

**Abschlußbericht zum BMLFUW Forschungsprojekt
Nr. 1199:**

**Entwicklung und Erprobung
von Hefe-Bioassays für *Fusarium*-Mykotoxine
(Deoxynivalenol und Zearalenon)**

**Dr. Gerhard Adam
Zentrum für Angewandte Genetik
Universität für Bodenkultur
Muthgasse 18
A-1190 Wien**

Wien, 29. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	3
Ergebnisse	4
1. Weiterentwicklung eines Bioassays für Zearalenone	4
1.1 Suche nach Östrogenrezeptor-Mutanten	4
1.2 Entwicklung von neuen Reportergenen	7
1.3 β -Galaktosidase als Reportergen zur quantitativen ZEA Bestimmung	9
2. Entwicklung eine Bioassays für DON	10
2.1 Suche nach <i>RPL3</i> -Mutanten	10
2.2 Inaktivierung von Kandidatengenen	10
ZUSAMMENFASSUNG	12
SUMMARY	13
Literaturverzeichnis	14
ANNEX I: Zearalenon-Bioassay (Stamm YZHB817, Arbeitsvorschrift)	16
ANNEXII: Zearalenon-Konzentrationsverlauf in einem infizierten Maiskolben	19

EINLEITUNG:

Fusarium graminearum und *F. culmorum* sind imstande sämtliche bedeutende Getreidearten (Weizen, Durumweizen, Gerste, Roggen und Hafer) und auch Mais zu befallen. Infolge der Ährenfusariose bzw. Kolbenfäule kann es im Feld zu einer Belastung des Erntegutes mit den *Fusarium*-Metaboliten Deoxynivalenol (DON) und Zearalenon (ZEA) kommen. Deoxynivalenol wirkt, so wie Toxine der Klasse der Trichothecene generell, als Inhibitor der Proteinsynthese in Eukaryonten. Zearalenon hat zwar geringe akute Toxizität, ist aber sehr stark östrogen wirksam. Eine kürzlich erfolgte toxikologische Bewertung durch das „Scientific Committee on Food“ der EU Kommission (Health and Consumer Protection Directorate) führte zu Festlegung einer temporären tolerierbaren Tagesaufnahme (temporary Tolerable Daily Intake: tTDI) von 1 µg/kg Körpergewicht für DON [1] und 0.2 µg/kg für Zearalenon [2]. Österreich hat seit 1993 Richtwerte für DON und ZEA in Weizen und Roggen für den menschlichen Verkehr [3], und kürzlich wurden auch Richtwerte für Futtermittel vorgeschlagen [4]. Die Richtwerte sind in Tabelle 1 zusammengestellt:

Produktkategorien	DON (µg/kg)	ZEA (µg/kg)
Für den menschlichen Verzehr :		
Weizen und Roggen	500	60
Durum-Weizen	750	60
Alleinfutter für:		
Zuchtsauen	500	50
Schweine aller Gewichtsklassen	500	---
Mastrinder	1000	---
Zuchtgeflügel und Legehennen	1000	---
Mastgeflügel	1500	---

Würde beispielsweise für den in Europa durchschnittlichen täglichen Verzehr (=178 g Weizenprodukte pro Person) ausschließlich Weizen verwendet, der DON am österreichischen Richtwert enthält (DON 500 µg/kg), so wäre die tägliche Aufnahme für den Durchschnittsmenschen (60 kg Körpergewicht) somit 1.48 µg DON/kg Körpergewicht, also bereits 148% des tTDI.

In Jahren mit für den Pilz günstigen Umweltbedingungen können jedoch wesentlich höhere Mykotoxingehalte auftreten. Beispielsweise wurden in Norddeutschland im Jahr 1998 bei Weizen durchschnittliche Belastungen von 6,82 mg DON/kg und ZEA bei 0,52 mg ZEA/kg festgestellt [5], mit Spitzenwerten von 34,6 mg DON/kg bzw. 2,2 mg ZEA /kg.

Problematisch ist weiters, daß neben Deoxynivalenol auch weitere Derivate, insbesondere 3-Acetyl-DON und 15-Acetyl-DON vorkommen können, sowie hochgiftige Typ A Trichothecene (HT-2 und T-2 Toxin). Diskutiert wird deshalb, insbesondere in skandinavischen Ländern, ob ein Summenwert für die Toxinklassen erstellt werden kann, der Grundlage von EU einheitlichen Bestimmungen sein kann.

Neben der Überwachung von Lebens- und Futtermittel sind jedoch vor allem Lösungsansätze gefragt. Da manche Pflanzenschutzmittel zwar die Symptome des *Fusarium*-Befalls mindern dabei jedoch sogar zu einem erhöhten Mykotoxingehalt führen können [18] sind direkte Messungen angebracht.

Eine nachhaltige Strategie ist die Züchtung *Fusarium*-resistenter Nutzpflanzen. Wiederum besteht für die Züchter großer Bedarf an Mykotoxinbestimmungen, da abhängig vom Genotyp bei scheinbar gleichem Befall (ermittelt durch visuelle Bonitierung) bis zum 10-fachen unterschiedliche Werte vorliegen können.

Die direkte Bestimmung des Toxingehaltes ist für die in der Pflanzenzüchtung üblichen großen Probenzahlen fast immer unfinanzierbar. Kosten um die 70 € pro Probe stellen auch ein Hindernis dar, um beispielsweise Futtermittel bzw. Rohstoffe wie Mais in größerer Zahl zu untersuchen.

Ziel dieses Projektes war es daher, auf genetisch veränderten Hefestämmen basierende Bioassays für die wesentlichsten Fusariumtoxine (Deoxynivalenol und Zearalenon) zu entwickeln bzw. zu verbessern. Die Eignung dieser Bioassays für die Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln, sowie ihre Anwendbarkeit als Selektionswerkzeug in der Pflanzenzüchtung soll untersucht werden.

ERGEBNISSE:

1. Weiterentwicklung eines Bioassays für Zearalenon

1.1. Suche nach Östrogenrezeptor-Mutanten mit höherer Affinität für ZON

Zearalenon interagiert mit dem humanen Östrogenrezeptor, jedoch ist die Affinität zum Mykotoxin etwa 20-fach niedriger als zum Hormon. Die dem Projektteil zugrundeliegende Überlegung war nun, daß Mutanten des Östrogenrezeptors existieren könnten, die stärker mit dem Zearalenon interagieren. Solche Mutanten sollten dadurch selektierbar sein, daß ein östrogen reguliertes Reporter-gen bei niedrigeren ZEA Konzentrationen aktiviert wird, als für die Aktivierung durch den Wildtyp-Östrogenrezeptor notwendig sind.

