiesen werden (Kuemmerle und Zhou 2002; Daian et al. 2003; Moerth et al. 2007; Otis et al. 2005).

Aufgrund der Tatsachen, dass (1) die DUSP1 der Schlüsselregulator der MAPK-Pathways ist; (2) die MAPK-Pathways wichtige Signaltransduktionswege in der Regulation von Wachstum darstellen; (3) DON sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Expression und Aktivierung sowohl von MAPKs als auch von DUSPs induziert, wäre es für zukünftige Arbeiten von Interesse, die Bedeutung der DUSPs innerhalb der molekularen Mechanismen, die der Wachstumsdepression zugrunde liegen, detaillierter zu untersuchen.



## 5 Zusammenfassung

Deoxynivalenol (DON), ein Typ B Trichothecene, ist das weltweit am häufigsten nachgewiesene Mykotoxin in Nahrungs- und Futtermitteln. Sowohl bei Schweinen als auch bei Mäusen ließen sich nach Aufnahme von DON kontaminiertem Futter zahlreiche klinische Symptome beobachten. Die molekularen Mechanismen, die diesen *in vivo* Effekten zugrunde liegen, sind jedoch weitgehend ungeklärt. Auf molekularer Ebene induziert DON als Folge seiner Proteinsynthese-hemmenden Eigenschaften eine „ribotoxische Stress-Antwort“, die durch die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signaltransduktionswege charakterisiert ist. Die MAPK-Pathways stellen ein essentielles Netzwerk in der zellulären Antwort auf externe Stimuli dar. Um die Bedeutung des für DON spezifischen Induktionsprofils der MAPKs zukünftig besser einschätzen zu können, wurden in dieser Arbeit neben der Rolle MAPKs-spezifischer Transkriptionsfaktoren erstmals auch negative Regulatoren der MAPK-Pathways näher untersucht.

Zunächst wurde die Induktion der MAPKs-spezifischen Transkriptionsfaktoren (JUN, JUND, FOS, FOSL2, ATF3, EGR1) in sechs verschiedenen humanen Zelllinien unterschiedlicher geweblicher Herkunft auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR untersucht. Die Ergebnisse der Studie zeigten signifikante zelltyp- und konzentrationsabhängige Unterschiede im Potential von DON, die Expression der Transkriptionsfaktoren des AP-1 Komplexes zu induzieren. So führten geringe Konzentrationen von DON (1  $\mu$ M) innerhalb von drei Stunden zu einem deutlichen Anstieg der JunD in immunkompetenten Zellen, wohingegen eine Hochregulation von EGR1 nur in Zellen epithelialen und mesenchymalen Ursprungs nachgewiesen werden konnte. Zudem geht aus der Studie hervor, dass JUN in allen sechs untersuchten Zelllinien der dominierende Transkriptionsfaktor unter DON-Exposition ist. Verglichen mit der frühen Hochregulation der oben aufgeführten Transkriptionsfaktoren ließ sich eine gesteigerte Expression der FOSL2 mRNA in den meisten Zelllinien erst nach 24 Stunden nachweisen. Des Weiteren konnte im Rahmen der Untersuchungen eine signifikante Induktion des zur CREB Familie gehörenden Transkriptionsfaktors ATF3 gezeigt werden.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde die Bedeutung von negativen Regulatoren der MAPK-Pathways in Form der Dual-spezifischen Phosphatasen (DUSPs) für die zelluläre Antwort auf DON in der epithelialen Leberzelllinie HepG2 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DON sowohl in hohen (10  $\mu$ M) als auch in niedrigen (1  $\mu$ M) Konzentrationen die Expression

verschiedener DUSPs auf mRNA-Ebene induziert, wobei die DUSP1 am stärksten hochreguliert wurde. Zudem ließ sich in Abhängigkeit vom MEK/ERK-Pathway konzentrationsabhängig eine anhaltende Hochregulation der DUSP1 auf Protein-Ebene nachweisen. Hierbei korrelierte die Hochregulation der DUSP1 mit der Inaktivierung von JNK1/2, wohingegen bei p38 und ERK1/2 keine Regulation beobachtet werden konnte. Im Gegensatz hierzu führte ein DUSP1 knock-down zu einer deutlich verlängerten Aktivierung von JNK1/2, was zu einem signifikanten gesteigerten apoptotischen Potential von DON führte. Als wesentliches neues Ergebnis wurde festgestellt, dass die DUSP1 ein Schlüsselregulator der MAPK-Pathways bei der zellulären Antwort auf DON ist, indem sie die Induktion von intrinsischer Apoptose durch die rasche Inaktivierung von JNK1/2 verhindert.

## 6 Summary

### **Role of DUSP1 and the expression of MAPKinases-specific transcription factors during cellular response to deoxynivalenol**

Deoxynivalenol (DON), a type B trichothecene, is the most common mycotoxin contaminant of cereal-based food products worldwide. After ingestion of DON contaminated feedstuff numerous clinical symptoms were observed in pigs as well as in mice. However, until now, the underlying molecular mechanisms of the observed *in vivo* effects are still largely unknown. Due to its inhibitory potential on protein synthesis, DON induces a “ribotoxic stress-response“ which is characterized by activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways, representing an essential network in the cellular response to external stimuli. To clarify the impact of the DON specific MAPKs induction profile our study focused on the role of MAPKs specific transcription factors in detail and shed light on the function of negative regulators of the MAPK pathways in response to DON for the first time.

First of all, we studied the expression of MAPKs specific transcription factors (JUN, JUND, FOS, FOSL2, ATF3, EGR1) on mRNA level by qRT-PCR in six human cell lines derived from different tissues. The results of the study revealed significant cell type and concentration dependent differences in the potential of DON to induce the expression of transcription factors belonging to the AP-1 complex. Thus, low concentrations of DON (1  $\mu$ M) induced a significant increase in JUND in immunocompetent cells within 3 hours, whereas an up-regulation of EGR1 could only be detected in cells of epithelial and mesenchymal origin. Furthermore, the study revealed JUN as the dominant transcription factor after DON treatment in all of the six tested cell lines. Compared to the early up-regulation of the transcription factors listed above, an increase of FOSL2 mRNA expression was not detected before 24 h. In addition, we observed a significant increase of ATF3 expression, a transcription factor belonging to the CREB family.

A further objective of this study was to evaluate the impact of dual-specificity phosphatases (DUSPs), which function as negative regulators of MAPKs signaling in cellular response to DON. For this purpose, the experiments were performed in the well established epithelial liver cell line HepG2. The results indicate that both high (10  $\mu$ M) and low (1  $\mu$ M) concentrations of DON trigger a strong mRNA expression of several DUSPs, with the highest

up-regulation observed for DUSP1. Furthermore, a strong and sustained concentration-dependent induction of DUSP1 protein was observed in cells treated with DON, which depends on the activation of the MEK/ERK pathway. The expression of DUSP1 protein correlates with the inactivation of JNK1/2, whereas a sustained activation of p38 and ERK1/2 was observed in the presence of DON. In contrast, treatment of DUSP1 knock-down cells with DON triggers a prolonged activation of JNK1/2, which leads to a significant increase of apoptosis. Taken together, we propose DUSP1 as a key regulator in cellular response to DON by preventing DON induced apoptosis through its ability to rapidly inactivate JNK1/2.

