Aus dem Physiologischen Institut
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. S. Silbernagl

Screening der apoptoseinduzierenden Interaktionen von Nephrotoxinen unter besonderer Berücksichtigung von Ochratoxin A

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Florian Weber

aus Bad Kissingen

Würzburg Februar 2004

Referent: Prof. Dr. med. M. Gekle

Korreferent: Prof. Dr. med. N. Gordjani

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2004

Der Promovend ist Arzt.

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1. Klinische Bedeutung des Mykotoxins Ochratoxin A 1

1.1.1. Physiologische Quellen und Konzentrationen für Ochratoxin A 2

1.1.2. Ochratoxin A-Assoziierte Organschäden 2

1.2. Toxikokinetik von Ochratoxin A 3

1.2.1. Aufbau und chemische Eigenschaften 3

1.2.2. Resorption und Verteilung von Ochratoxin A im Körper 4

1.3. Toxikodynamik von Ochratoxin A am Nephron 5

1.3.1. Renale Hämodynamik und glomeruläre Filtration 5

1.3.2. Proximaler Tubulus 5

1.3.3. Postproximale Abschnitte 7

1.4. Apoptose 8

1.4.1. Definition und Funktion der Apoptose im Körper 8

1.4.2. Induktion von Apoptose 9

1.4.3. Die Signalkaskade der Apoptose 10

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit 12

2. Material und Methoden **14**

2.1. Zellkultur 14

2.2. Bestimmung von Apoptose, Nekrose und Protein in der 96-Well Schale 15

2.2.1. Apoptose 15

2.2.2. Nekrose 16

2.2.3. Proteinbestimmung 16

2.3. DNA-Fragmentierung 17

2.4. Bestimmung von Sauerstoffradikalenbildung und Protein in der 24-Well Schale 18

2.5. Materialien 18

2.6. Statistik 19

2.7. Beschreibung der Interaktionen mit Ochratoxin A 20

3. Ergebnisse **21**
3.1. Allgemeines 21
3.1.1. Auswahl der getesteten Substanzen 21
3.1.2. Wirkung von Ochratoxin A alleine 21
3.2. Antibiotika 24
3.2.1. Gentamicin 24
3.2.2. Cephalosporine 24
3.2.3. Amphotericin B 25
3.3. Cisplatin 26
3.4. Cyclosporin A 28
3.5. Cadmium 29
3.6. Sauerstoffradikale 31
3.7. Angiotensin II 33
3.8. Stickstoffmonoxid 34
3.9. Physiologische pH-Werte 35
3.10. Mögliche Wirkmechanismen der beobachteten Potenzierungen 36
3.10.1. Hemmung der Sauerstoffradikalbildung durch TIRON 37
3.10.2. Einfluss des intrazellulären Kalziums auf die Interaktionen mit Ochratoxin A 38
3.11. Bildung von Sauerstoffradikalen 39
3.12. Protektive Wirkung von Stickstoffmonoxid 41

4. Diskussion **42**
4.1. Apoptose als Reaktion der Zelle auf Toxine 42
4.2. Vorteile der Messmethode 43
4.3. Die Interaktionsbestimmung beeinflussende Faktoren 43
4.4. Generell gültige Interaktionen 45
4.5. Mögliche Signalkaskaden der Interaktionen 47
4.5.1. Sauerstoffradikale 47
4.5.2. Kalzium 48
4.5.3. Stickstoffmonoxid 48

5. Zusammenfassung **49**
6. Ausblick **50**
7. Anhang **51**
8. Abkürzungsverzeichnis **103**
9. Literaturverzeichnis **104**

Danksagung
Lebenslauf

1. Einleitung

Jeden Tag ist der menschliche Organismus einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, die als endogene Stoffwechselprodukte zum Einen der Regulation des Zusammenspiels der einzelnen Zellen dienen, zum Anderen als Endprodukte anfallen und wegen ihrer toxischen Wirkungen ausgeschieden werden müssen. Neben den endogenen Stoffwechselprodukten nehmen wir täglich größere Mengen an Schadstoffen aus der Umwelt auf. Dies geschieht hauptsächlich durch die Nahrung. Neben den bekannten Intoxikationen durch Schwermetalle und Medikamente sowie enterotoxinbildenden Mikroorganismen, wie zum Beispiel Staphylococcus aureus, sind Mykotoxine eher unbekannt. Mykotoxine sind sogenannte sekundäre Metaboliten von Pilzen, die im Gegensatz zu den Produkten des Primärstoffwechsels nur unter bestimmten Voraussetzungen gebildet werden und den Produzenten charakterisieren. Zu nennen wären hier Farbstoffe, Antibiotika, Aromastoffe und Toxine, die einen Vorteil beim Überleben sichern. Ihre Gefährlichkeit wurde jedoch lange Zeit nicht erkannt bzw. unterschätzt. Erst als 1960 nach einem Massensterben junger Puten Aflatoxin als Ursache entdeckt war, wurde die Erforschung der Mykotoxine forciert. Neben den Aflatoxinen rückte in den letzten Jahren das Ochratoxin immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses, und hier insbesondere das Ochratoxin A (OTA). OTA ist ein Produkt verschiedener Aspergillus und Penicilliumarten (1), das im Tierversuch hohe nephrotoxische (2)und kanzerogene Wirkungen zeigt (3;4) und zudem im Verdacht steht, an der Entstehung verschiedenster Nephropathien unklarer Ätiologie beteiligt zu sein. Ein Beispiel ist die sogenannte Balkan-endemische Nephropathie (BEN). Sie geht mit einer erhöhten Inzidenz an urogenitalen Adenomen und Karzinomen einher (2).

Durch die Schädigung des Ausscheidungsorgans des Körpers, der Niere, beeinflußt OTA viele verschiedene Nierenfunktionen. Unter anderem verzögert OTA seine eigene Elimination, was seine Konzentration in der Niere erhöht (5).

1.1. Klinische Bedeutung des Mykotoxins Ochratoxin A

1.1.1. Physiologische Quellen und Konzentrationen für Ochratoxin A

In Deutschland ist neben den Aflatoxinen, Ochratoxin A das bedeutenste Mykotoxin (6). Ochratoxin A ist ein sekundärer Metabolit von Schimmelpilzen, der Aspergillus- und Penicilliumgruppe, wobei in Europa vornehmlich *Aspergillus ochraceus*, und *Penicillium viridicatum* zu nennen sind. Die Bedeutung dieses Metaboliten beruht auf der weiten Verbreitung dieser Pilze. Viele Lebensmittel stellen einen idealen Nährboden für Ochratoxinbildner dar, wenn sie nicht ordnungsgemäß gelagert werden. So wurde OTA in Tierfutter und in Lebensmiteln, zum Beispiel Gerste, Mais, Weizen, Bohnen, aber auch in Nüssen, Kaffee und in Tierprodukten wie Schweinefleisch- und Milcherzeugnissen nachgewiesen (3). Von Bedeutung ist, dass es ein sehr stabiles Molekül ist, das Braten, Backen und Rösten nahezu unbeschadet übersteht und in der Nahrung persistiert (3). OTA konnte in bis zu 60 % der Lebensmittelproben der westlichen Industrienationen nachgewiesen werden (2;3). Die nachweisbaren Mengen an Ochratoxin A lagen zwischen 0,4 µg/kg und 69 mg/kg abhängig vom Nahrungsmittel (3). Dieser hohe Grad an Nahrungsmittelkontamination zeigt das Risiko für den Menschen deutlich auf. Da sich OTA in der Nahrungskette anreichert, ließ es sich in 76% der Seren kanadischer Schweine in Konzentrationen bis zu 573 nmol/l und in über 80% der humanen Seren in Kanada und Europa (5;7) nachweisen. Die mittlere Serumkonzentration in Kanada und Mitteleuropa lag im Bereich von 10^{-13} bis 10^{-8} mol/Liter (7;8). In Gebieten mit hoher Inzidenz der endemischen Balkannephropathie, wie Bulgarien, oder Jugoslawien wurden Plasmakonzentrationen von bis zu 10^{-5} mol/Liter nachgewiesen (2).

1.1.2. Ochratoxin A-assoziierte Organschäden

In den 1920er Jahren trat in Dänemark eine Schweinenephropathie ungeklärter Ätiologie auf. Im Jahre 1974 zeigten Krogh et al., dass *Penicillium viridicatum*, und

somit Ochratoxin A dieses Massensterben in natürlich vorkommenden Konzentrationen verursacht (9).

Die vornehmlich nephrotoxische Wirkung von Ochratoxin A wurde in den folgenden Jahren durch weitere Studien bestätigt. Diese beschreiben Veränderungen im Bezug auf die Glucose- und Proteinaufnahme durch OTA im proximalen Tubulus (10-13). Desweiteren wurden abhängig von der Konzentration sowohl atrophe als auch hypertrophe Veränderungen des proximalen Tubulusepithels (14) und reaktive Umbauvorgänge des Nierenparenchyms beobachtet. Neben den Veränderungen an der Niere, die schon früh in vivo nachweisbar sind (15) zeigt OTA auch einen Einfluss auf das Immunsystem (2;16;17), Milz, Leber (11) und Gehirn (18). Alle diese Studien sehen jedoch die Niere als den Hauptwirkort für Ochratoxin A unter natürlichen Konzentrationen an(2;3;11).

1.2. Toxikokinetik von Ochratoxin A

1.2.1. Aufbau und chemische Eigenschaften

Im Jahr 1965 beschrieben van der Merwe et al. (19) einen toxisch wirkenden Schimmelpilzmetaboliten von *Aspergillus ochraceus Wilh.* und nannten es Ochratoxin A (OTA). Noch im selben Jahr beschrieben sie die physikochemischen Eigenschaften von OTA , wie die seiner Analoga Ochratoxin B und C (20). Ochratoxin A besteht aus einem Dihydroisocoumarin-Ring, der mit einer Peptidbindung an einen L-Phenylalaninrest gebunden ist (Abb. 1.1). Hydrolyse dieser Bindung führt zu Ochratoxin α und L-Phenylalanin. Ochratoxin A unterscheidet sich von den Ochratoxinen B und C hauptsächlich durch seine Substituenten. (vgl. Abb. 1) Ochratoxin A ist eine farblose, kristalline Substanz mit einem Molekulargewicht von 403,8 g/mol. Es hat einen Schmelzpunkt bei 169°C und ist eine schwache organische Säure mit einem pK_s-Wert von 7,1 (21). Dies bedeutet, dass es in saurem Milieu lipophil ist und sehr gut in Membranen eindringen kann.

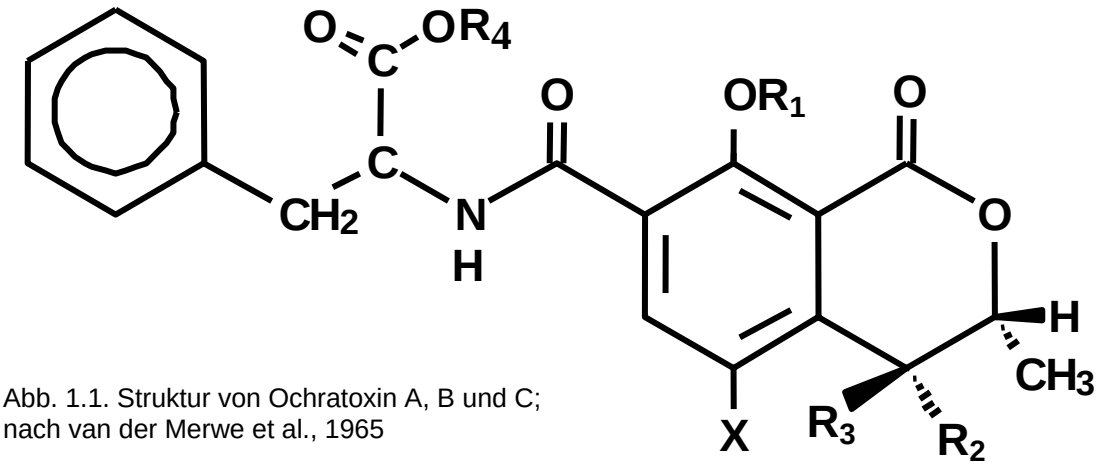


Abb. 1.1. Struktur von Ochratoxin A, B und C; nach van der Merwe et al., 1965

Ochratoxin A:	Ochratoxin B:	Ochratoxin C:
X=Cl; R_1-R_4=H	X=H; R_1-R_4=H	X=Cl; R_1-R_3=H; R_4=CH_3

1.2.2. Resorption und Verteilung von Ochratoxin A im Körper

Oral gegebenes OTA wird zu 40 % (Huhn) bzw. 66 % (Ratte) im Jejunum absorbiert (3). Die Serumhalbwertszeit von 120 h bei Ratten und bis zu 840 h bei Affen (2) wird zum Teil durch die Bindung von OTA an Albumin hervorgerufen (Assoziationskonstante $7*10^4$ bis $3*10^6$ l/mol). Der dabei entstehende OTA-Albuminkomplex stellt ein großes Depot für OTA im Körper dar. Nur 0,2 % des OTA sind ungebunden im Serum und können somit glomerulär filtriert werden (2). Zusätzlich beschreiben frühe Studien ein spezifisches, hochaffines Bindungsprotein bei Mensch und Schwein, das als selektives Transportprotein in der Niere dient (2;22). Erst kürzlich zeigten Sauvant et al., dass es sich hierbei um den organischen Anionentransporter handeln könnte, den OTA hemmend beeinflusst (8). Durch diese Hemmung verlangsamt OTA seine eigene Ausscheidung und aus diesem Grund werden große Toxinmengen im Zytoplasma des proximalen Tubulus gefunden (24). Ein Teil des OTA wird in der Leber konjugiert und biliär ausgeschieden, wobei es einen enterohepatischen Kreislauf beschreibt (2;24) und auf diesem Wege im Körper persistiert.

OTA wird durch Hydrolyse der Peptidbindung in ein Dihydroisocoumarinderivat, das sog. Ochratoxin α, und Phenylalanin abgebaut (2;24). Abhängig von der Tierspezies werden bis zu 80 % des OTA bei Rindern, jedoch nur 10-25 % bei Ratten zu

Ochratoxin α hydrolysiert, und über Urin und in geringerem Maße über die Fäzes ausgeschieden (2;24).

1.3. Toxikodynamik von Ochratoxin A am Nephron

OTA zeigt eine Vielzahl toxischer Effekte. So wirkt OTA teratogen (25), beeinflusst den Carotinoidmetabolismus (26), wirkt immunsuppressiv (27), und hemmt die Aktivität natürlicher Killerzellen bei Mäusen (28). Der wohl wichtigste Effekt ist jedoch die Nephrotoxizität (2). Viele Studien zeigen, dass OTA nicht nur an einem bestimmten Teil des Nephrons wirkt, sondern abhängig von Dosis und Zeit der Exposition verschiedene Abschnitte beeinflusst (5). Im folgenden möchte ich die Effekte chonischer Exposition auf die drei Hauptabschnitte des Nephrons darstellen.

1.3.1. Renale Hämodynamik und glomeruläre Filtration

Chronische OTA-Exposition führt zu einem Absinken des renalen Blutflusses und einem Anstieg des renalen Gefäßwiderstandes. Dies hat auch ein Absinken der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zur Folge (5;29). Diese Veränderung der Hämodynamik und somit auch der GFR kann durch eine Beeinflussung des Vas efferens über einen Anstieg von Angiotensin II hervorgerufen werden (30). Wie Gekle et. al. (29) zeigten, verursacht chronische Gabe von Ochratoxin A dieses Absinken der GFR über einen Anstieg an Angiotensin II, das zudem durch den erhöhten Druck in den Kapillaren zu strukturellen Veränderungen am Glomerulus führt (5).

1.3.2. Proximaler Tubulus

Ein wichtiger Aspekt bei verschiendensten Nierenerkrankungen sind hyper- und hypotrophe Veränderungen am Nephron. Schäden im proximalen Tubulus entstehen nur infolge chronischer OTA-Exposition, wohingegen akute OTA-Gabe an diesem Nephronabschnitt keine messbare Wirkung hat (5;31)
OTA führt in nanomolaren Konzentrationen zu vermehrter DNS-Synthese und somit zu Zellproliferation. Mikromolare Konzentrationen dagegen vermindern die

Proliferationsrate (14). Während die verminderte Proliferation durch mikormolare OTA-Konzentrationen nicht durch Kalzium gesteuert wird, bewirkt Ochratoxin A in nanomolaren Konzentrationen Veränderungen der zellulären Kalziumhomöostase (32). Binnen Sekunden löst OTA reversible, konzentrationsabhängige Oszillationen des intrazellulären Kalziums aus, die mit vermehrter Aktivität von Ca^{2+}-Kanälen, Phospholipase C, der Ca^{2+}-ATPase und vermehrter Füllung der Ca^{2+}-Speicher einhergeht. Desweiteren führt die Aktivierung von Proteinkinase A zu einem Anstieg des intrazellulären cAMP(32). Der proliferative Effekt von EGF oder Angiotensin II wird durch die gleichzeitige OTA-Gabe mittels Kalzium potenziert (32). Diese Erkenntnisse unterstreichen die herausragende Rolle von Kalzium als Mittler der Pathophysiologie von OTA.

Desweiteren verändert OTA in nanomolaren Konzentrationen den intrazellulären pH-Wert und beeinflusst die Mitochondrien. Werden die Zellen OTA ausgesetzt, sinkt der pH-Wert im Zytosol, um jedoch binnen Minuten in alkalische Werte umzuschlagen. In der ersten Phase kommt es zu einer kalziumabhängigen Hyperpolarisierung und somit Aktivierung der Mitochondrienmembran. Es kommt zu einer Ansäuerung des Zytosols und vermehrter ATP-Bildung (33). In der zweiten Phase folgt ein wiederum kalziumvermitteltes Ansteigen des pH-Wertes durch Na^+/H^+ Austausch und H^+-ATPase (33).

OTA induziert den programmierten Zelltod von proximalen Tubuluszellen kalziumvermittelt. OTA löst eine zeit- und konzentrationsabhängige Caspase-3 Aktivierung, Chromatinkondensation und DNS-Fragmentierung als typische Zeichen der Apoptose aus (34).

Im proximalen Tubulus wird der Hauptteil der im Glomerulus ausfiltrierten Proteine wieder für den Körper zurückgewonnen. Da OTA eine verminderte Expression von Bindungsstellen für diese Proteine und eine vermehrte Reexozytose von Albumin bewirkt, führt OTA zu Proteinurie (13).

Ein weiterer Angriffspunkt von OTA ist der organische Anionentransporter (OAT1). Unter chronischem OTA-Einfluss sinkt die PAH-Ausscheidung (Paraaminohippursäure) deutlich ab, da der OAT als Transporter gehemmt wird (23;31). Der OAT ist von eminenter Bedeutung für die Toxikokinetik von Ochratoxin A. Er ist für die Ausscheidung einer Vielzahl von Xenobiotika – darunter auch Ochratoxin A – und

Medikamente aus der Nierenzelle und dem Körper nötig. Wird er durch OTA gehemmt, beeinflusst OTA seine eigene Ausscheidung und führt so zu veränderten Konzentrationen und toxikodynamischen Verhältnissen in der Niere.

1.3.3. Postproximale Abschnitte

Akute OTA-Exposition beeinflusst deutlich den postproximalen Tublus. Darauf deutet die durch OTA induzierte Polyurie hin (5). Hierbei wurde eine vermehrte Na^+ und Cl^- Ausscheidung und ein Anstieg des Urin-pH beobachtet (35). Weitere Versuche zeigten OTA als eine, die Anionenleitfähigkeit der Plasmamembran verändernde Substanz (35).
Durch die Hemmung der Anionenkanäle, und hier insbesondere der Chloridkanäle wirkt sich OTA über einen Anstieg des intrazellulären Cl^- und eine folgende Alkalinisierung des Zytosols hemmend auf die NaCl Resorption und den transepithelialen Säure / Base Transport aus (2;36).
Dieser Mechanismus bietet ein gutes Modell die kanzerogene Wirkung von OTA zu beschreiben. Alkalisches Zytoplasma führt zu irreversiblen phänotypischen und genotypischen Transformationen. Im Zusammenhang mit OTA werden veränderte Chromosomenzahl, Chromosomenkondensation, Oszillationen des Plasmamembran-potenzials und intrazellulären Kalziums sowie morphologische und funktionelle Veränderungen der Zellen nach chronischer OTA-Gabe beschrieben, die so in der ursprünglichen Zelle nicht zu finden waren (5;37).
Ein möglicher gemeinsamer Angelpunkt dieser Transformation sind die sogenannten MAP-Kinasen (mitogen activated protein Kinasen), zu denen auch ERK (extrazellulär regulierte Kinase) und JNK (c-jun amino terminale Kinase) zählen. Schramek et al. untersuchten einen Zusammenhang zwischen der Alkalinisierung des Zytosols und der vermehrten Aktivierung von ERK. Sie wiesen nach, dass OTA zu einer vermehrten zeit- und konzentrationsabhängigen Phosphorylierung von ERK 1 und 2 führt, die als Mittler in der Signaltransduktion zu einer Dedifferenzierung und Transformation des Epithels führten (38).
Die zweite Kinase aus der MAP-Kinasen Gruppe, die durch OTA aktiviert wird, ist die JNK-Kinase (39). Sie wird durch verschiedene Stimuli induziert und aktiviert vor allem die wichtige Exekutionscaspase 3, um den programmierten Zelltod auszulösen (34).

Bestätigt wird dies durch die Beobachtungen von Schwerdt et al., die nach OTA-Gabe an proximalen Tubuluszellen und Sammelrohrzellen die typischen Zeichen der Apoptose (DNS-Fragmente, Caspase 3 Aktivierung) nachweisen konnten (34).

Wirkmechanismen von Ochratoxin A

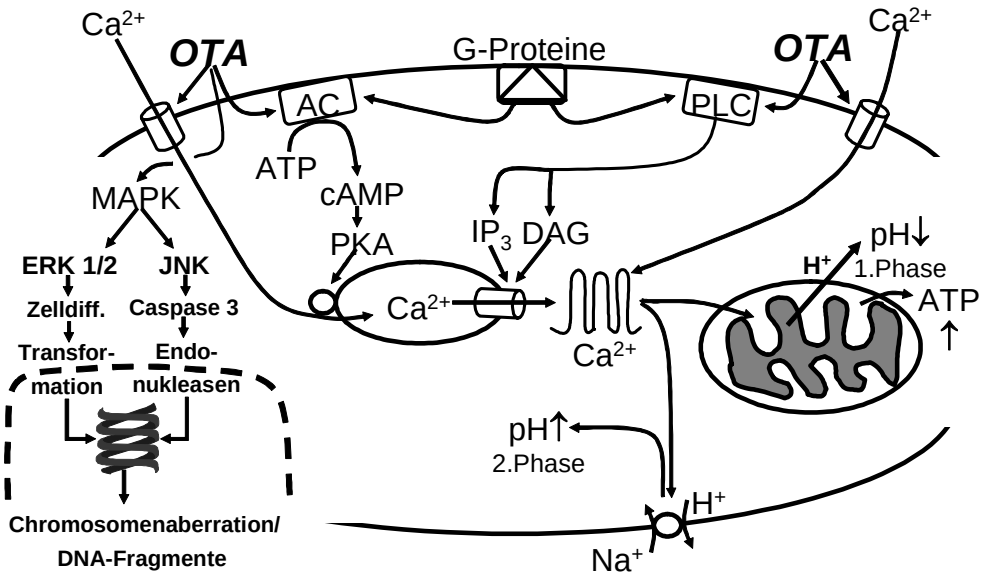


Abb. 1.1. Synopsis einiger Wirkmechanismen von Ochratoxin A (OTA) an renalen Epithelzellen. Abkürzungen: Adenylatcyclase (AC), Phospholipase C (PLC), Proteinkinase A (PKA), Inositoltriphosphat (IP_3), Diacylglycerat (DAG), Mitogen Acitvated Protein-Kinase (MAPK), Zelldifferenzierung (Zelldiff.).

1.4. Apoptose

1.4.1. Definition und Funktion der Apoptose im Körper

Unter Apoptose versteht man, im Gegensatz zur Nekrose, den programmierten Zelltod. Apoptose dient als physiologischer Mechanismus der Anpassung des Gewebes an die Bedürfnisse des Gesamtorganismus. So kann der Gesamtorganismus ohne die Elimination kranker, unter Umständen sogar entarteter Zellen nicht überleben, und auch in der Embryonalentwicklung müssen Zellen entfernt werden, damit sich der Körper

formen und entwicklen kann (40). Apoptose selbst verhindert nicht nur Krankheiten, wie zum Beispiel Tumore, sondern kann Krankheiten hervorrufen, wenn sie pathologisch gesteigert oder herabgesetzt ist. Pathologisch gesteigerte Apoptose führt zu vermehrtem Zellverlust und kann infolge dessen zu Organinsuffizienzen (41), Immunschwäche, neurodegenerativen Erkrankungen (40) und Transplantatabstoßung führen. Eine pathologisch verminderte Apoptose löst einen Überschuss betroffener Zellen aus und so u.a. Tumorleiden (40).

1.4.2. Induktion von Apoptose

Apoptose wird unter anderem durch Toxine, Strahlen, Ischämie, fehlende Wachstumsfaktoren, sog. „survival factors“ wie EGF (41;42), Oxidantien, genetische Defekte und Infektionen hervorgerufen (41;43;44). Viele Zelltypen besitzen spezifische Rezeptoren, deren Liganden Apoptose induzieren. Am besten untersucht ist die Tumor-Necrose-Faktor (TNF) Superfamilie, zu der auch das Fas Antigen zählt (41). Interagieren Typ I TNF-Rezeptor mit TNF alpha oder Fas mit Fas-Ligand, begeht die Zelle kalziumabhängig Apoptose. Die Rac-Proteine Raf und Ras, Phospholipase A_2 (43), NF-kB und die Jun-N-terminale Kinase sind hierbei beteiligt (40-42). Gestresste Zellen bilden auf ihrer Oberfläche sogar gleichzeitig Fas und Fas-Ligand. So lösen sie ihren eigenen Zelltod aus (40).

Man unterscheidet verschiedene weitere Trigger der Apoptose: Glucocorticoide induzieren Apoptose in Thymozyten und Transforming-Growth-Factor β (TGFβ) löst Apoptose in epithelialen Zelllinien aus (41). Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt u.a. das akuten Nierenversagen im septischen Schock und wird als apoptoseinduzierend beschrieben, H_2O_2 wird bei Ischämie gebildet und der CD95- Rezeptor dient als Angriffspunkt der zytotoxischen T-Zellen (41;42). Im Falle einer Virusinfektion verursachen Lymphozyten die Apoptose, indem sie mittels Perforin Löcher in der Zellmembran der infizierten Zelle bilden, durch die Granzym B eindringen kann und Apoptose über spezifische Caspasen (s. u.) induziert (40).

Caspasen können auch ohne extrazellulären Stimulus aktiviert werden. Dies geschieht insbesondere, wenn eine Zelle geschädigt ist. In diesem Falle erkennt die Zelle die

Schwere des Schadens und tötet sich um dem Gesamtorganismus nicht, z.B. als Tumorzelle, zu schaden (s.u.)(40).

1.4.3. Die Signalkaskaden der Apoptose

Apoptose kann in zwei Phasen unterteilt werden. In der einen entscheidet sich die Zelle, Apoptose auszulösen und in der Zweiten, der sog. Exekutionsphase, findet die genetisch kontrollierte Aktivierung von Effektormechanismen statt. Diese führt zu den klassischen morphologischen Zeichen der Apoptose: Kondensiertes Chromatin, Chromatinfragmente von ca. 180 Basenpaaren und sog. apoptotic bodies (44).
Die Exekutionsphase wird durch das Plasmaprotein ICE (Interleukin 1/3 converting Enzym), die Mitochondrien und die Genprodukte p53, c-myc und bcl-2 induziert (41).

- p 53 wird durch Schäden an der DNS aktiviert (40;41) und ist eines der Gene, die bei malignen Erkrankungen in ca 50 % der Fälle mutieren(40). p 53 stoppt physiologisch den Zellzyklus und aktiviert die Apoptose (44).
- C-myc ist ein weiterer Transkriptionsfaktor (41). Er beeinflusst sowohl die Zellproliferation als auch Apoptose (41;44). Erklärt wird dieser Zusammenhang (44), indem man Apoptose als abgewandelte Mitose oder mitotische Katastrophe versteht: Veränderungen des Zytoskeletts, Abrunden der Zelle, Zusammenbruch der Kernhülle und Chromatin-Kondensation finden sich sowohl bei Apoptose als auch bei Mitose (44). Eine gute Versorgung der Zelle mit Nährstoffen und Wachstumsfaktoren hemmt Apoptose. Fallen diese „survival factors“ weg, stirbt die Zelle (41).
- Die Proteine bcl-2 und bcl-x hemmen Apoptose, während weitere Proteine dieser Familie (Bax, Bad, Bid) den Zelltod induzieren und über eine Hemmung von Bcl-2 wirken (40;41). Diese wirken über eine Beeinflussung der Freisetzung von Sauerstoffradikalen und Cytochrom c aus den Mitochondrien, Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum und die G-Proteine Raf und Ras (43;44), die die Mitochondrien zerstören. Zusätzlich können die Proteine dieser Familie durch gegenseitige Bindung direkt oder über Zwischenproteine die Cytochrom-c Freisetzung oder Caspase-9-Aktivierung (s.u.) hemmen. Die Aktivität der Proteine

der Bcl-2 Familie wird über Phorsphorylierung und Dephosphorylierung geregelt (40).

Der programmierte Zelltod kann somit zum Teil als mitochondriale Katastrophe aufgefasst werden. Noch vor Veränderungen des Zellkerns findet man eine durch intrazelluläres Kalzium vermittelete Entkopplung des Elektronentransports an den Mitochondrien, durch die Sauerstoffradikale entstehen (43;44). Wie bereits erwähnt, stellen die Sauerstoffradikale (ROS) eine weitere Möglichkeit der Apoptoseinduktion dar. Werden die Zellen exogenem H_2O_2 ausgesetzt oder bricht die Atmungskette in den Mitochondrien zusammen (bad-, bid- oder TNF-vermittelt), wird der Zelltod ausgelöst (44).

Das ICE zählt zu einer Familie von Proteasen, die alle die Aminosäure Cystein in ihrem aktiven Zentrum tragen. Viele dieser sogenannten Caspasen werden während der Apoptose aktiv und stellen neben den Mitochondrien ein zweites System der Apoptoseinduktion dar (40;44). Jede liegt in Form einer Procaspase vor und wird kontinuierlich von der gesunden Zelle gebildet (40). Caspasen können in zwei Gruppen unterteilt werden: Initiator- und Exekutorcaspasen. Ein typisches Beispiel für Initiatorcaspasen ist die Caspase-8, die von verschienden Rezeptoren (CD95 und TNF) über identische „death domains“ angesprochen wird. Caspase-8 aktiviert die Proteine Bad oder Bid und setzt Cytochrom c frei, das letztendlich Caspase-3 aktiviert (42).

Caspase-3 ist eine sog. Exekutorcaspase, die in der Lage ist, die Wirkung der übergeordneten Caspasen und Rezeptoren auf die typischen Zeichen der Apoptose zu bündeln (44). Einmal aktiv, erreicht die Zelle den sogenannten point of no return, ab dem diese Caspasen spezifische Proteine der Zelle aktivieren, die u.a. die Hülle des Zellkerns auflösen, indirekt eine DNAse zum Zerschneiden der DNS aktivieren, das Zytoskelett der Zelle, die Zell-Zell-Verbindungen zu den Nachbarzellen und den Energiemetabolismus zerstören (40;44). Desweiteren wird der Aufbau der Zellmembran im Rahmen der Apoptose verändert. Negativ geladene Phosphatidylserine werden von der Innenseite der Zellmembran zur Außenseite gedreht. Hier markieren sie die Zelloberfläche, so dass die sterbende Zelle schnell von Phagozyten erkannt und abgebaut wird. Die Rolle der Caspasen bei diesen Umbauvorgängen ist noch unklar (40;44). Welche Caspasen während der Apoptose aktiv sind, ist vom Zelltyp und

auslösenden Stimulus abhängig. Ihre Wirkung wird durch die sogenannten IAPs (Inhibitors of apoptosis proteins) gehemmt (40).

Eine weitere wichtige Substanzgruppe stellen die Sphingomyelinasen dar. Sie sind mit den Rezeptoren CD95 und TNF verknüpft und bilden aus Sphingomyelin Ceramid (42). Dieses aktiviert wiederum die kleinen G-Proteine Raf und Ras, durch die Kalziumgetriggert die Mitochondrien zerstört werden, und Sauerstoffradikale und Cytochrom c frei werden (42;43)

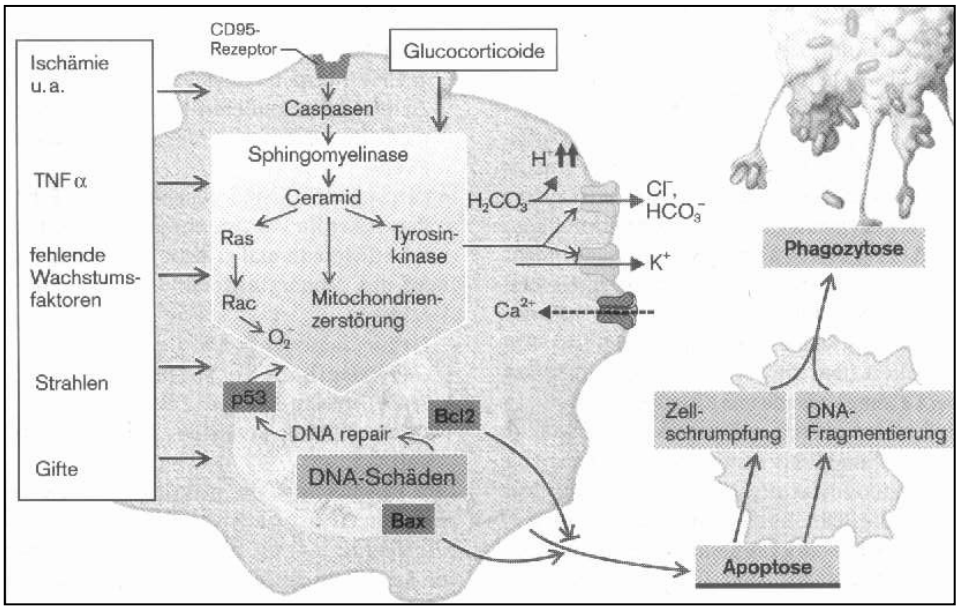


Abb. 1.3. Übersicht verschiedener Signalkaskaden der Apoptose aus Lang, Silbernagl, Taschenatlas der Pathophysiologie, Thieme 1998

1.5. Zielsetzung dieser Arbeit

Jeden Tag sind wir einer Vielzahl nephrotoxischer Stoffe ausgesetzt. Zu diesen gehören Toxine wie Ochratoxin A, sowie synthetisch hergestellte Substanzen wie z.B. bestimmte Antibiotika. Aber auch Ischämie kann die Niere schädigen. Für uns war es wichtig zu zeigen, ob die apoptoseinduzierende Wirkung von OTA - als ein Markerereignis seiner Nephrotoxizität - durch die gleichzeitige Exposition eines weiteren nephrotoxischen Stimulus beeinflusst wird. Desweiteren galt es, Apoptose

von Nekrose abzugrenzen und Wirkmechanismen der beobachteten Interaktionen aufzuzeigen.

Wegen der großen Zahl möglicher Kombinationen wählten wir als schnelle und effiziente Messmethode die 96-well Platte. Dieses High Throughput Screening zeigte in Vorversuchen die gleichen Ergebnisse wie die in zahlreichen Veröffentlichungen zur Apoptosebestimmung verwendeten Petrischalen.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

Da Ochratoxin A an verschiedenen Abschnitten des Nephrons angreift, war es für uns interessant, die apoptoseinduzierende Wirkung am Zellkulturmodell verschiedener Zellen zu studieren. Repräsentativ für den proximalen Tubulus untersuchten wir zwei Zelltypen, IHKE-Zellen, die von S. Mollerup, Institut für Toxikologie in Oslo Norwegen zur Verfügung gestellt wurden, und LLC-PK_1-Zellen der American Type Culture Collection (ATCC CRL 1392, Rockville, Md., USA), die als etabilierte Zellmodelle für diesen Bereich des Nephrons gelten (23;45). MDCK-C7 Zellen sind in unserem Labor aus den MDCK Zellen der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Md., USA) kloniert worden und stellen, da sie vom Sammelrohrepithel des Hundes abgeleitet sind, ein Modell der Hauptzellen der postproximalen Nephronabschnitte dar(23).

LLC-PK_1-Zellen und MDCK-C7-Zellen wurden mit Minimal Essential Medium, mit Earls Salzen, nichtessentiellen Aminosäuren und L-Glutamin (MEM-Medium, Biochrom KG, Berlin, BRD) unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO_2) kultiviert. Dem Medium waren 10% fetales Kälberserum (Biochrom KG, Berlin), 26 mmol/l $NaHCO_3$ und 1 g/l Glucose zugesetzt.