Ursprünglich wurde für die Experimente das Plasmid YEp-HEGO verwendet. Eine humane Östrogenrezeptor-cDNA wird dabei unter dem *PGK1*-Promoter der Hefe exprimiert, das Plasmid ist vom 2 μ -Plasmid der Hefe abgeleitet und liegt in hoher Kopienzahl vor. Das Plasmid wurde mutagenisiert und Mutanten selektiert, die bei 0,1 ppb Zearalenon im Medium bereits ein *URA3* Gen anschalten (*URA*⁺ sind), das einen künstlichen Promotor mit 3 „estrogen responsive elements“ enthält. Leider ergab sich, daß viele der „Mutanten“ wahrscheinlich Adaptanten mit erhöhter Kopienzahl waren, da ihr Phänotyp nicht stabil war. Andere Mutanten waren unabhängig von Östrogenrezeptor-Plasmid *URA*⁺ (vermutlich also Promotor-Mutationen). Daraufhin wurde zu einem neuen System mit mehreren Reporter-genen gewechselt.

Ein Plasmid wurde freundlicherweise von Prof. Didier Picard (Genf) zur Verfügung gestellt, das ein Hybridgen enthält, in dem die DNA-Bindungsdomäne des Hefe-Transkriptionsaktivators *GAL4* mit der hormonabhängigen Transkriptionsaktivierungsdomäne des humanen Östrogenrezeptors (hER) fusioniert ist.

Der resultierende chimäre Transkriptionsfaktor aktiviert nun hormonabhängig Gene mit *GAL4*-Bindungsstellen im Promotor, wobei die basale Expression ohne Hormon extrem niedrig ist. Das Genkonstrukt wurde in ein Centromerplasmid (*CEN4 TRP1 ARS1*) umkloniert (pTK103), damit dieses System mit gängigen Two-Hybrid Stämmen kompatibel ist. Verwendet wurde der Stamm PJ69-4A (beschrieben in [6]).

In mehreren Stufen wurde der Stamm YZHB817 konstruiert. Unter Verwendung des Plasmide pUG6 (enthält die *loxP*-*KanR*-*loxP*, [7]) und pBS49 (enthält *URA3-GAL1-Cre* [8]) wurden die Gene *PDR5* und *SNQ2* disruptiert, da die ZEA Aufnahme mehr als 30-fach verbessert ist, wenn diese ABC Transporter Proteine fehlen.

Für die Disruptionen wurden PCR Produkte mit der *Kan^R*-Kassette als Vorlage unter Verwendung von langen Oligonukleotiden hergestellt, die somit etwa 45 bp Homologie zu den zu disruptierenden Genen aufwiesen. Die korrekte Integration wurde durch PCR mit flankierenden Markern gezeigt. Die Strategie ist in der nachfolgenden Abbildung (Diplomarbeit Herwig Bachmann, 2001) dargestellt.

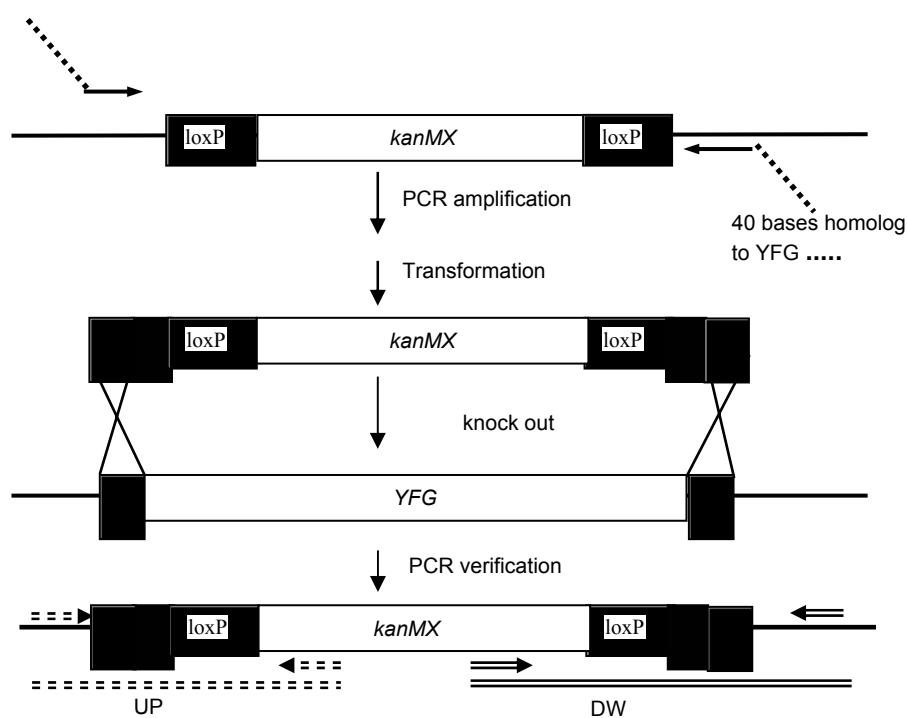
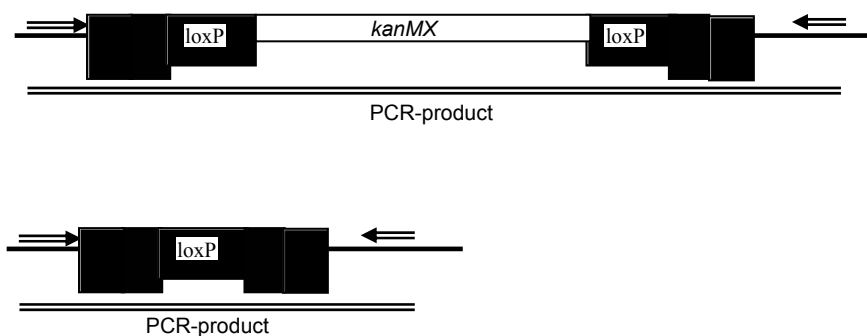


Figure 1: Gene disruption using *loxP*-*kanMX*-*loxP* disruption cassette. Using oligonucleotides that consist on their 3'-end (arrow -full line) of ~20 bases homologous to flanking sequences of the *loxP*-*kanMX*-*loxP* cassette and on their 5'-end (dotted line) of ~40 bases homologous to flanking sequences of the gene to be disrupted a fragment will be amplified which recombines with the targeted sequences after yeast transformation. A PCR verification of the genomic integration at the wanted locus is done using oligonucleotides (double lines) located as shown in the figure, which results in fragments of a specific length. *YFG*- your favourite gene
UP - amplified verification fragment at 5'-end
DW - amplified verification fragment at 3'-end