## 7 Literaturverzeichnis

**Abraham** S.M., Lawrence T., Kleiman A., Warden P., Medghalchi M., Tuckermann J., Saklatvala J., Clark A.R. (2006):

Antiinflammatory effects of dexamethasone are partly dependent on induction of dual specificity phosphatase 1

J Exp Med. 203, 1883-1889

**Allan** L.A., Clarke P.R. (2009):

Apoptosis and autophagy: Regulation of caspase-9 by phosphorylation

FEBS J. 276, 6063-6073

**Allison** C.C., Kufer T.A., Kremmer E., Kaparakis M., Ferrero R.L. (2009):

*Helicobacter pylori* induces MAPK phosphorylation and AP-1 activation via a NOD1-dependent mechanism

J Immunol. 183, 8099-8109

**Allison** C.C., Ferrero R.L. (2010):

Role of virulence factors and host cell signaling in the recognition of *Helicobacter pylori* and the generation of immune responses

Future Microbiol. 5, 1233-1255

**Amuzie** C.J., Harkema J.R., Pestka J.J. (2008):

Tissue distribution and proinflammatory cytokine induction by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse: comparison of nasal vs. oral exposure

Toxicology 248, 39-44

**Amuzie** C.J., Shinozuka J., Pestka J.J. (2009):

Induction of suppressors of cytokine signaling by the trichothecene deoxynivalenol in the mouse

Toxicol Sci. 111, 277-287

**Amuzie** C.J., Pestka J.J. (2010):

Suppression of insulin-like growth factor acid-labile subunit expression-a novel mechanism for deoxynivalenol-induced growth retardation

Toxicol Sci. 113, 412-21

**Asim** M., Chaturvedi R., Hoge S., Lewis N.D., Singh K., Barry D.P., Algood H.S., de Sablet T., Gobert A.P., Wilson K.T. (2010):

*Helicobacter pylori* induces ERK-dependent formation of a phosphor-c-Fos c-Jun activator protein-1 complex that causes apoptosis in macrophages

J Biol Chem. 285, 20343-20357

**Bae** H., Gray J.S., Li M., Vines L., Kim J., Pestka J.J. (2010):

Hematopoietic cell kinase associates with the 40S ribosomal subunit and mediates the ribotoxic stress response to deoxynivalenol in mononuclear phagocytes

Toxicol Sci. 115, 444-452

**Balachandran** S., Barber G.N. (2007):

PKR in innate immunity, cancer, and viral oncolysis

Methods Mol Biol. 383, 277-301

- Ballif B.A., Blenis, J. (2001):**  
Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals  
Cell Growth Differ. 12, 397-408
- Barnes P.J. (2006):**  
Transcription factors in airway diseases  
Lab Invest. 86, 867-72
- Behmoaras J., Bhangal G., Smith J., McDonald K. Mutch, B., Lai P.C., Domin J., Game L., Salama, A., Foxwell, B.M., Pusey, C.D., Cook, H.T., Aitman, T.J. (2008):**  
JunD is a determinant of macrophage activation and is associated with glomerulonephritis susceptibility  
Nat Genet 40, 553-559
- Bensassi F., El Golli-Bennour E., Abid-Essefi S., Bouaziz C., Hajlaoui M.R., Bacha H. (2009):**  
Pathway of deoxynivalenol-induced apoptosis in human colon carcinoma cells  
Toxicology 264, 104-109
- Bergsjø B., Matre T., Nafstad I. (1992):**  
Effects of diets with graded levels of deoxynivalenol on performance in growing pigs  
Zentralbl Veterinarmed A 39, 752-758
- Bergsjø B., Langseth W., Nafstad I., Jansen J.H., Larsen H.J. (1993):**  
The effects of naturally deoxynivalenol-contaminated oats on the clinical condition, blood parameters, performance and carcass composition of growing pigs  
Vet Res Commun. 17, 283-294
- Bhat R.V., Beedu S.R., Ramakrishna Y., Munshi K.L. (1989):**  
Outbreak of trichothecene mycotoxicosis associated with consumption of mould-damaged wheat production in Kashmir Valley, India  
Lancet 1, 35-37
- Bost F., Aouadi M., Caron L., Binetruy B. (2005):**  
The role of MAPKs in adipocyte differentiation and obesity  
Biochimie 87, 51-56
- Bretz M., Beyer M., Cramer B., Humpf H.U. (2006):**  
Stable isotope dilution analysis of the Fusarium mycotoxins deoxynivalenol and 3-acetyldeoxynivalenol  
Mol Nutr Food Res. 50, 251-260
- Brondello J.M., Brunet A., Pouyssegur J., McKenzie F.R. (1997):**  
The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade  
J Biol Chem. 272, 1368-1376

**Brondello J.M.**, Pouyssegur J., McKenzie F.R. (1999):  
Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation  
Science 286, 2514-2517

**Cagnol S.**, Chambard J.C. (2010):  
ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence  
FEBS J. 277, 2-21

**Canady R.A.**, Coker R.D., Egan S.K., Krska R., Kuiper-Goodman T., Olsen M., Pestka J., Resnik S., Schlatter J. (2001):  
Deoxynivalenol, 419-555  
In: WHO/IPCS (Hrsg.), Safety evaluation of certain mycotoxins in food  
WHO Food Additives Ser. 47

**Camps M.**, Nichols A., Arkinstall S. (2000):  
Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function  
FASEB J. 14, 6-16

**Caplen N.J.**, Mousses S. (2003):  
Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells  
Ann N Y Acad Sci. 1002, 56-62

**Chang L.**, Karin M. (2001):  
Mammalian MAP kinase signalling cascades  
Nature 410, 37-40

**Chen B.C.**, Hsieh S.L., Lin W.W. (2001):  
Involvement of protein kinases in the potentiation of lipopolysaccharide-induced inflammatory mediator formation by thapsigargin in peritoneal macrophages  
J Leukoc Biol. 69, 280-288

**Chi H.**, Barry S.P., Roth R.J., Wu J.J., Jones E.A., Bennett A.M., Flavell R.A. (2006):  
Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses  
Proc Natl Acad Sci. USA 103, 2274-2279

**Choi B.H.**, Hur E.M., Lee J.H., Jun D.J., Kim K.T. (2006):  
Protein kinase Cdelta-mediated proteasomal degradation of MAP kinase phosphatase-1 contributes to glutamate-induced neuronal cell death  
J Cell Sci. 119, 1329-1340