IHKE-Zellen wurden in Ham F-12/Dulbecos modifiziertem Eagel's Medium (DMEM), dem 1,1 g/l $NaHCO_3$, 3,57 g/l 4-(2-hydroyethyl)-1-piperazin-ethanosulphonsäure (HEPES), 5 mg/l Rinderinsulin, 5 mg/l humanes Transferrin 36 µg/l Hydrocortison, 10 µg/l Mäuse-EGF, 5 µg/l Na-Selenit, 10% fetales Kälberserum (Biochrom KG, Berlin) und 4,5 g/l Glucose zugegeben war, unter Standardbedingungen angesät. Die Medien wurden zweimal pro Woche gewechselt und die Zellen zeitgleich subkultiviert. Zur Messung gaben wir 200 µl Zellsuspension mit serumhaltigem Medium in jedes Well der 96-Well Schalen. Nachdem die Zellen konfluent waren, wurden sie für 24 h mit serum- und wachstumsfaktorfreien Medium, und für weitere 24 h mit serumfreien Medium plus den zu testenden Substanzen unter Standardbedingungen inkubiert.

2.2. Bestimmung von Apoptose, Nekrose und Protein in der 96-Well Schale

Die Zellen wurden in 96-Well Schalen (Fläche pro Well 0,385 cm^2; Becton/Dickinson, USA) nach obigen Schema mit 200 µl der entsprechenden serumhaltigen Medien angesät. Bei Konfluenz für 24 h mit serumfreien Medium und für weitere 24 h mit 40 µl serumfreien Mediums und den zu testenden Substanzen inkubiert. 40µl / Well wählten wir um den Petrischalen identischeVolumina von 100µl pro Quadratzentimeter Zellen im Well zu erreichen und so vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.
Die Vorteile der 96-Well Schale als Messmethode bestanden zum Einen darin, in einer Schale entweder Caspase-3-Aktivität und Proteingehalt pro Well oder Trypanblauaufnahme und Proteingehalt pro Well hintereinander zu messen und aufeinander beziehen zu können. Dies ermöglichte eine direkte Bestimmung der Apoptose- bzw. Nekroserate in einem Arbeitsgang.
Zum Anderen benötigten wir nur ¼ der Zeit, und sparten bis zu 87 % der Kosten pro Messung, verglichen mit der Petrischale. Dies ermöglichte uns, unsere Ergebnisse erheblich schneller und ökonomischer zu erhalten, und stellte gerade bei der großen Zahl möglicher Kombinationen einen unschätzbaren Vorteil gegenüber der herkömmlichen Methode dar.

2.2.1. Apoptose

Prinzip der Messung war die Spezifität des aktiven Zentrums der Caspase-3 für die Aminosäurenfolge Asp-Glu-Val-Asp und somit die Fähigkeit aus dem Substrat DEVC-AFC (Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) das fluoresziernde AFC-Ende abzuspalten. Das photometrisch messbare AFC diente bezogen auf das Zellprotein als Maß der Caspase-3 Aktivität und somit als Maß der Apoptoserate.
Nachdem die Zellen 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert waren, wurde die Caspase-3 Aktivität mit Hilfe des Caspase-3 Aktivität Assays bestimmt (Clontech Laboratories, Palo Alto, USA). Das Medium wurde abgenommen, und die Wells dreimal mit PBS (Phosphat-buffered saline) gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Zellen für 10 min mit 30 µl Zell Lyse Puffer auf Eis inkubiert und hierauf für 60 min bei 37°C mit 1,5 µl Caspase-3-Substrat (50 µM DEVD-AFC) versetzt. Die Fluoreszenz des

Spaltungsprodukts AFC (7-amino-4-trifluoromethylcoumarin) wurde durch eine Wellenlänge von 400 nm hervorgerufen und bei 505 nm Extinktion im Spektrofluorometer (Wallec, Victor^2) bestimmt. Das abgespaltene AFC wurde mit Hilfe einer Kalibrationskurve bekannter AFC-Konzentrationen quantifiziert.

2.2.2. Nekrose

Begeht die Zelle im Gegensatz zur Apoptose Nekrose, so reißt die Zellmembran auf und intrazelluläre Bestandteile verlassen die Zelle (41). Aber auch extrazelluläre Substanzen können in die Zelle gelangen. Wie bei Gekle et al. (14) beschrieben, wurde die Zellmembranpermeabilität mittels der Aufnahme von Trypanblau in die Zelle gemessen. Nachdem das Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen waren, wurden die Zellen in der 96-Well Schale für 5 Minuten mit 50 µl 0,2%iger Trypanblaulösung bei 37°C inkubiert. Hierauf wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen, mit 1%iger SDS Lösung 20 min bei Raumtemperatur lysiert und die optische Dichte (OD) pro Well bei 560 nm Wellenlänge mittels Multiwell-Multilabel-counter (Wallac, Victor^2) gemessen.

2.2.3. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) der Firma Pierce bestimmt (KMF Laborchemie, Sankt Augustin, BRD). Diese Methode kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Proteine in alkalischer Umgebung (sog. Biuret-Reaktion) mit der colorimetrischen Bestimmung des Cu^{+}-Kations mittels Bicinchoninsäure. Beide gehen einen wasserlöslichen Komplex ein, der Licht mit 562 nm Wellenlänge stark absorbiert. Die Absorption steht in linearer Beziehung zum Proteingehalt und ermöglicht eine genaue Proteinbestimmung.
Zur Messung wurden 50 Teile BCA-Reagenz A mit 1 Teil 4%iger $CuSO_4$-Lösung gemischt und 1:1 mit destilliertem Wasser verdünnt. 250 µl davon wurden in jedes Well gegeben und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die optische Dichte im Multiwell-Multilabel-counter (Wallac, Victor^2) bei 560 nm Wellenlänge ließ sich mittels einer Kalibrierungskurve bekannter Proteinmengen in den Proteingehalt pro Well umrechnen.

2.3. DNA-Fragmentierung

Die Zellen wurden in Petrischalen mit 100 mm Durchmesser (Becton und Dickinson, USA) mit 6,5 ml der entsprechenden Medien nach obigem Zeitschema unter Standardbedingungen angesät und inkubiert, wobei darauf geachtet wurde, dass noch keine Konfluenz der Zellen zu erkennnen war.

Nach den Inkubationsperioden (24 h) mit je 6,5 ml serumfreien Mediums plus Testsubstanzen pro Petrischale wurden die Medien abgenommen, und die im Medium vorhandenen Zellen abzentrifugiert, 0,5 ml Lysepuffer (5 mM Tris, 20 mM EDTA, pH 8,0, in 0,5%iger Triton X-100 Lösung) auf die Petrischalen gegeben und die Zellbestandteile abgekratzt. Hierauf wurden die abgekratzten und abzentrifugierten Zellen aufsuspendiert und 60 Minuten auf Eis im Lysepuffer inkubiert. Die Suspension wurde für 20 Minuten bei 13000 Umdrehungen pro Minute und 4°C zentrifugiert und der Überstand weiterbearbeitet. 1,5 µl Proteinase K und 1 µl RNAse (10 g/l) wurden mit dem Überstand für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Dann wurde das gleiche Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Biochrom, Berlin, BRD) zugegeben. Nach dem Zentrifugieren (6000 U/min, 4°C) wurde die obere Phase abgenommen, zu ihr 1/10 des Volumens 3 mol/l Natriumazetat (pH 5,2) (Sigma, Deisenhofen, BRD) und das Doppelte Volumen 100%iger Ethanol (-20°C) gegeben und über Nacht bei –20°C gefällt.

Am nächsten Tag wurden die Eppendorf-Caps 30 Minuten zentrifugiert (13000 U/min, 4°C) und der Überstand verworfen. Zum Sediment wurde 0,1 ml 70%iger Ethanol (4°C) zugegeben, 5 Minuten zentrifugiert (13000 U/min, 4°C) und der Überstand entfernt. Die DNA-Pellets wurden in in 20 µl TE-Puffer (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) gelöst und jeweils gleiche DNA-Mengen (Spektroskopische Bestimmung) in 1,4%igem Agarose-Gel aufgetrennt. Mittels 5 %igem Ethidiumbromid wurden die Banden durch UV-Beleuchtung sichtbar.

Alle Vorgänge ohne Temperaturangabe wurden auf Eis durchgeführt.

2.4. Bestimmung von Sauerstoffradikalenbildung und Protein

Zur Bestimmung der intrazellulären Bildung von Sauerstoffradikalen als sekundäre Messanger der beobachteten Interaktionen wurden die Zellen in 24-Well Schalen (Becton/Dickinson, USA) unter Standardbedingungen kultiviert und für 24 h mit 175 µl pro Well serumfreien Mediums ohne und für weitere 24 h mit Testsubstanzen inkubiert. Die Medien wurden abgenommen, und die Zellen bei 4°C zweimal mit PBS gewaschen und schließlich zu den Zellen 200 µl HEPES-Ringer (pH 7,4, 37°C) mit 20 µmol/l DCF-DA (Dichlor-Fluoreszeindiacetat) gegeben. DCF-DA wird durch Sauerstoffradikale in den Fluoreszenzstoff DCF umgewandelt. Die Zunahme der Fluoreszenz wurde im Verlauf von 20 Min bei 37°C im Multiwell-Multilabel-reader bei 485 nm Wellenlänge Anregung und 535 nm Extinktion gemessen. Der Vergleich zwischen den Steigungen der DCF-Bildung mit den Testsubstanzen und der Kontrolle erlaubte Rückschlüsse auf die Sauerstoffradikalbildung in der Zelle.
Zur Proteinbestimmung wurden die Zellen mit 200 µl 0,1%igem TRITON und 20 mmol/l MOPS vom Untergrund gelöst und der Proteingehalt mit 300 µl unverdünnter BCA-Lösung nach dem oben genau beschreibenen Messprinzip im multiwell-multilabel-reader bestimmt.

2.5. Materialien

Die Substanzen Amphotericin B, Angiotensin II, BAPTA-AM (1,2bis-(o-aminophenoxylethane-N,N,N‘,N‘-tetraazetatsäure-acetonmethoxyesther), Cephalexin, Cisplatin (Cis-dichloro-diamine-II-platin), Cyclosporin A, TIRON (4,5-Dihydroxy-1,3-Benzenedisulfonsäure) und OTA (Ochratoxin A) wurden von Sigma, Deisenhofen, BRD; DMEM und MEM / Ham F-12 Medium mit Zusätzen sowie Gentamicin von Biochrom, Berlin, BRD und GSNO (S-nitroso-L-glutathione) und SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin) von Alexis, Grünberg, BRD bezogen.
Alle weiteren, im Text nicht gesondert benannten Chemikalien, wurden von Merck, Darmstadt, BRD geliefert.

2.6. Statistik

Die im folgenden Abschnitt genannten statistischen Methoden und Formeln sind L. Sachs, Angewandte Statistik, 1997 entnommen. Alle Messungen wurden an mindestens zwei verschiedenen Passagen derselben Zelllinie durchgeführt. Die Darstellungen zeigen Mittelwert und Standardfehler (SEM) für gemessene und erwartete Werte.

Der Standardfehler errechnete sich aus dem Quotienten von Standardabweichung (σ) und der Wurzel aus der Anzahl an gemessenen Proben (n):

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Um die Interaktionen bei der Kombination zweier Substanzen mathematisch darstellen zu können, war es nötig, die tatsächlich gemessene Wirkung der Kombinationen ($Mittelwert_{gemessen}$) mit der erwarteten Kombinationswirkung ($Mittelwert_{errechnet}$) in Relation zu setzen. Wenn die Kombination zweier Substanzen beide Wirkungen vereint, entspricht die Summe der Einzelwirkungen der gemessenen Kombinationswirkung. Die natürliche Grundaktivität der Zelle für jeden zu messenden Parameter entspricht dem Kontrollwert von 100 %. Um zu vermeiden, dass die Grundaktivität jeweils für $Mittelwert_1$ und $Mittelwert_2$ in der Summe erscheint, mussten einmalig 100 % abgezogen werden. Somit ergibt sich folgende Formel:

$$Mittelwert_{errechnet}\ [\%] = Mittelwert_{Substanz\ 1}\ [\%] + Mittelwert_{OTA}\ [\%] - 100\ \%$$

Um die errechneten Mittelwerte genauer zu beschreiben, wurde der jeweilige zu erwartende Standardfehler ($SEM_{errechnet}$) bestimmt:

$$SEM_{errechnet} = \sqrt{(SEM_{Substanz\ 1})^2 + (SEM_{OTA})^2}$$

Der Unterschied zwischen den gemessenen Kombinationswirkungen und den nach oben genannten Formeln errechneten Mittelwerten wurde mittels ungepaarten Students-T-Test bei $p < 0{,}05$ als signifikant gewertet. Ein signifikanter Unterschied wurde als Beweis der Interaktionen der beiden Substanzen angesehen.

Der Rohwert des t-Tests ließ sich nach folgender Formel berechnen und mittels bekannter Anzahl der Proben (n) und tabellarischen Nachschlagewerken (46) als Maß der Signifikanz verwenden:

$$\text{t-Test} = \frac{\left| (\text{Mittelwert}_{\text{gemessen}} - \text{Mittelwert}_{\text{errechnet}} \right|}{\sqrt{(\text{SEM}_{\text{gemessen}})^2 + (\text{SEM}_{\text{errechnet}})^2}}$$

2.7. Beschreibung der Interaktionen mit Ochratoxin A

Unser Hauptaugenmerk bei dieser Arbeit lag in der Beobachtung von Interaktionen spezifischer nephrotoxischer Substanzen. Das heißt, ob die apoptoseinduzierende Wirkstärke einer Substanz bei Koexposition mit OTA stärker ist als die Summe der beiden Einzelwirkungen, ob sie sich addieren, oder ob sie geringer ist. Einen überadditiven Effekt bezeichnet man pharmakologisch als Potenzierung, einen unteradditiven Effekt als Antagonismus bzw. Hemmung. Rein additive Effekte wurden als keine Interaktion gewertet (47). Antagonismus wird als Abnahme, Potenzierung als Zunahme der Wirkstärke definiert. Verdeutlicht wird dieser Zusammenhang durch Abb.2.2..

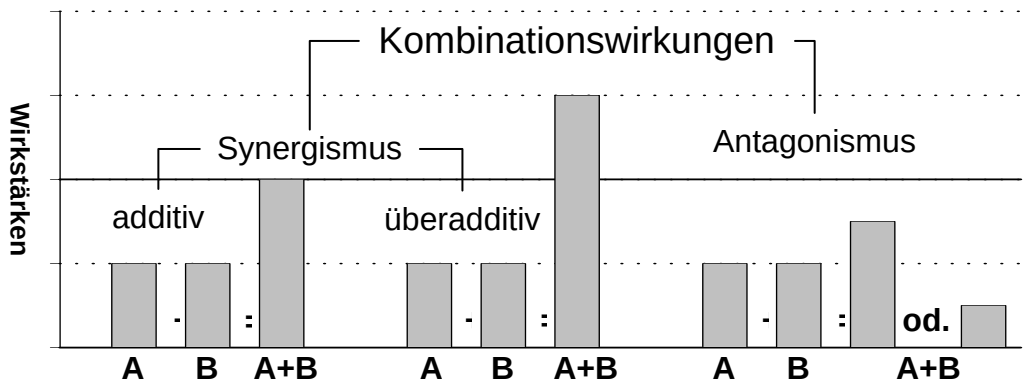


Abb. 2.2. Schema der Möglichkeiten von Kombinationswirkungen beim Zusammenwirken zweier Komponenten. Vergleich der Wirkungsstärken (nach Forth, Henschler; 1983)

3. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

3.1.1. Auswahl der getesteten Substanzen

Um die Interaktionen mit OTA möglichst repräsentativ darzustellen, war es zunächst nötig, ein breites Spektrum an nephrotoxischen Substanzen auszuwählen, denen große Anteile der Bevölkerung ausgesetzt sind. Peter H. Bach nennt in seinem Review (48) eine Vielzahl nephrotoxischer Substanzen. Wir haben jeweils einen Hauptvertreter der dort genannten Substanzklassen untersucht. Dies sind die Antibiotikaklassen der Aminoglykoside, Cephalosporine und Amphotericin B; das Tumortherapeutikum Cisplatin, das Immunsuppressivum Cyclosporin A und Cadmiumverbindungen wie sie bei Schwermetallexposition auftreten. Desweiteren untersuchten wir unterschiedliche nephrotoxische H_2O_2-Konzentrationen (49), die nach Ischämie im Gewebe auftreten (49;50) und Angiotensin II, das eine verstärkende Wirkung bei Nierenerkrankungen des Menschen haben soll (51). Zusätzlich wurde die apoptoseinduzierende Wirkung von NO (52;53) und die Wirkung verschiedener physiologischer pH-Werte in Kombination mit Ochratoxin A untersucht.
Gemessen wurden die Wirkstärken der Substanzen alleine und in Kombination mit Ochratoxin A, wobei auf physiologische bzw. toxikologisch relevante Konzentrationen geachtet wurde.

3.1.2. Wirkung von Ochratoxin A alleine

Wie bereits einleitend ausgeführt, stellt OTA nicht zuletzt wegen seiner nephrotoxischen und kanzerogenen Eigenschaften ein hohes Gefahrenpotenzial für den Menschen dar. Um Interaktionen von Ochratoxin A mit nephrotoxischen Substanzen messen bzw. vergleichen zu können, müssen wir die Einzelwirkung der Substanz auf die Zellen kennen. Fassen wir alle unsere Ergebnisse für Ochratoxin A zusammen, so erhalten wir für jede der untersuchten Zelllinien spezifische Reaktionen (vgl Abb. 3.1 bis 3.3), die es neben unseren Vorversuchen durch Vergleich mit anderen Studien

ermöglicht, die Genauigkeit unserer Messmethode retrospektiv zu überprüfen und uns zugleich ein Bild der Wirkung von OTA zu machen.

IHKE-Zellen, die dem proximalen Tubulus des Menschen entstammen, reagierten nach 24-stündiger Inkubation mit OTA-Konzentrationen zwischen 1 nmol/l und 1 µmol/l mit einem Absinken des Proteingehalts auf 80 % der Kontrolle. Gleichzeitig steigt die Caspase-3 Aktivität stetig an. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Schwerdt et al. überein (34) (Abb 3.1.).

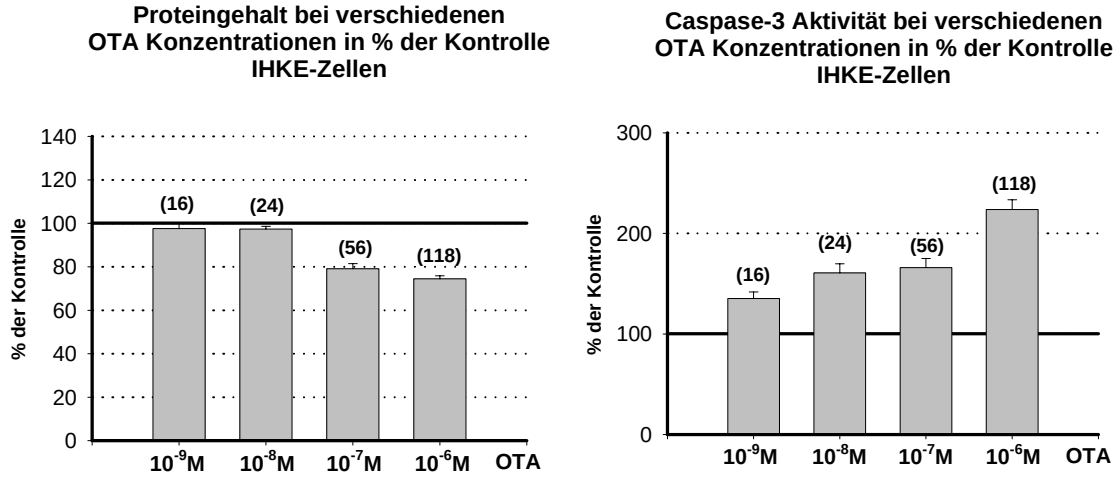


Abb. 3.1. Wirkung von 1 nM bis 1 µM Ochratoxin A (OTA) auf Protein (links) und Caspase-3 Aktivität (rechts) in IHKE-Zellen nach 24 h Inkubation in % der Kontrolle.

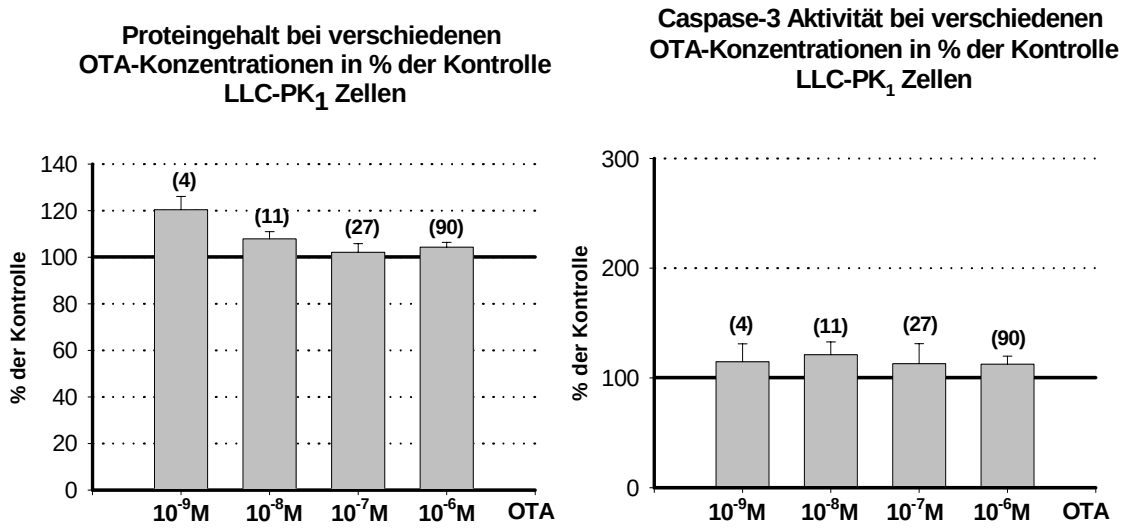


Abb. 3.2. Wirkung von 1 nM bis 1 µM Ochratoxin A (OTA) auf Protein (links) und Caspase-3 Aktivität (rechts) in LLC-PK_1-Zellen nach 24 h Inkubation in % der Kontrolle.

LLC-PK_1-Zellen aus dem proximalen Tubulus des Schweins zeigten nach 24-stündiger Inkubation unter geringen OTA-Konzentrationen (1 nmol/l) einen leichten proliferativen Effekt. Bei steigenden OTA-Konzentrationen (bis 1 µmol/l) blieb das Protein auf Kontrollniveau. Die Caspase-3-Aktivität zeigte auch bei hohen OTA-Konzentrationen keine Veränderung gegenüber der Kontrolle (Abb. 3.2.). LLC-PK_1-Zellen sind somit relativ unempfindlich gegenüber OTA.

Ein deutlich konzentrationsabhängiger Verlauf zeigte sich bei MDCK-C7-Zellen. Sie stammen aus dem Sammelrohr des Hundes. Ihr Proteingehalt sank unter steigenden OTA-Konzentrationen (max. 1 µmol/l) auf bis zu 70 % der Kontrolle ab. Zugleich stieg die Caspaseaktivität kontinuierlich an und erreichte bei 1 µmol/l das 10-fache der Kontrolle (Abb. 3.3.). Diese Ergebnisse decken sich mit den Veröffentlichungen von Gekle et al. in Petrischalen (14;39). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unsere Ergebnisse mit den vorbeschriebenen übereinstimmen und die Wirkung von OTA sowohl zelltyp- als auch konzentrationsabhängig ist.

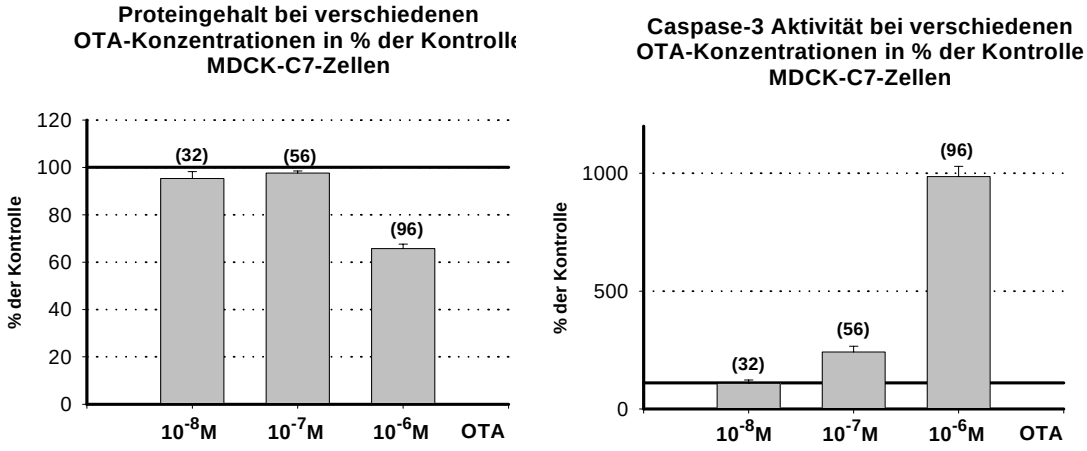


Abb. 3.3. Wirkung von 10 nM bis 1 µM Ochratoxin A (OTA) auf Protein (links) und Caspase-3 Aktivität (rechts) in MDCK-C7-Zellen nach 24 h Inkubation in % der Kontrolle.

3.2. Antibiotika

3.2.1. Gentamicin

Gentamicin ist ein Aminoglykosid-Antibiotikum, das als Hauptnebenwirkung nephrotoxische Eigenschaften zeigt (47). So induziert Gentamicin schon kurz nach der i.v.-Gabe Hyperkalzurie und Hypermagnesurie(54) und beeinflusst Lysosomen, Golgi-Apparat und Mitochondrien (55). Diese Effekte lassen sich z.T. schon bei geringen Dosierungen beobachten (54). Pharmakologisch relevante Dosen liegen zwischen 9,3 (56) und 10 mg/l (55).

Diese Konzentrationen zeigten bei IHKE, LLC-PK_1 und MDCK-C7 Zellen keine Veränderung des Proteingehaltes und der Caspase-3 Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (vgl. Anhang Abb. 7.1 bis 7.3). Die Effekte von OTA (1 µmol/l) und Gentamicin (10 mg/l) waren verglichen mit den errechneten Effekten nicht signifikant verschieden. Somit zeigen Aminoglykoside mit OTA keine Interaktion. (Anhang Abb. 7.1 bis 7.3 und Tabelle 3.2a)

	IHKE-Zellen	**LLC-PK_1-Zellen**	**MDCK-C7-Zellen**
10 mg/l Gentamicin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**
Caspase	**O**	**O**	**O**

Tabelle 3.2a: Übersicht der Interaktionen von 10 mg/l Gentamicin mit 1 µmol/l OTA. Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.2.2. Cephalosporine

Die Nephrotoxizität der Cephalosporin-Antibiotika wird in einer Vielzahl von Veröffentlichungen behandelt (57;58). Hierbei werden Plasmakonzentrationen von 1 mg/l (59) bis 4 mg/l (11) für Cephalexin, einem Antibiotikum aus dieser Gruppe beschrieben. Um eine bessere Vergleichbarkeit mit Gentamicin zu erreichen, wurden zwei Konzentrationen getestet: 3 mg/l und 10 mg/l (vgl. Anhang Abb. 7.4 bis 7.6).

Hierbei zeigten die untersuchten Zellen in Gegenwart von Cephalexin keine Veränderung des Proteins. Die Caspase-3 Aktivität stieg bei IHKE- und $LLCPK_1$-Zellen auf ca. 150 % der Kontrolle an.

Verglichen wir nun die Ergebnisse der errechneten Proteinmengen bzw. Caspaseaktivierung mit den tätsächlich gemessenen Cephalexin-OTA-Kombinationen, so sehen wir eine deutliche antagonistische Wirkung von OTA mit 10 mg/l Cephalexin in Bezug auf die Caspase-3 bei den Zellen aus dem proximalen Tubulus (IHKE und $LLC\text{-}PK_1$) sowie eine Hemmung der Wirkung auf den Proteingehalt am Sammelrohr (MDCK-C7) (vgl. Tabelle 3.2b). Die hemmende Wirkung am proximalen Tubulus ließ sich auch quantitativ durch die schwächer werdenen Banden bei Kombination von OTA mit Cephalexin im DNA-Gel (Abb.7.4) nachvollziehen. Alle weiteren untersuchten Kombinationsmöglichkeiten zeigen keine Interaktion (vgl. Tab. 3.2.b)

	IHKE-Zellen	**$LLC\text{-}PK_1$-Zellen**	**MDCK-C7-Zellen**
3 mg/l Cephalexin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**
Caspase	**O**	**O**	**O**
10 mg/l Cephalexin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	-
Caspase	-	-	**O**

Tabelle 3.2b. Übersicht der Interaktionen von 3 und 10 mg/l Cephalexin mit 1 µmol/l OTA.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.2.3. Amphotericin B

Amphotericin B wird in der Medizin als Antimykotikum genutzt und zeigt zytotoxische (60) und nephrotoxische (48) Eigenschaften hervorgerufen durch Apoptose (60). Klinisch relevante Konzentrationen bewegen sich im Bereich von 10 mg/l (60;61).

Bei IHKE-Zellen sank der Proteingehaltes unter 10 mg/l Amphotericin B auf 80 % der Kontrolle. Es zeigte sich aber kein Anstieg der Apoptose, wie auch das Agarose-Gel sichtbar machte (Abb. 7.7.). Die Wirkung von OTA bezüglich Proteingehalt und Caspase wird antagonisiert (vgl. Abb. 7.7 und Tabelle 3.2c.). Amphotericin B hatte keinen Effekt auf den Proteingehalt der $LLC\text{-}PK_1$ Zellen, rief jedoch eine deutliche

Caspasenaktivierung hervor. Die Wirkung von OTA (1 µmol/l) mit Amphotericin B (10 mg/l) war jedoch nicht von den erwarteten Ergenissen verschieden. Der Effekt ist somit rein additiv (vgl. Abb.7.8 und Tabelle 3.2c.).

Die Sammelrohrzellen (MDCK-C7) reagierten auf Amphotericin B mit einer Abnahme der Proteinmenge auf etwa 60 % der Kontrolle. Entsprechend stieg die Caspase-3 Aktivität auf das fast 50-fache der Kontrolle an. Beide Effekte wurden durch OTA abgeschwächt. OTA hemmte also die Wirkung von Amphotericin B und wirkt somit antagonistisch (vgl Abb. 7.9 und Tabelle 3.2c). Die Apoptoserate wurde aber nicht wie bei IHKE-Zellen auf Kontrollniveau gesenkt. Den Beweis, dass weiterhin nur Apoptose der Grund für das Absinken des Proteins war, und keine Nekrose stattfindet, liefert die typische DNA-Leiter im Agarosegel (Abb. 7.9). Die Intensitätsabnahme der DNA-Banden bei der Kombination von OTA mit Amphotericin B bestätigt unsere Messungen.

	IHKE-Zellen	**LLC-PK_1-Zellen**	**MDCK-C7-Zellen**
10 mg/l Amphotericin B	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	-	**O**	-
Caspase	-	**O**	-

Tabelle 3.2c Übersicht der Interaktionen von 10 mg/l Amphotericin B mit 1 µmol/l OTA.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.3. Cisplatin

Cis-dichlorodiamine-II-platin oder kurz Cisplatin ist eines der wichtigsten Tumortherapeutika, dessen Wirksamkeit durch Nierenschädigung stark eingeschränkt werden kann (62-64). Schon geringe Dosen von 10 bis 30 µmol/l Cisplatin induzieren Apoptose von Nierenzellen, während Konzentrationen von 1 mmol/l die Zellen via Nekrose absterben lassen (65;66). Um verschiedene Konzentrationen Cisplatin im Bezug auf ihre Apoptoseinduktion zu testen, wurde eine gering apoptoseinduzierende (10 µmol/l) und eine mäßig hohe Cisplatinkonzentration (100 µmol/l) untersucht.

Alle untersuchten Zelllinien (IHKE, LLC-PK_1 und MDCK-C7) zeigten ähnliche Reaktionen auf Cisplatin. Mit steigender Konzentration sankt der Proteingehalt und stieg die Caspaseaktivität (Abb. 7.10; 7.11 und 7.12). Am empfindlichsten waren

MDCK-C7-Zellen (Abb. 7.12a). Das Absinken des Proteingehalts war jedoch ausschließlich durch Apoptose bedingt wie die mangelnde Trypanblauaufnahme (Abb. 7.12a) und die DNA-Leiterbildung im Agarosegel (Abb. 7.11 b und 7.12b) zeigte.

Steigerten wir bei IHKE-Zellen die Konzentration von OTA in Anwesenheit von Cisplatin beobachten wir vorwiegend antagonistische Effekte auf Zellprotein und Caspase-3 Aktivierung.

Bei LLC-PK_1-Zellen potenziert sich der Effekt der Einzelwirkungen bei steigendem OTA- und Cisplatinkonzentrationen kaum (Abb. 7.11a). Vermehrte Nekrose spielt bei den beobachteten Interaktionen keine Rolle (Abb. 7.11a Trypanblau und 7.11b Agarosegel).

Ein gegensätzliches Bild sahen wir bei den vom Sammelrohr abgeleiteten MDCK-C7-Zellen. Steigende Cisplatin und OTA-Konzentrationen riefen eine deutliche Potenzierung der Apoptoserate, eine überadditive Abnahme des Proteins und eine deutlich höhere Nekroserate hervor, als bei rein additiver Wirkung erwartet (Abb. 7.12a). Nekrose hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse, da die Caspaseaktivierung auf ca. das 50-fache ansteigt, während die Nekroserate nicht einmal das Doppelte der Kontrolle erreichte (Abb. 7.12a).

IHKE-Zellen			
10 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**-**	**O**
Caspase	**O**	**O**	**+**
100 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	
Protein	**-**	**-**	
Caspase	**-**	**-**	
Trypanblau	**O**		

LLC-PK_1-Zellen		
10 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**-**
Caspase	**+**	**+**
100 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**-**
Caspase	**-**	**+**
Trypanblau	**O**	

MDCK-C7-Zellen			
10 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	+	O	+
Caspase	+	-	O
100 µmol/l Cisplatin	**+ 1 µM OTA**		
Protein	+		
Caspase	+		
Trypanblau	+		

Tabelle 3.3. Übersicht der Interaktionen verschiedener Cisplatin- und OTA-Konzentrationen. Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.4. Cyclosporin A

Cyclosporin A wird als Immunsuppressivum u.a. nach Nierentransplantation eingesetzt (67). Probleme in der Therapie bereitet auch hier – wie bei Cisplatin – die Nephrotoxizität dieses Pharmakons (68), die mit einer vermehrten Apoptoserate einhergeht (68;69) und die gesamte Nierenfunktion beeinflusst (70). Diese toxische Wirkung auf die Niere wird schon in geringen therapeutischen Dosen von 100 nmol/l beschrieben (68;69), und lässt sich konzentrationsabhängig steigern (71). Um auch hier innerhalb der pharmakologisch relevanten Konzentrationen zu bleiben (70;72), wurden unsere Zellmodelle mit 100 nmol/l Cyclosporin A inkubiert.

100 nmol/l Cyclosporin A riefen bei keiner der untersuchten Zelllinien ein signifikantes Ansteigen der Apoptoseaktiverung hervor. Im Bezug auf das Zellprotein zeigten lediglich MDCK-C7-Zellen ein signifikantes Absinken auf 90 % der Kontrolle (Abb. 7.13-7.15).

Kombinierten wir Cyclosporin A mit 1µmol/l OTA sahen wir bei MDCK-C7-Zellen additive Effekte. Eine Schutzwirkung der Kombination fand sich bei IHKE-und LLC-PK_1-Zellen. Die gemessene Caspase-3-Aktivierung lag weit unter der erwarteten (Antagonismus). Eine Übersicht gibt Tabelle 3.4.

	IHKE-Zellen	LLC-PK_1-Zellen	MDCK-C7-Zellen
100 nmol/l Cyclosporin A	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**
Caspase	**-**	**-**	**O**

Tabelle 3.4. Übersicht der Interaktionen von 100 nmol/l Cyclosporin A mit 1 µmol/l OTA.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.5. Cadmium

Schwermetalle stellen eine hohe Gefahrenquelle für die Bevölkerung dar, indem sie unter anderem die Niere schädigen. Ein Vertreter ist Cadmium, das sich in der Niere anreichert. Die Belastung der Niere durch Cadmium ist im letzten Jahrhundert um ein Vielfaches angestiegen. Dabei stellt das Rauchen eine der Hauptquellen dar(73). Cadmium schädigt vor allem den proximalen Tubulus (74) via Apoptose (75;76). Hierfür reicht schon die chronische Exposition geringer Mengen (73;74). Laut Jarup et al. (73) finden sich im Nierenkortex der dort vorgestellten Population jeweils in 12 % der Fälle Cadmiumkonzentrationen von 100, 167 und 233 µmol/kg.

Konzentrationen von 100 µmol/l $CdCl_2$ führten jedoch bei IHKE- und $LLCPK_1$-Zellen zu extremem Sinken des Proteins und der Caspaseaktivität (Abb. 7.16a und 7.17), die nicht vergleichbar waren. Somit untersuchten wir im folgenden Konzentrationen zwischen 1 und 100 µmol/l $CdCl_2$.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten unter steigenden $CdCl_2$-Konzentrationen einen kontinuierlichen Abfall des Zellproteins und ein Ansteigen der Caspaseaktivität (Abb. 7.16a, 7.17 und 7.18b). Das Absinken der Caspase-3-Aktivierung bei höheren Cadmium-Konzentrationen ist durch die erhöhte Nekroserate (vermehrte Trypanblauaufnahme) zu erklären (Abb. 7.17 und 7.18a). Nekrose führt zu vermehrter Trypanblauaufnahme in die defekten Zellen und gleichzeitig zu einem Absinken von Proteingehalt und Caspase-3 Aktivität.