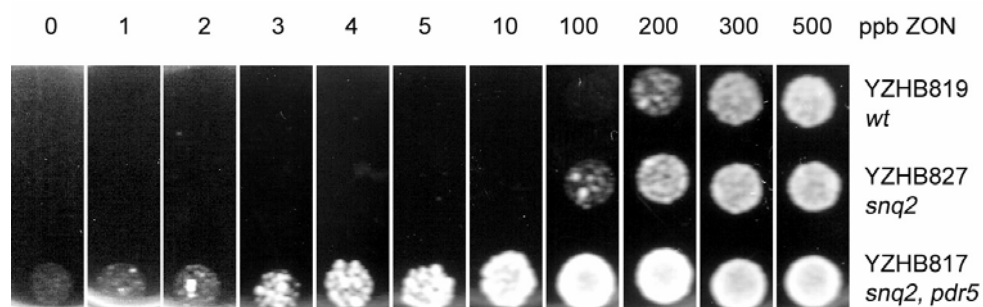
Nach erfolgreicher Transformation kann der Transformationsmarker (Geneticin G418 Resistenz, vermittelt durch *lox*-Kan^R-*lox* Kasette, wieder entfernt werden. Ein Problem dabei war, daß die *Cre* Rekombinase unter dem *GAL1* Promotor exprimiert wird, der *gal4* Marker des Stammes für die Induktion daher erst komplementiert werden mußte. Nach Expression von *Cre* bleibt nur eine *loxP* Sequenz im disruptierten Gen zurück, die G418 Resistenz kann als Transformationsmarker wiederverwendet werden.



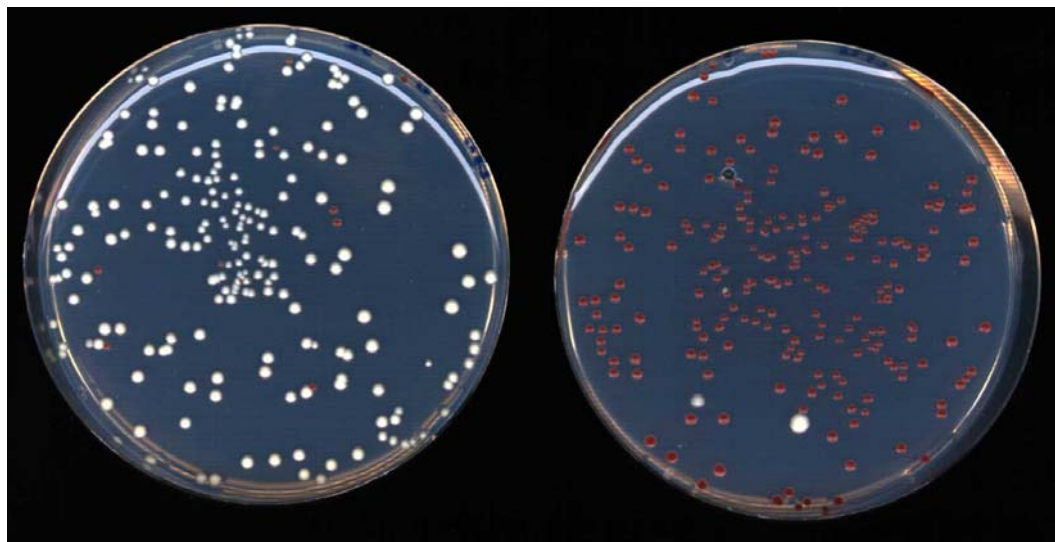
Der konstruierte Stamm YZHB817 hat folgenden Genotyp:

MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ, GAL2-ADE2 LYS2::GAL1-HIS3 met2::GAL7-lacZ; Δsnq2::loxP, Δpdr5::loxP-kan^r-loxP (pTK103 = CEN4 TRP1 – pADH1-GAL4-hER-HBD)

In Gegenwart von östrogen wirksamen Substanzen werden die unter *GAL*-Promotoren befindlichen Gene *HIS3*, *ADE2* und *lacZ* induziert. In der Abbildung ist gezeigt, daß das WT Plasmid pTK103 im Stamm mit der Doppeldisruption von *snq2* und *pdr5* bereits bei sehr geringen Zearalenon-Konzentrationen seinen Phänotyp von his- auf HIS+ ändert.



Das Plasmid pTK103 wurde nun mittels des *E. coli* Mutatorstammes XL1-Red mutagenisiert. Dieser Stamm weist Defekte in mehreren DNA Reparaturgenen auf, und hat eine um etwa 5.000-fach erhöhte spontane Mutationsrate [9]. Die Frequenz an Defektmutanten kann abgeschätzt werden als die Fraktion roter (*ade2*) Kolonien in Gegenwart von Hormonkonzentrationen, die bei Vorliegen des WT pTK103 das *GAL2-ADE2* aktivieren (weiße Kolonien).



SC-Trp, 1/4 Ade + 10 ppb 17-β-Estradiol

SC-Trp, 1/4 Ade

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist sind nach Transformation mit mutagenisiertem Plasmid einige Prozent Defektmutanten vorhanden. Als gravierendes Problem für unsere Strategie erwies sich jedoch die Existenz von konstitutiven Mutanten (weiße Kolonien auf Platten ohne Östrogen!).

Unter etwa 200.000 untersuchten Kolonien, die auf Medium wuchsen, das nur 1/10 der für die Aktivierung des *GAL1-HIS3* Gens notwendigen ZEA enthielt, konnten leider nur konstitutiven Mutanten gefunden werden. Mutanten die noch von ZEA abhängig sind sollten auf Platten ohne Hormon noch rote Kolonien ergeben.

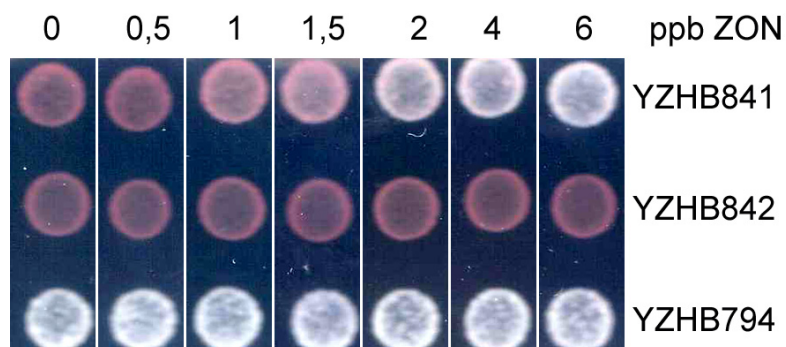
Der Grund für das häufige Auftreten von konstitutiven Mutanten ist wahrscheinlich, daß Abbruch-Mutanten ein verkürztes Protein bilden, in dem eine sonst inaktive Transkriptionsaktivierungs-Domäne freigelegt ist, die hinreichend für die Aktivierung der Reporterkonstrukte ist.

Es ist somit bisher nicht gelungen, Mutanten mit erhöhter Affinität zu selektieren. Aus zeitgründen wurde noch nicht versucht, ein neues Hybridgen herzustellen und zu testen, in dem die vermutete problematische Aktivierungsdomäne nicht mehr enthalten ist.