**Choi H.J.**, Yang H., Park S.H., Moon Y. (2009):  
HuR/ELAVL1 RNA binding protein modulates interleukin-8 induction by muco-active ribotoxin deoxynivalenol  
Toxicol Appl Pharmacol. 240, 46-54

- Chu Y.**, Solski P.A., Khosravi-Far R., Der C.J., Kelly K. (1996):  
The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity in vivo toward the ERK2 sevenmaker mutation  
J Biol Chem. 271, 6497-6501
- Chu S.H.**, Kim H., Seo J.Y., Lim J.W., Mukaida N., Kim K.H. (2003):  
Role of NF-kappaB and AP-1 on *Helicobacter pylori*-induced IL-8 expression in AGS cells  
Dig Dis Sci. 48, 257-265
- Clark A.R.** (2003):  
MAP kinase phosphatase 1: a novel mediator of biological effects of glucocorticoids?  
J Endocrinol. 178, 5-12
- Concannon C.G.**, Gorman A.M., Samali A. (2003):  
On the role of Hsp27 in regulating apoptosis  
Apoptosis 8, 61-70
- Coulthard, L.R.** White D.E., Jones D.L., McDermott M.F., Burchill S.A. (2009):  
p38 (MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics  
Trends Mol Med. 15, 369-379
- Cuevas B.D.**, Abell A.N., Johnson G.L. (2007):  
Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration  
Oncogene 26, 3159-3171
- Cundliffe E.**, Davies J.E. (1977):  
Inhibition of initiation, elongation, and termination of eukaryotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins  
Antimicrob Agents Chemother. 11, 491-499
- Curtui V**, Brockmeyer A., Dietrich R., Kappenstein O., Klaffke H., Lepschy J., Märtlbauer E., Schneider E., Seidler C., Thielert G., Usleber E., Weber R., Wolff J. (2005):  
Deoxynivalenol in food  
Mycotoxin Res. 21, 83-88
- Dänicke S.**, Valenta H., Klobasa F., Doll S., Ganter M., Flachowsky G. (2004):  
Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics  
Archives of Animal Nutrition-Archiv Für Tierernährung 58, 1-17
- Daian T.**, Ohtsuru A., Rogounovitch T., Ishihara H., Hirano A., Akiyama-Uchida Y., Saenko V., Fujii T., Yamashita S. (2003):  
Insulin-like growth factor-I enhances transforming growth factor-beta-induced extracellular matrix protein production through the P38/activating transcription factor-2 signaling pathway in keloid fibroblasts  
J Invest Dermatol. 120, 956-962



**De Walle J.V.**, Sergent T., Piront N., Toussaint O., Schneider Y.J., Larondelle Y. (2010):  
Deoxynivalenol affects in vitro intestinal epithelial cell barrier integrity through inhibition of protein synthesis  
*Toxicol Appl Pharmacol.* 245, 291-298

**Dhanasekaran D.N.**, Reddy E.P. (2008):  
JNK signaling in apoptosis  
*Oncogene* 27, 6245-6251

**Diaz F.J.**, Chow A.T., O'Geen A.T., Dahlgren R.A., Wong P.K. (2008):  
Restored wetlands as a source of disinfection byproduct precursors  
*Environ Sci Technol.* 42, 5992-5997

**Ding S.Z.**, Olekhnovich I.N., Cover T.L., Peek R.M. Jr., Smith M.F. Jr., Goldberg, J.B. (2008):  
Helicobacter pylori and mitogen-activated protein kinases mediate activator protein-1 (AP-1) subcomponent protein expression and DNA-binding activity in gastric epithelial cells  
*FEMS Immunol Med Microbiol.* 53, 385-394

**Döll S.**, Dänicke S., Ueberschar K.H., Valenta H., Schnurrbusch U., Ganter M., Klobasa F., Flachowsky G. (2003):  
Effects of graded levels of Fusarium toxin contaminated maize in diets for female weaned piglets  
*Arch Tierernähr.* 57, 311-334

**Döll S.**, Danicke S., Valenta H. (2008):  
Residues of deoxynivalenol (DON) in pig tissue after feeding mash or pellet diets containing low concentrations  
*Mol Nutr Food Res.* 52, 727-734

**Domene H.M.**, Hwa V., Argente J., Wit J.M., Camacho-Hubner C., Jasper H.G., Pozo J., van Duyvenvoorde H.A., Yakar S., Fofanova-Gambetti O.V., Rosenfeld R.G. (2009):  
Human acid-labile subunit deficiency: clinical, endocrine and metabolic consequences  
*Horm Res.* 72, 129-141

**Dong C.**, Davis R.J., Flavell R.A. (2002):  
MAP kinases in the immune response  
*Annu Rev Immunol.* 20, 55-72

**Donovan N.**, Becker E.B., Konishi Y., Bonni A. (2002):  
JNK phosphorylation and activation of BAD couples the stress-activated signaling pathway to the cell death machinery  
*J Biol Chem.* 277, 40944-40999

**Douglas S.A.**, Bunn S.J. (2009):  
Interferon-alpha signalling in bovine adrenal chromaffin cells: involvement of signal-transducer and activator of transcription 1 and 2, extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 and serine 31 phosphorylation of tyrosine hydroxylase  
*J Neuroendocrinol.* 21, 200-207

**Douglas** R.S., Afifiyan N.F., Hwang C.J., Chong K., Haider U., Richards P., Gianoukakis A.G., Smith T.J. (2010):

Increased generation of fibrocytes in thyroid-associated ophthalmopathy  
J Clin Endocrinol Metab. 95, 430-438

**Eferl** R., Zenz R., Theussl H.C., Wagner E.F. (2007):

Simultaneous generation of fra-2 conditional and fra-2 knock-out mice  
Genesis 45, 447-451

**Eferl** R., Hasselblatt P., Rath M., Popper H., Zenz R., Komnenovic V., Idarraga M.H., Kenner L., Wagner E.F. (2008):

Development of pulmonary fibrosis through a pathway involving the transcription factor Fra-2/AP-1

Proc Natl Acad Sci. USA 105, 10525-10530

**Ehrlich** K.C., Daigle K.W. (1987):

Protein synthesis inhibition by 8-oxo-12,13-epoxytrichothecenes  
Biochim Biophys Acta 923, 206-213

**Fadok** V.A., Henson P.M. (2003):

Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist--with a twist  
Curr Biol. 13, R655-7

**Farooq** A., Zhou M.M. (2004):

Structure and regulation of MAPK phosphatases  
Cell Signal. 16, 769-779

**Felicetti** L., Colombo B., Baglioni C. (1966):

Inhibition of protein synthesis in reticulocytes by antibiotics. II. The site of action of cycloheximide, streptovitacin A and pactamycin

Biochim Biophys Acta 119, 120-129

**Forsell** J.H., Witt M.F., Tai J.H., Jensen R., Pestka J.J. (1986):

Effects of 8-week exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol (vomitoxin) and zearalenone