Wurden die Zellen (IHKE; $LLCPK_1$ und MDCK-C7) mit verschiedenen $CdCl_2$- und OTA-Konzentrationen gleichzeitig inkubiert, so beobachteten wir unter steigenden Konzentrationen eine immer deutlicher hervortretende Potenzierung im Bezug auf Proteingehalt, Caspase-3-Aktivierung und Nekroserate (Abb. 7.16-7.19). Tabelle 3.5.

fasst die Interaktionen unterschiedlicher $CdCl_2$- und OTA-Konzentrationen zusammen. Das Maximum der Interaktionen ist sowohl zell- als auch konzentrationsabhängig.

Stiegen die Cadmiumkonzentrationen über 10 µmol/l (IHKE) bzw. 30 µmol/l (LLC-PK_1 und MDCK-C7) hinaus, interagieren OTA und $CdCl_2$ antagonistisch. Ursache könnte eine vermehrte Nekrose sein, wie Abb. 7.17 und 7.18a zeigen, oder eine maximale Aktivierung der Caspase-3 durch $CdCl_2$ bzw. OTA alleine. Eine ausreichende Bestimmung der Trypanblauaufnahme bei IHKE-Zellen mit $CdCl_2$-Konzentrationen größer 10 µmol/l war wegen starker Proteinschwankungen nicht möglich (Daten nicht dargestellt).

IHKE-Zellen				
1 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/lOTA**		
Protein	**O**	**O**		
Caspase	**O**	**O**		
3 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**		
Protein	**O**	**O**		
Caspase	**+**	**O**		
10 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+10 nmol/l OTA**	**+ 1 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**	**O**
Caspase	**+**	**+**	**O**	**-**
Trypanblau	**O**			
30 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**			
Protein	**-**			
Caspase	**-**			
100 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**			
Protein	**-**			
Caspase	**-**			

	LLC-PK_1-Zellen		MDCK-C7-Zellen	
1 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**		**+ 1 µmol/l OTA**	
Protein	**O**		**O**	
Caspase	**-**		**O**	
3 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**		**+ 1 µmol/l OTA**	
Protein	**-**		**O**	
Caspase	**+**		**O**	
10 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**		**+ 1 µmol/l OTA**	**+100 nmol/l OTA**
Protein	**O**		**O**	**O**
Caspase	**-**		**O**	**O**
Trypanblau			**O**	
30 µmol/l $CdCl_2$	**+ 1 µmol/l OTA**			**+100 nmol/l OTA**
Protein	**+**			**O**
Caspasse	**+**			**+**
Trypanblau	**+**			**+**
100 µmol/l $CdCl_2$		**+ 100 nmol/l OTA**		**+100 nmol/l OTA**
Protein		**O**		**-**
Caspase		**-**		**O**
Trypanblau				**+**

Tabelle 3.5. Übersicht der Interaktionen verschiedener $CdCl_2$- und OTA-Konzentrationen.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.6. Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikalen dienen u.a. als Botenstoff bei Apoptose- und Nekroseinduktion im Nierenepithel (49;50). Nierenepithelzellen reagieren auf ischämische und toxische Ereignisse mit vermehrter Sauerstoffradikalbildung (77). Grund ist eine Entkopplung der Atmungskette und die Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran (46), so dass die Sauerstoffradikale aus dem Mitochondrium in das Zytosol gelangen können und dort u.a. Apoptose auslösen (77). Uns stellte sich die Frage, ob die Niere nach ischämischen Ereignissen anfälliger für OTA ist. Um postischämische Sauerstoffradikalbildung zu simulieren, wurden die Zellen, analog der Literatur, mit bis zu 1 mmol/l H_2O_2 inkubiert (50;78).

Betrachteten wir die Wirkung steigender H_2O_2-Konzentrationen auf IHKE- und LLC-PK_1-Zellen, so zeigten sie unterschiedliche Effekte, obwohl beide vom proximalen Tubulus abgeleitet sind. Bei IHKE-Zellen führten 100 µmol/l H_2O_2 zu keiner Veränderung des Proteins und der Caspase, während 1 mmol/l H_2O_2 die Caspaseaktivität ansteigen und die Trypanblauaufnahme absinken ließ (Abb. 7.19). Im Gegensatz dazu zeigten LLC-PK_1-Zellen ein konzentrationsabhängiges Absinken des Proteins und der Caspaseaktivität (Abb. 7.20a und b).

Die MDCK-C7-Zellen des Sammelrohrs schützte H_2O_2 vor Nekrose, während Protein und Caspase nach 24 h nicht beeinflusst werden (Abb. 7.21 a).

Maßen wir die Interaktionen steigender OTA und H_2O_2-Konzentrationen so zeigte sich eine konzentrationsabhängige Potenzierung (Abb. 7.19 bis 7.21 und Tabelle 3.6) bei Protein, Caspase und Trypanblau.

IHKE-Zellen				
100 µmol/l H_2O_2	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**	**+ 1 nmol/l OTA**
Protein		**O**		
Caspase		**O**		
1 mmol/l H_2O_2	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**	**+ 1 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**	**O**
Caspase	**O**	+	-	**O**
Trypanblau	**O**			

LLC-PK_1-Zellen		
100 µmol/l H_2O_2	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**
Protein	**O**	-
Caspase	+	**O**
1 mmol/l H_2O_2	**+ 1 µmol/l OTA**	
Protein	**O**	
Caspase	+	
Trypanblau	**O**	

MDCK-C7-Zellen			
1 mmol/l H_2O_2	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	+	**O**	**O**
Caspase	+	**O**	**O**
Trypanblau	+		

Tabelle 3.6. Übersicht der Interaktionen verschiedener H_2O_2- und OTA-Konzentrationen.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.7. Angiotensin II

Angiotensin II spielt im Rahmen des Renin-Angiotensin Systems eine wichtige Rolle bei der Regulation des Elektrolyhaushaltes (30) und des Blutdruckes (47). In der Literatur werden für Angiotensin II sowohl apoptosefördernde (79) als auch wachstumsfördernde (51;80) Eigenschaften auf Nierenzellen beschrieben. Benesic et al. zeigten, dass OTA in der Lage ist, die durch Angiotensin II induzierte Zellproliferation von Nierenepithel zu verstärken (32). Uns beschäftigte die Frage, ob diesem Effekt bei Angiotensin II-Konzentrationen zwischen 10^{-11} und 10^{-6} M mit 10^{-6} bzw. 10^{-8} M OTA eine sinkende Apoptoserate zugrundeliegt.

Die Proliferation von IHKE-Zellen ist bei Exposition von 1 µmol/l OTA mit Angiotensin II überadditiv (Abb. 7.22). Geringere OTA-Konzentrationen von 10^{-8} M zeigen diese Wirkung nicht. Der proliferative Effekt ist somit sowohl von OTA an sich, als auch von dessen Konzentration abhängig. Die Caspase-3 Aktivität wurde nicht beeinflusst (Abb. 7.22 und Tabelle 3.7).

IHKE-Zellen		
10^{-11} bis 10^{-6} mol/l Angiotensin II	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	**-**	**O**
Caspase	**-**	**O**

Tabelle 3.7. Übersicht der Interaktionen verschiedener Angiotensin II- und OTA-Konzentrationen.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.8. Stickstoffmonoxid

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Molekül, das als Second Messenger an einer Vielzahl von Reaktionen im Organismus beteiligt ist und durch die NO-Synthetase gebildet wird (77). Es ruft in Nierenzellen die typischen Apoptosezeichen wie z.B. DNA-Fragmentierung (53;81) und die Induktion von Ceramiden und Sphingomyelinasen hervor (52;82). Gleichzeitig gehen viele Nierenerkrankungen, wie z.B. Glomerulosklerose mit einer erhöhten Apoptoserate einher (83). Um die Bildung von NO zu simulieren, wurden analog der Literatur (52;81) NO-Donoren in Konzentrationen zwischen 0,5 und 5 mmol/l. Es waren dies S-nitroso-glutathion (GSNO) und S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin (SNAP).

Wurden die untersuchten Zellen des proximalen Tubulus (IHKE und LLC-PK_1) mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener NO-Donoren inkubiert, beobachteten wir eine zelltypspezifische Empfindlichkeit. Während der Proteingehalt von IHKE-Zellen unter steigenden GSNO-Konzentrationen absank, änderte sich die Caspase-3-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle nicht. SNAP hingegen beeinflusste das Zellprotein nicht und senkte die Caspase-3 Aktivität auf fast Null. Diese Möglichkeit, die Apoptose durch NO-Donoren zu verhindern, beobachteten wir auch bei LLC-PK_1 und MDCK-C7 Zellen unabhängig vom verwendeten NO-Donor.

Die Interaktionen von Ochratoxin A mit NO zeigten bei allen untersuchten Zelltypen überwiegend hemmende Effekte. NO wirkt also an der Niere schützend, wenn die Zellen zugleich Ochratoxin A und NO exponiert sind (vgl. Abb. 7.23 bis 25 und Tabelle 3.8).

		IHKE-Zellen	LLC-PK_1-Zellen	MDCK-C7-Zellen
		+ 1 µmol/l OTA	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 µmol/l OTA**
GSNO	Protein	**-**	**0**	**0**
	Caspase	**-**	**0**	**-**
SNAP	Protein	**-**	**0/+**	
	Caspase	**-**	**-**	

Tabelle 3.8. Übersicht der Interaktionen verschiedener NO-Donoren mit 1 µmol/l OTA.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.9. Physiologische pH-Werte

Der pH-Wert des Urins ist abhängig vom Nephronabschnitt. Misst man im proximalen Tubulus einen pH von 6,5 bis 6,8, so kann er im Sammelrohr auf unter 5 absinken (13). Wie bereits Dahlmann et al zeigten, haben diese unterschiedlichen pH-Werte Einfluss auf die Aufnahme von OTA im Nephron (84) und im Jejunum (85). Außerdem lässt OTA den Urin-pH und den pH-Wert im Zytosol der Tubuluszelle ansteigen(86) und führt so zu morphologischen und funktionellen Veränderungen (87). Da der pH-Wert somit an verschiedenen nephrotoxischen Wirkungen von OTA mittelbar und unmittelbar beteiligt ist, war es für uns interessant zu untersuchen, ob der Umgebungs-pH Einfluss auf die Apoptoseinduktion von OTA hat, wie es für einige pH-Werte bereits berichtet wurde (14).

Da die Zellen des proximalen Tubulus mit starken Proteinveränderungen auf pH-Werte unter 6,6 reagierten, betrachten wir im Folgenden für diese Zellen nur pH-Werte zwischen 6,6 und 7,6. Der reguläre pH des Mediums für IHKE-Zellen ist 7,2, für MDCK-C7 und LLC-PK_1-Zellen 7,4, so dass die Proteinmenge bzw. Caspaseaktivität dieser pH-Werte dem Kontrollwert entsprechen. Um den erwünschten pH-Wert zwischen 5,8 und 7,6 zu erreichen, wurde das Medium zu Versuchsbeginn mit NaOH bzw. HCl titriert.

IHKE-Zellen reagierten auf steigende pH-Werte mit einem Proteinabfall und Caspaseanstieg, wobei gleichzeitig die Nekroserate zurückging (Abb. 7.26). Im Gegensatz dazu sank die Caspaseaktivität bei LLC-PK_1-Zellen, wenn der extrazellulären pH-Wert schrittweise angehoben wurde (Abb. 7.27). Die MDCK-C7 Zellen des Sammelrohrs zeigten einen ähnlichen Verlauf der Apoptoseaktivität, wobei mit steigender Caspaseaktivität das Zellprotein abnahm (Abb. 7.28). Kombinierten wir verschiedene pH-Werte und OTA-Konzentrationen, so verhielten sich IHKE- und LLC-PK_1-Zellen gegensätzlich. Während bei IHKE-Zellen saure pH-Werte schützten, und alkalische pH-Werte die OTA-Wirkung verstärkten, verhielten sich LLC-PK_1-Zellen umgekehrt (Abb. 7.26 und 7.27). MDCK-C7 Zellen schützten hingegen saure pH-Werte (Abb. 7.28). Eine Zusammenfassung der Interaktionen mit OTA gibt Tabelle 3.9.

IHKE-Zellen	
Azidose	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**O**
Caspase	**-**
Alkalose	**+ 1 µmol/l OTA**
Protein	**0**
Caspase	**+**
Trypanblau	**O**

LLC-PK_1-Zellen				
Azidose	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**	**+1 nmol/l OTA**
Protein	**O**	**O**	**O**	**O**
Caspase	**+**	**O**	**O**	**O**
Trypanblau	**-**			
Alkalose	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**	**+1 nmol/l OTA**
Protein	**-**	**O**	**O**	**O**
Caspase	**-**	**O**	**O**	**O**

MDCK-C7-Zellen			
Azidose	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	**-**	**O**	**O**
Caspase	**-**	**O**	**O**
Alkalose	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 nmol/l OTA**	**+ 10 nmol/l OTA**
Protein	**-**	**O**	**O**
Caspase	**O**	**O**	**O**

Tabelle 3.9. Übersicht der Interaktionen verschiedener pH-Werte und OTA-Konzentrationen.
Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.10. Mögliche Wirkmechanismen der beobachteten Potenzierungen

Da wir die überwiegende Zahl der Potenzierungen bei IHKE- und MDCK-C7-Zellen beobachtet haben, wollten wir bei diesen Zellen mögliche Mechanismen der Interaktion aufzeigen. Wie einleitend erwähnt, sind v. a. Sauerstoffradikale und Kalzium bei der Apoptoseinduktion beteiligt. Sollte die Interaktion durch Hemmer des intrazellulären

Kalziumanstiegs (BAPTA-AM) bzw. Sauerstoffradikalfänger (TIRON) zu beeinflussen sein, sind dies mögliche intrazelluläre Mechanismen.

3.10.1. Hemmung der Sauerstoffradikalbildung durch TIRON

Ein möglicher gemeinsamer Weg der Apoptoseinduktion wäre die verstärkte Bildung von Sauerstoffradikalen (50;78;88). Wir gaben zu den potenzierenden Konzentrationen von Ochratoxin A und Toxin den Sauerstoffradikalfänger TIRON (88). Vorversuche mit 3 mmol/l TIRON alleine zeigten keine signifikante Veränderung der zu messenden Parameter in unseres Modell.

Eine Zusammenfassung der in Abb. 7.29 bis 7.30 dargestellten Ergebnisse gibt Tabelle 3.9. Hier zeigen sich unter TIRON-Gabe sowohl hemmende als auch potenzierende Effekte auf die verschiedenen Interaktionen. In beiden Fällen sind somit Sauerstoffradikale beteiligt. Wird die Interaktion durch TIRON im Sinne einer Potenzierung verstärkt, schützen Sauerstoffradikale die Zelle, wird die Interaktion durch TIRON gehemmt, wird die Interaktion über Sauerstoffradikale verstärkt (vgl. Tabelle 3.9)

IHKE-Zellen			
3 mmol/l TIRON	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 mmol/l H_2O_2**	**+ OTA + H_2O_2**
Protein	**O**	**O**	**-**
Caspase	**+**	**-**	**+**
3 mmol/l TIRON	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 10 µmol/l $CdCl_2$**	**+ OTA + $CdCl_2$**
Protein	**O**	**O**	**-**
Caspase	**+**	**O**	**+**

MDCK-C7-Zellen			
3 mmol/l TIRON	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1mmol/l H_2O_2**	**+ OTA + H_2O_2**
Protein	-	-	-
Caspase	O	O	-
Trypanblau			-
3 mmol/l TIRON	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 10 µmol/l $CdCl_2$**	**+ OTA + $CdCl_2$**
Protein	-	O	-
Caspase	-	O	-
3 mmol/l TIRON	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 µmol/l Cisplatin**	**+ OTA + Cisplatin**
Protein	-	+	+
Caspase	O	+	-
Trypanblau			-

Tabelle 3.10a. Übersicht der Interaktionen des Sauerstoffradikalfängers TIRON mit potenzierenden Kombinationen von OTA und Toxin. Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.10.2. Einfluss des intrazellulären Kalziums auf die Interaktionen mit Ochratoxin A

OTA wirkt unter anderem über die Beeinflussung des intrazellulären Kalziums. Um zu untersuchen, ob das intrazelluläre Kalzium die Synergismen zwischen OTA und den anderen untersuchten Substanzen beeinflusst, gaben wir zu den potenzierenden Kombinationen 50 µmol/l BAPTA-AM. Hier zeigen sich unter BAPTA-AM-Gabe sowohl hemmende als auch potenzierende Effekte auf die Interaktionen. In beiden Fällen ist Kalzium an der Vermittlung der Interaktion beteiligt. Wird die Interaktion durch BAPTA-AM im Sinne einer Potenzierung verstärkt, schützt ein intrazellulärer Kalziumanstieg die Zelle, wird die Interaktion durch BAPTA-AM gehemmt, wird die Interaktion durch einen intrazellulären Kalziumanstieg verstärkt. Eine Zusammenfassung der Beteiligung von Kalzium in der Signalkaskade gibt Tabelle 3.10b.

IHKE-Zellen			
50 µmol/l BAPTA-AM	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 mmol/l H_2O_2**	**+ OTA + H_2O_2**
Protein	-	O	-
Caspase	-	-	-
50 µmol/l BAPTA-AM	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 10 µmol/l $CdCl_2$**	**+ OTA + $CdCl_2$**
Protein	-	-	-
Caspase	-	-	-

MDCK-C7-Zellen			
50 µmol/l BAPTA-AM	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 1 mmol/l H_2O_2**	**+ OTA + H_2O_2**
Protein	O	-	-
Caspase	O	O	O
Trypanblau			O
50 µmol/l BAPTA-AM	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 10 µmol/l $CdCl_2$**	**+ OTA + $CdCl_2$**
Protein	O	+	-
Caspase	-	+	-
50 µmol/l BAPTA-AM	**+ 1 µmol/l OTA**	**+ 100 µmol/l Cisplatin**	**+ OTA + Cisplatin**
Protein	O	+	+
Caspase	O	+	-
Trypanblau			-

Tabelle 3.10b. Übersicht der Interaktionen des Kalziumchelators BAPTA-AM mit potenzierenden Kombinationen von OTA und Toxin. Zeichenerklärung: + = Potenzierung, 0 = additiver Effekt, - = Antagonismus

3.11. Bildung von Sauerstoffradikalen

Zuletzt stellten wir uns die Frage, ob in Anwesenheit der Toxine vermehrt Sauerstoffradikale (ROS) gebildet werden. Um die intrazelluläre Sauerstoffradikalbildung zu messen, wurde die Spaltung von DCF-DA genutzt. Hierbei gilt die Zunahme der Fluoreszenz des Spaltungsprodukts über der Zeit als Maß der intrazellulären Sauerstoffradikalbildung pro Zeiteinheit. Beispielhaft betrachteten wir die MDCK-C7 Zellen aus dem Sammelrohr. Das Inlay links oben in der Abbildung zeigt beispielhaft den Verlauf der Sauerstoffradikalbildung bei n=3 über 2 Stunden unter der Inkubation mit 50 µmol/l BAPTA-AM, 100 µmol/l Cisplatin und 1 µmol/l

OTA. Das Verhältnis der gemessenen Steigung der Graphen zur Steigung der Kontrolle in Prozent diente der Quantifizierung der Bildung von Sauerstoffradkalen.

1 µmol/l OTA mit und ohne H_2O_2 (1 mmol/l) zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Veränderung der Sauerstoffradikalbildung, während diese bei H_2O_2 alleine sistiert.

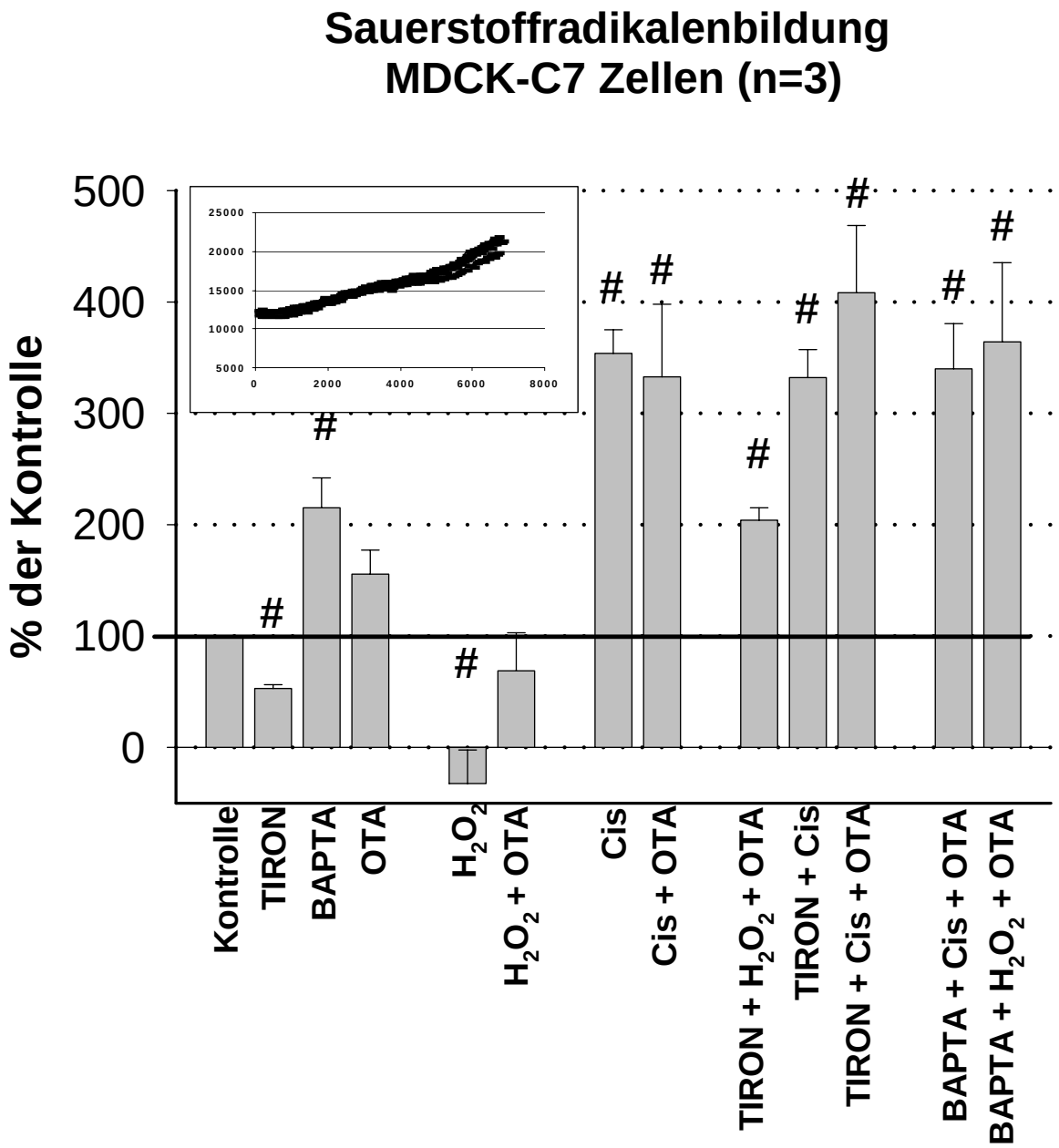


Abb. 3.4. Sauerstoffradikalenbildung in MDCK-C7 Zellen nach 24 h Inkubation mit 1µmol/l Ochratoxin A (OTA), 100 µmol/l Cisplatin (Cis), 1 mmol/l H_2O_2, 3 mmol/l TIRON, 50 µmol/l BAPTA-AM (BAPTA) in % der Kontrolle (n=3; $p < 0,05$). # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle. Zum Inlay siehe Text.

Der Ca^{2+}-Chelator BAPTA-AM (50 µmol/l) alleine verdoppelte verglichen mit der Kontrolle die ROS-Bildung. Dies könnte für einen schützenden Effekt des Kalziums vor Sauerstoffradikalen sprechen. Unterstützt wird diese These durch die Steigerung der ROS-Produktion in Gegenwart von BAPTA-AM bei H_2O_2 mit OTA auf das 3,5-fache verglichen mit H_2O_2 und OTA ohne BAPTA-AM. Der Effekt von Cisplatin (100 µmol/l) alleine und von Cisplatin (100 µmol/l) mit OTA (1 µmol/l) lässt sich jedoch durch die Zugabe von BAPTA-AM nicht weiter steigern. Grund könnte eine bereits vorliegende maximale Aktivierung der Sauerstoffradikalbildung durch Cisplatin alleine sein.

Kombiniert man den Radikalfänger TIRON (3 mmol/l) mit Cisplatin (100 µmol/l) alleine oder fügt zusätzlich OTA hinzu, so zeigten sich keine senkenden Effekte. Bei H_2O_2 mit OTA steigerte TIRON sogar die ROS-Bildung auf das Doppelte der Kontrolle, wohingegen TIRON alleine die Sauerstoffradikalbildung deutlich absenkte.

3.12. Protektive Wirkung von Stickstoffmonoxid

Da wir bei unseren Versuchen mit den NO-Donoren SNAP und GSNO alleine und in Kombination mit OTA ein stark apoptosehemmendes Potenzial feststellten, testeten wir, ob NO auch in der Lage ist, die Apoptose bei stark potenzierend interagierenden Kombination zu hemmen. Wie Abb. 7.33 zeigt, senkte die Anwesenheit von NO die potenzierte Caspaseaktivität von $CdCl_2$ mit OTA bei IHKE-Zellen auf Kontrollniveau ab. Dies bestärkt unsere Vermutung, dass NO apoptosehemmend wirkt und so u.U. bei OTA-Intoxikation nephroprotektiv sein könnte.

4. Diskussion

4.1. Apoptose als Reaktion der Zelle auf Toxine

Wir untersuchten die Wirkung verschiedener Nephrotoxine alleine und in Kombination mit OTA im Zellkulturmodell. Hierbei differenzierten wir die zwei möglichen Arten des Zelluntergangs, Apoptose und Nekrose. In pharmakologisch bzw. toxikologisch relevanten Konzentrationen ließ sich Apoptose als die eindeutig führende Reaktion der Zellen auf Nephrotoxine nachweisen. Nekrose findet nur in geringem Maße statt. Dafür sprechen zwei Beobachtungen:

In unserem Modell ist die Wirkung von OTA auf die Apoptose stets stärker als die Nekrose. So zeigen z.B. MDCK-C7 Zellen einen Anstieg der Trypanblauaufnahme auf das Doppelte der Kontrolle, zugleich aber eine um das 10-fache erhöhte Caspaseaktivität, wenn 1 mmol/l H_2O_2 mit 1 µmol/l OTA kombiniert wurden (vgl. Abb. 7.30a und 7.21a). Dieses Überwiegen der Apoptose ist bei allen untersuchten Zellinien und Nephrotoxinen in unterschiedlicher Ausprägung zu beobachten (vgl. auch Abb. 7.10 bis 7.12. [100 µM Cisplatin + 1 µM OTA])

Zum Anderen zeigen die Agarosegele eine deutliche DNS-Leiter als Zeichen der Apoptose. Im Falle der Nekrose würden die scharfen Banden der DNS-Leiter durch den unkontrollierten DNS-Abbau verwischen.

Desweiteren war Apoptose als Zellreaktion schon bei pharmakologisch relevanten und unter Umständen sogar geringen Konzentrationen nachweisbar. Dies betrifft unter anderem H_2O_2, die untersuchten Antibiotika, Cisplatin und vor allem Cadmium. IHKE-Zellen zeigen schon bei 1/10 der Cadmiumkonzentrationen, denen größere Bevölkerungsanteile ausgesetzt sind, deutliche Ansteige der Caspase-3-Aktivität (Abb. 7.16), LLC-PK_1-Zellen reagieren sogar schon auf weniger als 1/30 (Abb. 7.17). Daraus folgern wir, dass Nierenepithelzellen Apoptose auslösen, um auf verschiedenste Toxine zu reagieren, und dass die vermehrte Apoptoserate auch bei sehr geringen Konzentrationen nachweisbar ist, in denen das Gesamtorgan Niere unter Umständen noch keine Ausfallerscheinungen zeigt. Apoptose stellt somit einen frühen Marker der Nierenschädigung dar und ist neben der Beeinflussung der Resorption und Sekretion

durch die Toxine ein bedeutender Grund für die Nephrotoxizität der untersuchten Substanzen.

4.2. Vorteile der Messmethode

Wegen der große Zahl an zu testenden Kombinationen war es nötig, ein effizienteres und ökonomischeres Verfahren als die üblicherweise verwendeten Petrischalen (35 mm) zur Apoptose- bzw. Nekrosebestimmung zu verwenden.
Die Bestimmung der relevanten Parameter in der 96-Well Schale ist im Vergleich zur Petrischale erheblich kostengünstiger. Eine Messung kostet inklusive der anteiligen Ausgaben für Messschale, Medien, Caspase-Lysepuffer und Substraten 0,62 € gegenüber 4,49 € in den herkömmlichen Petrischalen bei gleichem Messverfahren. Dies führte zu einer Ersparnis von mehr als 86 %.
Gleichzeitig können wir mit einer Schale 96 Messungen durchführen. Somit reduzieren wir den Platz- und Zeitbedarf erheblich. 96 Stück Petrischalen erfordern eine minimale Arbeitsfläche von 30 auf 45 cm. Demgegenüber stehen 13 x 8 cm der 96-Well Schale.
Daneben sparen 96-Well Platten Zeit. Bei Petrischalen benötigen wir inklusive aller Schritte und Inkubationszeiten 6 Minuten pro Messung, im 96-Well Format sind es bei identischen Ergebnissen 1,5 Minuten.
Das 96-Well Platten Format bietet somit erhebliche Vorteile in Bezug auf Kosten, Platzbedarf und Zeitaufwand und stellt eine erheblich ökonomischere Messmethode dar als Petrischalen. Zusätzlich ermöglicht diese Methode ca. 100 Toxinkombinationen gleichzeitig zu testen und die Ergebnisse unter den exakt selben Bedingungen zu vergleichen.

4.3. Die Interaktionsbestimmung beeinflussende Faktoren

Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionen verschiedener Nephrotoxine mit OTA aufzuzeigen. Dabei untersuchten wir zwei dem proximalen Tubulus entstammende Zelllinien (IHKE- und LLC-PK_1) und eine Zelllinie aus dem Sammelrohr (MDCK-C7). Interessant war, dass die verschiedenen Zellen unterschiedlich auf das gleiche Toxin reagieren können und selbst Zellen aus dem selben Nephronabschnitt eine völlig andere

Empfindlichkeit und Interaktionen zeigen. So sind LLC-PK_1 im allgemeinen unempfindlicher gegenüber OTA alleine und in Kombination mit anderen Toxinen als IHKE- und MDCK-C7 Zellen. Bei LLC-PK_1 Zellen überwiegen deutlich additive Interaktionen. Nur $CdCl_2$ und Azidose rufen in Kombination mit Ochratoxin A eine potenzierende Interaktion hervor. Cisplatin hingegen zeigt beim Zusammenwirken mit OTA bei LLC-PK_1 Zellen Antagonismus, während es bei IHKE- und MDCK-C7 Zellen überadditive Interaktionen auslöst. Die Interaktionen sind somit zelltypabhängig.

Zum Zweiten ist die Interaktionen von der Zeit abhängig. So ist es möglich, dass nach 24 h das Maximum der Caspasenaktivität schon überschritten ist, wie die bereits zerschnittene DNS als DNS-Leiter in den Agarosegelen zeigt. Dadurch messen wir unter Umständen eine geringere Caspase-3 Aktivität als zum Zeitpunkt der maximalen Aktivierung (vgl. Abb. 7.11a [100 µM Cisplatin mit OTA]; Abb. 7.16a [10 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA]; Abb. 7.17 [30 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA]; Abb. 7.18b [100 µM $CdCl_2$ + 0,1 µM OTA]; Abb. 7.20a und b [1 mM H_2O_2]).

Hat die Caspasenaktivität ihr Maximum bereits länger überschritten, sinkt der Proteingehalt ab. Ein Absinken des Proteingehalts kann entweder durch Apoptose oder Nekrose hervorgerufen werden, die voneinander abgegrenzt werden müssen. Ist der Reiz durch das Toxin zu stark, wird wie einleitend erwähnt statt Apoptose hauptsächlich Nekrose ausgelöst. Können wir keine Nekrose nachweisen (wie in Abb. 7.20a [1 mM H_2O_2 +/- OTA]; Abb. 7.18a [30 bzw. 100 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA]; Abb. 7.17 [30 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA]; Abb. 7.16a [10 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA]; Abb. 7.12a [100 µM Cisplatin + OTA] und Abb. 7.21a [1 mM H_2O_2 + 1 µM OTA]) ergeben sich drei Möglichkeiten. Entweder war der Reiz nicht stark genug um Nekrose auszulösen, oder wir haben in einer Latenzphase gemessen, in der die Nekrose gerade beginnt bzw. geendet hat. Die beiden letzteren Möglichkeiten sind zwar theoretisch möglich jedoch nach der langen Inkubationszeit von 24 h auszuschließen. Nach dieser Zeitspanne wäre ein Nekrosenachweis im Agarosegel sicher möglich und durch die apoptosetypischen DNS-Leiter auszuschließen.

Ein dritter Faktor, der die Interaktion beeinflusst, ist die Konzentration der Toxine. Steigerten wir sowohl die Konzentrationen von OTA als auch der kombinierten Toxine (Cisplatin, H_2O_2, Cadmium und versch. pH-Werte), so veränderten sich die Interaktionsmuster von Potenzierung in Antagonismus oder umgekehrt (vgl. Tabelle

3.3; 3.5; 3.6 und 3.9). Besonders auffällig ist in diesem Zusammenhang, dass eine Potenzierung bei höheren Konzentrationen einen additiven Effekt hatte oder sogar in Antagonismus übergehen kann. (vgl. Tab. 3.5. IHKE-Zellen: 30 bzw. 100 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA und MDCK-C7: 100 µM $CdCl_2$ + 1 µM OTA; sowie Tabelle 3.3 (IHKE und LLC-PK_1 : 100 µM Cisplatin + 1 µM OTA und IHKE: 1 mM H_2O_2 + 1 µM OTA)). Durch die maximale Aktivierung der Caspase-3 durch das Toxin bzw. OTA alleine (vgl. Abb. 7.18a; Abb. 7.10; Abb. 7.11a und Abb. 7.19a) ist keine weitere Steigerung der Caspase-3-Aktivität möglich, wenn OTA und das Toxin kombiniert werden. Die erwartete Summe der Einzeleffekte ist höher als die maximal mögliche Caspaseaktivität., was aber nach unserer Definition einem Antagonismus entspricht. Diese Vorgänge zeigen, dass die Interaktionen von den Toxinkonzentrationen abhängen und die Interaktionstheorie nur im submaximalen Bereich Gültigkeit hat.

Als Viertes ergaben unsere Experimente, dass die Interaktionen den untersuchten Nephrotoxinen abhängig sind. Sie belegen analog zu vielen verschiedenen Studien, dass alle untersuchten Substanzen ein nephrotoxisches Potenzial haben. Der Ausprägungsgrad ist jedoch abhängig von der untersuchten Substanz. Ebenso hängen die beobachteten Interaktionen mit OTA von der Kombination der Toxine ab. Antibiotika, Antimykotika und Immunsuppressiva zeigen in therapeutischen Konzentrationen überwiegend additive Effekte bei Koexposition mit OTA, also keine Interaktion, während NO-Donoren deutlich unteradditive Wirkmuster entfalten. Cadmium, H_2O_2 und Cisplatin interagieren potenzierend.

Die Interaktionen von OTA mit den untersuchten Nephrotoxinen sind somit abhängig von dem betroffenen Zelltyp, der Inkubationszeit, der Art der Toxine und der Toxinkonzentration.

4.4. Generell gültige Interaktionen

Um die beobachteten Interaktionen verschiedener OTA- und Toxinkonzentrationen der drei Zelllinien vereinfacht darzustellen, möchte ich im folgenden generell gültige Interaktionen aufzeigen. Kriterien hierbei sind: Unter steigenden Konzentrationen beider Substanzen tritt die Interaktion immer deutlicher hervor, und mindestens zwei der drei untersuchten Zelllinien zeigen dieses Muster. Zusätzlich darf die dritte Zelllinie

keine gegensätzliche Interaktion aufweisen. Eine Ausnahme bildet Cisplatin bei LLC-PK_1-Zellen. Der Antagonismus bei hohen Konzentrationen ist durch bereits maximale Caspasenaktivierung durch die Einzelsubstanz (s.o.) zu erklären, so dass diese den anderen Zelllinien gegenläufige Interaktion im Gesamtbild als Potenzierung gewertet wurde.

Eine POTENZIERUNG der nephrotoxischen Eigenschaften (Caspase-3, Proteingehalt und Nekrose) zeigten die Kombinationen von H_2O_2, $CdCl_2$ und Cisplatin mit OTA. Cephalexin und Gentamicin zeigten überwiegend ADDITIVE EFFEKTE, während Cyclosporin A, GSNO, SNAP, Amphotericin B und Angiotensin II ANTAGONISTISCH mit OTA interagieren.

Die Interaktionen verschiedener pH-Werte mit OTA zeigten sogar innerhalb der proximalen Tubuluszellen unterschiedliche Muster, so dass diese nicht eindeutig zugeordnet werden können (vgl. Abb. 3.9).