1.2. Entwicklung von neuen Reporter genen für die visuelle Detektion von Zearalenon

Zur Verbesserung des existierenden Bioassays, der auf Wachstum/Nichtwachstum beruht, wurden zusätzliche Reportergene hergestellt, die eine phänotypische Detektion von Zearalenon ermöglichen sollen.

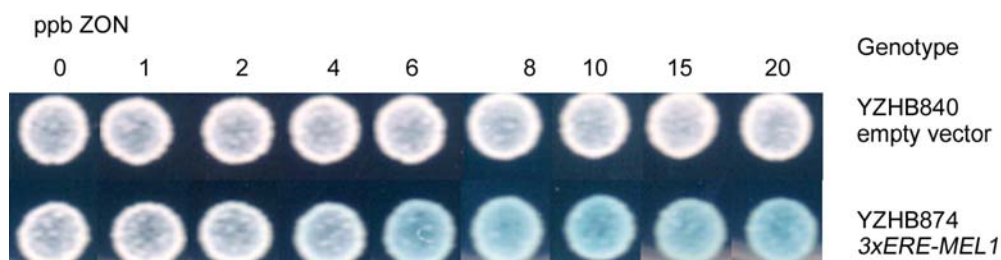
Dabei wurde das von Pierrat *et al.* [10] beschriebene Promotorkonstrukt herangezogen. Jedoch wurden anstelle von *URA3* die Gene *ADE2* und *MEL1* eingefügt.



Wie aus der obigen Abbildung ersichtlich ist, ändert sich die Farbe der Kolonien mit dem *3xERE-ADE2* Konstrukt (YZHB841) in Abhängigkeit von der Zearalenon-Konzentration. Die Kontrollstämme YZHB794 (*ADE*⁺) und YZHB842 (*ade*⁻) ändern ihre Färbung nicht.

Da Acetonitril in Agarplatten auch bei einer Endkonzentration von 12,5% nicht wachstumsinhibierend ist, können Getreideextrakte (die 75% AcN enthalten) 1:6 in den Agar gemischt werden. Da das in der Probe ursprünglich vorhandene ZEA bei der Extraktion schon 4-fach verdünnt wurde, ergibt sich eine Gesamtverdünnung um einen Faktor 24. Da bei 2 ppb Endkonzentration in der Platte bereits ein Farbumschlag stattfindet, sind Proben die mehr als 50 ppb ZEA enthalten, unmittelbar erkennbar.

In ähnlicher Weise wurde auch ein Reporterkonstrukt für das *MEL1*-Gen konstruiert. *MEL1* kodiert für eine α -Galaktosidase (Melibiase), die in gängigen Laborstämmen von *Saccharomyces cerevisiae* fehlt. Das Enzym liegt extrazellulär vor, für Aktivitätstests ist es nicht notwendig Zellextrakte herzustellen. Mit Hilfe des chromogenen Substrates X- α -Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- α -D-Galactopyranosid) kann die Aktivität auch auf Agar nachgewiesen werden.



Es konnten somit 2 neue Reporter-Konstrukte hergestellt werden, die einen äußerst sensitiven qualitativen Nachweis der östrogenen Aktivität erlauben. Das *MEL1* Reporterkonstrukt ist allerdings weniger sensitiv und benötigt das teure chromogene Substrat.

Anwendung: Klonierung eines Zearalenon-Detoxifikationsgens

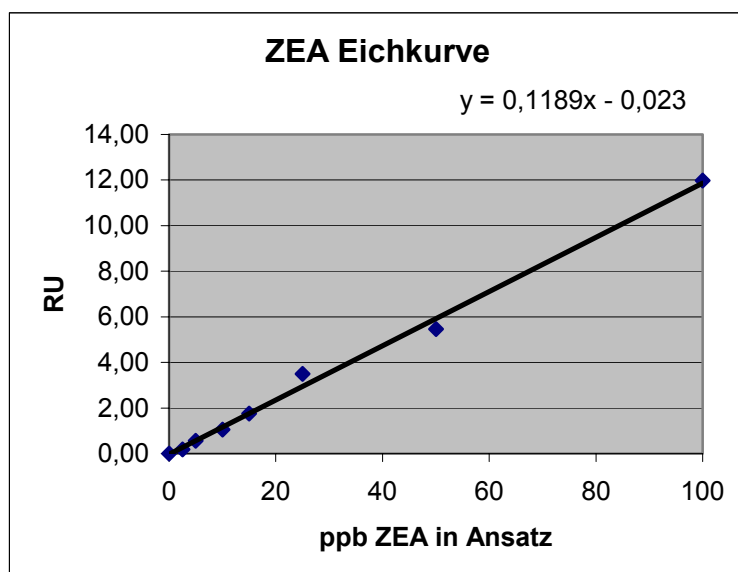
Die konstruierten Reportergene erwiesen sich auch als sehr nützlich für die Grundlagenforschung. So konnten wir damit in einem anderen Projekt (BOKU-Forschungsstimulierung: MIKROORG) eine Glykosyltransferase klonieren, die Zearalenon höchstwahrscheinlich in das Zearalenon-4- β -Glucopyranosid überführt. Die Bildung dieses Derivates in Mais-Suspensionskulturen wurde beschrieben [11]. Es ist bisher sehr wenig über diesen Detoxifikationsmechanismus in Pflanzen bekannt. Das ZEA-Glucose-Konjugat kann allerdings im Verdauungstrakt von Glucosidasen gespalten und wieder reaktiviert werden („maskiertes Mykotoxin“, das den üblichen Bestimmungsmethoden entgeht). Das klonierte *Arabidopsis*-Gen sollte einen Zugang öffnen zu diesem für die Züchter wichtigen Mechanismus. Jüngst vorgestellte Ergebnisse deuten darauf hin, daß in Weizen Zearalenon-Glucosid in etwa 30% der Menge des bestimmten ZEA vorliegt [12].

1.3. β -Galaktosidase als Reportergen zur quantitativen ZEA Bestimmung

Der hergestellte Hefestamm YZHB817 hat an einem Methionin-Biosynthesegen ein *E. coli* β -Galaktosidase-Gen unter Kontrolle des *GAL7* Promotors integriert. Dieses Reporterkonstrukt (*met2::GAL7-lacZ*) wird nun durch ein Gal4-Östrogenrezeptor-Hybridprotein abhängig von der ZEA-Dosis induziert. Darauf basierend wurde ein Assay mit permeabilisierten Hefezellen entwickelt. Die Hefezellen werden mit der Probe versetzt und nach mehreren Stunden Inkubation wird die Zelldichte bestimmt (OD_{600}) und die Zellen durch Zugabe von Chloroform permeabilisiert. Dann wird das chromogene Substrat ONPG (ortho-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) dazupipettiert und die Reaktion durch pH-Verschiebung mittels Carbonatlösung gestoppt. Aus der pro Reaktionszeit gebildeten Menge des gelben Farbstoffes (A_{420}) errechnet sich die östrogene Aktivität wie folgt:

$$RU = (OD_{420} \times 1000) / (OD_{600} \times \text{Inkubationszeit [min]})$$

RU...relative units



OD_{420} (Substratumsatz)

OD_{600} (Hefezellmenge)

Gemessen wird gegen einen Blindwert (Zellen die nur mit Lösungsmittel statt Extrakt inkubiert wurden). Ein Beispiel für die Beziehung zwischen dem der Hefe vorgelegten Zearalenon und der resultierenden Aktivität des Reportergens ist anbei gezeigt. Ein vollständiges Protokoll ist im Annex I zu finden.