Food Chem Toxicol. 24, 213-219

**Franklin** C.C., Kraft A.S. (1997):

Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells

J Biol Chem. 272, 16917-16923

**Ganiatsas** S., Kwee L., Fujiwara Y., Perkins A., Ikeda T., Labow M.A., Zon L.I. (1998):

SEK1 deficiency reveals mitogen-activated protein kinase cascade crossregulation and leads to abnormal hepatogenesis

Proc Natl Acad Sci. USA 95, 6881-6886

**Gauvreau** H.C. (2000):

Toxicokinetic, Tissue Residue, and Metabolic Studies of Deoxynivalenol (Vomitoxin) in Turkeys

Simon Fraser University, Vancouver, BC

**Gilchrist** M., Henderson W.R. Jr., Clark A.E., Simmons R.M., Ye X., Smith K.D., Aderem A. (2008):

Activating transcription factor 3 is a negative regulator of allergic pulmonary inflammation  
J Exp Med. 205, 2349-2357

**Gilchrist** M., Thorsson V., Li B., Rust A.G., Korb M., Roach J.C., Kennedy K., Hai T., Bolouri H., Aderem A. (2006):

Systems biology approaches identify ATF3 as a negative regulator of Toll-like receptor 4  
Nature 441, 173-178

**Guha** M., O'Connell M.A., Pawlinski R., Hollis A., McGovern P., Yan S.F., Stern D., Mackman N. (2001):

Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression  
Blood 98, 1429-1439

**Gum** R.J., Gaede L.L., Heindel M.A., Waring J.F., Trevillyan J.M., Zinker B.A., Stark M.E., Wilcox D., Jirousek M.R., Rondinone C.M., Ulrich R.G. (2003):

Antisense protein tyrosine phosphatase 1B reverses activation of p38 mitogen-activated protein kinase in liver of ob/ob mice  
Mol Endocrinol. 17, 1131-1143

**Hai** T., Hartman M.G. (2001):

The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis  
Gene 273, 1-11

**Hammer** M., Mages J., Dietrich H., Servatius A., Howells N., Cato A.C., Lang R. (2006):

Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock  
J Exp Med. 203, 15-20

**Hartman** M.G., Lu D., Kim M.L., Kociba G.J., Shukri T., Buteau J., Wang X., Frankel W.L., Guttridge D., Prentki M., Grey S.T., Ron D., Hai T. (2004):

Role for activating transcription factor 3 in stress-induced beta-cell apoptosis  
Mol Cell Biol. 24, 5721-32

**Hazel** C.M., Patel S. (2004):

Influence of processing on trichothecene levels  
Toxicol Lett. 153, 51-59

**Hess** J., Angel P., Schorpp-Kistner M. (2004):

AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings  
J Cell Sci. 117, 5965-5973

**Hirosumi** J., Tuncman G., Chang L., Gorgun C.Z., Uysal K.T., Maeda K., Karin M., Hotamisligil G.S. (2002):

A central role for JNK in obesity and insulin resistance  
Nature 420, 333-336

**Hisatsune** J., Nakayama M., Isomoto H., Kurazono H., Mukaida N., Mukhopadhyay A.K., Azuma T., Yamaoka Y., Sap J., Yamasaki E., Yahiro K., Moss J., Hirayama T. (2008):

Molecular characterization of *Helicobacter pylori* VacA induction of IL-8 in U937 cells reveals a prominent role for p38MAPK in activating transcription factor-2, cAMP response element binding protein, and NF-kappaB activation  
J Immunol. 180, 5017-5027

**Hofmann** C., Shepelev M., Chernoff J. (2004):

The genetics of Pak  
J Cell Sci. 117, 4343-4354

**Hope** R., Aldred D., Magan N. (2005):

Comparison of environmental profiles for growth and deoxynivalenol production by *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* on wheat grain  
Lett Appl Microbiol. 40, 295-300

**Hung** P.F., Wu B.T., Chen H.C., Chen Y.H., Chen C.L., Wu M.H., Liu H.C., Lee M.J., Kao Y.H. (2005):

Antimitogenic effect of green tea (-)-epigallocatechin gallate on 3T3-L1 preadipocytes depends on the ERK and Cdk2 pathways  
Am J Physiol Cell Physiol. 288, 1094-1108

**Hutter** D., Chen P., Barnes J., Liu Y. (2000):

Catalytic activation of mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 by binding to p38 MAP kinase: critical role of the p38 C-terminal domain in its negative regulation  
Biochem J. 352 Pt 1, 155-163

**Hutter** D., Chen P., Li J., Barnes J., Liu Y. (2002):

The carboxyl-terminal domains of MKP-1 and MKP-2 have inhibitory effects on their phosphatase activity  
Mol Cell Biochem. 233, 107-117

**Ihara** T., Sugamata M., Sekijima M., Okumura H., Yoshino N., Ueno Y. (1997):

Apoptotic cellular damage in mice after T-2 toxin-induced acute toxicosis  
Nat Toxins 5, 141-145

**Instanes** C., Hetland G. (2004):

Deoxynivalenol (DON) is toxic to human colonic, lung and monocytic cell lines, but does not increase the IgE response in a mouse model for allergy  
Toxicology 204, 13-21

**Into** T., Shibata K. (2005):

Apoptosis signal-regulating kinase 1-mediated sustained p38 mitogen-activated protein kinase activation regulates mycoplasmal lipoprotein- and staphylococcal peptidoglycan-triggered Toll-like receptor 2 signalling pathways  
Cell Microbiol. 7, 1305-1317

**Iordanov M.S.**, Pribnow D., Magun J.L., Dinh T.H., Pearson J.A., Chen S.L., Magun B.E. (1997):

Ribotoxic stress response: activation of the stress-activated protein kinase JNK1 by inhibitors of the peptidyl transferase reaction and by sequence-specific RNA damage to the alpha-sarcin/ricin loop in the 28S rRNA  
Mol Cell Biol. 17, 3373-3381

**Islam Z.**, Nagase M., Yoshizawa T., Yamauchi K., Sakato N. (1998):

T-2 toxin induces thymic apoptosis in vivo in mice  
Toxicol Appl Pharmacol. 148, 205-214

**Iverson F.**, Armstrong C., Nera E., Truelove J., Fernie S., Scott P., Stapley R., Hayward S., Gunner S. (1995):

Chronic feeding study of deoxynivalenol in B6C3F1 male and female mice  
Teratog Carcinog Mutagen 15, 283-306

**Jacobs D.**, Glossip D., Xing H., Muslin A.J., Kornfeld K. (1999):

Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase  
Genes Dev. 13, 163-175

**JECFA:** Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (2001):

Fiftysixth meeting  
WHO Food Additives Series No 47  
<http://www.who.int/pcs/jecfa/summaries.htm>

**Jeffrey K.L.**, Camps M., Rommel C., Mackay C.R. (2007):

Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses  
Nat Rev Drug Discov. 6, 391-403

**Johnson G.L.**, Lapadat R. (2002):

Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases  
Science 298, 1911-1912