Eine Zusammenfassung der beobachteten Interaktionen der drei untersuchten Zelllinien bezüglich der Caspase-3 Aktivität gibt Abb. 4.1.

	H_2O_2	Cyclosporin A	$CdCl_2$	SNAP	GSNO	Azidose	Alkalose	Cephalexin	Gentamicin	Amphotericin B	Angiotensin II	Cisplatin
IHKE	+	-	+		-	-	+	0	0	-	-	+
LLC-PK_1	+	-	+	0	0	+	-	0	0	0		+
MDCK-C7	+	0	0	-	-	-	-	-	0	-		+

Abbildung 4.1.: Zusammenfassung der Interaktionen von OTA mit Nephrotoxinen nach 24 h Inkubation bezogen auf die Caspase-3 Aktivität bei IHKE-, LLC-PK_1- und MDCK-C7 Zellen. Abkürzungen: (+) Potenzierung; (-) Antagonismus; (0) keine Wechselwirkung = additiver Effekt

4.5. Mögliche Signalkaskaden der Interaktionen

4.5.1. Sauerstoffradikale

Sauerstoffradikale (ROS) spielen als second messenger bei der Vermittlung der Interaktionen eine nicht unbedeutende Rolle, wie unsere Ergebnisse an MDCK-C7 Zellen zeigten (vgl. Abb. 3.4.)

Der signifikante Anstieg der Sauerstoffradikalbildung bei Cisplatin bzw. Cisplatin mit OTA gegenüber der Kontrolle legt eine Beteiligung von ROS an der Vermittlung der Interaktion nahe. Wird die Zelle H_2O_2 ausgesetzt sistiert die intrazelluläre ROS-Bildung. Dies geschieht möglicherweise als Gegenregulation, um noch mehr zellschädigende ROS zu vermeiden. Werden die Sauerstoffradikale durch TIRON reduziert steigt auch wieder die intrazelluläre ROS Bildung ([H_2O_2 und OTA]; Abb. 3.4.).

Die Sauerstoffradikalbildung stellt somit eine fein regulierte Signalkaskade der MDCK-C7 Zelle dar, die ja nach Art der kombinierten Toxine ansteigt oder abfällt.

Desweiteren zeigen unsere Untersuchungen sowohl hemmende, als auch potenzierende Interaktionen, wenn zusätzlich der Sauerstoffradikalfänger TIRON in wirksamen Konzentrationen (3 mmol/l) zu potenzierend interagierenden Nephrotoxinen gegeben wurde.

Eine potenzierende Wirkung auf Proteinmenge bzw. Caspase-3 Aktivität durch die Zugabe von TIRON bedeutet einen schützenden Effekt von Sauerstoffradikalen, denn die Anwesenheit von ROS führt nicht zu vermehrter Apoptose. Eine antagonistische Wirkung durch TIRON deutet hingegen auf einen durch ROS vermittelten programmierten Zelltod hin, denn ein Absinken der ROS lässt den apoptoseinduzierenden Effekt ebenfalls absinken.

Zusammenfassend sind Sauerstoffradikale sowohl bei IHKE-, als auch bei MDCK-C7 Zellen an der Vermittlung der Kombinationswirkung beteiligt und verstärken oder hemmen diese abhängig von der Toxinkombination.

4.5.2. Kalzium

Wie einleitend erwähnt ist Kalzium ein wichtiger Botenstoff der Apoptoseinduktion von OTA. Kalzium ist an der Induktion der Apoptose in IHKE-Zellen bei OTA, H_2O_2, $CdCl_2$, und $CdCl_2$ mit OTA beteiligt (vgl. Tab. 3.10b).
Ein hohes intrazelluläres Kalzium schützt MDCK-C7 Zellen vor den Effekten von $CdCl_2$ (10 µmol/l), Cisplatin (100 µmol/l) und OTA mit Cisplatin (Tab. 3.10b). Den Effekt von OTA alleine scheint Kalzium dagegen nicht zu beeinflussen, während es die Interaktionen von H_2O_2 und OTA, $CdCl_2$ und OTA und Cisplatin mit OTA verstärkt.
Bei MDCK-C7 Zellen erfolgt sogar die Hemmung der Sauerstoffradikalbildung durch die Kombination von H_2O_2 + OTA mit Hilfe von Kalzium. Ein Absinken des intrazellulären Kalziums durch BAPTA-AM ruft einen signifikanten Anstieg der Sauerstoffradikalbildung hervor (vgl. Abb. 3.4.).
Kalzium ist somit bei allen potenzierend interagierenden Nephrotoxinen als second messenger beteiligt, jedoch sind zelltypspezifische Unterschiede zu beobachten.

4.5.3. Stickstoffmonoxid

Bei unseren Versuchen mit den NO-Donoren SNAP und GSNO stellten wir ein stark apoptosehemmendes Potenzial fest, wenn die Zellen diesen Substanzen alleine oder in Kombination mit OTA exponiert sind. Werden zu Toxinkombinationen, die allein stark potenzierend wirken, NO-Donoren gegeben, so sinkt die Caspaseaktivität deutlich ab, in unserem Beispiel sogar auf Kontrollniveau (vgl. Abb. 7.33). Dies veranlasst uns zu dem Schluss, dass NO-Donoren in unserem Zellmodell vor Apoptose schützen und so einen möglichen intrazellulären Schutzmechanismus vor dem programmierten Zelltod darstellen.
Neben Sauerstoffradikalen, intrazellulärem Kalzium und Stickstoffmonoxid könnten bei den beobachteten Interaktionsmustern JNK, TNF α und die Mitochondrien eine Rolle spielen.

5. Zusammenfassung

Ochratoxin A ist ein Schimmelpilzmetabolit, der in vielen Nahrungsmitteln des Menschen vorkommt und in > 80 % der Blutproben nachweisbar ist. OTA wirkt hauptsächlich auf die Niere, und hier unter anderem durch Apoptose. Im täglichen Leben sind wir jedoch vielen Nephrotoxinen gleichzeitig ausgesetzt. Somit untersuchten wir die apoptoseinduzierende Wirkung verschiedener Substanzen, wie Antibiotika, NO-Donoren, H_2O_2, $CdCl_2$ Cisplatin, Cyclosporin A und unterschiedliche pH-Werte in Kombination mit OTA. Bedingt durch die hohe Zahl möglicher Kombinationen verwendeten wir ein schnelles und effizientes Apoptose-Screening. Wir bestimmten Caspase-3 Aktivität und Proteingehalt direkt an Zellen, die in 96-well Platten angesät wurden. Apoptose wurde durch DNA-Leiterbildung bestätigt, Nekrose durch die Aufnahme von Trypanblau in die Zelle bestimmt. Die untersuchten Zelllinien umfassten: LLC-PK_1 und IHKE-Zellen (proximaler Tubulus) sowie MDCK-C7 Zellen (Sammelrohr).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die apoptoseinduzierende Wirkung von OTA von homöostatischen und nephritogenen Agenzien beeinflusst wird, denen die Zellen simultan mit OTA ausgesetzt werden. So beobachteten wir, abhängig von der Kombination, antagonistische, additive und potenzierende Effekte. Potenzierung der Wirkung von OTA wurde u.a. für H_2O_2, Cd^{2+}, und Cisplatin beobachtet, während NO-Donoren, Amphotericin B und Angiotensin II eine hemmende Wirkung auf OTA hatten. Cephalexin Cyclosporin A und Gentamicin zeigten überwiegend additive Wirkung. Das Ausmaß der Interaktion war zwischen den einzelnen Zelllinien unterschiedlich.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass das nephrotoxische Potenzial von Ochratoxin A von der Koexposition mit anderen nephritogenen Stoffen abhängig ist und somit eine Risikoabschätzung für OTA stets andere Risikofaktoren berücksichtigen muss. Desweiteren bleibt zu bemerken, dass Stickstoffmonoxid nicht nur in Kombination mit OTA antagonistisch wirkt, sondern auch die potenzierenden Effekte von OTA mit Cadmium deutlich zu hemmen vermag. NO wirkt also in unserem Modell schützend auf die Zellen.

6. Ausblick

Ochratoxin A ist ein ubiquitär vorhandenes Toxin, dessen schädigende Wirkung auf die Niere durch die gleichzeitige Exposition mit anderen Giftstoffen gehemmt oder verstärkt werden kann. Diese Arbeit unterstreicht die besondere Bedeutung, die dieser Stoff im Zusammenhang mit anderen Toxinen im Rahmen der Nierenschädigung spielen kann. Offen bleibt die Frage, ob auch an anderen Organen des Körpers die organschädigende Wirkung von OTA durch die Koexposition mit anderen Toxinen beeinflusst wird. Auch konnten im Rahmen dieser Arbeit die während der Apoptoseinduktion aktivierten Enzyme und Signalkaskaden nicht zur Gänze dargestellt werden. So wäre es interessant, die genauen Signalwege der beobachteten Interaktionen zu erforschen, um die potenzierte Wirkung der Koexposition bestimmter Nephrotoxine mit OTA gezielt hemmen zu können. Dies ist umso wichtiger, da eine Senkung der Wirkkonzentrationen bestimmter Pharmaka, z.B. Tumortherapeutika, zum Schutz der Niere nicht wünschenswert ist, um eine möglichst effektive Therapie zu erreichen.

7. Anhang

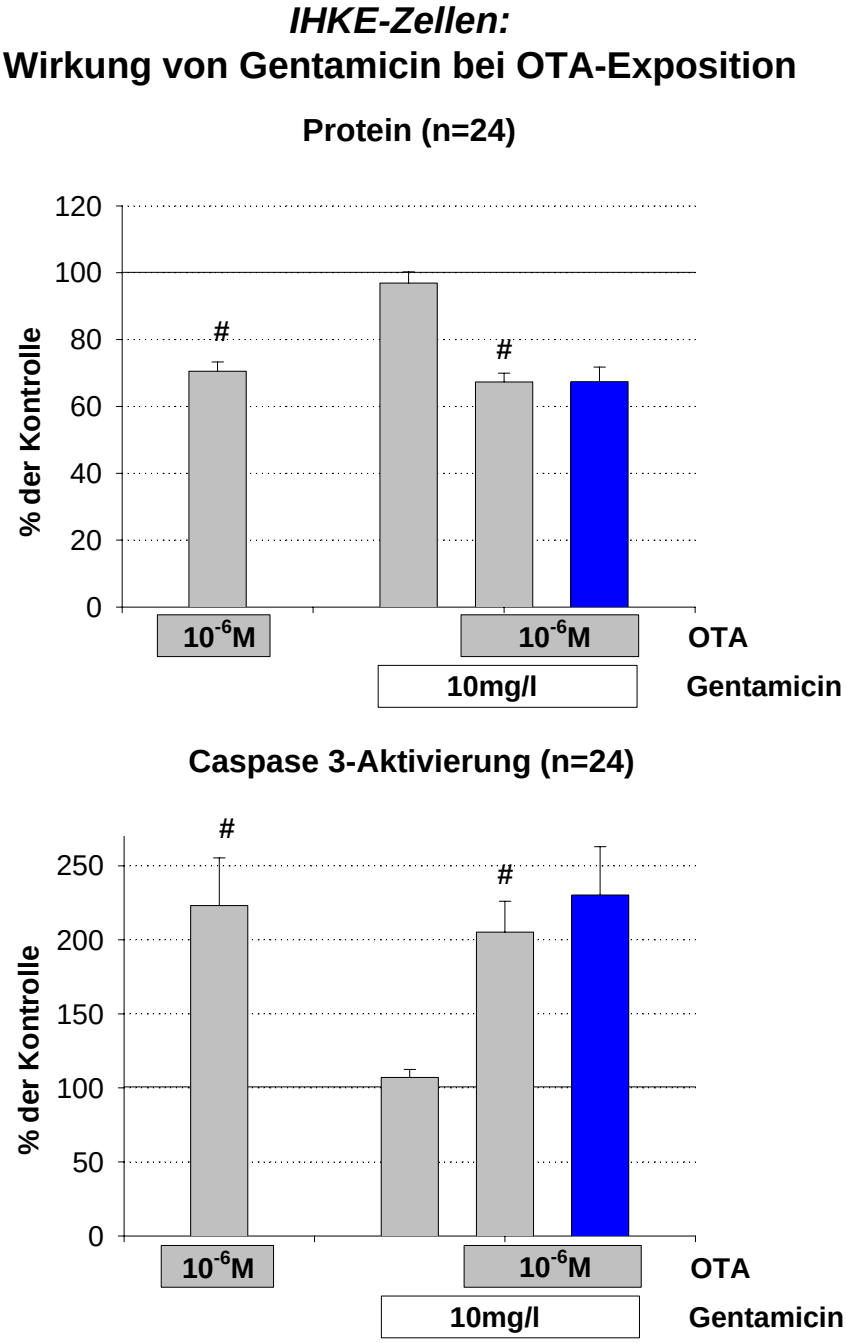
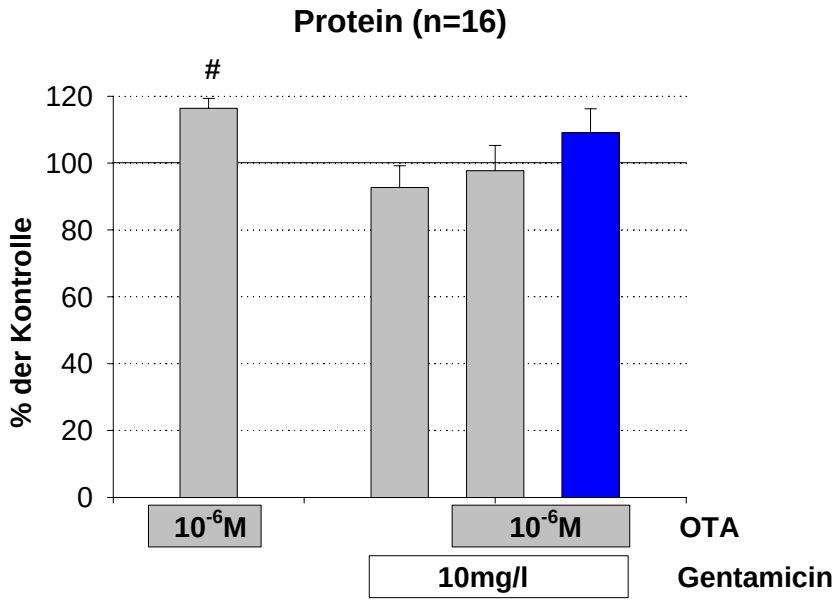


Abb. 7.1. Proteingehalt (linke Graphen) und Caspase-3 Aktivität (rechte Graphen) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antibiotikum Gentamicin(10 mg/l). (n=24; $p < 0,05$).
* = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von Gentamicin bei OTA-Exposition



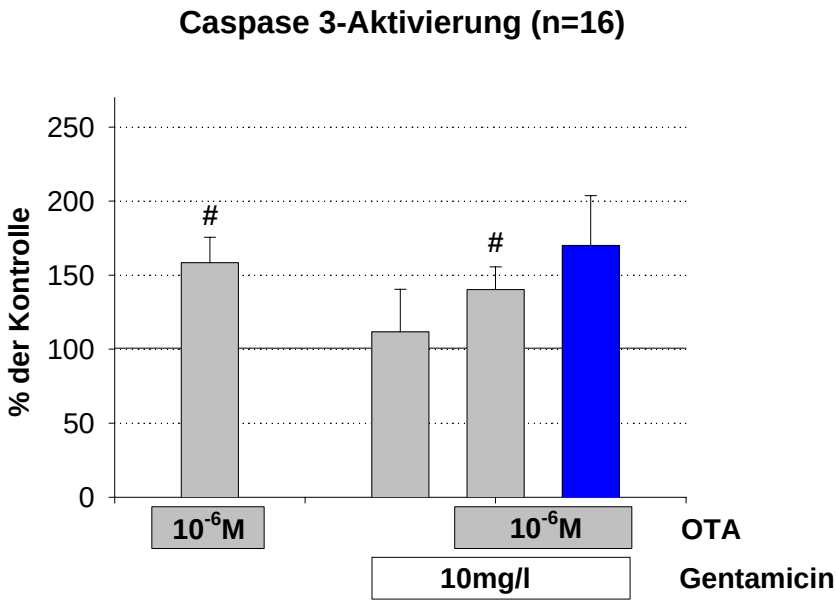
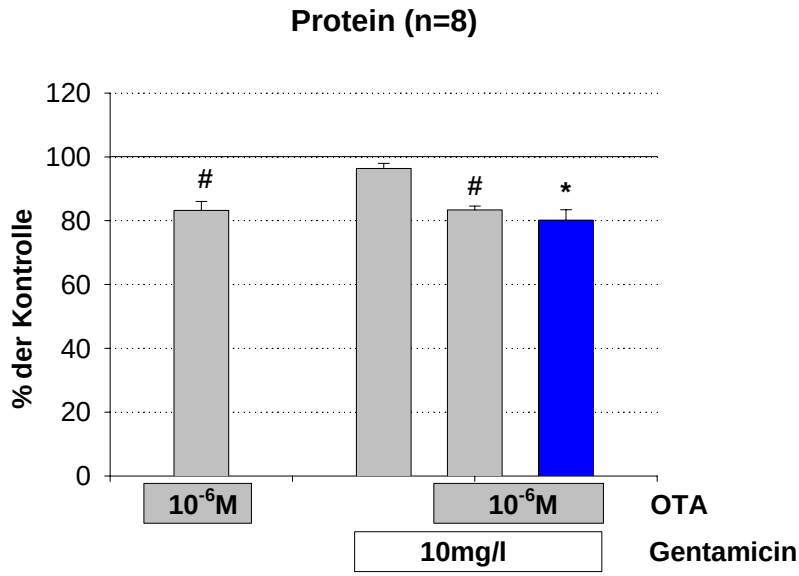


Abb. 7.2. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antibiotikum Gentamicin (10 mg/l) (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Gentamicin bei OTA-Exposition



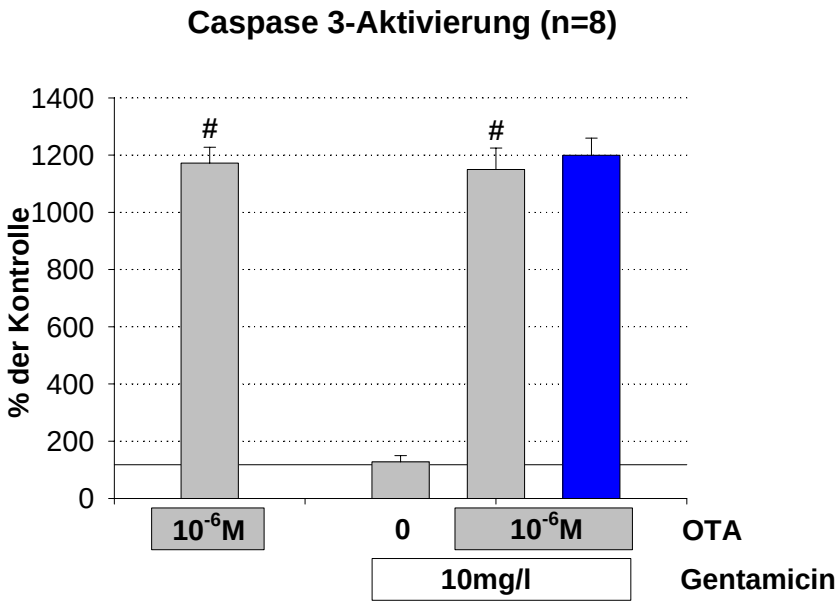
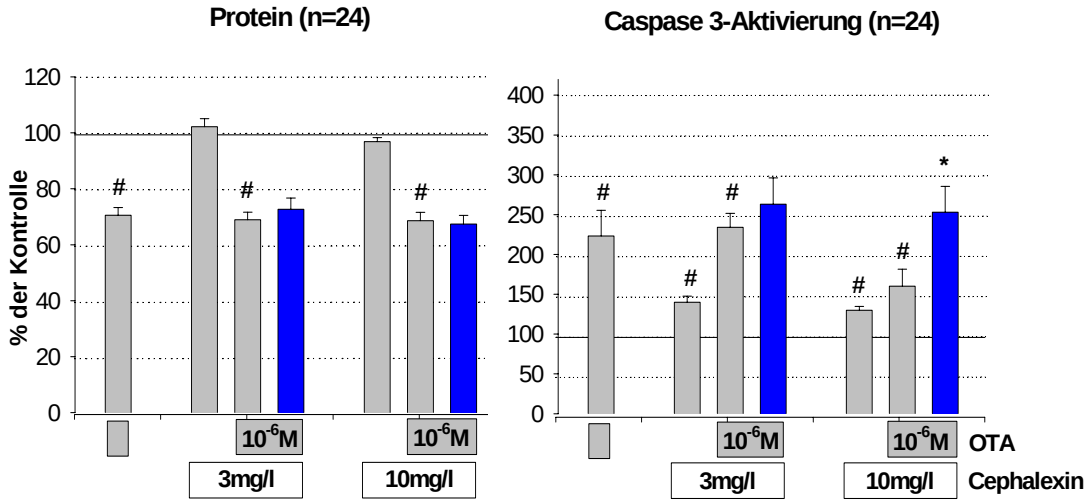
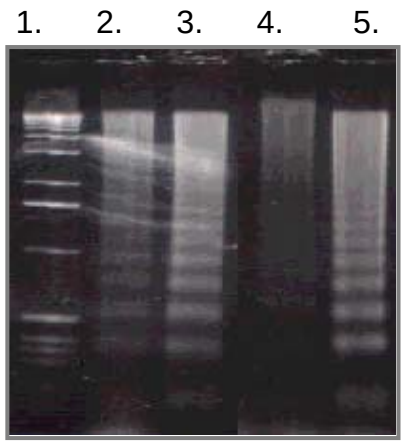


Abb. 7.3. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und Gentamicin (10 mg/l). (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von Cephalexin bei OTA-Exposition





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Cephalexin (10mg/l)
5. OTA+Cepahelxin

Abb. 7.4. Proteingehalt (linke Graphen) und Caspase-3 Aktivität (rechte Graphen) sowie der DNS-Leiterbildung (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antibiotikum Cephalexin(bis 10 mg/l). (n=24; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von Cephalexin bei OTA-Exposition

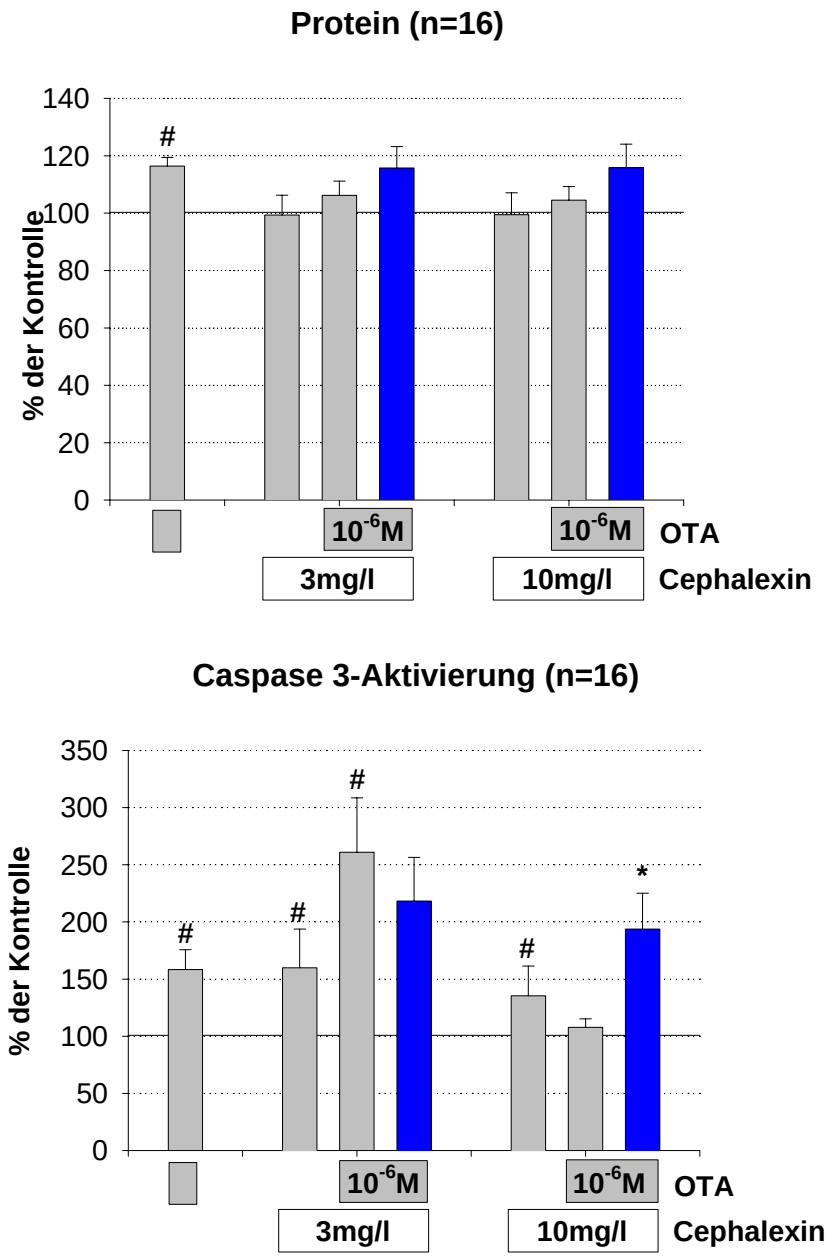


Abb. 7.5. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antibiotikum Cephalexin (bis 10 mg/l) (n=16; $p < 0,05$).
* = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Cephalexin bei OTA-Exposition

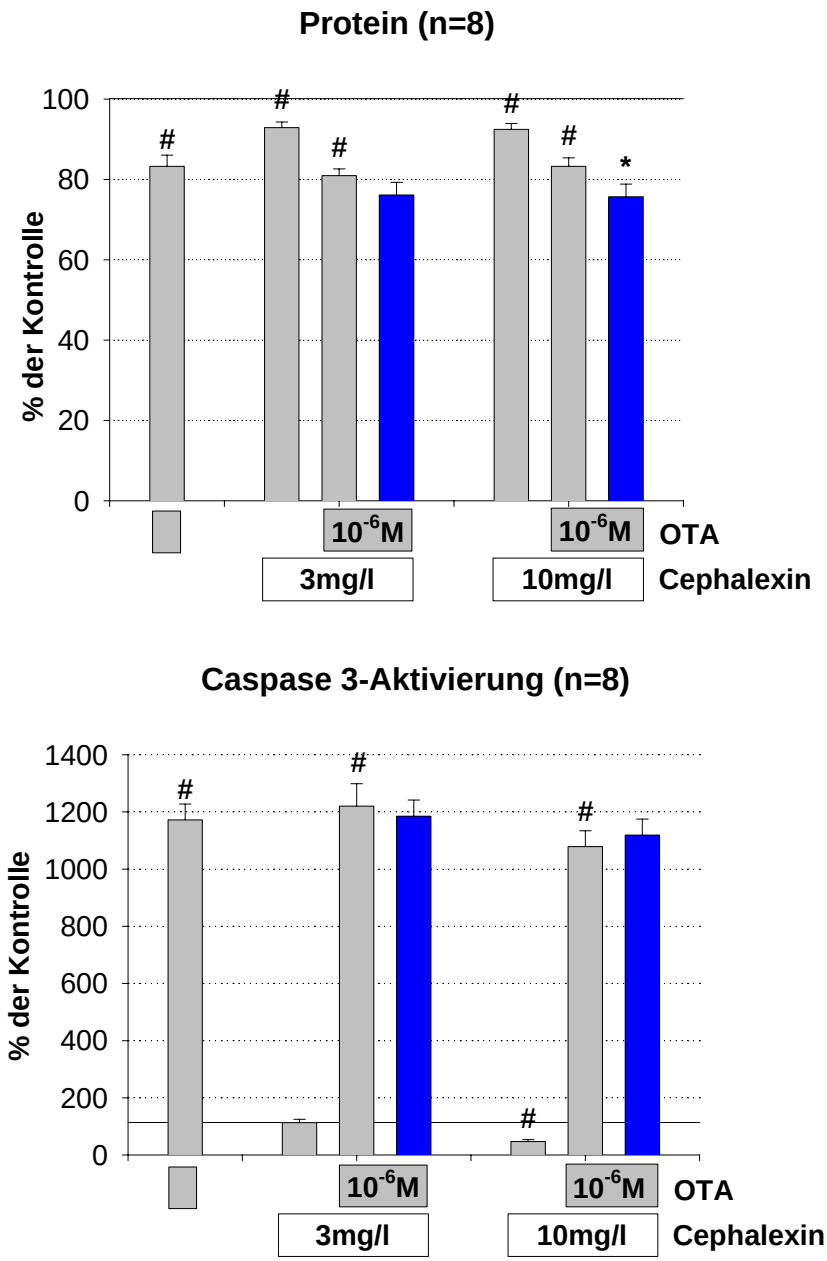
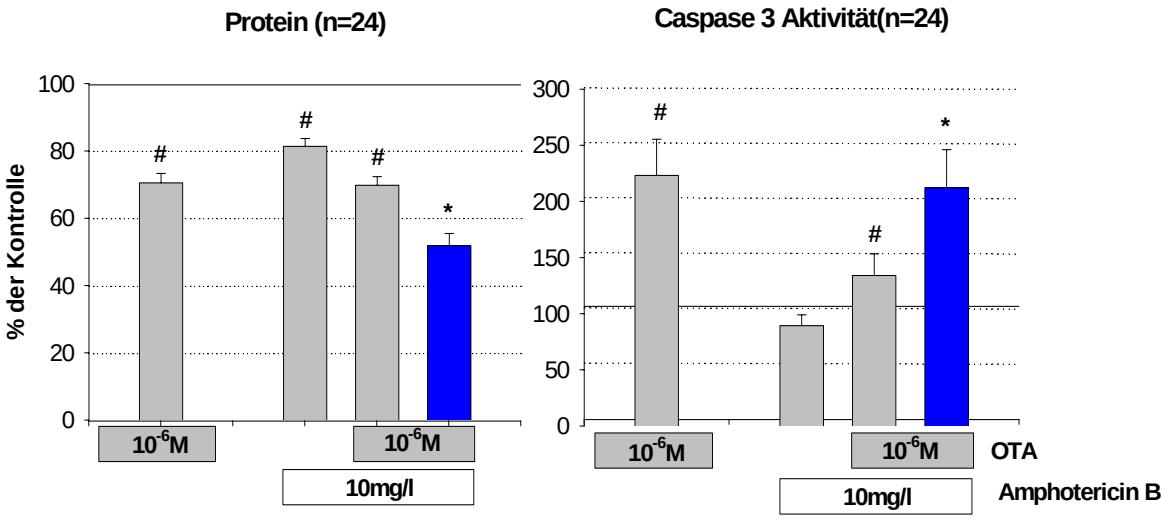
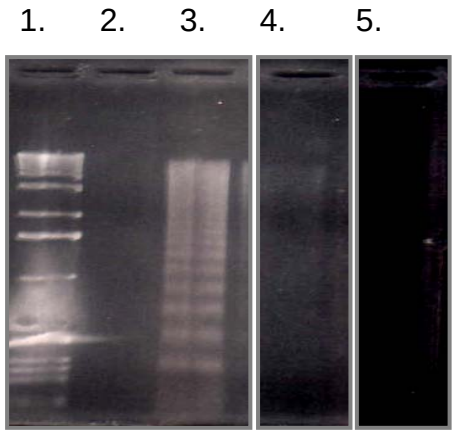


Abb. 7.6. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antibiotikum Cephalexin (bis 10 mg/l). (n=8; $p < 0,05$).
* = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von Amphotericin B bei OTA-Exposition





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Amphotericin B (10mg/l)
5. Ochratoxin A + Amphotericin B

Abb. 7.7. Proteingehalt (linke Graphen) und Caspase-3 Aktivität (rechte Graphen) sowie DNS-Leiter-Bildung in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und dem Antimykotikum Amphotericin B (10 mg/l). (n=24; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von Amphotericin B bei OTA-Exposition

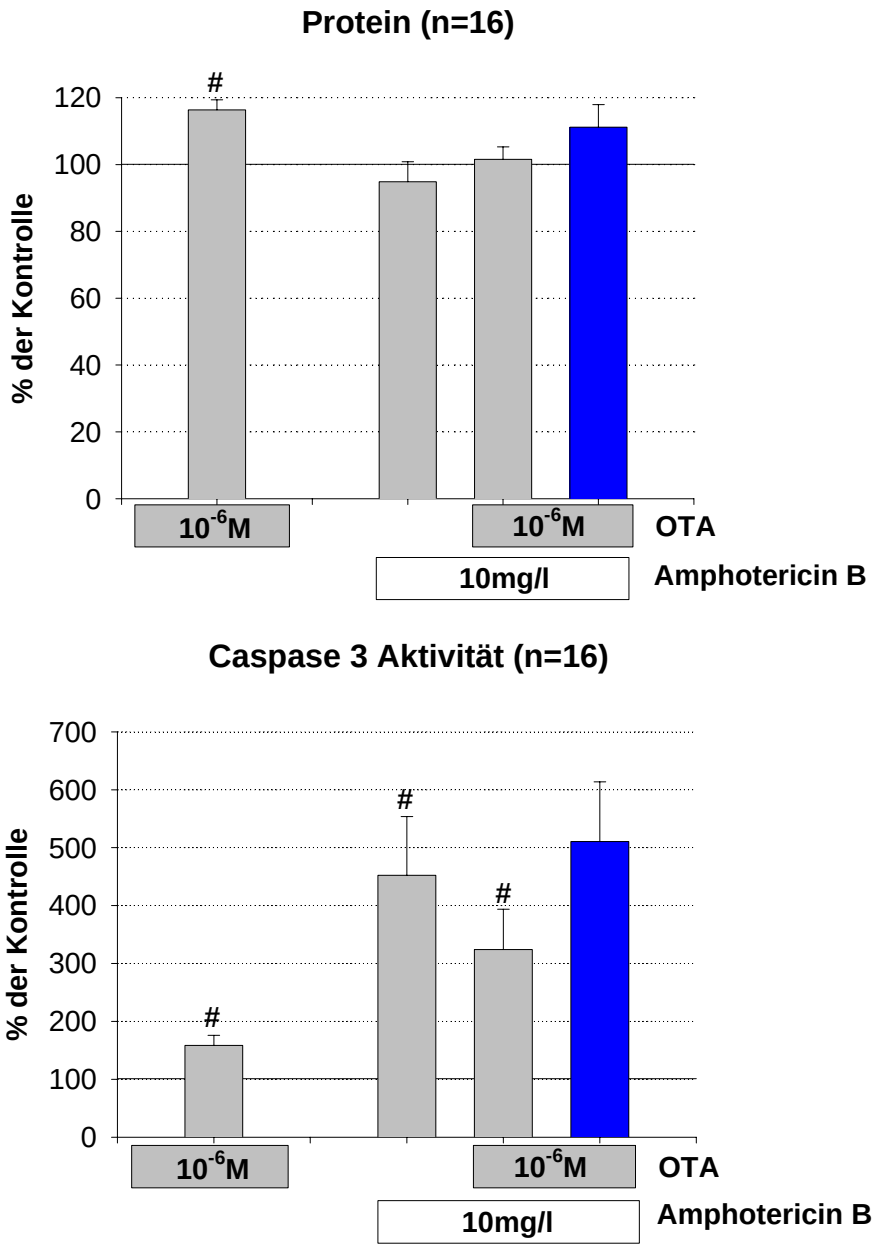
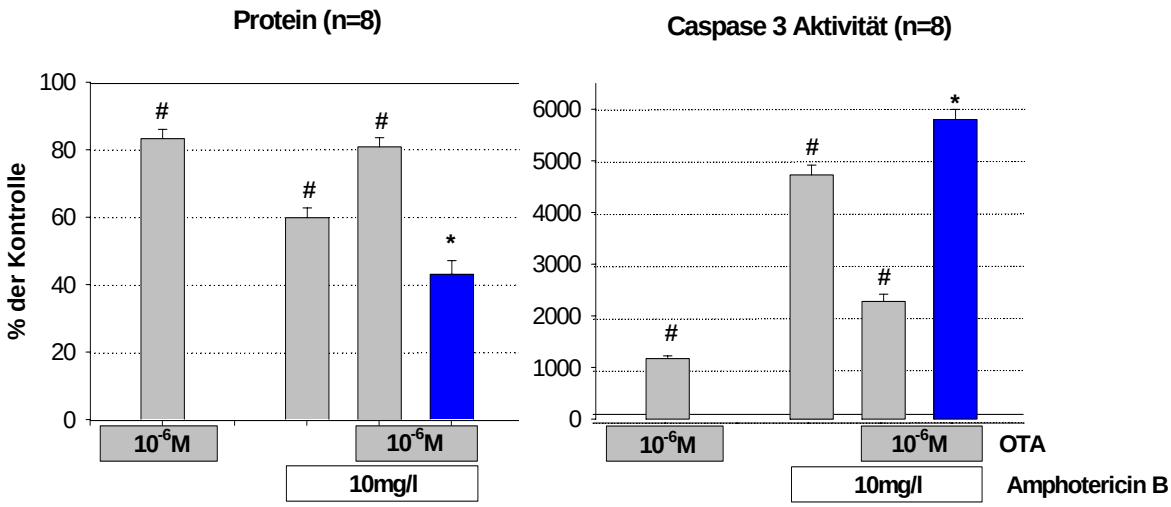
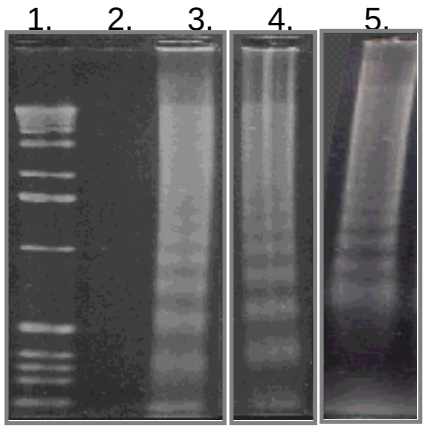