Einschränkend ist allerdings anzumerken, daß Extrakte von Proben, die 75% Acetonitril aufweisen, vor der Zugabe zur Hefe sicherheitshalber nochmals 1:5 zu verdünnen sind, um eine Störung durch das Lösungsmittel auszuschließen. Da es bei der Extraktion schon zu einer 4-fachen Verdünnung des in der Probe vorhandene ZEA gekommen ist, müssen erhebliche Mengen ZEA in der Probe vorliegen, um die Extrakte direkt, ohne vorheriges Eindampfen (in Speedvac), analysieren zu können. Wie das in Annex II gezeigte Anwendungsbeispiel zeigt, besteht dieses Problem bei Proben aus Feldversuchen mit künstlicher *Fusarium*-Infektion nicht.

2. Entwicklung eines Bioassays für Deoxynivalenol

2.1. Suche nach *RPL3*-Mutanten mit erhöhter Sensitivität für Trichothecene

In früheren Studien wurden DON-resistente Mutanten in einem Gen gefunden, das für das ribosomale Protein L3 (*RPL3*) kodiert. Es wurde im Antrag vorgeschlagen, daß Mutanten gesucht werden sollten, die im Gegenteil zu einer erniedrigten Resistenz führen. Leider erwiesen sich die vorgeschlagenen Anreicherungsverfahren mit Canavanin und Nystatin als nicht selektiv genug. Da nur etwa 400 Einzelkolonien/pro Platte auf Toxinmedium Replika-plattiert werden können, wäre der Aufwand an Deoxynivalenol (DON) unverträglich hoch gewesen. Die Strategie wurde daher aufgegeben.

2.2. Inaktivierung von Kandidatengen für Deoxynivalenol-Resistenz in Hefe

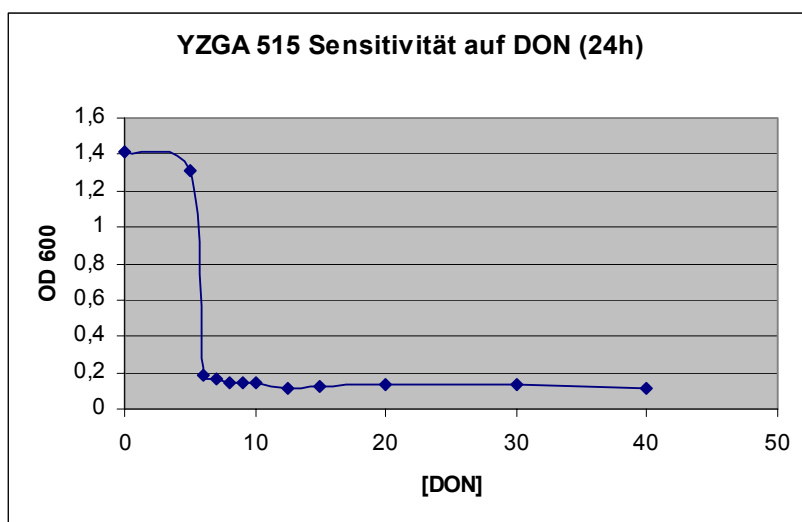
Bei Antragstellung war bekannt, daß die Ausschaltung der Hefegene *PDR5* (bewirkt Toxin Efflux) und *AYT1* (Acetyltransferase) die DON-Resistenz stark vermindert. Dennoch besteht Grund zur Annahme, daß weitere Resistenzgene existieren, insbesondere solche, die unter RAS-cAMP Kontrolle stehen.

Die *PDR5*-ähnlichen Gene *PDR10* und *PDR15* tragen nur geringfügig zur Resistenz bei, der RAS-cAMP Effekt muß auch durch andere Gene vermittelt werden. Die ersten Kandidaten waren die unter dieser Regulation stehenden Glutathione-S-Transferasen (GSTs) *GTT1* und *GTT2* [13]. Manche GSTs in der Lage, Epoxidringe durch nucleophile Addition von Glutathion an die Epoxidgruppe zu spalten. Da die Epoxidgruppe in Trichothecenen essentiell für die Toxizität ist, könnten GSTs eine Rolle in der Entgiftung spielen. Die Doppelmutanten $\Delta gtt1 \Delta gtt2$ wurden hergestellt, zeigten jedoch unveränderte DON Resistenz. Weiter Kandidaten, die getestet wurden, sind Gene mit GST-Homologie [14], denen jedoch eine Rolle als Translations-Elongationsfaktor Untereinheit 1 Gamma zugeschrieben wird. Neben den 2 bekannten Genen *TEF4* und *CAM1* existiert ein weiteres, sequenzähnliches Protein unbekannter Funktion (*YGR201c*). Ein Sequenzvergleich zeigt daß die 50 Aminosäure langen N-terminale Überhang gegenüber *TEF4* und *CAM1* wahrscheinlich ein Artefakt der Computerbiologie ist, da ein „in frame ATG“ an der exakten Position des Starts der beiden anderen existiert.

Die 3 Gene *TEF4*, *CAM1* und *YGR201c* wurden nun in einem *GTT1 GTT2* Stamm und einer $\Delta gtt1 \Delta gtt2$ Doppelmutante inaktiviert. Die Tatsache daß diese Mutanten lebensfähig sind spricht gegen eine Rolle in der Translation. Jüngst wurde übrigens die bisher bezweifelte GST-Aktivität für das homologe Reis-Gen nachgewiesen [15], die Rolle dieser Gene könnte eine Art ins Ribosom eingebaute Entgiftungsfunktion

sein. Unerwarteter weise zeigte sich jedoch keine starken Effekte in irgendeiner Genkombination, dies muß jedoch noch unter mehreren Bedingungen verifiziert werden. Falls die Hefegene wirklich keinen Effekt haben, könnten die Hefestämme dennoch nützlich zur Charakterisierung der nach *Fusarium*-Infektion stark induzierten Weizen EF-1 γ cDNA sein (unpubliziert). Die Frage, welches der RAS/cAMP regulierte Stressgen für die induzierte Resistenz verantwortlich ist, konnte bei Projektende somit noch nicht beantwortet werden. Die Strategie die naheliegendsten Kandidaten zu disruptieren erwies sich als nicht erfolgreich, viele der insgesamt mehr als 200 diesem Regulationstyp unterliegenden Gene haben keine bekannte biochemische Funktion.