**Junttila M.R.**, Li S.P., Westermarck J. (2008):

Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival  
FASEB J. 22, 954-965

**Karahashi H.**, Michelsen K.S., Arditi M. (2009):

Lipopolysaccharide-induced apoptosis in transformed bovine brain endothelial cells and human dermal microvessel endothelial cells: the role of JNK  
J Immunol. 182, 7280-7286

**Kato M.**, Sanada M., Kato I., Sato Y., Takita J., Takeuchi K., Niwa A., Chen Y., Nakazaki K., Nomoto J., Asakura Y., Muto S., Tamura A., Iio M., Akatsuka Y., Hayashi Y., Mori H., Igarashi T., Kurokawa M., Chiba S., Mori S., Ishikawa Y., Okamoto K., Tobinai K., Nakagama H., Nakahata T., Yoshino T., Kobayashi Y., Ogawa S. (2009):

Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas  
Nature 459, 712-716

**Keyse S.M., Emslie E.A. (1992):**

Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase  
Nature 359, 644-647

**Khachigian L.M., Collins T. (1997):**

Inducible expression of Egr-1-dependent genes. A paradigm of transcriptional activation in vascular endothelium  
Circ Res. 81, 457-461

**Kinser S., Jia Q., Li M., Laughter A., Cornwell P., Corton J.C., Pestka J. (2004):**

Gene expression profiling in spleens of deoxynivalenol-exposed mice: immediate early genes as primary targets  
J Toxicol Environ Health A 67, 1423-1441

**Koga K., Takaesu G., Yoshida R., Nakaya M., Kobayashi T., Kinjyo I., Yoshimura A. (2009):**

Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein  
Immunity 30, 372-383

**Kojima S., Yanagihara I., Kono G., Sugahara T., Nasu H., Kijima M., Hattori A., Kodama T., Nagayama K.I., Honda T. (2000):**

Mkp-1 encoding mitogen-activated protein kinase phosphatase 1, a verotoxin 1 responsive gene, detected by differential display reverse transcription-PCR in Caco-2 cells  
Infect Immun. 68, 2791-2796

**Königs M., Schwerdt G., Gekle M., Humpf H.U. (2008):**

Effects of the mycotoxin deoxynivalenol on human primary hepatocytes  
Mol Nutr Food Res. 52, 830-839

**Kristiansen M., Hughes R., Patel P., Jacques T.S., Clark A.R., Ham J. (2010):**

Mkp1 is a c-Jun target gene that antagonizes JNK-dependent apoptosis in sympathetic neurons  
J Neurosci 30, 10820-10832

**Kuemmerle J.F., Zhou H. (2002):**

Insulin-like growth factor-binding protein-5 (IGFBP-5) stimulates growth and IGF-I secretion in human intestinal smooth muscle by Ras-dependent activation of p38 MAP kinase and Erk1/2 pathways  
J Biol Chem. 277, 20563-20571

**Kurokawa M., Kornbluth S. (2009):**

Caspases and kinases in a death grip  
Cell 138, 838-854

**Kuwano Y., Kim H.H., Abdelmohsen K., Pullmann R. Jr., Martindale J.L., Yang X., Gorospe M. (2008):**

MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR and NF90  
Mol Cell Biol. 28, 4562-4575

**Kyriakis J.M.**, Avruch J. (2001):

Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation

Physiol Rev. 81, 807-869

**Lacey J.**, Bateman G.L., Mirocha C.J. (1999):

Effects of infection time and moisture on development of ear blight and deoxynivalenol production by *Fusarium* spp. in wheat

Annals of Applied Biol. 134, 277-283

**Leng Y.**, Steiler T.L., Zierath J.R. (2004):

Effects of insulin, contraction, and phorbol esters on mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from lean and ob/ob mice

Diabetes 53, 1436-1444

**Letai A.**, Bassik M.C., Walensky L.D., Sorcinelli M.D., Weiler, S., Korsmeyer S.J. (2002):

Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics

Cancer Cell. 2, 183-192

**Li F.Q.**, Luo X.Y., Yoshizawa T. (1999):

Mycotoxins (trichothecenes, zearalenone and fumonisins) in cereals associated with human red-mold intoxications stored since 1989 and 1991 in China

Nat Toxins 7, 93-97

**Li M.**, Pestka J.J. (2008):

Comparative induction of 28S ribosomal RNA cleavage by ricin and the trichothecenes deoxynivalenol and T-2 toxin in the macrophage

Toxicol Sci. 105, 67-78

**Liu, Y.**, Shepherd, E.G., Nelin, L.D. (2007):

MAPK phosphatases--regulating the immune response

Nat Rev Immunol. 7, 202-212

**Lupu F.**, Terwilliger J.D., Lee K., Segre G.V., Efstratiadis A. (2001):

Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth

Dev Biol. 229, 141-162

**Marani M.**, Tenev T., Hancock D., Downward J., Lemoine N.R. (2002):

Identification of novel isoforms of the BH3 domain protein Bim which directly activate Bax to trigger apoptosis

Mol Cell Biol. 22, 3577-3589

**Marchand S.**, Fonquerne G., Clermont I., Laroche L., Huynh T.T., Belzile F.J. (2008):

Androgenic response of barley accessions and F1s with *Fusarium* head blight resistance

Plant Cell Rep 27, 443-451

**Maresca M.**, Mahfoud R., Garmy N., Fantini J. (2002):

The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells

J Nutr. 132, 2723-2731

- Mayr B.**, Montminy M. (2001):  
Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB  
Nat Rev Mol Cell Biol. 2, 599-609
- McLaughlin C.S.**, Vaughan M.H., Campbell J.M., Wei C.M., Stafford M.E. (1977):  
Inhibition of protein synthesis by trichothecenes, 263-273  
In: Rodicks J.V., Hasseltine C.M., Mehlman M.A. (Hrsg.), Mycotoxins in Human and Animal Health  
Pathotoxin Publishers, Park Forest, IL
- Meixner A.**, Karreth F., Kenner L., Wagner E.F. (2004):  
JunD regulates lymphocyte proliferation and T helper cell cytokine expression  
EMBO J. 23, 1325-1335
- Meixner A.**, Karreth F., Kenner L., Penninger J.M., Wagner E.F. (2010):  
Jun and JunD-dependent functions in cell proliferation and stress response  
Cell Death Differ. 17, 1409-1419
- Miller J.D.** (2008):  
Mycotoxins in small grains and maize: old problems, new challenges  
Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 25, 219-230
- Misra-Press A.**, Rim C.S., Yao H., Roberson M.S., Stork P.J. (1995):  
A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation  
J Biol Chem. 270, 14587-14596
- Miura K.**, Nakajima Y., Yamanaka N., Terao K., Shibato T., Ishino S. (1998):  
Induction of apoptosis with fusarenon-X in mouse thymocytes  
Toxicology 127, 195-206
- Moerth C.**, Schneider M.R., Renner-Mueller I., Blutke A., Elmlinger M.W., Erben R.G., Camacho-Hubner C., Hoeflich A., Wolf E. (2007):  
Postnatally elevated levels of insulin-like growth factor (IGF)-II fail to rescue the dwarfism of IGF-I-deficient mice except kidney weight  
Endocrinology 148, 441-451
- Moon Y.**, Pestka J.J. (2002):  
Vomitoxin-induced cyclooxygenase-2 gene expression in macrophages mediated by activation of ERK and p38 but not JNK mitogen-activated protein kinases  
Toxicol Sci. 69, 373-382
- Moon Y.**, Yang H., Lee S.H. (2007):  
Modulation of early growth response gene 1 and interleukin-8 expression by ribotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) via ERK1/2 in human epithelial intestine 407 cells  
Biochem Biophys Res Commun. 362, 256-262