Abb. 7.8. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und Amphotericin B (10 mg/l) (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Amphotericin B bei OTA-Exposition





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Amphotericin B (10mg/l)
5. Amphotericin+Ochratoxin A

Abb. 7.9. Proteingehalt (links oben) und Caspase-3 Aktivität (rechts oben) sowie der DNS-Leiterbildung (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und Amphotericin B (Amphot.) (10 mg/l). (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von Cisplatin bei OTA-Exposition

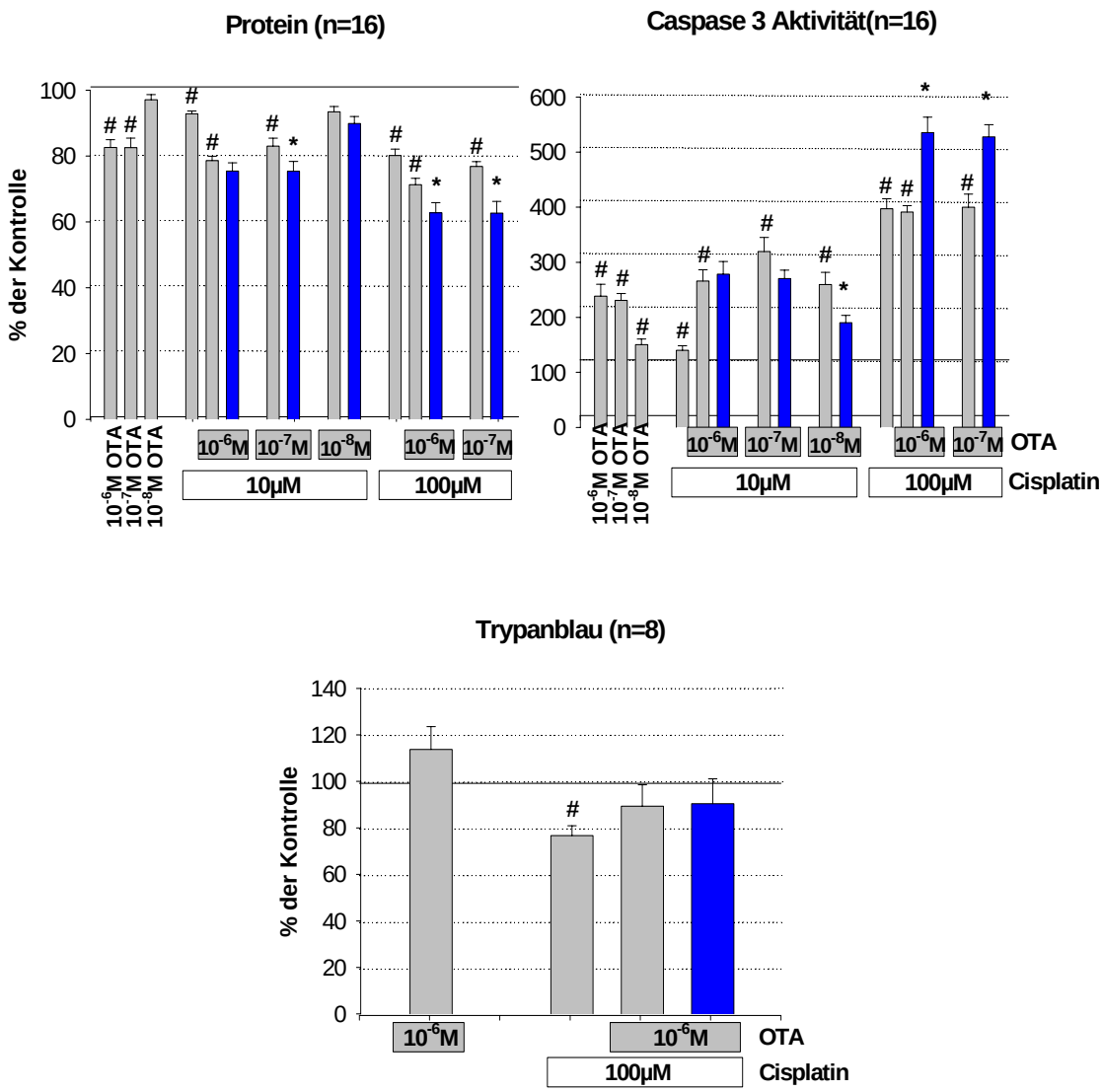


Abb. 7.10. Proteingehalt (links oben) und Caspase-3 Aktivität (rechts oben) sowie Trypanblauaufnahme (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} bis 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) und 10 bzw. 100 µM Cisplatin (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von Cisplatin bei OTA-Exposition I

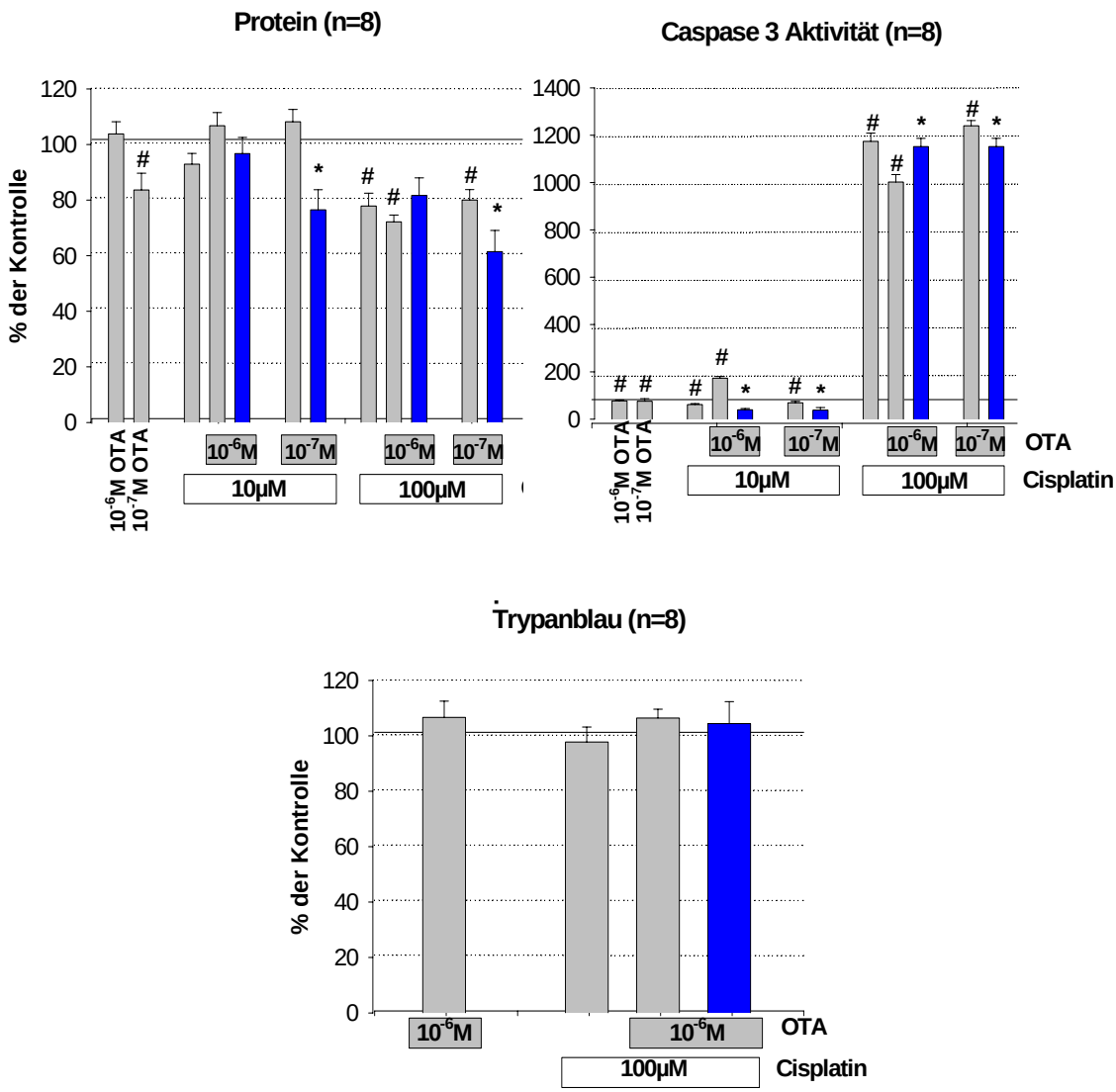
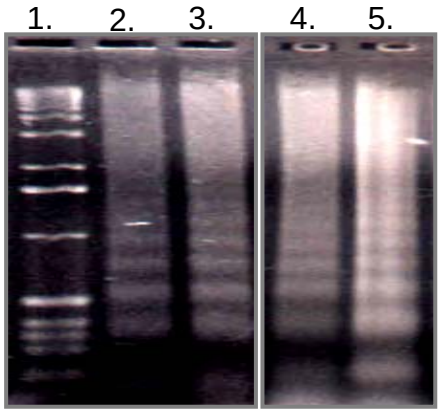
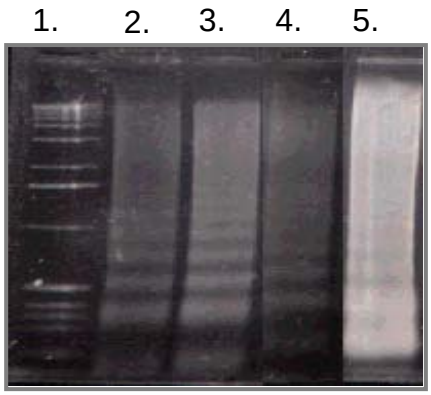


Abb. 7.11a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 10 bzw. 100 µM Cisplatin (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert.
= signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von Cisplatin bei OTA-Exposition II



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Cisplatin (30µM)
5. Cisplatin+Ochratoxin A



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Cisplatin (100µM)
5. Cisplatin+Ochratoxin A

Abb. 7.11b. DNS-Leiterbildung in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 30 (oben) bzw. 100 µM Cisplatin (unten).

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Cisplatin bei OTA-Exposition I

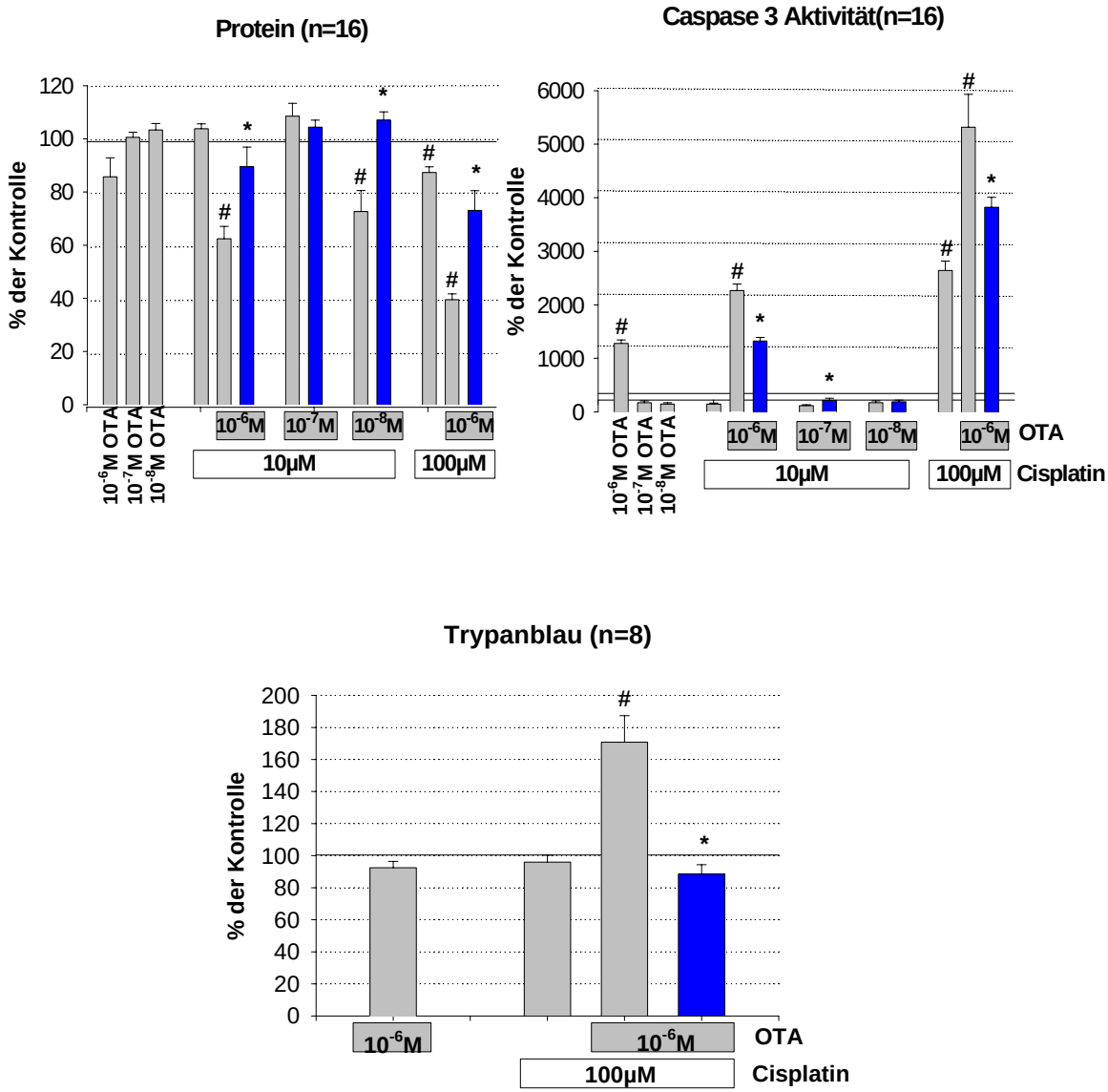
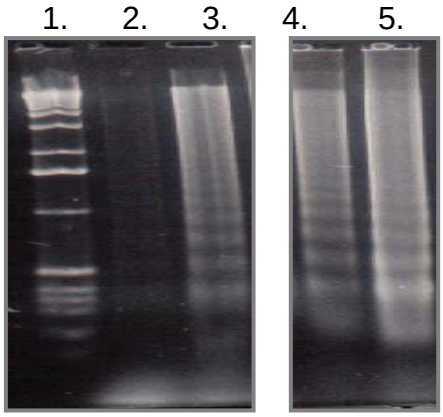
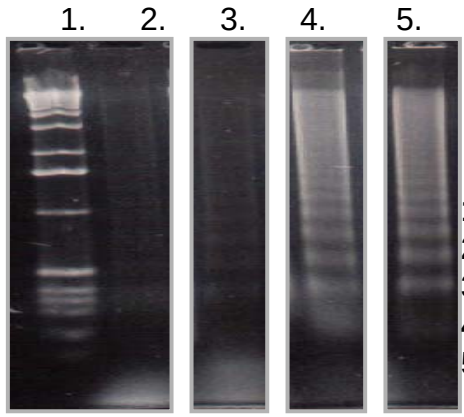


Abb. 7.12a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} bis 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) und 10 bzw. 100 µM Cisplatin (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Cisplatin bei OTA-Exposition II



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. Cisplatin (100µM)
5. Cisplatin+Ochratoxin A



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-8} M)
4. Cisplatin (100µM)
5. Cisplatin+Ochratoxin A

Abb. 7.12b. DNS-Leiterbildung in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} (oben) bis 10^{-8} M (unten) Ochratoxin A (OTA) und 100 µM Cisplatin

IHKE-Zellen:
Wirkung von Cyclosporin A bei OTA-Exposition

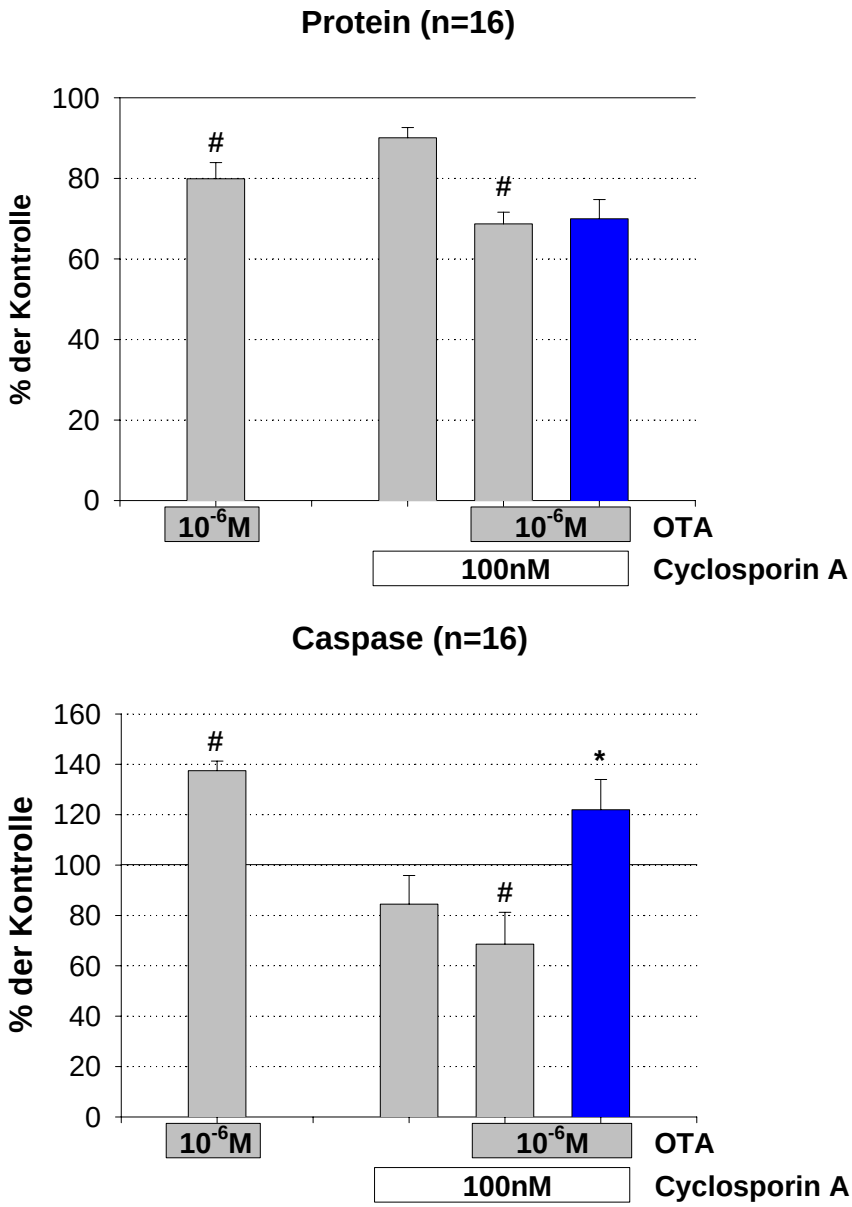


Abb. 7.13. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und Cyclosporin A (100 nM). (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

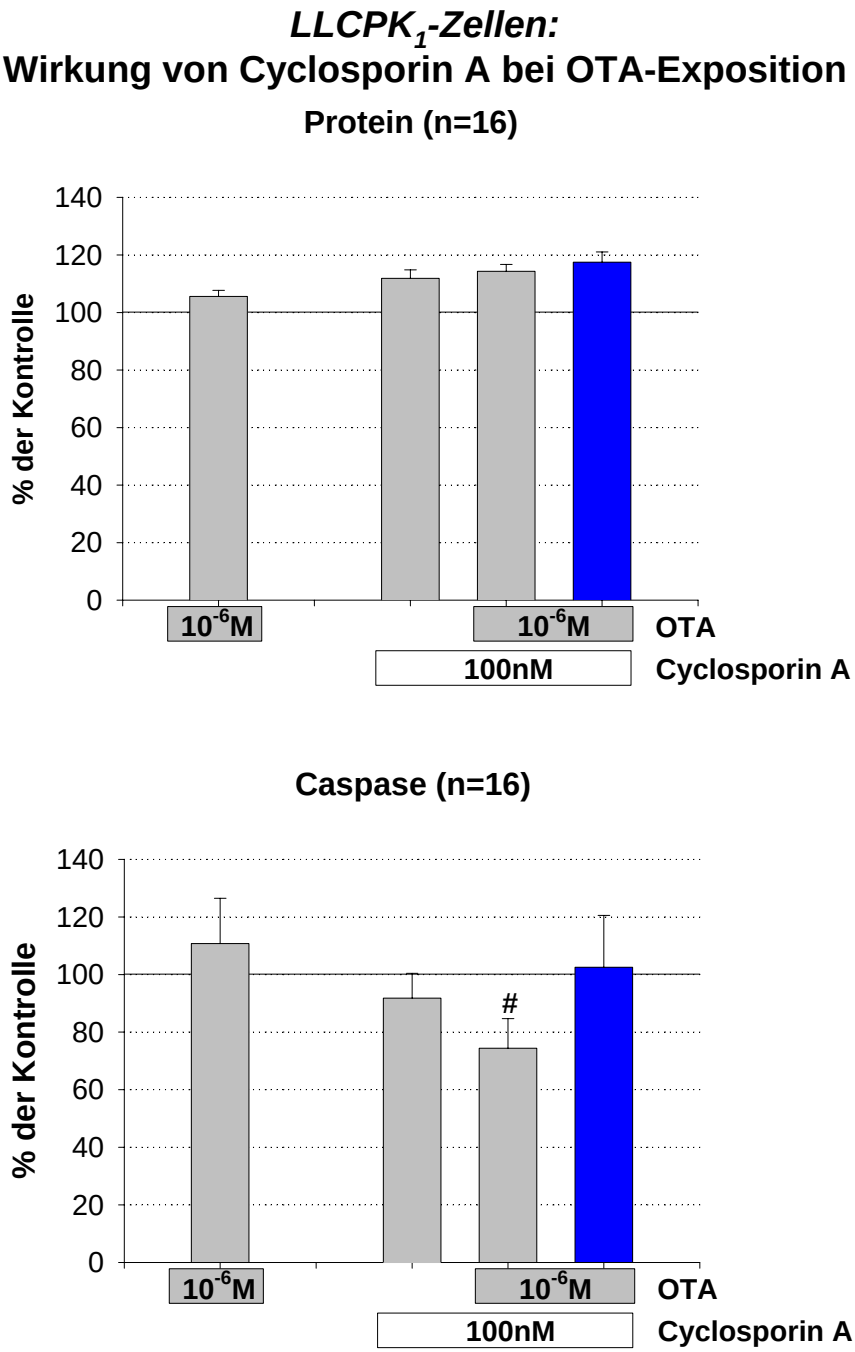
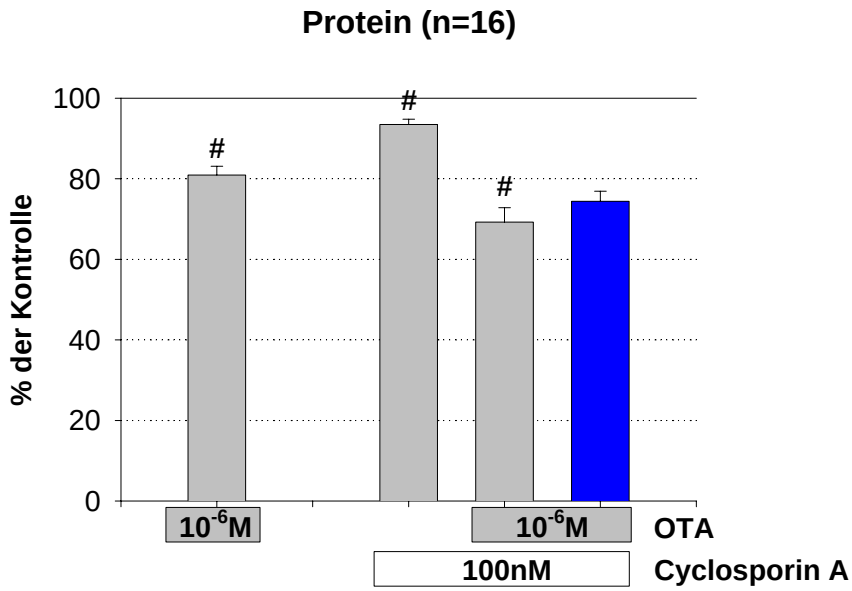


Abb. 7.14. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK_1 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 100 nM Cyclosporin A (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von Cyclosporin A bei OTA-Exposition



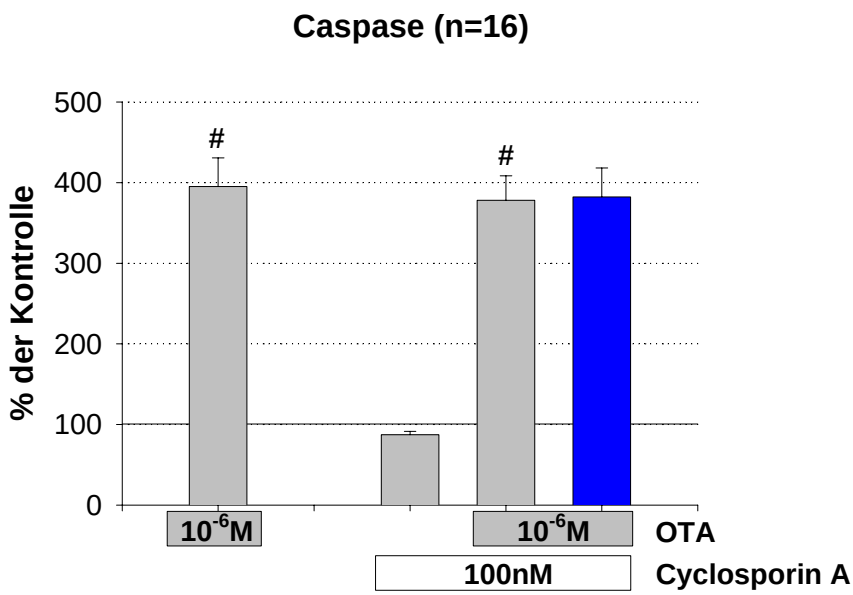
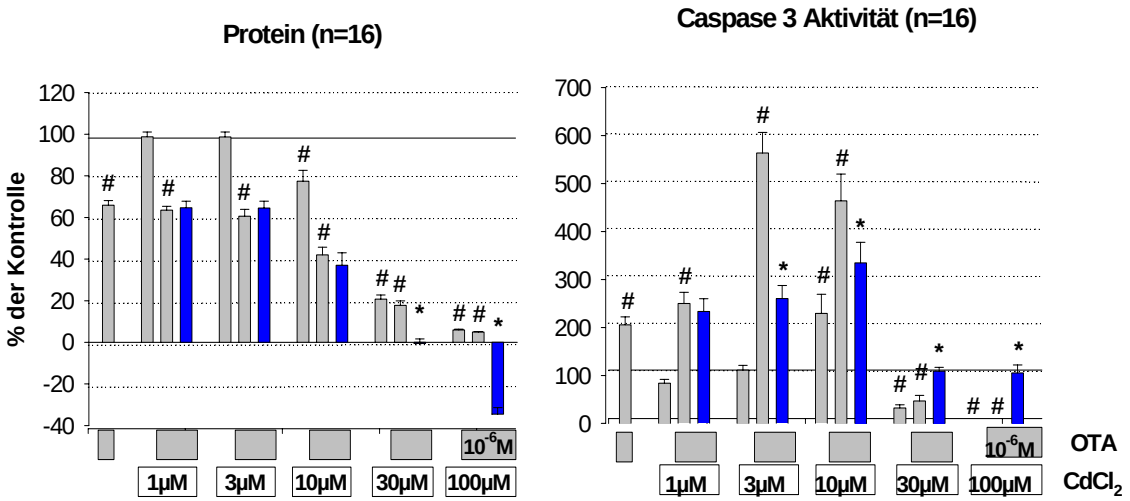
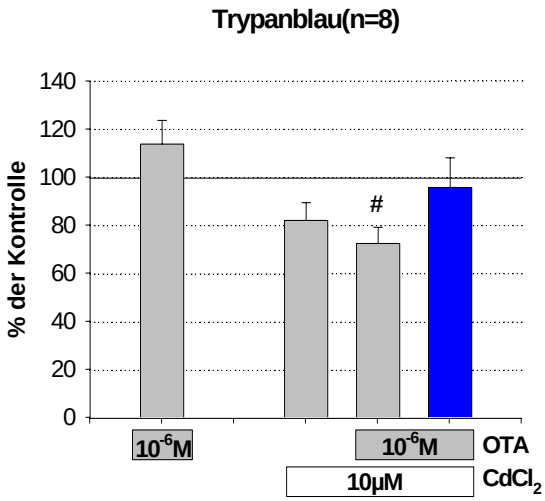
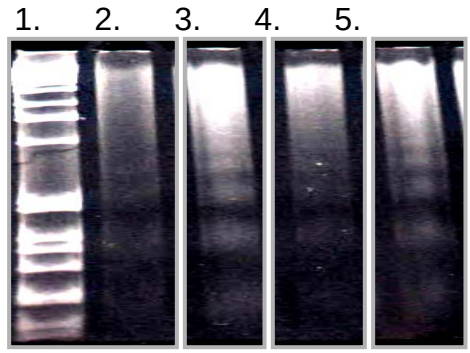


Abb. 7.15. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 100 nM Cyclosporin A (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert.

IHKE-Zellen:
Wirkung von $CdCl_2$ bei OTA-Exposition (10^{-6} M)



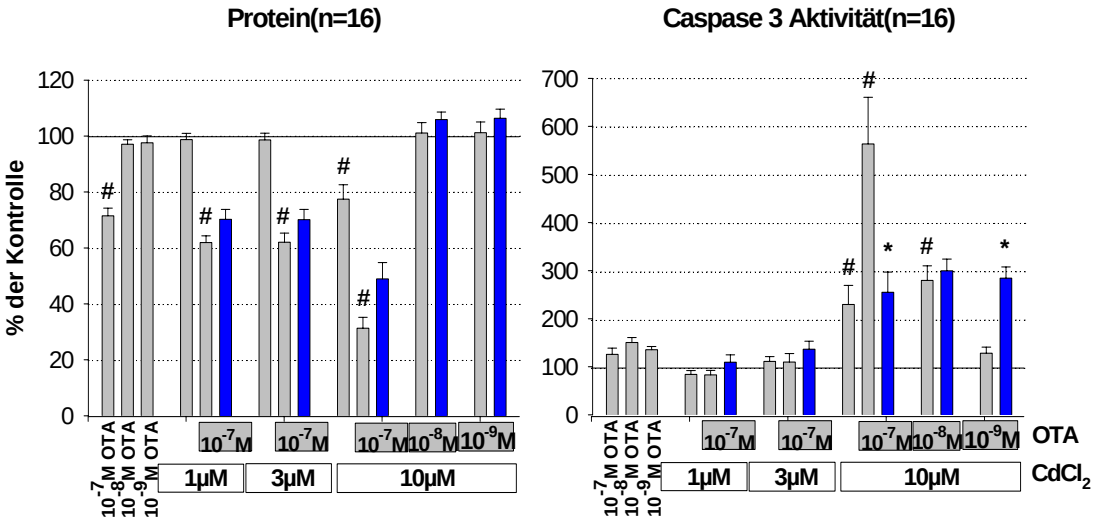


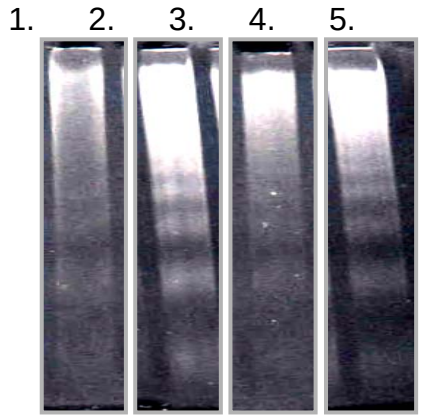


1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. $CdCl_2$ (10µM)
5. $CdCl_2$+Ochratoxin A

Abb. 7.16a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten links) und DNS-Leiterbildung (unten rechts) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 bis 100 µM $CdCl_2$ (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zwischen Messung und Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von $CdCl_2$ bei OTA-Exposition (10^{-7} bis 10^{-9} M)





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-7} M)
4. CdCl2 (10µM)
5. CdCl2+Ochratoxin A

Abb. 7.16b. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie DNS-Leiterbildung (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} bis 10^{-9} M Ochratoxin A (OTA) und 1 bis 10 µM $CdCl_2$ (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$).
* = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zwischen Messung und Kontrolle.