Es wurde daher ein Screen nach Genen, die bei Überexpression erhöhte Resistenz vermitteln, begonnen. DNA Mengen ausreichend für die Herstellung mehrerer Millionen Hefetransformanten wurden von 2 cDNA Genbanken und einer genomische Genbank präpariert, bei denen die Inserts unter Kontrolle des *GAL1* Promotors stehen.



Die Kombination der gegenwärtig bekannten, die Toxinresistenz reduzierenden Mutationen führt zu Hefestämmen, die einen Faktor 4 bzw. 5 sensitiver sind als die besten in der Literatur beschriebenen [16, 17]. Für DON ergibt sich eine IC50 von nur 5,5 ppm.

Für eine Anwendung dieses Bioassays im Bereich der Resistenzzüchtung ergeben sich 2 gravierende Probleme:

- 1) Da die Proben mit 75% Acetonitril extrahiert werden (1:4 Verdünnung des vorhandenen DON) und der Hefestamm bei etwa 3% Acetonitril bereits merkbare Wachstumsinhibition zeigt, müßten die Extrakte vorher entsprechend verdünnt werden. Wenn etwa 400 μ l Extrakt mit 800 μ l Hefevorkultur zusammengebracht werden, so ist vorher eine Verdünnung um 10-fache notwendig, um auf eine Endkonzentration von 2,5% Acetonitril zu kommen. Die Mengen, die z.B. in kontaminiertem Mais vorkommen, erreichen jedoch bei weitem nicht Werte, um dann noch inhibierend zu sein. Der Assay wäre also höchstens nach einer Probenaufbereitung z.B. mit Immunoaffinitätssäulchen anwendbar, was der ursprünglichen Intention widerspricht.
- 2) Der Bereich in dem ein proportionaler Zusammenhang zwischen Wachstum und Toxingehalt besteht ist sehr eng. Es zeigte sich, daß die Wiederholbarkeit (Tag zu Tag) von Bestimmungen mit Eichlösungen unbrauchbar gering war, bedingt durch die Steilheit der Kurve im proportionalen Bereich.

Der DON-Bioassay ist jedoch sehr gut geeignet für das Screening von Bakterien auf DON-Degradation. Im Rahmen des BOKU-Projektes MIKROORG konnten 2 Bakterienstämme identifiziert werden, die Hefe vor DON schützen.

Einer der Bakterienstämme produziert eine Substanz, die vermutlich durch Verminderung der RAS-Farnesylierung Toxinresistenz in Hefe auslöst, der andere kann DON auf unbekannte Weise inaktivieren. Weiters zeigte sich, daß verschiedene als „Probiotika“ in Umlauf befindliche Lactobacillen und Bifidobakterien eine enorm hohe Fähigkeit haben, Deoxynivalenol (vermutlich an Zellwandstrukturen) zu binden.

ZUSAMMENFASSUNG:

Ziele des Projektes war die Entwicklung von genetisch veränderten Hefestämmen, die als sensitive Indikator-Organismen in Bioassays für die Fusariumtoxine Deoxynivalenol und Zearalenon eingesetzt werden können.

Der entwickelte DON Bioassay blieb leider unter den ursprünglichen Erwartungen. Es konnten keine Erhöhung der Sensitivität der Hefe gegen DON erzielt werden, die den Test praxistauglich für die Überwachung von Lebens- und Futtermitteln oder die Resistenzzüchtung gemacht hätte. Die hergestellten Stämme sind jedoch ein nützliches Werkzeug beim Screening nach Mikroorganismen die DON inaktivieren können, oder nach Mykotoxinbindern oder Substanzen, welche die Toxizität von DON herabsetzten. Weiters erwiesen sie sich als wertvoll in der Grundlagenforschung, ein DON Detoxifikationsgen von *Arabidopsis thaliana* konnte kloniert werden (unpubliziert).

Zearalenon hat starke östrogene Wirksamkeit. Es wurden daher Hefestämme entwickelt, die unter der Kontrolle des humanen Östrogenrezeptors stehende, neukonstruierte Reportergene exprimieren. Das modifizierte *ADE2* erlaubt eine sensitive phänotypische Detektion geringer Mengen (2 ppb) von Zearalenon im Medium durch Änderung der endogenen Koloniefarbe (*ade2*: rot/ *ADE2*: weiß). Das veränderte *MEL1* Gen erlaubt die Detektion von etwa 6 ppb ZEA durch die Blaufärbung, die durch die Spaltung des chromogenen Substrates auftritt.

Weiters wurde ein für die quantitative Bestimmung von ZEA im für Lebens- und Futtermittel relevanten Bereich tauglicher Assay entwickelt, der auf der Messung der induzierten *lacZ* Aktivität in permeabilisierten Zellen basiert. Das Reportergen steht dabei unter Kontrolle eines natürlicherweise *GAL4* abhängigen Hefepromotors, die Aktivierung erfolgt durch ein *GAL4*-Östrogenrezeptor-Hybridprotein, das die DNA-Bindungsdomäne von Gal4p enthält und die hormonabhängige Aktivierungsdomäne des Östrogenrezeptors. Dieser Assay sollte auch in der Züchtung von Mais und Weizen auf niedrigen Zearalenongehalt wichtige Anwendungen finden.

SUMMARY:

Goals of this project were the development of genetically modified yeast strains, to be used as sensitive indicator organisms in bioassays for the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol.

The resulting DON bioassay, unfortunately, did not reach the increased sensitivity to become practically useful for the analysis of food or feed samples.

Yet, the constructed yeast strains are useful tools to screen for micro-organisms that are able to inactivate DON, or for substances binding the mycotoxin or antagonising its toxicity. The strains turned out to be extremely useful for basic science, we were successful to clone a DON detoxification gene from *Arabidopsis thaliana* (unpublished).

Zearalenone has very high estrogenic activity. We therefore developed yeast strains containing newly constructed reporter genes that are controlled by the human estrogen receptor expressed in yeast. The modified *ADE2* allows the sensitive phenotypic detection of low amounts of zearalenone (2 ppb in the medium) by the endogenous red pigment of *ade2* mutants. Similarly, the modified *MEL1* gene allows detection of ZEA (6 ppb) by development of a blue colour due to the hydrolysis of a chromogenic substrate.

Furthermore we developed a simple quantitative test for zearalenone in the concentration range relevant for food and feed samples. The assay is based on the measurement of the induced *lacZ* activity in permeabilised cells. The reporter gene is controlled by a *GAL4* dependent yeast promoter, which is activated by a Gal4-estrogen-receptor hybrid-protein, which consists of the DNA binding domain of Gal4p and the hormone dependent activation domain of the human estrogen receptor. This assay should find important applications also in breeding for low ZEA content in maize and wheat.