- Moon Y.**, Yang H., Park S.H. (2008):  
Hypo-responsiveness of interleukin-8 production in human embryonic epithelial intestine 407 cells independent of NF-kappaB pathway: new lessons from endotoxin and ribotoxic deoxynivalenol  
Toxicol Appl Pharmacol. 231, 94-102
- Moore-Carrasco R.**, Garcia-Martinez C., Busquets S., Ametller E., Barreiro E., Lopez-Soriano F.J., Argiles J.M. (2006):  
The AP-1/CJUN signaling cascade is involved in muscle differentiation: implications in muscle wasting during cancer cachexia  
FEBS Lett. 580, 691-696
- Morooka N.**, Uratsuji N., Yoshizawa T., Yamamoto H. (1972):  
Studies on the toxic effects of barley infected with *Fusarium spp.*  
J Food Hyg Soc Japan 13, 368-375
- Mukaida N.** (2000):  
Interleukin-8: an expanding universe beyond neutrophil chemotaxis and activation  
Int J Hematol. 72, 391-398
- Nelin L.D.**, Wang X., Zhao Q., Chicoine L.G., Young T.L., Hatch D.M., English B.K., Liu Y. (2007):  
MKP-1 switches arginine metabolism from nitric oxide synthase to arginase following endotoxin challenge  
Am J Physiol Cell Physiol. 293, 632-640
- Nielsen C.M.** (2009)  
Untersuchungen zur Toxizität und den molekularen Wirkungsmechanismen von Deoxynivalenol  
Diss. vet. med., München
- Nielsen C.**, Lippke H., Didier A., Dietrich R., Martlbauer E. (2009):  
Potential of deoxynivalenol to induce transcription factors in human hepatoma cells  
Mol Nutr Food Res. 53, 479-491
- Nishikawa T.**, Hagihara K., Serada S., Isobe T., Matsumura A., Song J., Tanaka T., Kawase I., Naka T., Yoshizaki K. (2008):  
Transcriptional complex formation of c-Fos, STAT3, and hepatocyte NF-1 alpha is essential for cytokine-driven C-reactive protein gene expression  
J Immunol. 180, 3492-3501
- Nobori K.**, Ito H., Tamamori-Adachi M., Adachi S., Ono Y., Kawauchi J., Kitajima S., Marumo F., Isobe M. (2002):  
ATF3 inhibits doxorubicin-induced apoptosis in cardiac myocytes: a novel cardioprotective role of ATF3  
J Mol Cell Cardiol. 34, 1387-1397
- Obrig T.G.**, Moran T.P., Brown J.E. (1987):  
The mode of action of Shiga toxin on peptide elongation of eukaryotic protein synthesis  
Biochem J. 244, 287-294

**Ono K.**, Han J. (2000):

The p38 signal transduction pathway: activation and function  
Cell Signal. 12, 1-13

**Otis J.S.**, Burkholder T.J., Pavlath G.K. (2005):

Stretch-induced myoblast proliferation is dependent on the COX2 pathway  
Exp Cell Res. 310, 417-425

**Owens D.M.**, Keyse S.M. (2007):

Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases  
Oncogene 26, 3203-3213

**Paul W.E.**, Seder R.A. (1994):

Lymphocyte responses and cytokines  
Cell 76, 241-251

**Pawlinski R.**, Pedersen B., Kehrl B., Aird W.C., Frank R.D., Guha M., Mackman N. (2003):  
Regulation of tissue factor and inflammatory mediators by Egr-1 in a mouse endotoxemia model

Blood 101, 3940-3947

**Pawson T.**, Scott J.D. (1997):

Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins  
Science 278, 2075-2080

**Pestka J.J.** (2008):

Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis  
Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 25, 1128-40

**Pestka J.J.** (2010):

Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance  
Arch Toxicol. 84, 663-679

**Pestka J.J.**, Amuzie C.J. (2008):

Tissue distribution and proinflammatory cytokine gene expression following acute oral exposure to deoxynivalenol: comparison of weanling and adult mice  
Food Chem Toxicol. 46, 2826-2831

**Pestka J.J.**, Smolinski A.T. (2005):

Deoxynivalenol: toxicology and potential effects on humans  
J Toxicol Environ Health B Crit Rev. 8, 39-69

**Pestka J.J.**, Yan D., King L.E. (1994):

Flow cytometric analysis of the effects of in vitro exposure to vomitoxin (deoxynivalenol) on apoptosis in murine T, B and IgA+ cells  
Food Chem Toxicol. 32, 1125-1136

**Pestka J.J., Uzarski R.C., Islam Z. (2005):**

Induction of apoptosis and cytokine production in the Jurkat human T cells by deoxynivalenol: role of mitogen-activated protein kinases and comparison to other 8-ketotrichothecenes

Toxicology 206, 207-219

**Piessevaux J., Lavens D., Peelman F., Tavernier J. (2008):**

The many faces of the SOCS box

Cytokine Growth Factor Rev. 19, 371-381

**Prandini A., Sigolo S., Filippi L., Battilani P., Piva G. (2009):**

Review of predictive models for Fusarium head blight and related mycotoxin contamination in wheat

Food Chem Toxicol. 47, 927-931

**Prelusky D.B., Hamilton R.M., Trenholm H.L., Miller J.D. (1986):**

Tissue distribution and excretion of radioactivity following administration of <sup>14</sup>C-labeled deoxynivalenol to White Leghorn hens

Fundam Appl Toxicol. 7, 635-645

**Prelusky D.B., Gerdes R.G., Underhill K.L., Rotter B.A., Jui P.Y., Trenholm H.L. (1994):**

Effects of low-level dietary deoxynivalenol on haematological and clinical parameters of the pig

Nat Toxins 2, 97-104

**Prelusky D.B. (1996):**

A study on the effect of deoxynivalenol on serotonin receptor binding in pig brain membranes

J Environ Sci Health B 31, 1103-1117

**Razzazi-Fazeli E., Bohm J., Jarukamjorn K., Zentek J. (2003):**

Simultaneous determination of major B-trichothecenes and the de-epoxy-metabolite of deoxynivalenol in pig urine and maize using high-performance liquid chromatography-mass spectrometry