LLCPK1-Zellen:
Wirkung von $CdCl_2$ bei OTA-Exposition

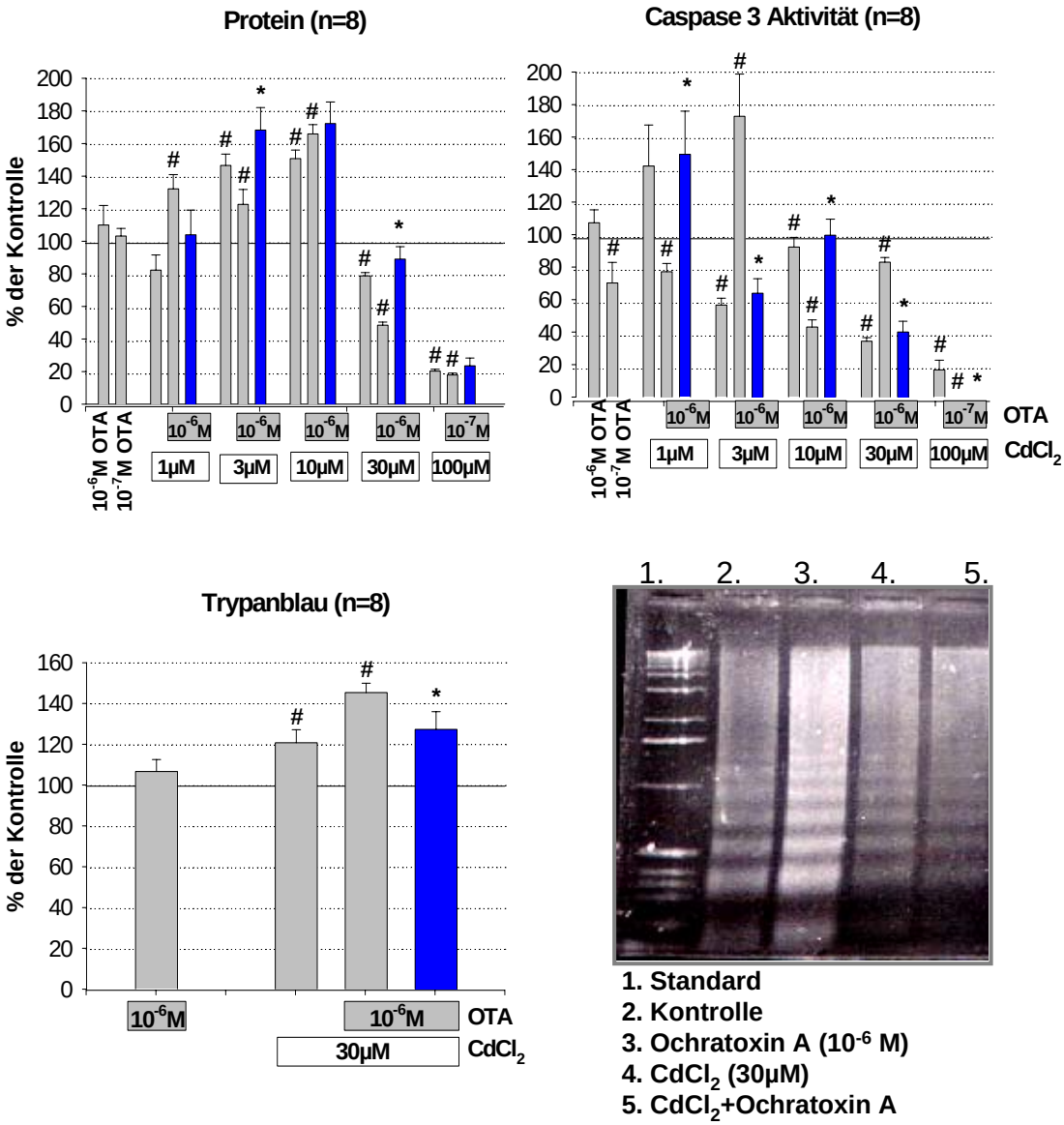


Abb. 7.17. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten links) und DNS-Leiterbildung (unten rechts) in LLC-PK_1 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 bis 100 µM $CdCl_2$ (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von $CdCl_2$ bei OTA-Exposition (10^{-6} M)

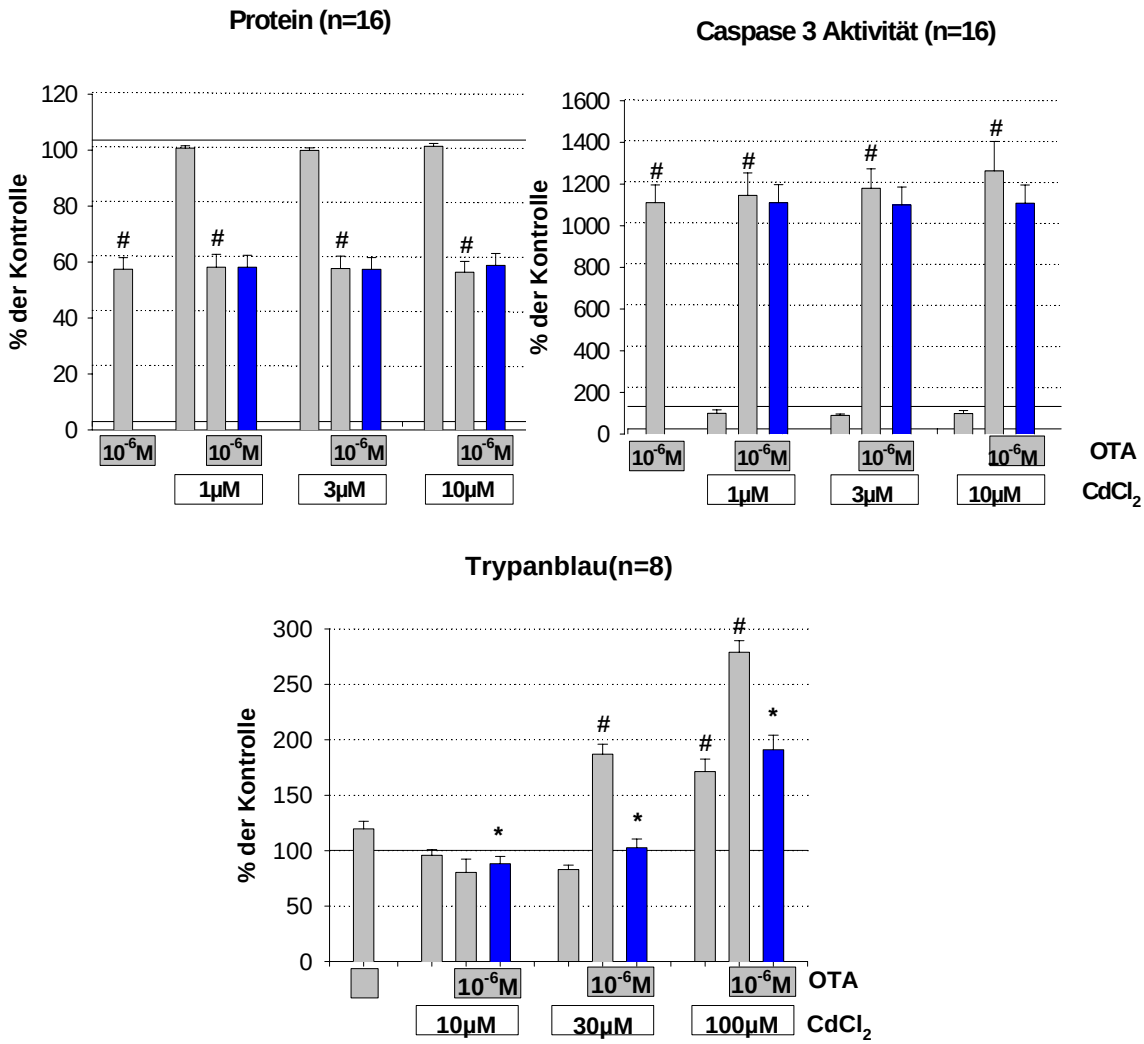
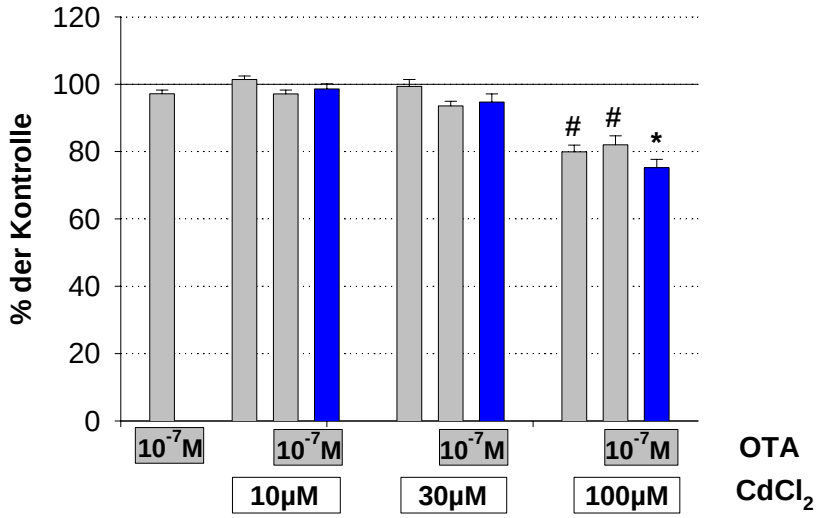


Abb. 7.18a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 bis 10 µM $CdCl_2$. (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von $CdCl_2$ bei OTA-Exposition (10^{-7} M)
Protein (n=16)



Caspase 3 Aktivität (n=16)

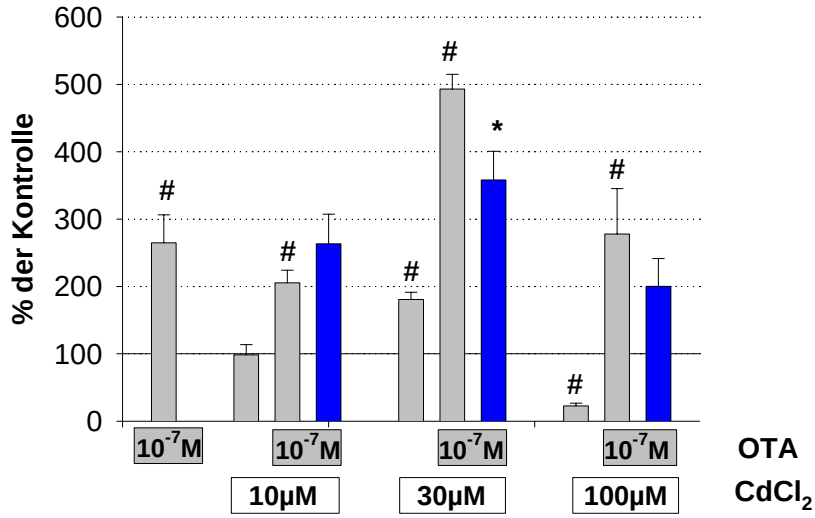
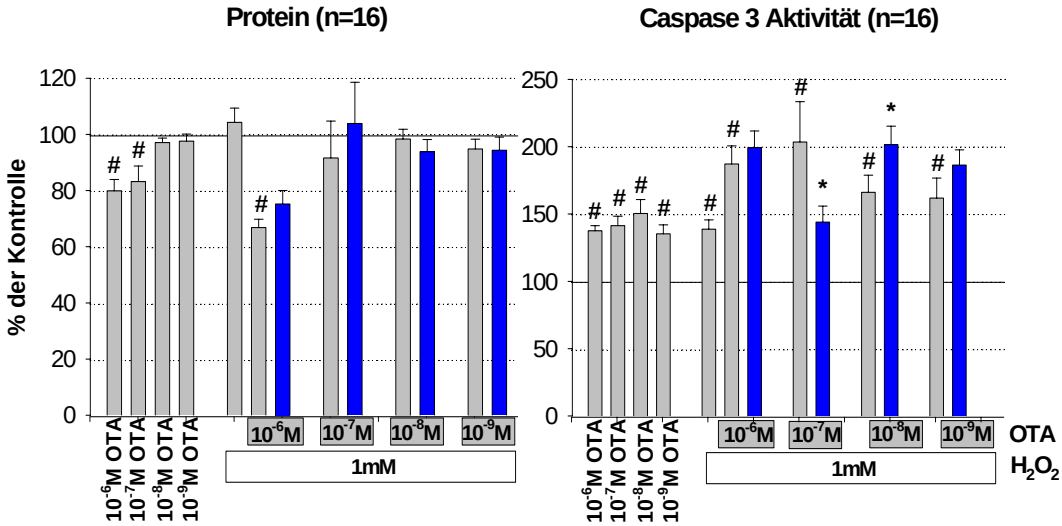
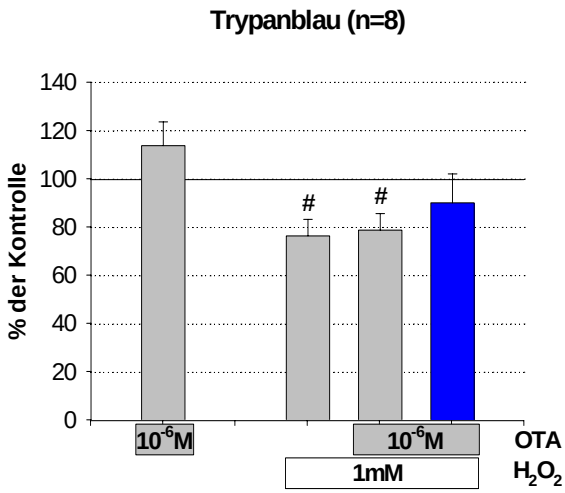
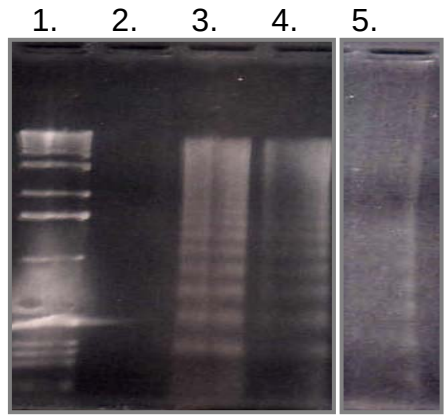


Abb. 7.18b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} M Ochratoxin A (OTA) und 10 bis 100 µM $CdCl_2$. (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von 1mM H_2O_2 bei OTA-Exposition



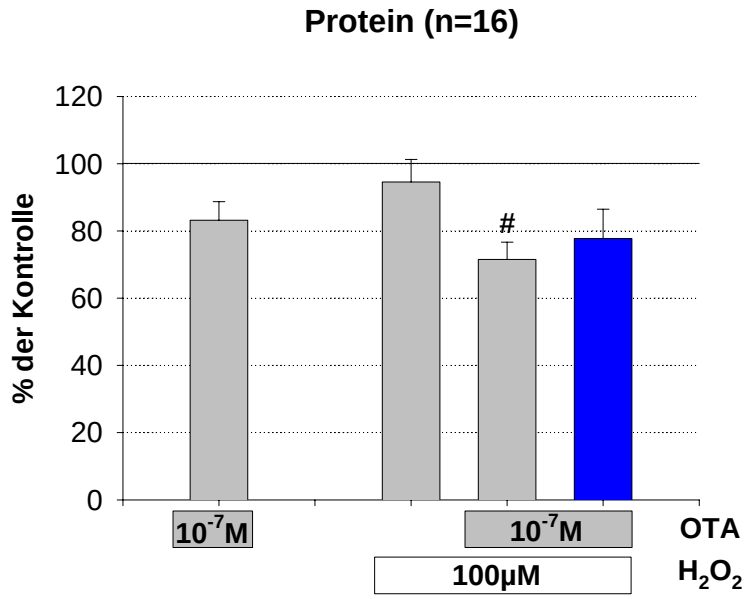




1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. H_2O_2 (1mM)
5. H_2O_2+Ochratoxin A

Abb. 7.19a. Proteingehalt (links oben) und Caspase-3 Aktivität (rechts oben) sowie Trypanblauaufnahme (unten links) und DNS-Leiterbildung (unten rechts) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} bis 10^{-9} M Ochratoxin A (OTA) und1 mM H_2O_2. (n=16 bzw 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von 100µM H_2O_2 bei OTA-Exposition



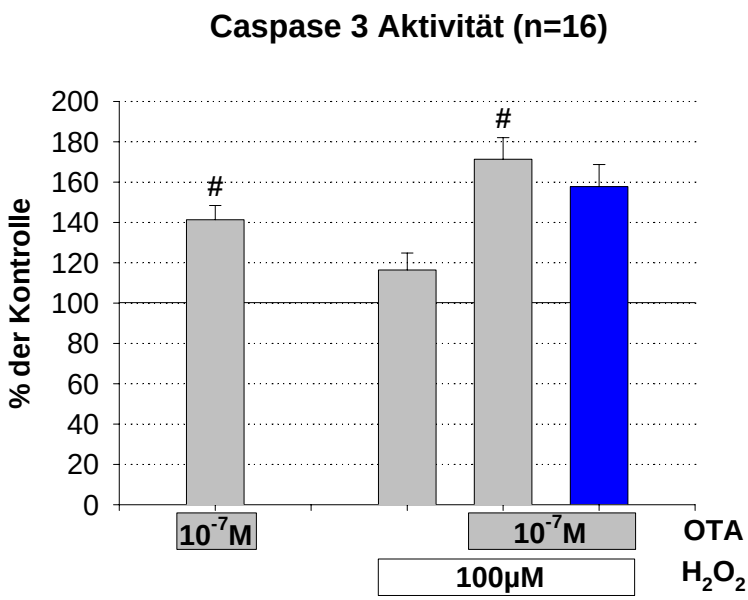


Abb. 7.19b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} M Ochratoxin A (OTA) und 100 µM H_2O_2 in IHKE-Zellen. (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen
Wirkung von 1mM H_2O_2 bei OTA-Exposition

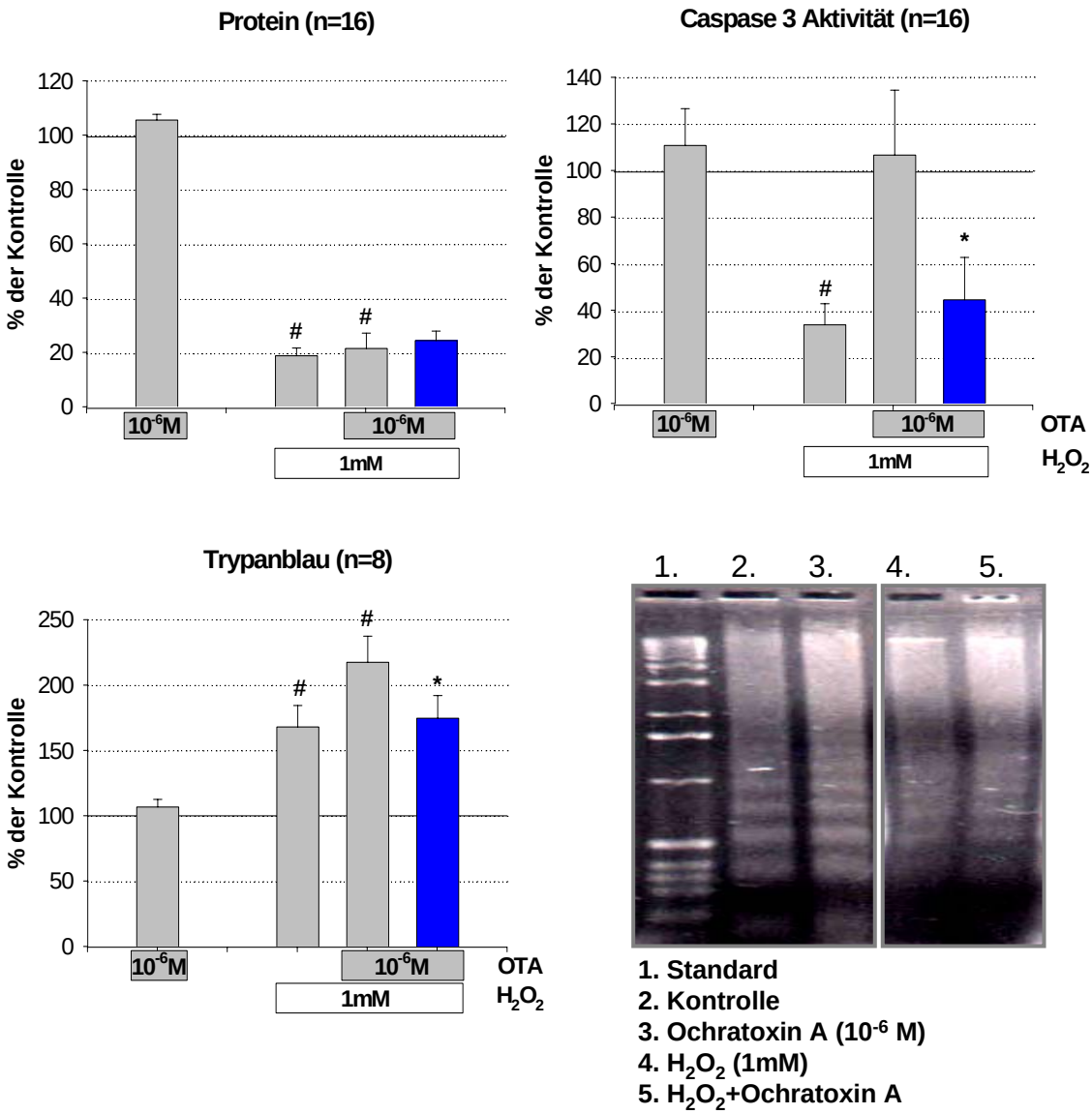


Abb. 7.20a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten links) und DNS-Leiterbildung (unten rechts) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2 (n=16 bzw. 8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von 100µM H_2O_2 bei OTA-Exposition

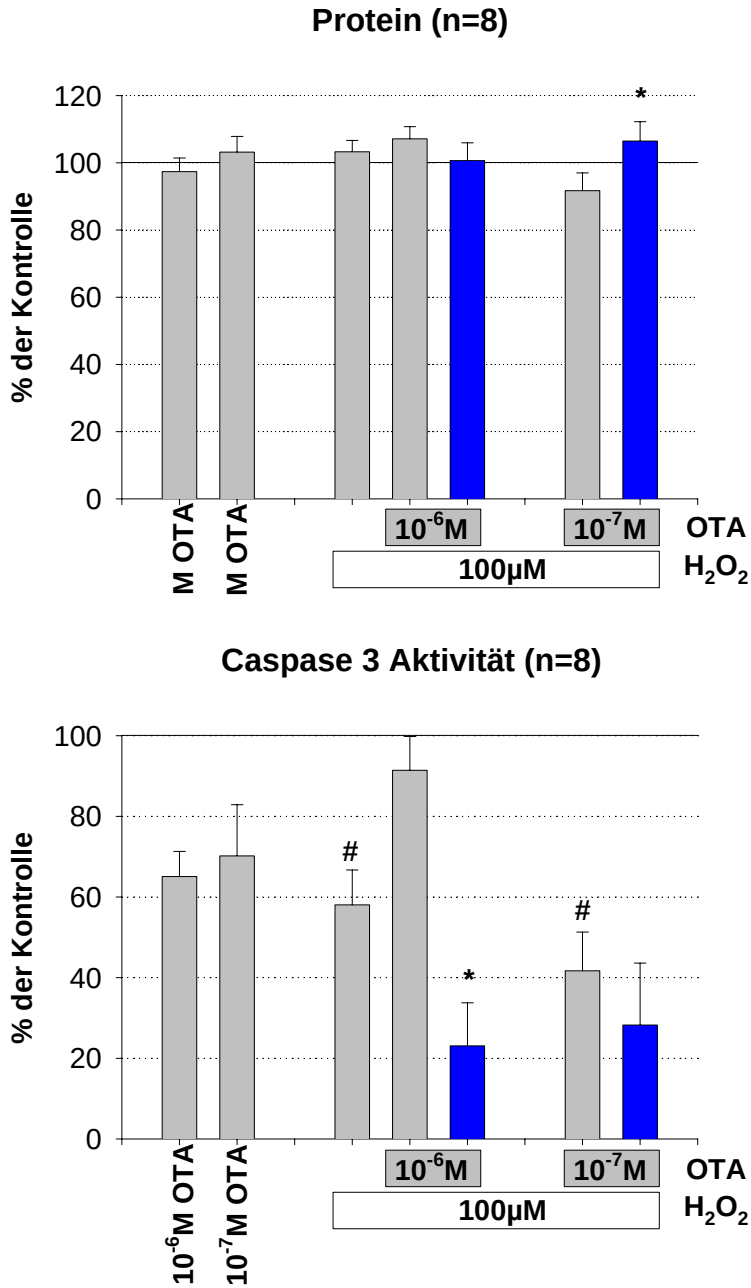


Abb. 7.20b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} und 10^{-7} M Ochratoxin A (OTA) und 100 µM H_2O_2 (n=8; $p < 0{,}05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von H_2O_2 bei OTA-Exposition I

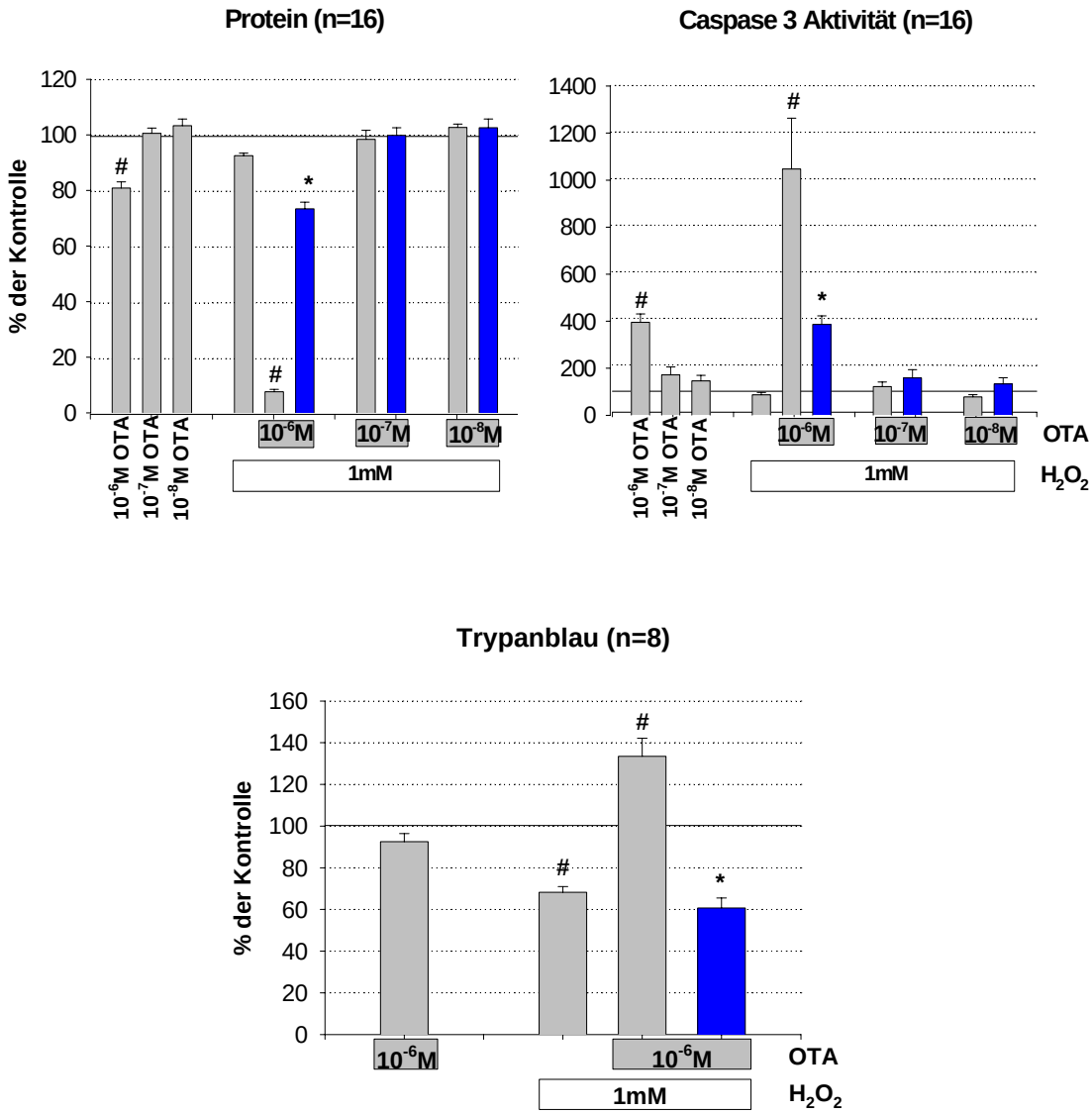
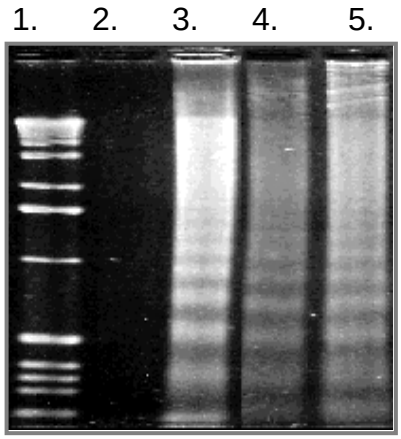
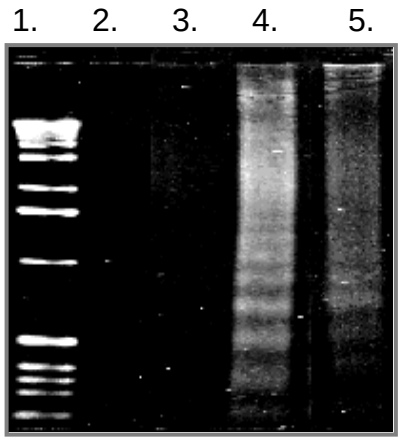


Abb. 7.21a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} bis 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2 (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von H_2O_2 bei OTA-Exposition II



1. Standard
2. Kontrollle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. H_2O_2 (1mM)
5. H_2O_2+Ochratoxin A



1. Standard
2. Kontrollle
3. Ochratoxin A (10^{-8} M)
4. H_2O_2 (1mM)
5. H_2O_2+Ochratoxin A

Abb. 7.21b. DNS-Leiterbildung in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} (oben) und 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2.

IHKE-Zellen:
Wirkung von Angiotensin II bei OTA-Exposition

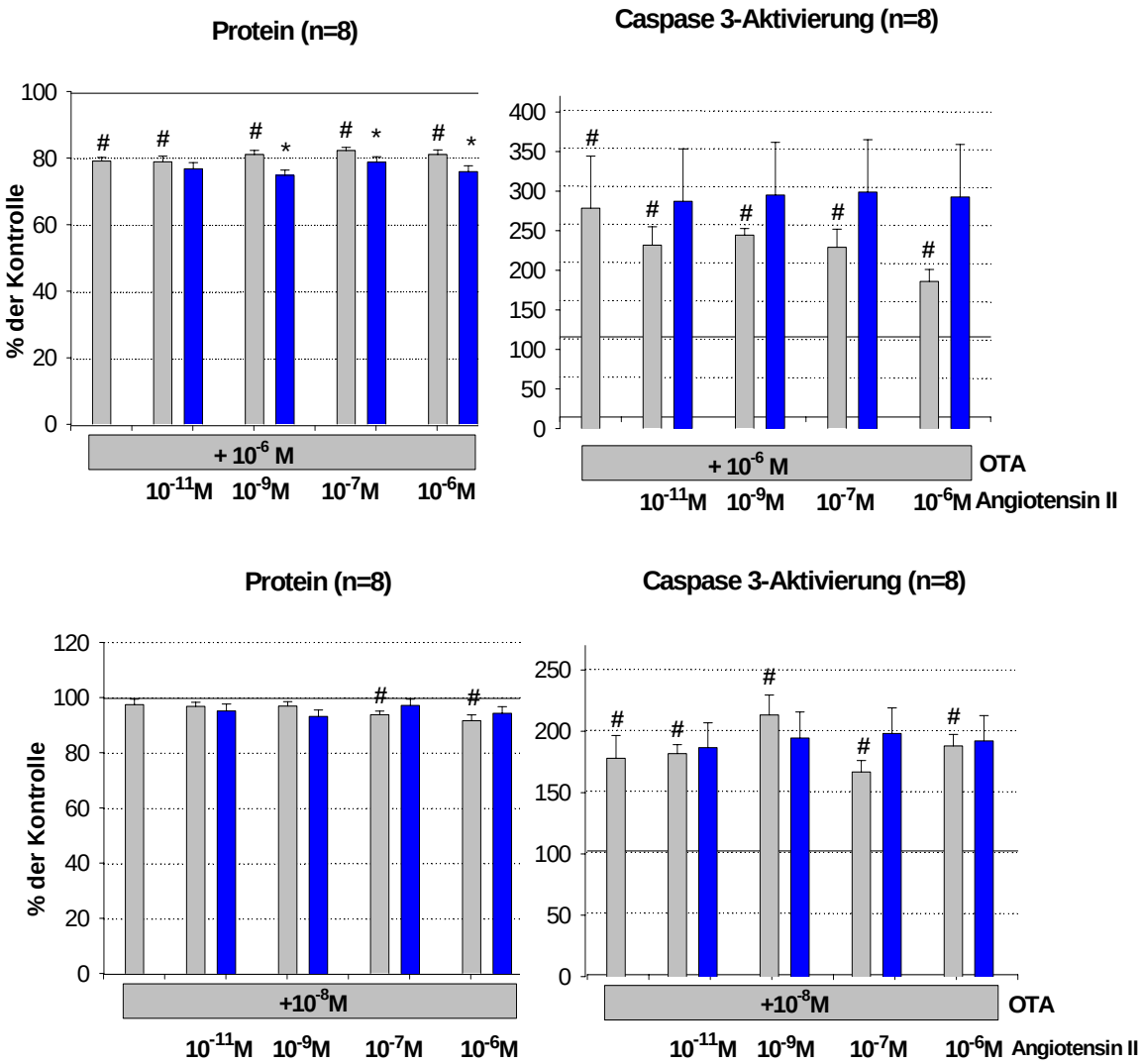
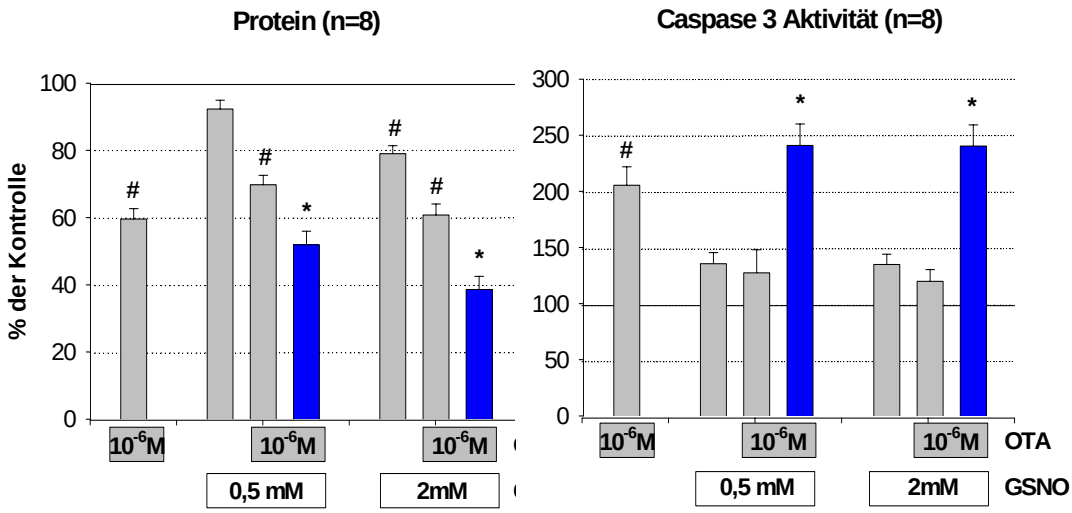
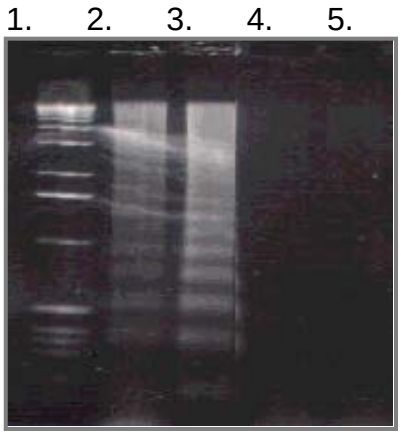


Abb. 7.22. Proteingehalt (linke Graphen) und Caspase-3 Aktivität (rechte Graphen) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} (oben) bzw. 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) (unten) und 10^{-11} bis 10^{-6} M Angiotensin II (n=8; $p < 0,05$). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden nur die Meßergebnisse für OTA alleine , nicht jedoch für Angiotensin II allein dargestellt. * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen Kombinatioinswert (grau). # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von GSNO bei OTA-Exposition

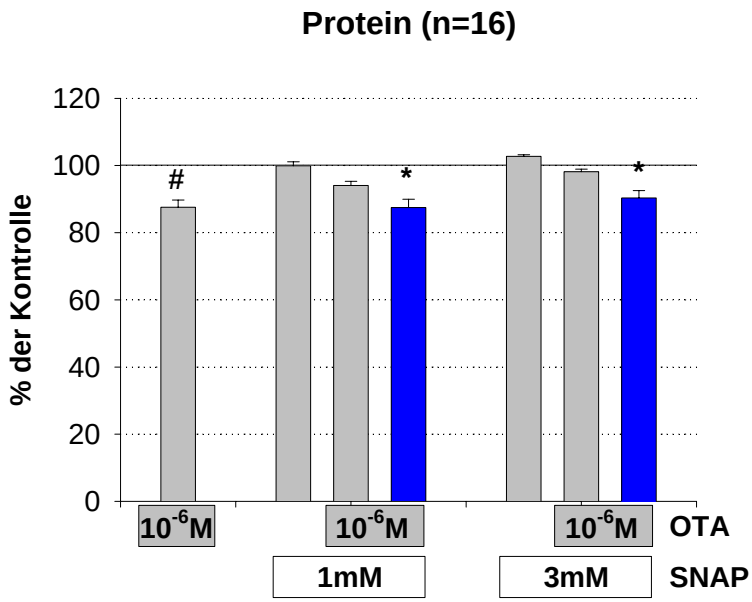




1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. GSNO (2mM)
5. GSNO+Ochratoxin

Abb. 7.23a. Proteingehalt (links oben) und Caspase-3 Aktivität (rechts oben) sowie DNS-Leiterbildung (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 2 mM GSNO. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zwischen Messung und Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von SNAP bei OTA-Exposition



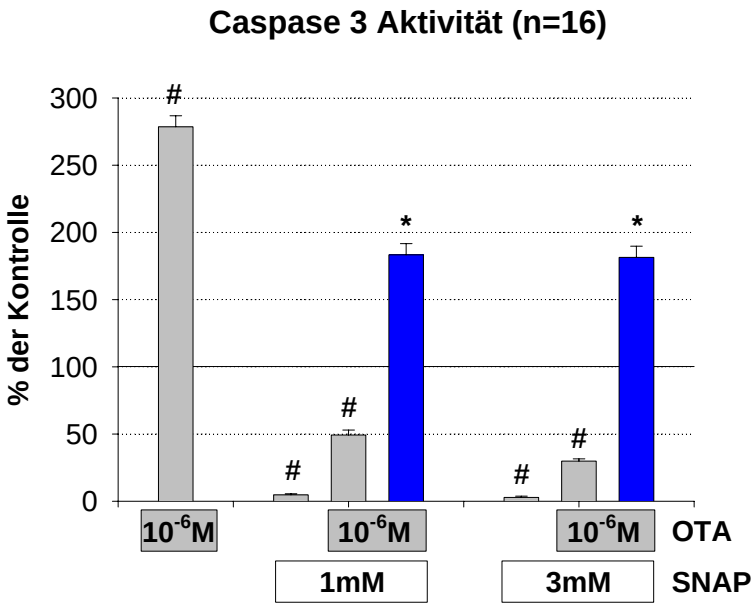
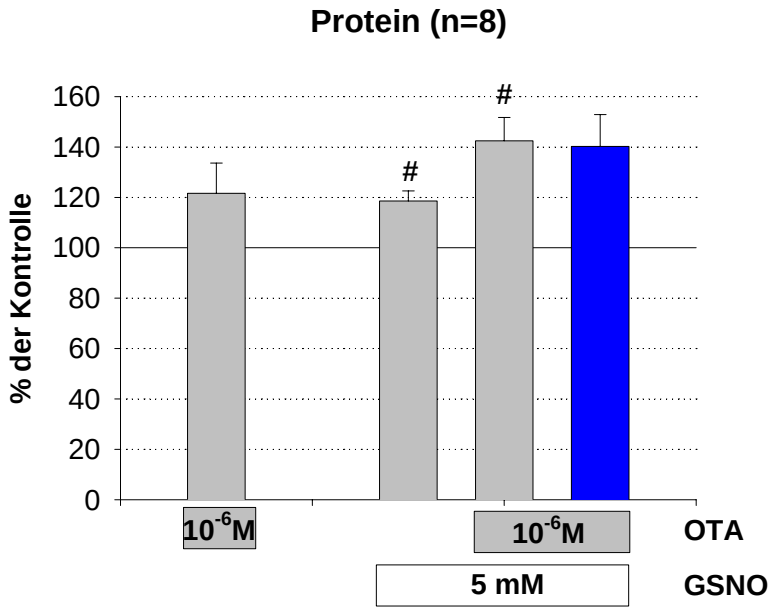


Abb. 7.23b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (oben) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 und 3 mM SNAP (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zwischen Messung und Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von GSNO bei OTA-Exposition