Literatur:

1. Scientific Committee on Food (1999): Opinion on Fusarium Toxins. Part 1: Deoxynivalenol (DON). http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out44_en.html
2. Scientific Committee on Food (2000): Opinion on Fusarium Toxins. Part 2: Zearaleonone (ZEA). http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/out65_en.pdf
3. Bundesministerium für Gesundheit, Sport und Konsumentenschutz (GZ 32.110/1-III/B/1b/93). Mitteilungen der österreichischen Sanitätsverwaltung, Heft 7-8/1993.
4. Lew, H. (1999): Empfohlenes Richtwerteschema für Desoxynivalenol (Vomitoxin) und Zearalenon im Futter. Der Förderungsdienst 47/5, 157.
5. Ellner, F. M. (1999): 1998 – Ein Jahr für Fusariumtoxine. Proceedings des 21. Mykotoxin-Workshops, Jena 7. - 9. Juni 1999. (Eds. H. Rosner & P. Kielstein) Gesellschaft für Mykotoxinforschung e.V.
6. James P. Halladay J. und Craig E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436
7. Sauer B. (1987): Functional expression of the *cre-lox* site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7(6): 2087-2096
8. Güldner U., Heck S., Fiedler T., Beinhauer J. und Hegemann J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucl. Acids Res.* 24: 2519-2524
9. Greener A., Callahan M., und Jerpseth B. (1996): An efficient random mutagenesis technique using an *E. coli* mutator strain. *Meth. Mol. Biol.* 57: 375-385
10. Pierrat B., Heery D.M., Lemoine Y., und Losson R. (1992) Functional analysis of the human estrogen receptor using a phenotypic transactivation assay in yeast. *Gene* 119: 237-245
11. Engelhardt G., Zill G., Wohner B. und Wallnöfer P.R. (1988) Transformation of the *Fusarium* mycotoxin zearalenone in maize cell cultures. *Naturwissenschaften.* 75: 309-310
12. Schneweis I., Meyer C., Engelhardt G., und Bauer J. (2001): Vorkommen von Zearalenon-4-β-Glucopyranosid in Weizenproben. Proceedings 23. Mykotoxin-Workshop, Wien, 28. – 30. Mai 2001
13. Choi J.H., Lou W., und Vancura A. (1998). A novel membrane-bound glutathione S-transferase functions in the stationary phase of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol.Chem.* 273, 29915-29922
14. Koonin EV, Mushegian AR, Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Bork P, und Valencia A. (1994): Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein Sci.* 3: 2045-54.

15. Kobayashi S., Kidou S., und Ejiri S. (2001): Detection and characterization of glutathione S-transferase activity in rice EF-1betabeta'gamma and EF-1gamma expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288: 509-14
16. Binder J. (1999): A yeast bioassay for trichothecenes. *Nat. Toxins* 7: 401-406
17. Engler KH, Coker RD, und Evans IH. (1999): A colorimetric technique for detecting trichothecenes and assessing relative potencies. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1854-1857.
18. D'Mello JPF, MacDonald AMC, Postel D, Dijkema WTP, Dujardin A, und Placinta CM (1998): Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 104:741-751

Annex I:

Zearalenone Bioassay (β -Galaktosidase Reporter, Stamm YZHB817)

1) Probenextraktion: Das Standardprotokoll wurde etwas verkleinert:

Etwa 6 g der gemahlene Getreide- oder Maisproben werden in 50 ml Einweg-Zentrifugenröhrchen (Fa. Greiner) genau eingewogen und mit 4 ml 75% Acetonitril pro Gramm Probe versetzt. Die Extraktion erfolgt mit dem Ultra-Turrax T25 Mixer für 3 Minuten bei 24500 rpm.

Die Suspension wird anschließend 5 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert (Sigma Laborzentrifuge 4-15). Der Überstand wird durch ein Whatman GF/A Filter filtriert.

- a) Proben mit niedrigem ZEA Gehalt: 1 ml dieses Extraktes werden in ein steriles 2.2 ml Eppendorfgefäß übergeführt und in der Speedvac (Savant) zur Trockene (öliger Rückstand) eingengt, mit 100 μ l 40% Ethanol versetzt und die Probe am Eppendorfschüttler 30 Minuten bei 37°C gevortext. Danach wird die Kultur des Indikatorstammes (1,9 ml) direkt in die Eppendorfgefäße pipettiert und nochmals 30 Minuten geschüttelt, anschließend werden die Kulturen in Glasröhrchen übergeführt. „Verdünnungsfaktor“: 10/4.

Blindprobe: Hefestamm versetzt mit Lösungsmittel (40% Ethanol).

Eichreihe: Standard (0-150 ppb ZEA verdünnt in 40% Ethanol)

- b) Proben mit hohem ZEA Gehalt:

Die Extrakte werden 1: 5 mit sterilem Wasser verdünnt (Acetonitril-Konzentration im Extrakt ist somit 25%),

Dieser verdünnte Extrakt ist direkt verwendbar, im Inkubationsansatz liegen daher nur mehr nur 1,25% AcN vor, diese sind nicht mehr inhibierend).

Verdünnungsfaktor: 1/20.

Blindprobe: Hefestamm versetzt mit Lösungsmittel (25% Acetonitril).

Eichreihe: Standard (0-150 ppb ZEA verdünnt in 25% Acetonitril)

2) Vorbereitung des Indikatorstammes:

Mit einer Einzelkolonie (von einer SC-TRP Platte, nicht älter als 1 Woche) des Stammes YZHB817 werden 25 ml SC-TRP Medium in einem 100 ml Erlenmayerkolben beimpft und über Nacht bei 28°C geschüttelt (200 rpm). Morgens wird die OD₆₀₀ bestimmt und auf OD₆₀₀ = 0,1 zurückverdünnt. Die Kultur wird dann bis zum frühen Nachmittag weiterwachsen gelassen und für den Inkubationsansatz nochmals auf OD₆₀₀ = 0,1 zurückverdünnt.

3) Ansetzen des Bioassays:

Von der zurückverdünnten Kultur (OD₆₀₀ = 0,1) werden 1,9 ml je Probe in ein steriles Glasröhrchen (Cap-o-Test) portioniert und anschließend werden 100 μ l der Extrakte bzw. Kalibrierlösungen/Lösungsmittelkontrolle zugegeben. Die Ansätze werden bei 28°C für 16-18 Stunden bei 200 rpm leicht schrägliegend geschüttelt.

Wichtig: mehrere Blindwerte ansetzen!

4) Durchführung der Messung:

Von den Röhrcchen werden 300 µl entnommen, mit 600 µl Wasser verdünnt und gegen eine Blindprobe von verdünntem Medium gemessen. (In die Berechnung geht die tatsächlich vorliegende Zelldichte (OD_{600}) ein, dh. Meßwert x3). Um nicht aus dem linearen Bereich zu kommen sind Meßwerte größer 0,6 zu vermeiden (gegebenenfalls stärker verdünnen!).