J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 796, 21-33

**Ringe J., Strassburg S., Neumann K., Endres M., Notter M., Burmester G.R., Kaps C., Sittlinger M. (2007):**

Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2

J Cell Biochem. 101, 135-146

**Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. (2005):**

Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: A review

Food Addit Contam. 22, 369-378

**Rotter B.A., Thompson B.K., Lessard M., Trenholm H.L., Tryphonas H. (1994):**

Influence of low-level exposure to Fusarium mycotoxins on selected immunological and hematological parameters in young swine

Fundam Appl Toxicol. 23, 117-124

**Rotter** B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J. (1996):  
Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)  
J Toxicol Environ Health 48, 1-34

**Roy** S., Charboneau R., Cain K., DeTurris S., Melnyk D., Barke R.A. (1999):  
Deficiency of the transcription factor c-fos increases lipopolysaccharide-induced macrophage interleukin 12 production  
Surgery 126, 239-247

**Roy** S., Charboneau R., Melnyk D., Barke R.A. (2000):  
Interleukin-4 regulates macrophage interleukin-12 protein synthesis through a c-fos mediated mechanism  
Surgery 128, 219-224

**Rubinfeld** H., Seger R. (2005):  
The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling  
Mol Biotechnol. 31, 151-174

**Ryu** J.C., Ohtsubo K., Izumiyama N., Nakamura K., Tanaka T., Yamamura H., Ueno Y. (1988):  
The acute and chronic toxicities of nivalenol in mice  
Fundam Appl Toxicol. 11, 38-47

**Sahu** S.C., Garthoff L.H., Robl M.G., Chirtel S.J., Ruggles D.I., Flynn T.J., Sobotka T.J. (2008):  
Rat liver clone-9 cells in culture as a model for screening hepatotoxic potential of food-related products: hepatotoxicity of deoxynivalenol  
J Appl Toxicol. 28, 765-772

**Salojin** K.V., Owusu I.B., Millerchip K.A., Potter M., Platt K.A., Oravec T. (2006):  
Essential role of MAPK phosphatase-1 in the negative control of innate immune responses  
J Immunol. 176, 1899-1907

**Sanchéz-Perez** I., Murguia J.R., Perona R. (1998):  
Cisplatin induces a persistent activation of JNK that is related to cell death  
Oncogene 16, 533-544

**Sancho** D., Gomez M., Martinez Del Hoyo G., Lamana A., Esplugues E., Lauzurica P., Martinez A.C., Sanchez-Madrid F. (2006):  
CD69 targeting differentially affects the course of collagen-induced arthritis  
J Leukoc Biol. 80, 1233-1241

**Schaafsma** A.W., Hooker D.C. (2007):  
Climatic models to predict occurrence of Fusarium toxins in wheat and maize  
Int J Food Microbiol. 119, 116-125

**Schlatter** J. (2004):  
Toxicity data relevant for hazard characterization  
Toxicol Lett. 153, 83-89

**Schmolke M.**, Zimmermann G., Buerstmayr H., Schweizer G., Miedaner T., Korzun V., Ebmeyer E., Hartl L. (2005):

Molecular mapping of Fusarium head blight resistance in the winter wheat population Dream/Lynx

Theor Appl Genet. 111, 747-756

**Scientific Committee on Food of the European Commission (SCF)** (1999):

Opinion on Fusarium toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON), expressed on 2 December 1999

[http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.pdf)

**Scientific Committee on Food of the European Commission (SCF)** (2002):

Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium toxins.

Part 6: Group evaluation of T-2 toxin, HT-2 toxin, nivalenol and deoxynivalenol, 27. February 2002

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out123_en.pdf)

**SCOOP** (2003):

(Scientific Cooperation)

Report of experts participating in Task 3.2.10: Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU Member States

<http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210.pdf>

**Sergent T.**, Parys M., Garsou S., Pussemier L., Schneider Y.J., Larondelle Y. (2006):

Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations

Toxicol Lett.. 164, 167-176

**Shaulian E.**, Karin M. (2002):

AP-1 as a regulator of cell life and death

Nat Cell Biol. 4, 131-136

**Shaulian E.** (2010):

AP-1 The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise?

Cell Signal. 22, 894-899

**Shepherd E.G.**, Zhao Q., Welty S.E., Hansen T.N., Smith C.V., Liu Y. (2004):

The function of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in peptidoglycan-stimulated macrophages

J Biol Chem. 279, 54023-54031

**Shi Y.**, Porter K., Parameswaran N., Bae H.K., Pestka J.J. (2009):

Role of GRP78/BiP degradation and ER stress in deoxynivalenol-induced interleukin-6 upregulation in the macrophage

Toxicol Sci. 109, 247-255

**Shifrin V.I.**, Anderson P. (1999):

Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis

J Biol Chem. 274, 13985-13992

- Shinozuka J.**, Li G., Kiatipattanasakul W., Uetsuka K., Nakayama H., Doi K. (1997):  
T-2 toxin-induced apoptosis in lymphoid organs of mice  
*Exp Toxicol Pathol.* 49, 387-392
- Slack D.N.**, Seternes O.M., Gabrielsen M., Keyse S.M. (2001):  
Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1  
*J Biol Chem.* 276, 16491-16500
- Speijers G.J.**, Speijers M.H. (2004):  
Combined toxic effects of mycotoxins  
*Toxicol Lett.* 153, 91-98
- Spindelböck B.U.** (2004):  
Untersuchungen zum Vorkommen und zur Häufigkeit von Deoxynivalenol in Lebensmitteln  
Diss. vet. med., München
- Staples C.J.**, Owens D.M., Maier J.V., Cato A.C., Keyse S.M. (2010):  
Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK pathways mediated by MAP kinase phosphatase-1 determines cellular sensitivity to UV radiation  
*J Biol Chem.* 285, 25928-25940
- Sugiyama K.**, Muroi M., Tanamoto K., Nishijima M., Sugita-Konishi Y. (2010)  
Deoxynivalenol and nivalenol inhibit lipopolysaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells  
*Toxicol Lett.* 192, 150-154
- Sun H.**, Charles C.H., Lau L.F., Tonks N.K. (1993):  
MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo  
*Cell* 75, 487-493
- Sweeney R.**, Yao C.H., Yao M.C. (1991):  
A mutation in the large subunit ribosomal RNA gene of *Tetrahymena* confers anisomycin resistance and cold sensitivity  
*Genetics* 127, 327-334
- Thompson W.L.**, Wannemacher R.W. Jr. (1986):  
Structure-function relationships of 12,13-epoxytrichothecene mycotoxins in cell culture: comparison to whole animal lethality  
*Toxicon* 24, 985-994
- Tiemann U.**, Brussow K.P., Kuchenmeister U., Jonas L., Kohlschein P., Pohland R., Danicke S. (2006):  
Influence of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected enzymatic and histological parameters of liver in gilts  
*Food Chem Toxicol.* 44, 1228-1235