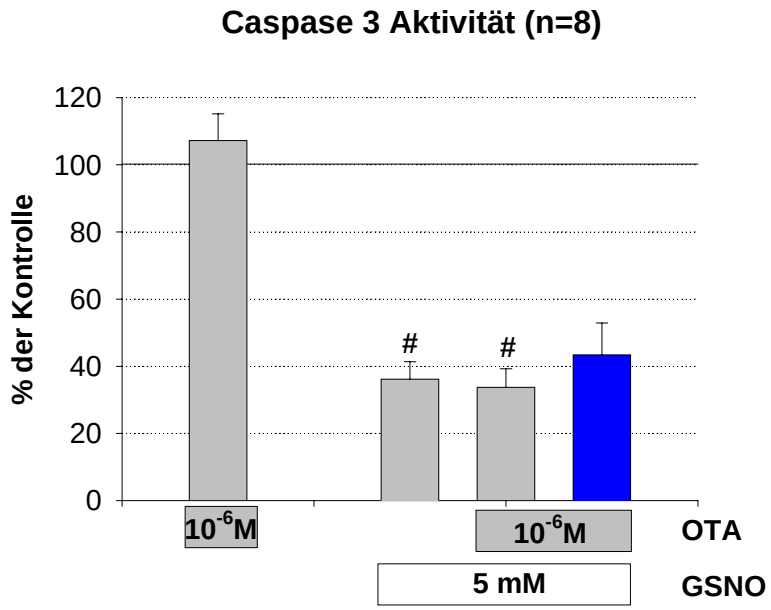


Abb. 7.24a. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 5 mM GSNO (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung von SNAP bei OTA-Exposition

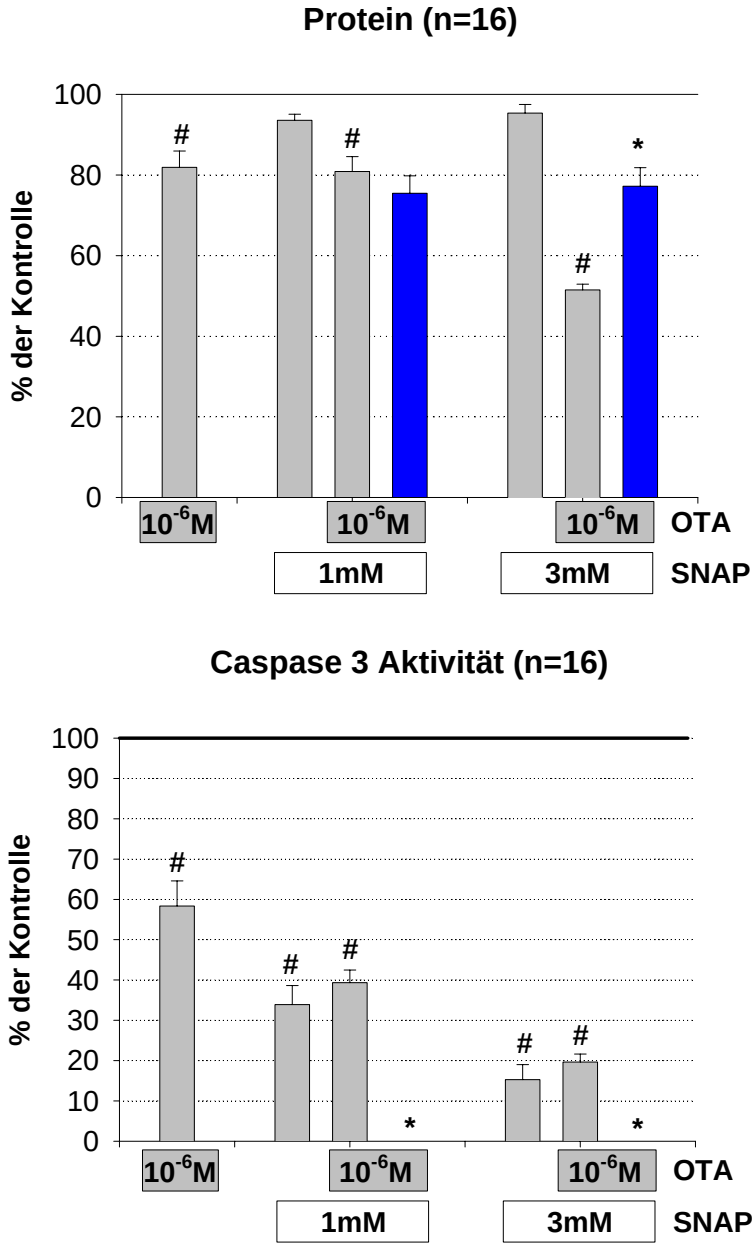
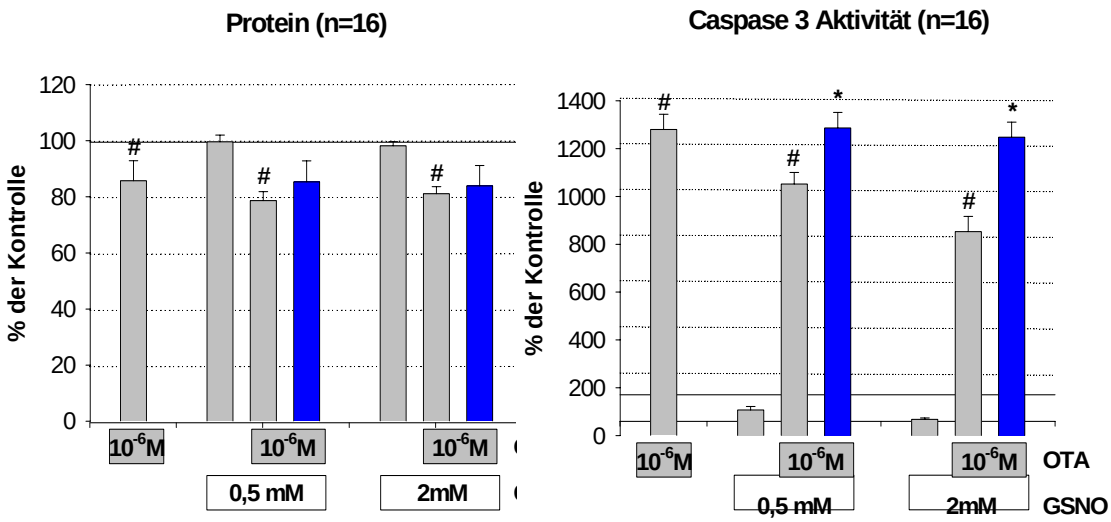
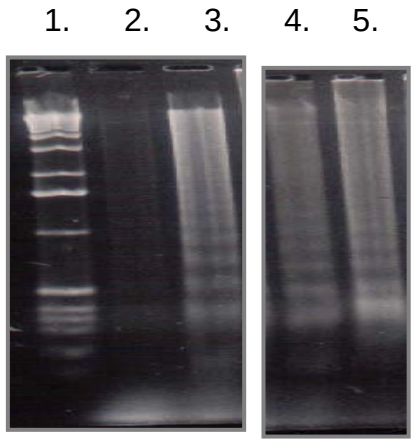


Abb. 7.24b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 bzw. 3 mM SNAP (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert.# = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von GSNO bei OTA-Exposition





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. GSNO (2mM)
5. GSNO+Ochratoxin A

Abb. 7.25. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie DNS-Leiterbildung (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 0,5 bzw. 2 mM GSNO (n=16; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition I

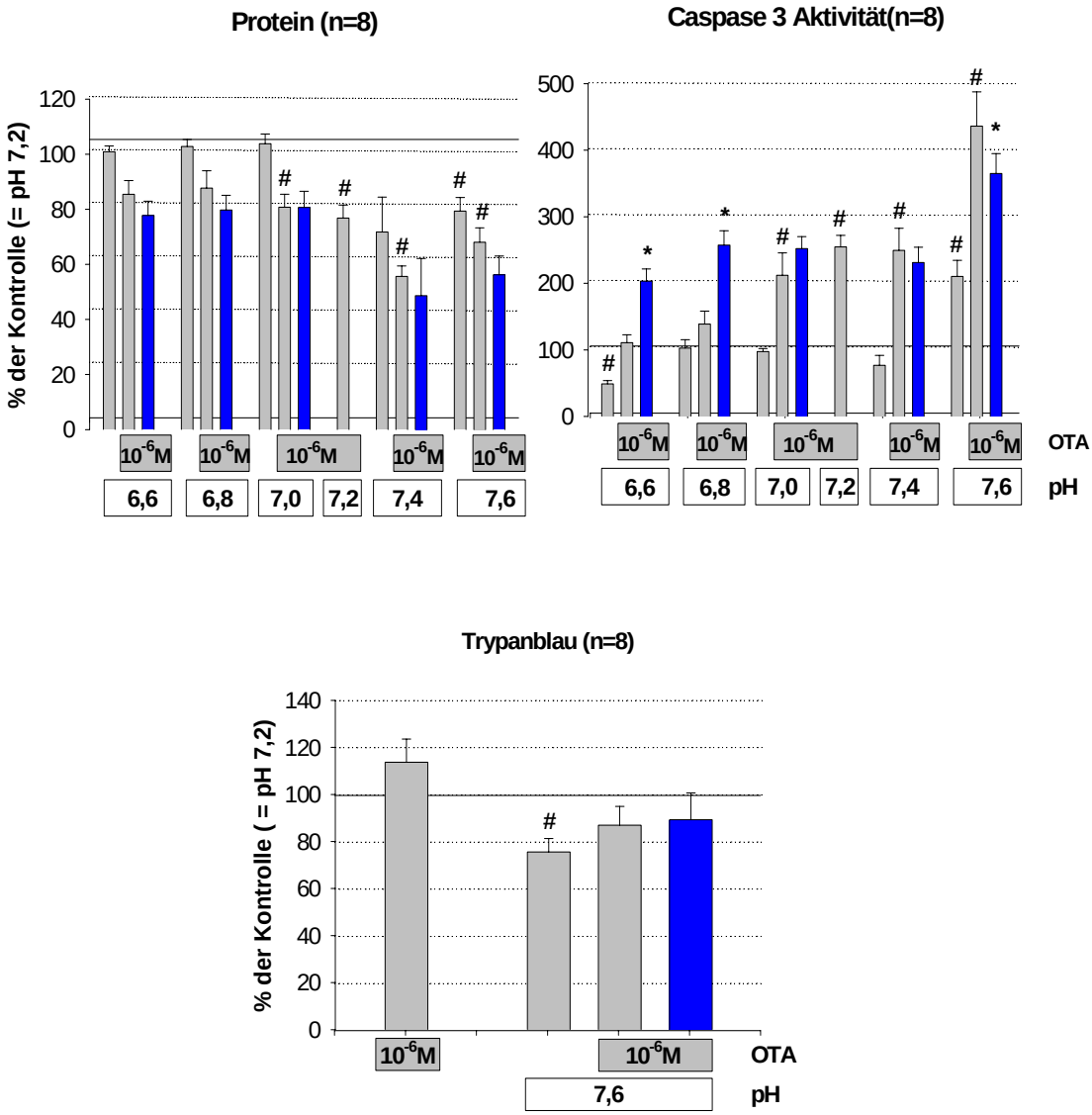
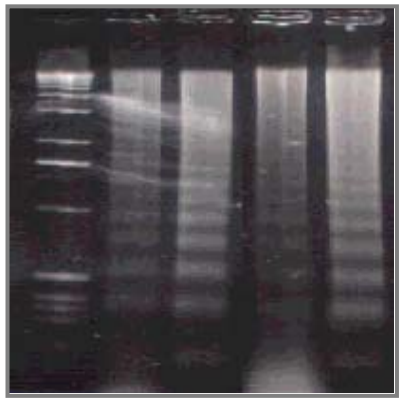


Abb. 7.26a. Proteingehalt (links oben) und Caspase-3 Aktivität (rechts oben) sowie Trypanblauaufnahme (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und verschiedenen pH-Werten. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

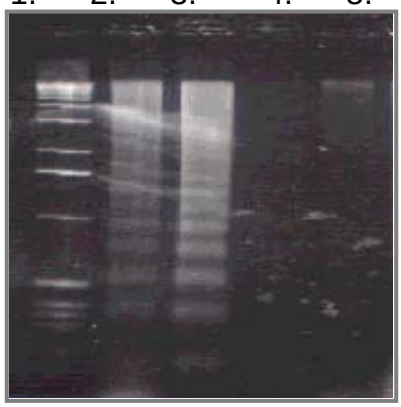
IHKE-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition II

1. 2. 3. 4. 5.



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. pH 7,6
5. pH 7,6+Ochratoxin A

1. 2. 3. 4. 5.



1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. pH 6,6
5. pH 6,6+Ochratoxin A

Abb. 7.26b. DNS-Leiterbildung in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) bei pH 7,6 (oben) bzw. pH 6,6 (unten).

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition (10^{-6} M)

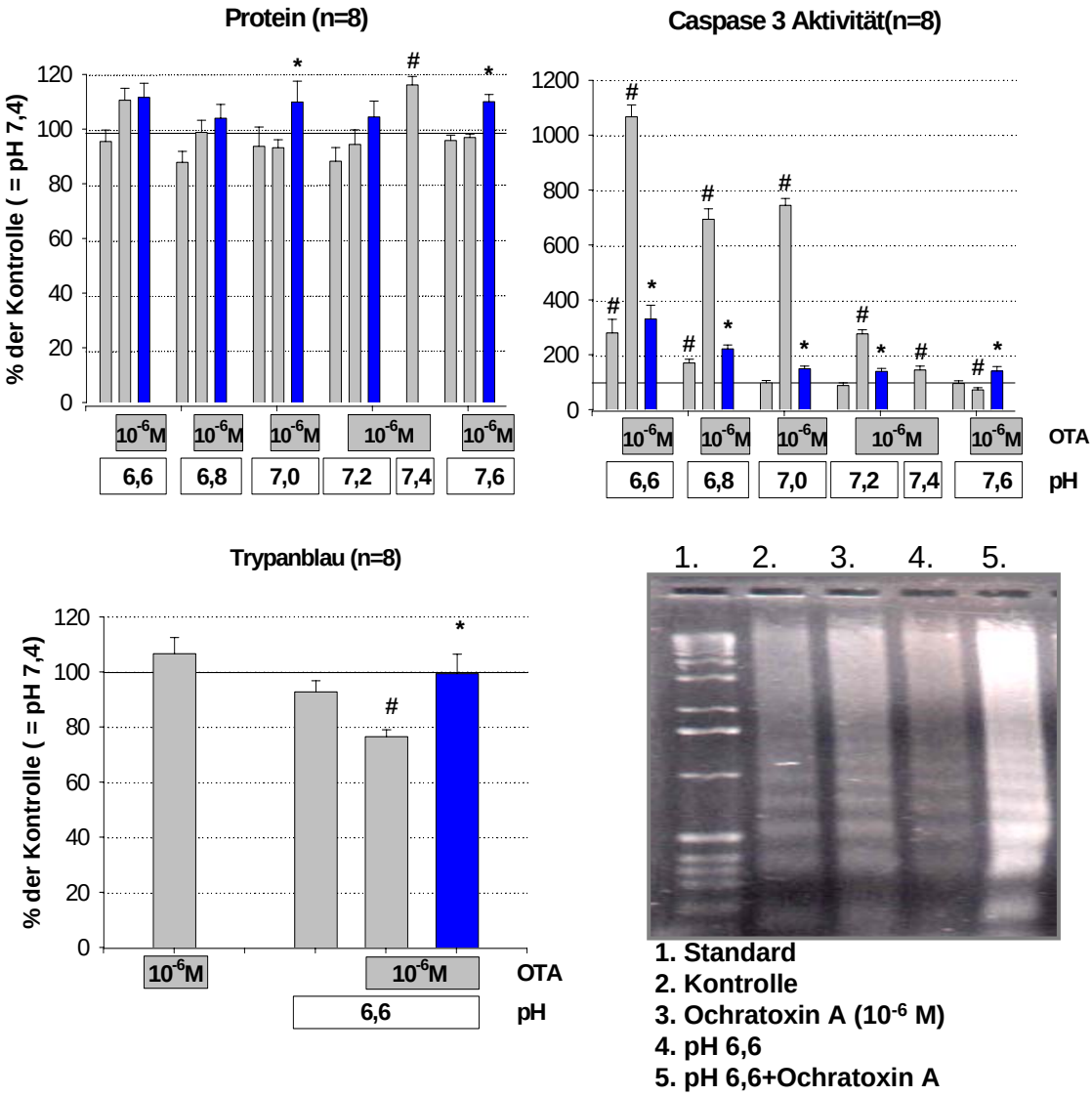
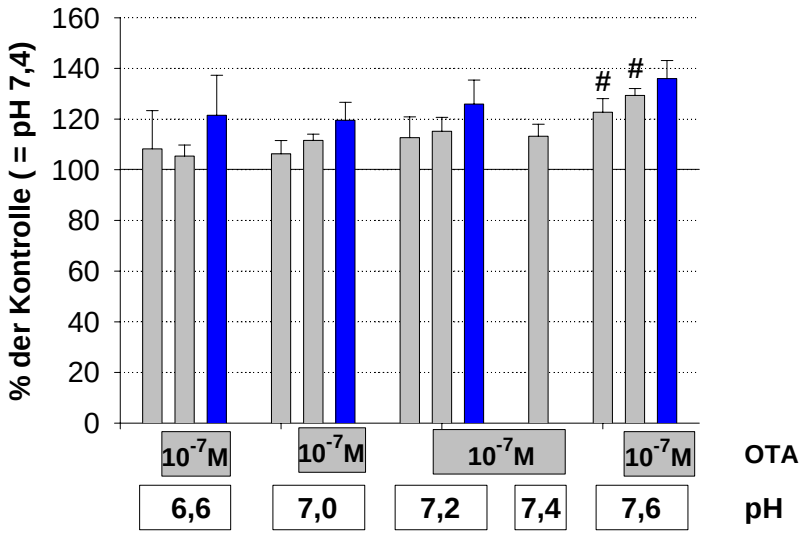


Abb. 7.27a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme (unten links) und DNS-Leiterbildung (unten rechts) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und verschiedenen pH-Werten (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung verschiedner pH-Werte bei OTA-Exposition (10^{-7} M)

Protein (n=4)



Caspase 3 Aktivität(n=4)

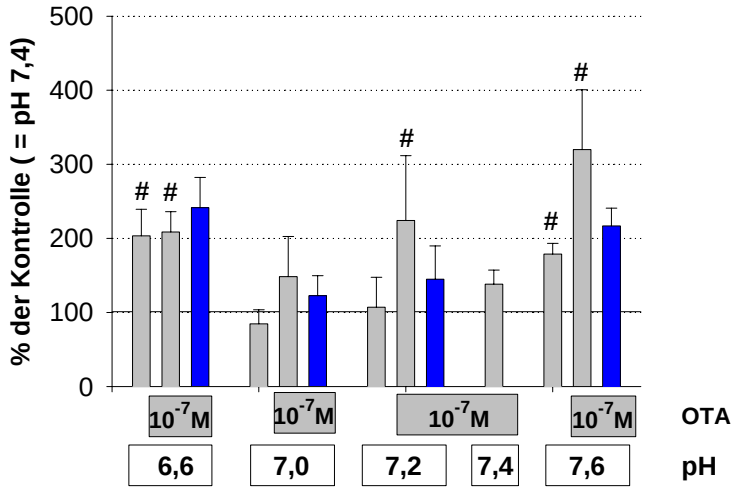


Abb. 7.27b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} M Ochratoxin A (OTA) und verschiedenen pH-Werten (n=4; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

LLCPK$_1$-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition (10^{-8} und 10^{-9} M)

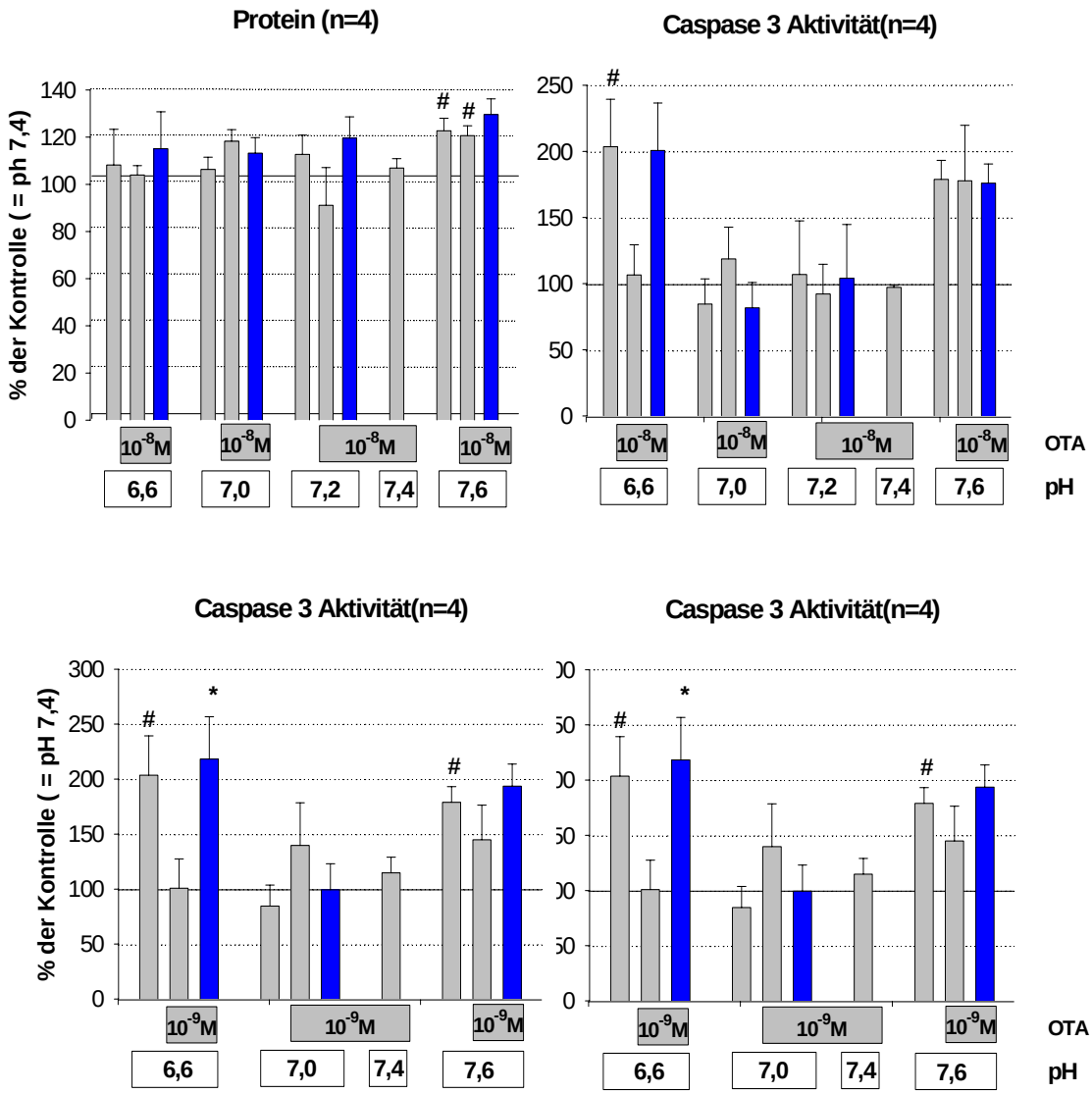
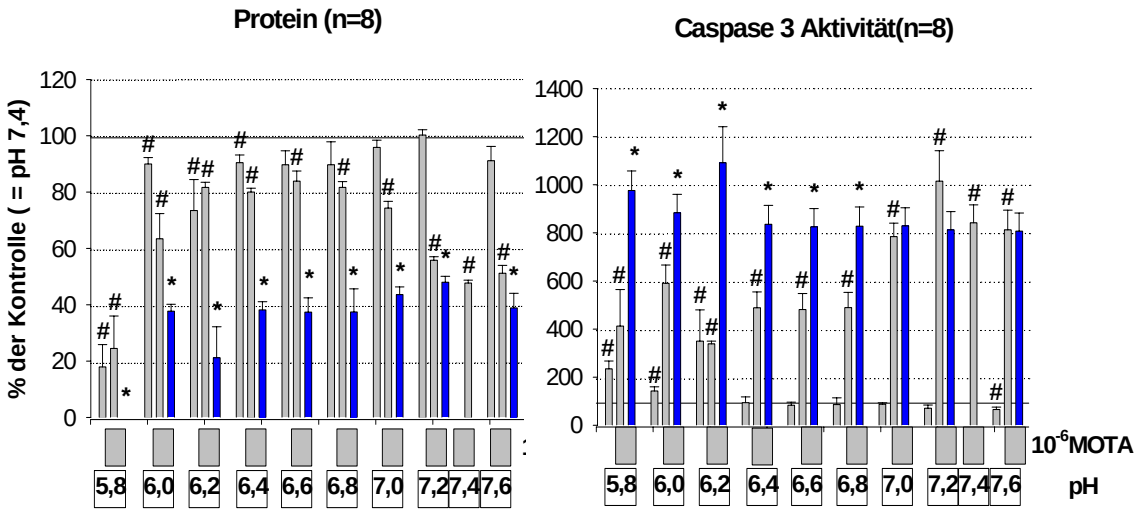
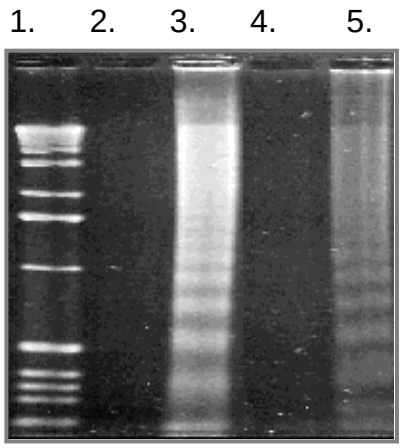


Abb. 7.27c. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in LLC-PK$_1$ Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} M Ochratoxin A (OTA) und verschiedenen pH-Werten (n=4; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition (10^{-6} M)





1. Standard
2. Kontrolle
3. Ochratoxin A (10^{-6} M)
4. pH 6,6
5. pH 6,6+Ochratoxin A

Abb. 7.28a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie DNS-Leiterbildung (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und verschiedenen ph- (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung verschiedener pH-Werte bei OTA-Exposition (10^{-7} u. 10^{-8} M)

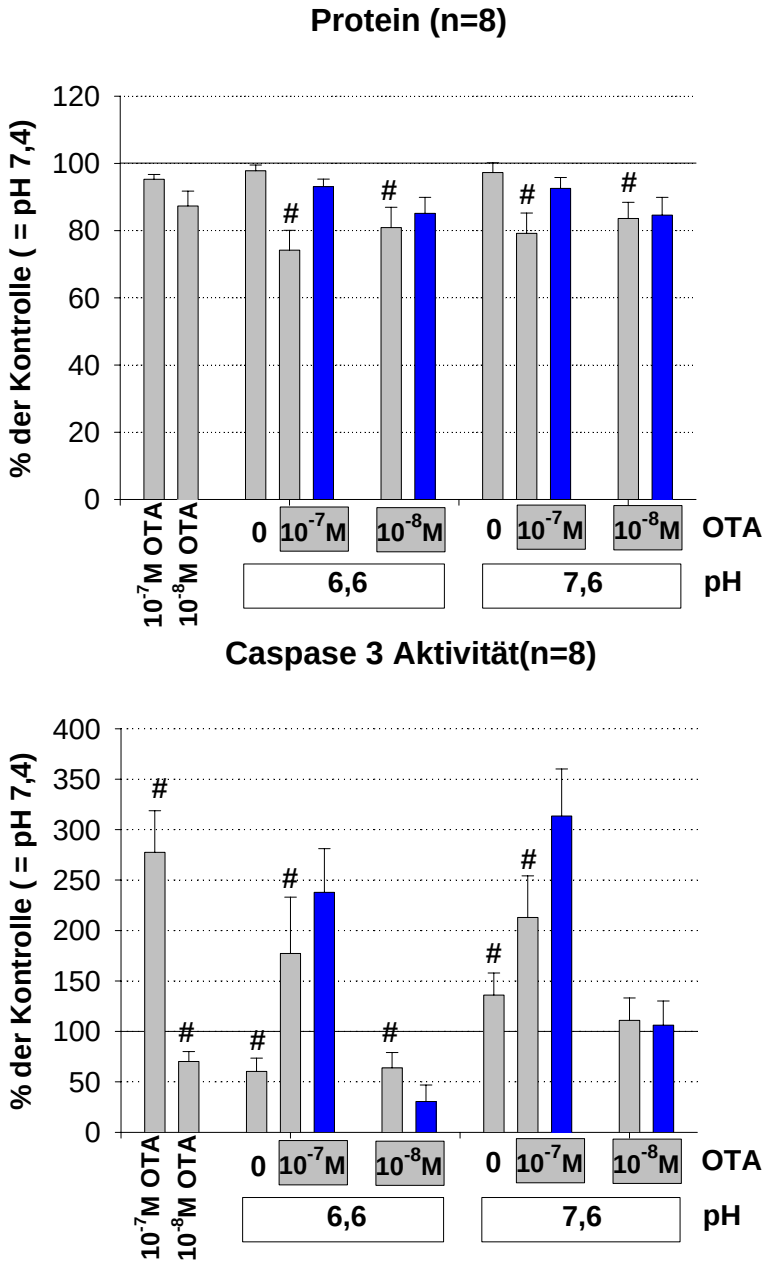
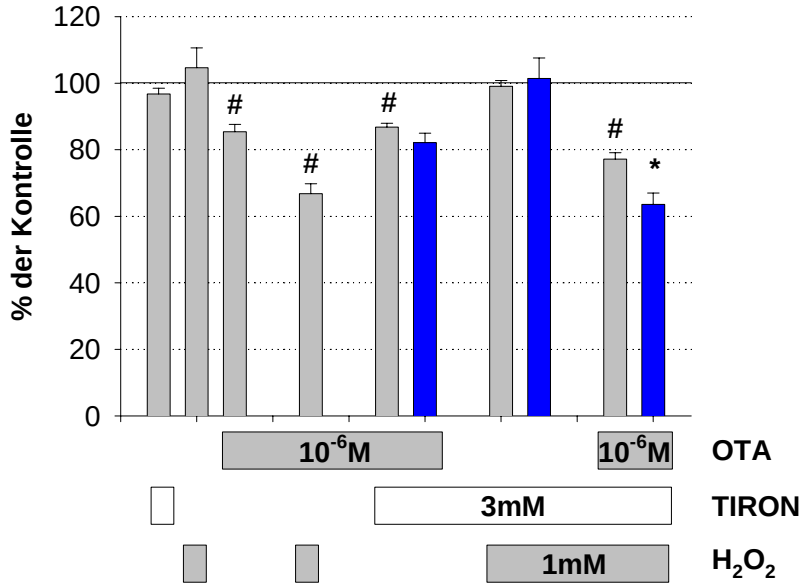


Abb. 7.28b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 10^{-7} bzw. 10^{-8} M Ochratoxin A (OTA) und pH 6,6 bzw. 7,6 (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von TIRON bei H_2O_2 und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

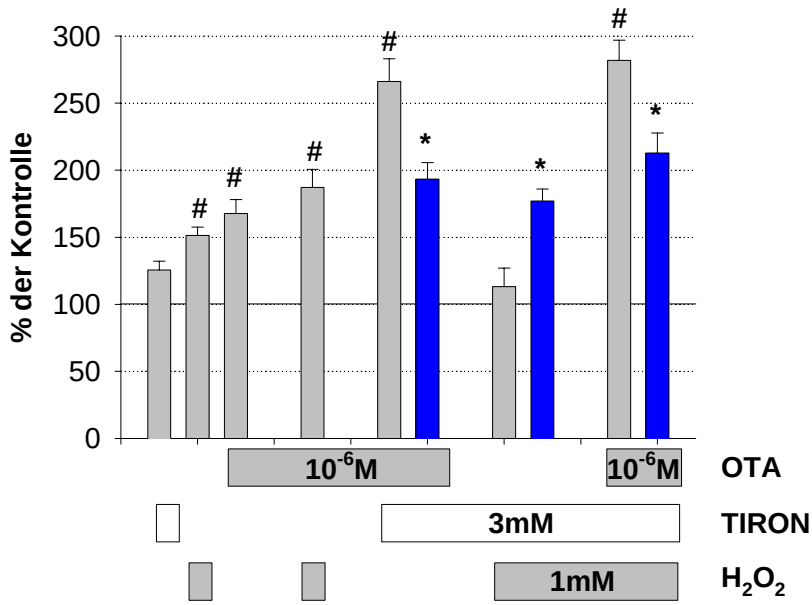
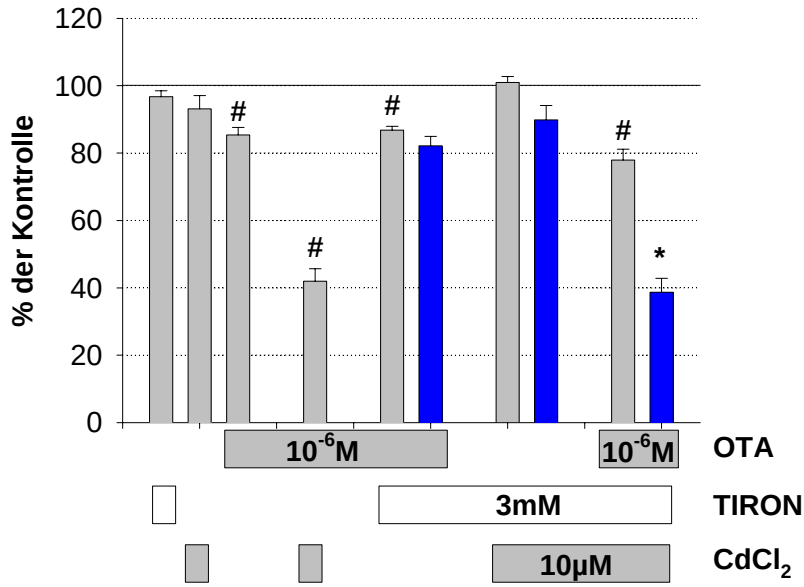


Abb. 7.29a. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3 mM TIRON, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen (grau) Kombinationswert.# = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von TIRON bei $CdCl_2$ und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

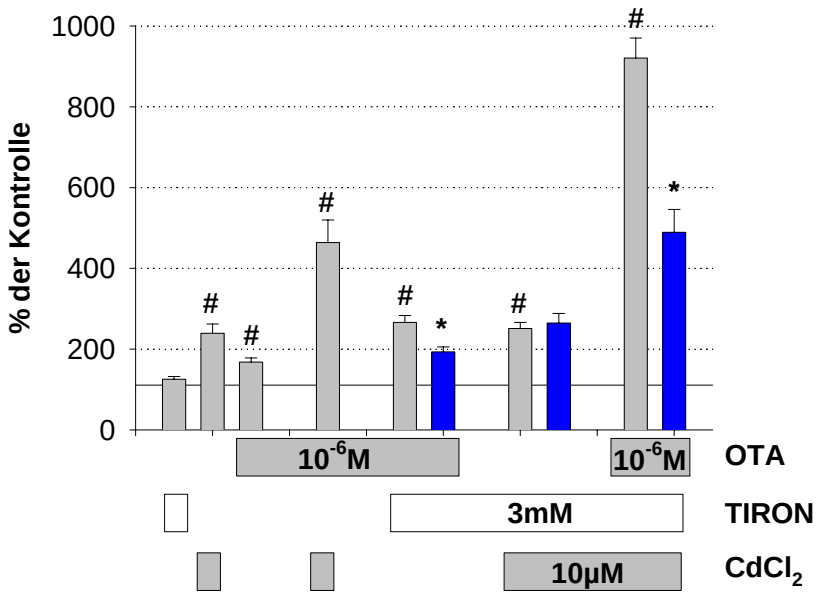
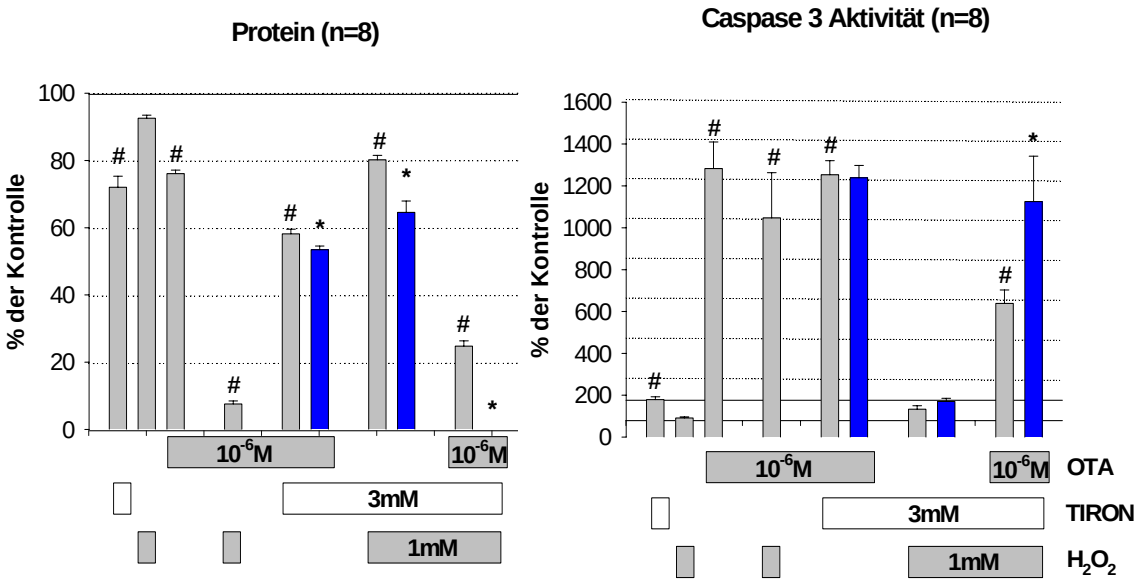