Von der restlichen, gut durchgemischten Suspension wird 1 ml entnommen und in ein Eppendorfgefäß übergeführt. Das Zellpellet wird durch 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm geerntet und der Überstand abgenommen (Vorsichtig, Pellet nicht aufwirbeln).

Das Pellet wird in 500 µl Z-Puffer resuspendiert. Zur Suspension wird 25 µl Chloroform pipettiert und die heftig gevortexte Mischung 10 Minuten bei 30°C equilibriert.

Start und Stop der Reaktionen erfolgen nach Stopuhr, z.B. alle 10 Sekunden: Zeiten notieren!

Start: durch Zugabe von 100 µl ONPG-Substratlösung.
 Inkubieren bis leichte Gelbfärbung eintritt. Inkubationszeit notieren (10 bis 100 Minuten möglich), Proben versetzt stoppen (wieder alle 10 Sekunden).
 Stop: durch Zugabe von 1 M Na_2CO_3 (Stoplösung).

(Anm.: Die Intensität der Gelbfärbung steigt nach der pH-Verschiebung, es sollen keine Werte unter 0,1 und über 0.6 gemessen werden, besser ist die Variation der Inkubationszeit).

(Achtung: da die Hefe geringe basale Aktivität aufweist, ist es sinnvoll „blanks“ und Eichreihe genau solange wie die Proben zu inkubieren, was bei sehr unterschiedlichen Proben schwierig ist. Es ist jedoch möglich die Zeitabhängigkeit des Leerwertes zu bestimmen und den geringen Beitrag zu subtrahieren.)

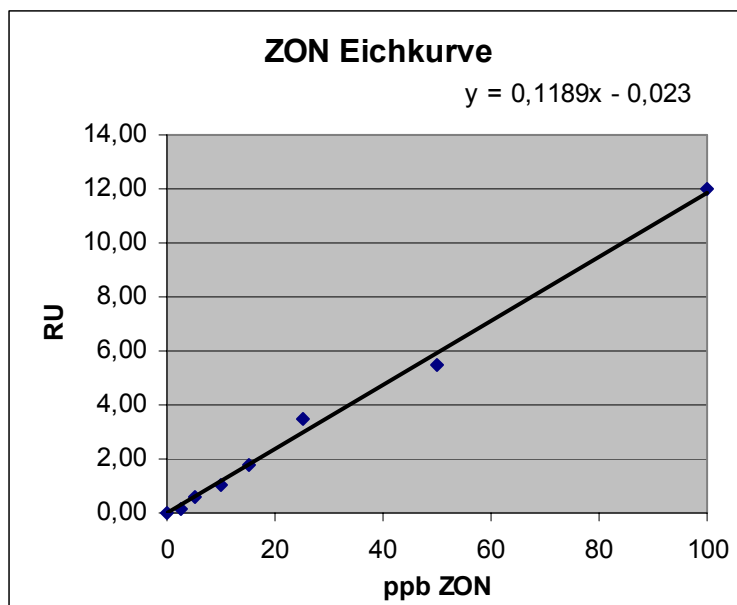
Nach dem Stop der Reaktion werden die Proben 5 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert, und der Überstand in 1 ml Plastik-Einwegküvetten übergeführt (Achtung, kein Chloroform mitschleppen, Plastikküvetten!).

Zum Abgleichen wird der Blindwert verwendet (Inkubationsansatz der nur Lösungsmittel, kein zugegebenes ZEA enthält, möglichst gleiche Inkubationszeit). Die Extinktion der Proben bei 420 nm wird ermittelt.

Berechnung der „relativen Units“:

$$RU = (OD_{420} \times 1000) / (OD_{600} \times \text{Inkubationszeit in min})$$

Zur Ermittlung des Zusammenhanges zwischen RU und Zearalenon-Equivalenten dient die mitgeführte Eichkurve. Ein Beispiel ist nachfolgend gezeigt:



Material:

SC – Trp Medium for yeast culture:

1,43 g/l Yeast nitrogen base

5 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Aminosäuren als 100xStammlösungen zugeben: alles außer Tryptophan

Auf 960 ml bringen, autoklavieren

20 g/l Glucose steril hinzufügen (40 ml 50 % Lösung)

Z- Puffer:

60 mM Na_2HPO_4

40 mM NaH_2PO_4

10 mM KCl

1 mM MgSO_4

Z-Puffer soll frisch aus Teil A und B (1:1) gemischt werden.

Teil ZA: 8.52 g Na_2HPO_4
5.50 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0.75 g KCl
auf 500 ml, autoklavieren

Teil ZB: 0.246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ auf 500 ml, autoklavieren

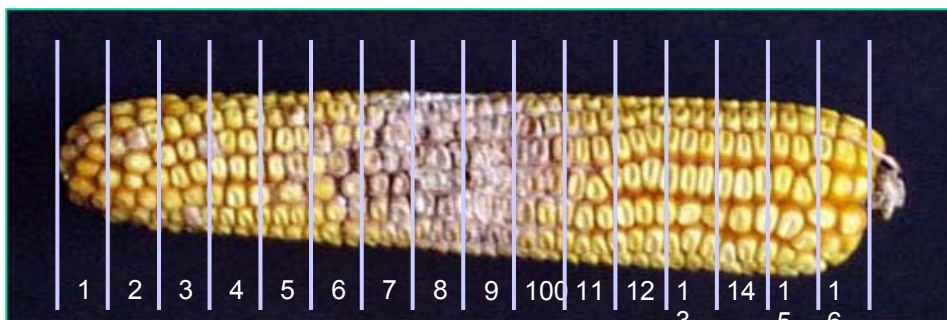
ONPG: 4 mg/ml O-NitroPhenyl- β -D-Galactopyranoside (in Wasser)
(Sigma 1127)

Stop – Solution: 1 M Na_2CO_3

Annex II:

Bestimmung des ZEA-Konzentrationsverlaufes in einem Maiskolben

Probenmaterial: Maiskolben infiziert mit *F. graminearum* (IFA Tulln),
(entspricht etwa dem Bild nach Zünslerbefall).



Der Kolben wurde in Scheibchen zersägt, die Körner und Spindel getrennt gemahlen und die Zearalenon-Konzentration in den Proben mit Hilfe des Bioassays bestimmt.

Wie aus den folgenden Abbildungen ersichtlich ist, sind die festgestellten Konzentrationen in der Spindel um ein vielfaches höher sind als in den Körnern. Der Pilz scheint sich über die Spindel auszubreiten und kann von dort weitere Körner infizieren. Ein wesentlicher Resistenzfaktor ist daher die Fähigkeit der Pflanze die Ausbreitung des Pilzes in der Spindel zu stoppen.