- Turner P.C., Rothwell J.A., White K.L.M., Gong Y., Cade J.E., Wild C.P. (2008):**  
Urinary deoxynivalenol is correlated with cereal intake in individuals from the United Kingdom  
Environ Health Perspect. 116, 21-25
- Ueno Y., Sato N., Ishii K., Sakai K., Tsunoda H. (1973):**  
Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of *Fusarium* species  
Appl Microbiol. 25, 699-704
- Ueno Y. (1977):**  
Mode of action of trichothecenes  
Ann Nutr Aliment. 31, 885-900
- Vesonder R.F., Ciegler A., Jensen A.H. (1973):**  
Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn  
Appl Microbiol. 26, 1008-1010
- Wagner E.F., Eferl R. (2005):**  
Fos/AP-1 proteins in bone and the immune system  
Immunol Rev. 208, 126-140
- Wagner E.F. (2010):**  
Bone development and inflammatory disease is regulated by AP-1 (Fos/Jun)  
Ann Rheum Dis. 69 Suppl 1, 86-88
- Wang X., Liu Y. (2007):**  
Regulation of innate immune response by MAP kinase phosphatase-1  
Cell Signal 19, 1372-1382
- Wang X., Nelin L.D., Kuhlman J.R., Meng X., Welty S.E., Liu Y. (2008):**  
The role of MAP kinase phosphatase-1 in the protective mechanism of dexamethasone against endotoxemia  
Life Sci. 83, 671-680
- Watjen W., Debbab A., Hohlfeld A., Chovolou Y., Kampkotter A., Edrada R.A., Ebel R., Hakiki A., Mosaddak M., Totzke F., Kubbutat M.H., Proksch P. (2009):**  
Enniatins A1, B and B1 from an endophytic strain of *Fusarium tricinctum* induce apoptotic cell death in H4IIE hepatoma cells accompanied by inhibition of ERK phosphorylation  
Mol Nutr Food Res. 53, 431-440
- Williams B.R. (2001):**  
Signal integration via PKR  
Sci STKE 89, r2
- Wong S.S., Zhou H.R., Pestka J.J. (2002):**  
Effects of vomitoxin (deoxynivalenol) on the binding of transcription factors AP-1, NF-kappaB, and NF-IL6 in raw 264.7 macrophage cells  
J Toxicol Environ Health A 65, 1161-1180

- Wu J.J., Bennett A.M. (2005):**  
Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling  
J Biol Chem. 280, 16461-16466
- Wu J.J., Roth R.J., Anderson E.J., Hong E.G., Lee M.K., Choi C.S., Neuffer P.D., Shulman G.I., Kim J.K., Bennett A.M. (2006):**  
Mice lacking MAP kinase phosphatase-1 have enhanced MAP kinase activity and resistance to diet-induced obesity  
Cell Metab. 4, 61-73
- Xu X.M., Berrie A.M. (2005):**  
Epidemiology of mycotoxigenic fungi associated with Fusarium ear blight and apple blue mould: a review  
Food Addit Contam. 22, 290-301
- Xu X.M., Nicholson P., Thomsett M.A., Simpson D., Cooke B.M., Doohan F.M., Brennan J., Monaghan S., Moretti A., Mule G., Hornok L., Beki E., Tatnell J., Ritieni A., Edwards S.G. (2008):**  
Relationship between the fungal complex causing Fusarium head blight of wheat and environmental conditions  
Phytopathology 98, 69-78
- Yamaoka Y., Kikuchi S., el-Zimaity H.M., Gutierrez O., Osato M.S., Graham D.Y. (2002):**  
Importance of *Helicobacter pylori* oipA in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production  
Gastroenterology 123, 414-424
- Yan S.F., Fujita T., Lu J., Okada K., Shan Zou Y., Mackman N., Pinsky D.J., Stern D.M. (2000):**  
Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress  
Nat Med. 6, 1355-1361
- Yang G.H., Jarvis B.B., Chung Y.J., Pestka J.J. (2000):**  
Apoptosis induction by the satratoxins and other trichothecene mycotoxins: relationship to ERK, p38 MAPK, and SAPK/JNK activation  
Toxicol Appl Pharmacol. 164, 149-160
- Zenz R., Eferl R., Scheinecker C., Redlich K., Smolen J., Schonhaler H.B., Kenner L., Tschachler E., Wagner E.F. (2008):**  
Activator protein 1 (Fos/Jun) functions in inflammatory bone and skin disease  
Arthritis Res Ther. 10, 201-210
- Zheng C.F., Guan K.L. (1993):**  
Dephosphorylation and inactivation of the mitogen-activated protein kinase by a mitogen-induced Thr/Tyr protein phosphatase  
J Biol Chem. 268, 16116-16119



**Zhou H.R.**, Islam Z., Pestka J.J. (2003a):

Rapid, sequential activation of mitogen-activated protein kinases and transcription factors precedes proinflammatory cytokine mRNA expression in spleens of mice exposed to the trichothecene vomitoxin

Toxicol Sci. 72, 130-142

**Zhou H.R.**, Lau A.S., Pestka J.J. (2003b):

Role of double-stranded RNA-activated protein kinase R (PKR) in deoxynivalenol-induced ribotoxic stress response

Toxicol Sci. 74, 335-344

**Zhou H.R.**, Jia Q., Pestka J.J. (2005):

Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kinase Hck

Toxicol Sci. 85, 916-926

**Zhou D.**, Collins C.A., Wu P., Brown E.J. (2010):

Protein tyrosine phosphatase SHP-1 positively regulates TLR-induced IL-12p40 production in macrophages through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase

J Leukoc Biol. 87, 845-855

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. E. Märtlbauer danke ich für das Vertrauen bei der Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M. Gareis danke ich für die geleistete Unterstützung in den vergangenen Jahren.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. R. Dietrich, der großen Wert auf Selbstständigkeit legte, mir dennoch jeder Zeit mit seinem Wissen und seiner Erfahrung zur Seite stand und somit meine Entwicklung über den Zeitraum der Dissertation maßgeblich förderte.

Frau Dr. C. Hackel danke ich herzlich für Ihre tatkräftige Unterstützung und die produktiven Diskussionen während der Anfertigung der Dissertationsarbeit.

Frau B. Minich danke ich herzlich für die exzellente Einarbeitung im Zellkulturlabor und die stetige Unterstützung bei den Versuchen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. S. Härtle, die sowohl Ihre Zeit als auch Ihr Durchflusszytometer für Versuche zur Verfügung stellte.

Für die Finanzierung des Projektes im Rahmen des Graduiertenkolleg 1029 bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Zudem möchte ich meiner Freundin Esther ganz herzlich für den großen Rückhalt und Ihr Verständnis danken.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Eltern, meiner Schwester Caroline, sowie meinen Omas Resi und Nene die mich über den gesamten Zeitraum der Promotion unterstützt und motiviert haben.