Abb. 7.29b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3 mM TIRON, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 10 µM $CdCl_2$. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von TIRON bei H_2O_2 und OTA-Exposition



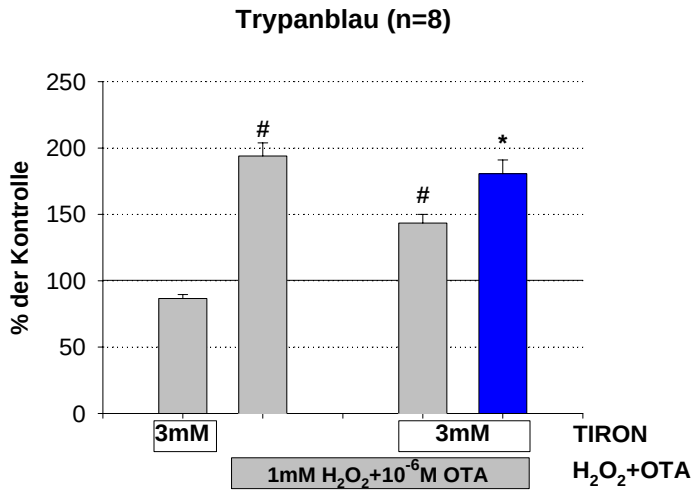
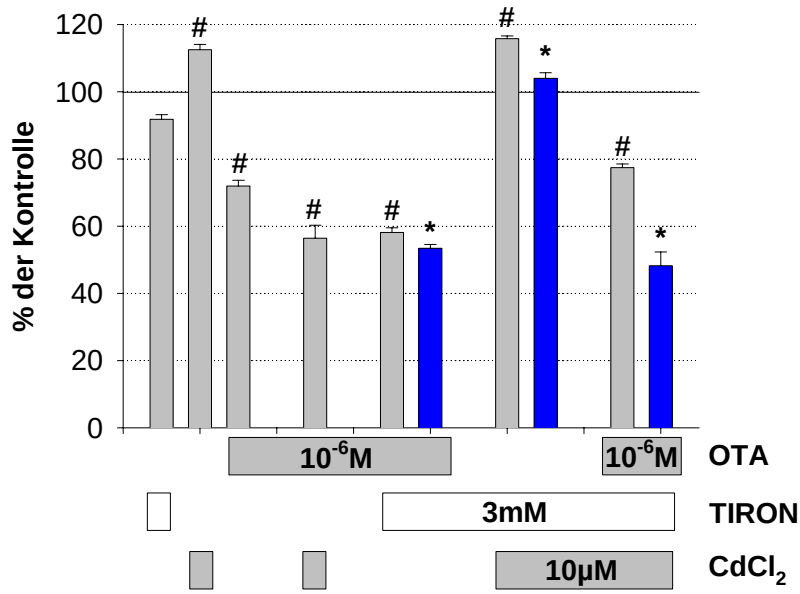


Abb. 7.30a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3 mM TIRON, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von TIRON bei $CdCl_2$ und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

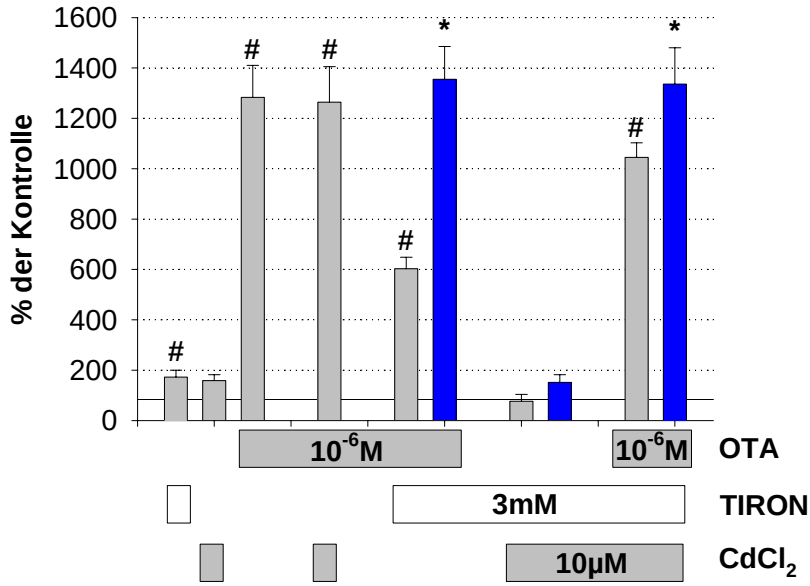
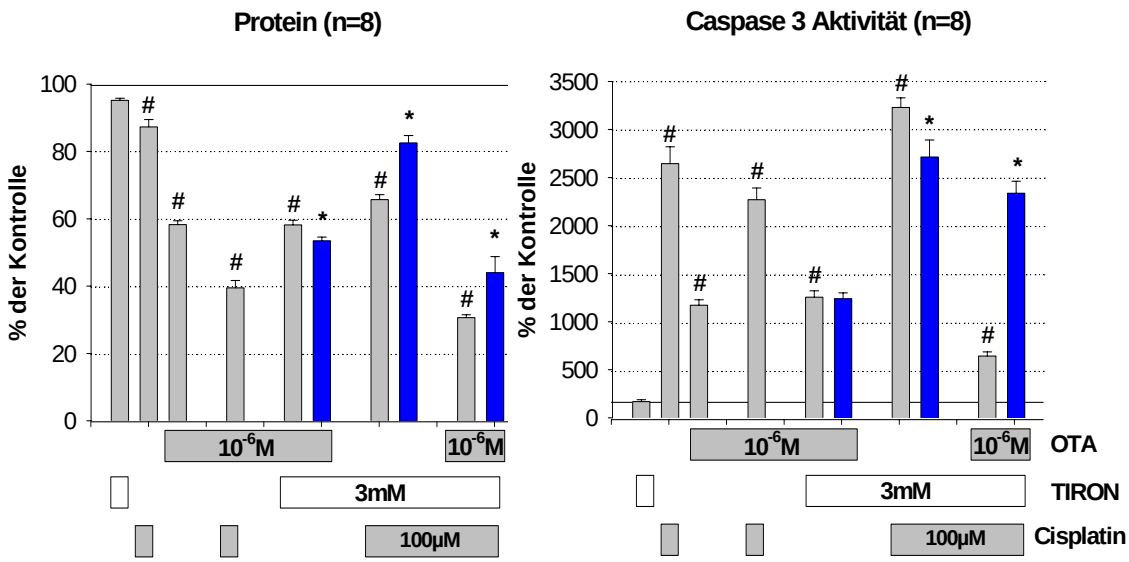


Abb. 7.30b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3mM TIRON, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 10 µM $CdCl_2$. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von TIRON bei Cisplatin und OTA-Exposition



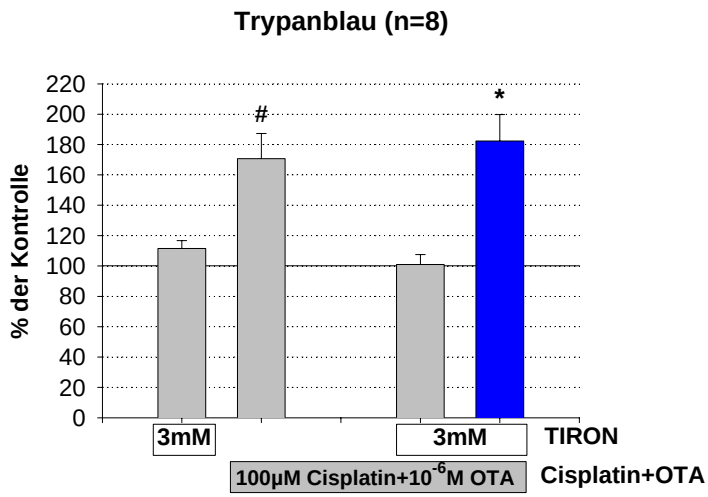
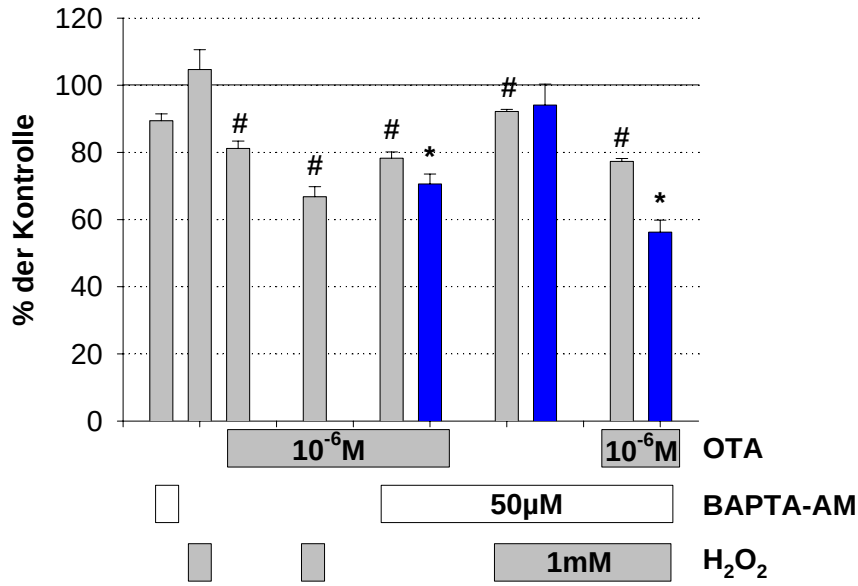


Abb. 7.30c. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3 mM TIRON, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 100 µM Cisplatin. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von BAPTA-AM bei H_2O_2 und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

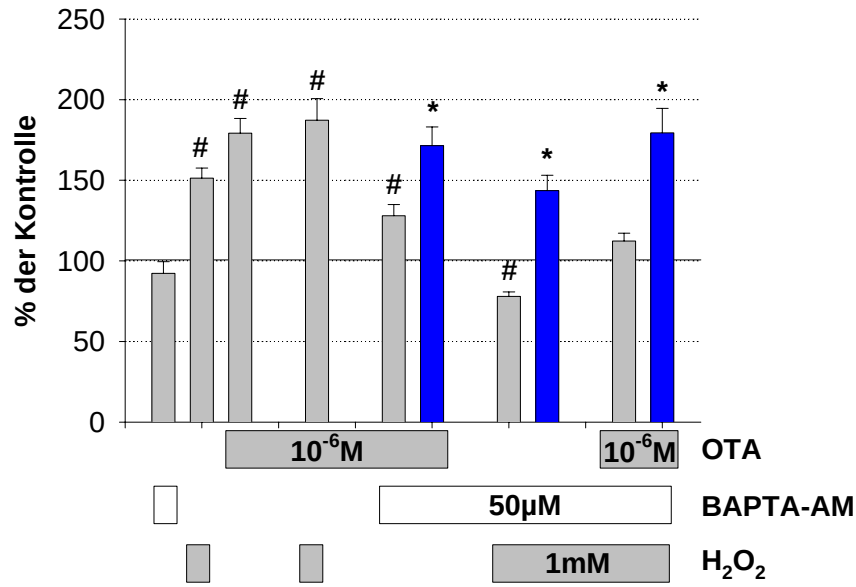
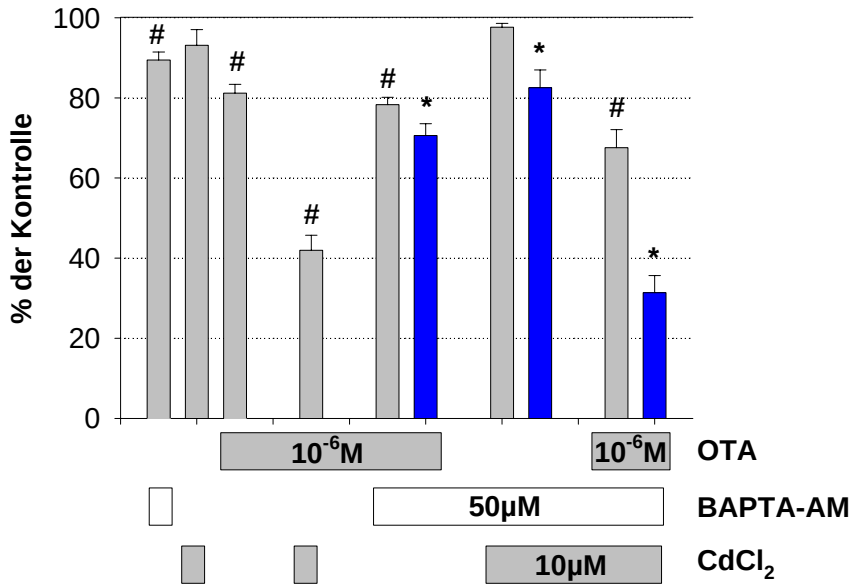


Abb. 7.31a. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 50µM BAPTA-AM, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen (grau) Kombinationswert.# = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkung von BAPTA-AM bei $CdCl_2$ und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

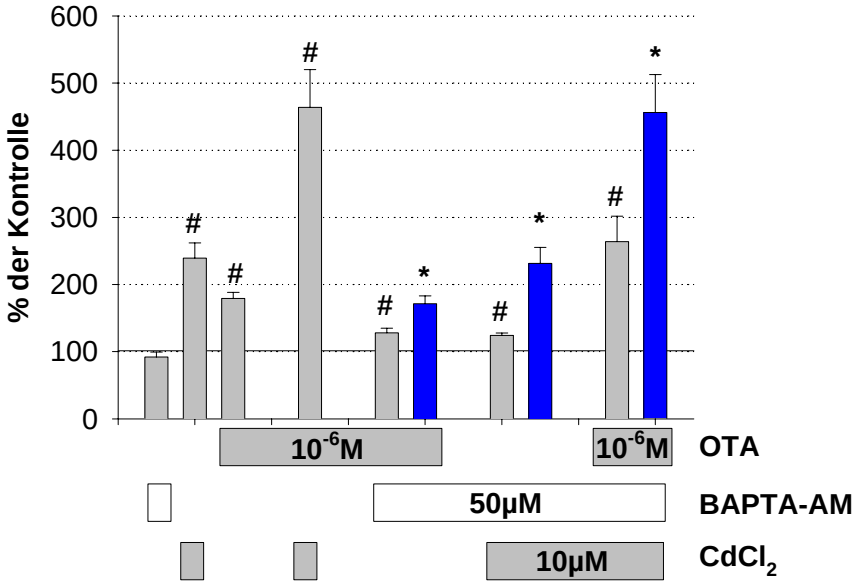
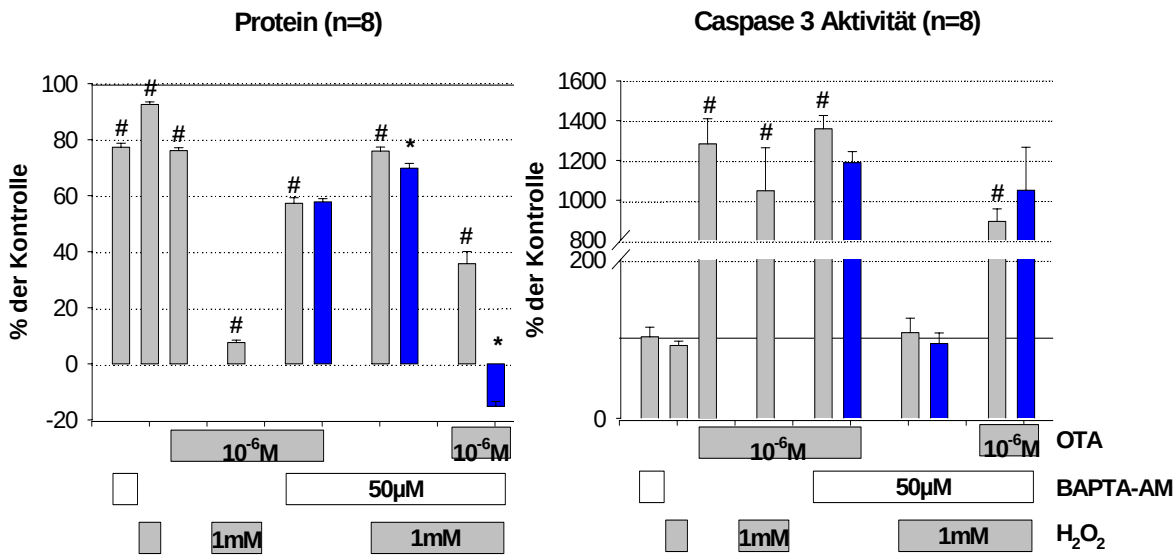


Abb. 7.31b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 50 µM BAPTA-AM, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 10 µM $CdCl_2$. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von BAPTA-AM bei H_2O_2 und OTA-Exposition



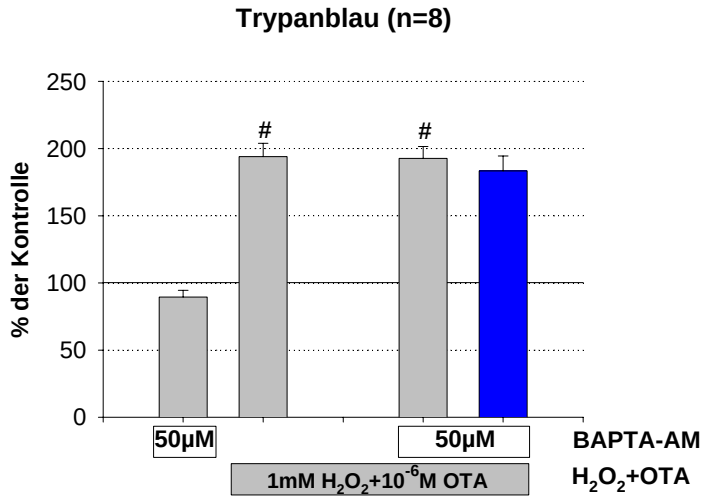
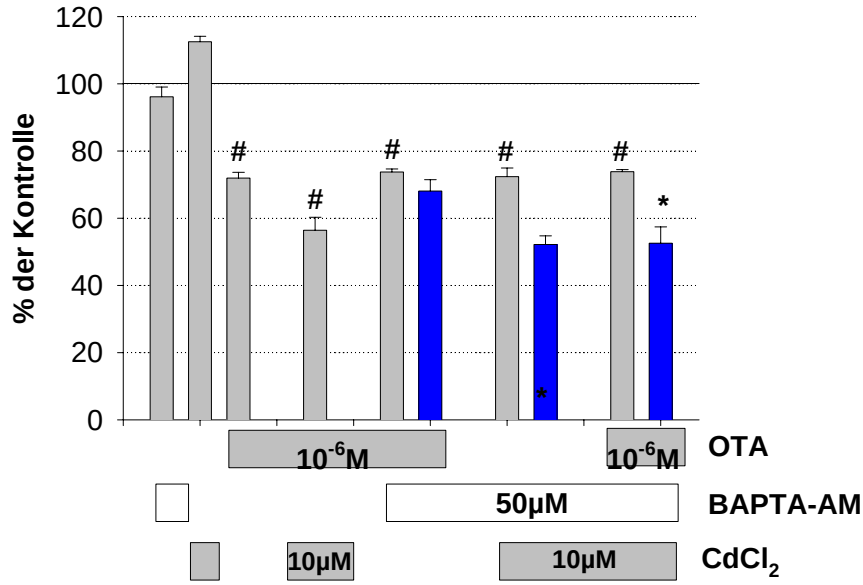


Abb. 7.32a. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 50 µM BAPTA-AM, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 1 mM H_2O_2. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von BAPTA-AM bei $CdCl_2$ und OTA-Exposition
Protein (n=8)



Caspase 3 Aktivität (n=8)

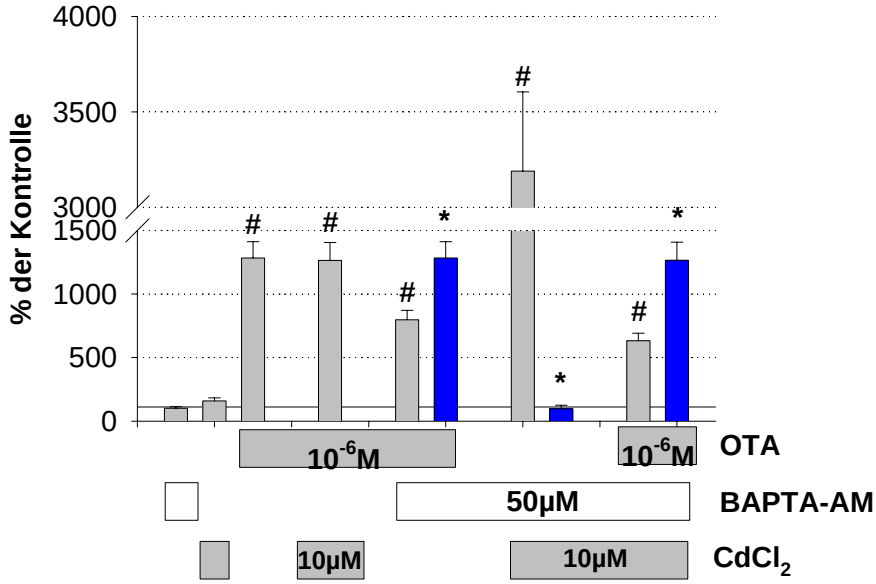
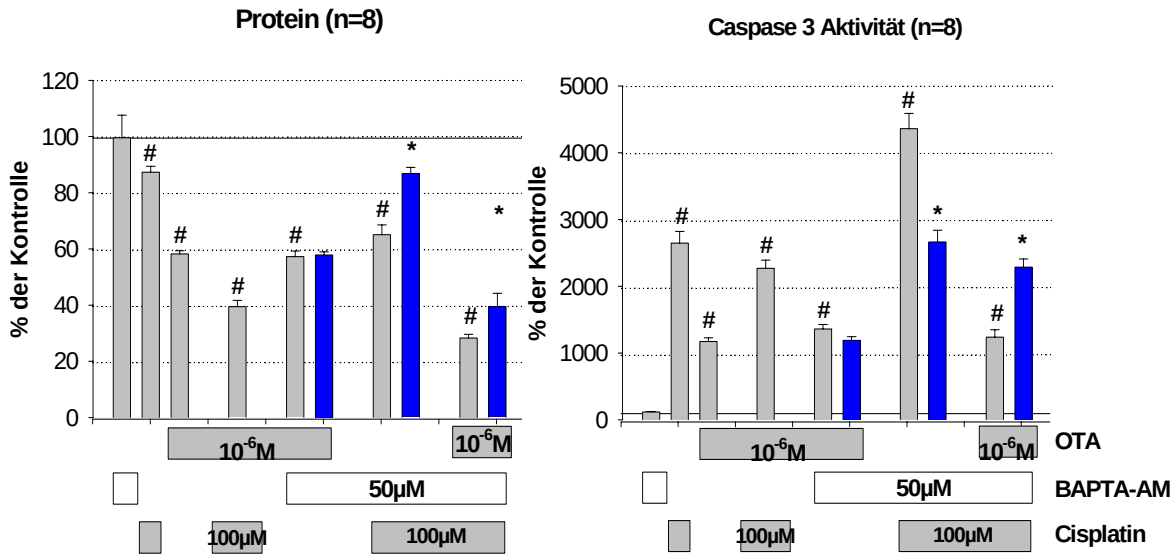


Abb. 7.32b. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 50 µM BAPTA-AM, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 10 µM $CdCl_2$. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

MDCK-C7-Zellen:
Wirkung von BAPTA-AM bei Cisplatin und OTA-Exposition



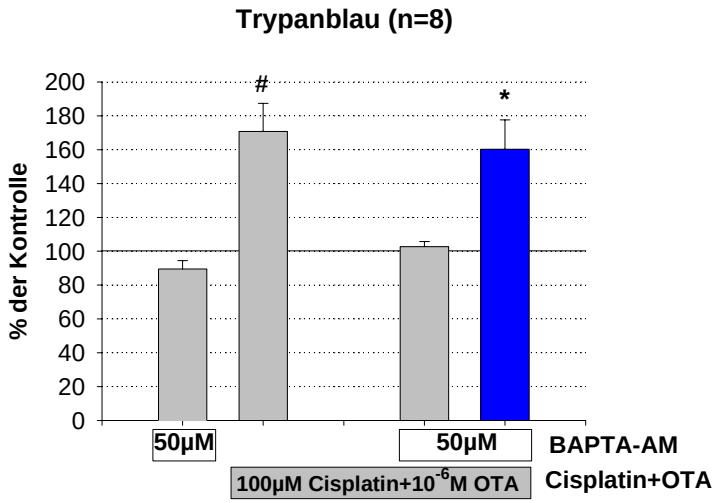


Abb. 7.32c. Proteingehalt (oben links) und Caspase-3 Aktivität (oben rechts) sowie Trypanblauaufnahme in MDCK-C7 Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 50 µM BAPTA-AM, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 100µM Cisplatin. (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenem (grau) Kombinationswert. # = signifikanter Unterschied zur Kontrolle.

IHKE-Zellen:
Wirkugn von NO-Donoren bei $CdCl_2$ und OTA-Exposition

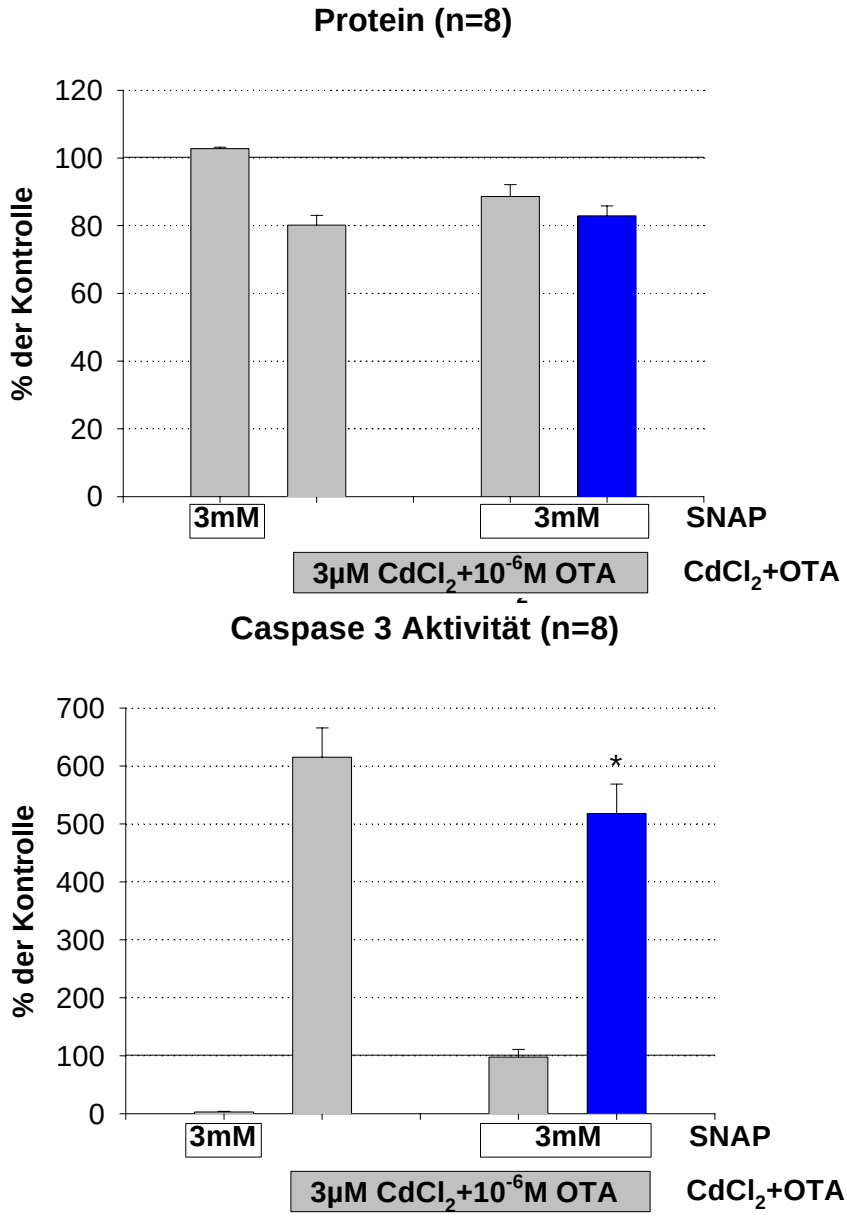


Abb. 7.33. Proteingehalt (oben) und Caspase-3 Aktivität (unten) in IHKE Zellen nach 24 h kontinuierlicher Inkubation mit 3 mM SNAP, 10^{-6} M Ochratoxin A (OTA) und 3 µM $CdCl_2$ (n=8; $p < 0,05$). * = signifikanter Unterschied zwischen errechnetem (schwarz) und gemessenen (grau) Kombinationswert.

8. Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatcyclase
AMP	Adenosin-monophosphat
ATP	Adenosin-triphosphat
BAPTA-AM	1,2 bis-(o-aminophenoxylethan-,N-,N-,N‘,N‘-tetraazetatsäure-acetonmethoxyesther
BCA	Bicinchoninsäure Assay
BEN	Balkan-Endemische Nephropathie
cAMP	Zyklisches Adenosin-monophosphat
Cisplatin	Cis-dichloro-diamine-II-platin
DAG	Diacylglycerat
DCF-DA	Dichlor-Fluoresceindiazetat
DEVD-AFC	Asp-Glu-Val-Asp-7amino-4-trifluoromethylcoumarin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epithelial growth factor
ERK	Extracellular regulated kinase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GSNO	S-nitroso-diamine-II-platin
ICE	Interleukin Converting Enzym = Caspase 1
IP_3	Inositol-triphosphat
JNK	c-jun-aminoterminale Kinase
MAPK	Mitogen aktivated protein-kinase
OD	Optische Dichte
OTA	Ochratoxin A
PAH	Paraaminohippursäure
PBS	Phosphat buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
ROS	Sauerstoffradikale
SEM	Standardfehler
SNAP	S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamin
TGF	Transforming growth factor
TIRON	4,5-Dihydroxy-1,3-Benzendisulfonsäure
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

9. Literaturverzeichnis

1. *Ochratoxin A: Vorkommen und toxikologische Bewertung.* Weilheim: VHC Verlagsgesellschaft mbH, 1990,

2. **Delacruz L. and Bach P.H.** The Role of Ochratoxin A Metabolism and Biochemistry in Animal and Human Nephrotoxity. Journal of biopharmaceutical Sciences 1, 277-304. 1990.

3. **Kuiper-Goodmann, T and Scott P.M.** Risk Assesment of the Mykotoxin Ochratoxin A. BIOMEDICAL AND ENVIROMENTAL SCIENCE 2, 179-248. 1989

4. **Krogh, P., N.H. Axelsen, F. Elling, N. Gryd-Hansen, B. Hald, J. Hyldgaard-Jensen, A.E. Larsen, A. Madsen, H.P. Mortensen, T. Moller, O.K. Petersen, U. Ravnskov, M. Rostgaard, and O. Aalund.** Experimental porcine nephropathy. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.A.* Suppl.No.246: 1-21, 1974.

5. **Gekle M. and Silbernagl S.** Renal Toxicodynamics of Ochratoxin A: A Pathophysiological Approach. Kidney and Blood Pressure Research 19, 225-235. 1996.

6. **Dantzig, A.H. and L. Bergin.** Uptake of the cephalosporin, cephalexin, by a dipeptide transport carrier in the human intestinal cell line, Caco-2. *Biochim Biophys Acta* 1027: 211-217, 1990.

7. **Scott, P.M., S.R. Kanhere, B.P. Lau, D.A. Lewis, S. Hayward, J.J. Ryan, and T. Kuiper-Goodman.** Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Addit Contam* 15: 555-562, 1998.

8. **Sauvant, C., S. Silbernagl, and M. Gekle.** Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal-tubule-derived opossum kidney cells. *J Pharmacol Exp Ther* 287: 13-20, 1998.

9. **Krogh, P., N.H. Axelsen, F. Elling, N. Gyrd-Hansen, B. Hald, J. Hyldgaard-Jensen, A.E. Larsen, A. Madsen, H.P. Mortensen, T. Moller, O.K. Petersen, U. Ravnskov, M. Rostgaard, and O. Aalund.** Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A- contaminated feed. *Acta Pathol Microbiol Scand [A]* 0: 1-21, 1974.

10. **Berndt, W.O. and A.W. Hayes.** In vivo and in vitro changes in renal function caused by ochratoxin A in the rat. *Toxicology* 12: 5-17, 1979.

11. **Creppy, E.E., R. Roschenthaler, and G. Dirheimer.** Inhibition of protein synthesis in mice by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Food Chem Toxicol* 22: 883-886, 1984.

12. **Krogh, P., B. Hald, R. Plestina, and S. Ceovic.** Balkan (endemic) nephropathy and foodborn ochratoxin A: preliminary results of a survey of foodstuffs. *Acta Pathol Microbiol Scand [B]* 85: 238-240, 1977.

13. **Silbernagl S.** Die Funktion der Nieren. In: *Lehrbuch der Physiologie*, edited by R. Klinke and Silbernagl S. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 2003, p. 325-335.

14. **Gekle, M., C.A. Pollock, and S. Silbernagl.** Time- and concentration-dependent biphasic effect of ochratoxin A on growth of proximal tubular cells in primary culture. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 275: 397-404, 1995.

15. **Pepeljnjak, S., I. Cepelak, and D. Juretic.** Effect of ochratoxin A on brush border enzymes of rat kidney. *IARC Sci Publ* 273-277, 1991.

16. **Dwivedi, P. and R.B. Burns.** Pathology of ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Res Vet Sci* 36: 92-103, 1984.

17. **Luster, M.I., D.R. Germolec, G.R. Burleson, C.W. Jameson, M.F. Ackermann, K.R. Lamm, and H.T. Hayes.** Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res* 47: 2259-2263, 1987

18. **Dortant, P.M., G.W. Peters-Volleberg, H. Van Loveren, R.R. Marquardt, and G.J. Speijers.** Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats. *Food Chem Toxicol* 39: 55-65, 2001.

19. **van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L, Scott DB, and Theron JJ.** Ochratoxin A, a Toxic Metabolite produced by Aspergillus ochraceus Wilh. Nature 205, 4975-4976. 1965.

20. **Van der Merwe, K.J., P.S. Steyn, and L. Fourie.** Mycotoxins. II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of Aspergillus ochraceus Wilh. *J Chem Soc [Perkin 1]* 7083-7088, 1965.

21. **Harwig, J., T. Kuiper-Goodman, and P.M. Scott.** Microbial Food Toxicants: Ochratoxins. In: *Handbook of Foodborne Diseases of Biological Origin*, 1983, p. 193-238.

22. **Stojkovic, R., K. Hult, S. Gamulin, and R. Plestina.** High affinity binding of ochratoxin A to plasma constituents. *Biochem.Int.* 9(1): 33-38,

23. **Gekle, M., S. Wunsch, H. Oberleithner, and S. Silbernagl.** Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties. *Pflugers Arch* 428: 157-162, 1994.

24. **Galtier, P.** Pharmacokinetics of ochratoxin A in animals. *in: Mycotoxins,Endemic nephropathy and urinary tract tumors,IARC Lyon* 1991.

25. **Tamaru, M., Y. Hirata, and T. Matsutani.** Neurochemical effects of prenatal treatment with ochratoxin A on fetal and adult mouse brain. *Neurochem.Res.* 13(12): 1139-1147, 1988.

26. **Schaeffer, J.L., J.K. Tyczkowski, and P.B. Hamilton.** Alterations in carotenoid metabolism during ochratoxinosis in young broiler chickens. *Poult.Sci.* 66(2): 318-324, 1987.

27. **Lea, T., K. Steien, and F.C. Stormer.** Mechanism of ochratoxin A induced immunosuppression. *Mycopath.* 107(2-3): 153-159, 1989.

28. **Luster, M.I., D.R. Germolec, G.R. Burleson, C.W. Jameson, M.F. Ackermann, K.R. Lamm, and H.T. Hayes.** Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A. *Cancer Res.* 47(9): 2259-2263, 1987.

29. **Gekle, M. and S. Silbernagl.** Mechanism of ochratoxin A-induced reduction of glomerular filtration rate. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 276: 316-321, 1993.

30. **Kastner, P.R., J.E. Hall, and A.C. Guyton.** Control of glomerular filtration rate: role of intrarenally formed angiotensin II. *Am.J.Physiol.* 246: F897-F9061984.

31. **Aydin, G., N. Ozcelik, E. Cicek, and M. Soyoz.** Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by Ochratoxin A and melatonin in rats. *Hum Exp Toxicol* 22: 383-391, 2003.

32. **Benesic, A., S. Mildenberger, and M. Gekle.** Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflugers Arch* 439: 278-287, 2000.

33. **Eder, S., A. Benesic, R. Freudinger, J. Engert, G. Schwerdt, K. Drumm, and M. Gekle.** Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflugers Arch* 440: 521-529, 2000.

34. **Schwerdt, G., R. Freudinger, S. Mildenberger, S. Silbernagl, and M. Gekle.** The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol Toxicol* 15: 405-415, 1999.

35. **Gekle, M., H. Oberleithner, and S. Silbernagl.** Ochratoxin A impairs "postproximal" nephron function in vivo and blocks plasma membrane anion conductance in Madin-Darby canine kidney cells in vitro. *Pflugers Arch* 425: 401-408, 1993.

36. **Gekle, M., R. Vogt, H. Oberleithner, and S. Silbernagl.** The mycotoxin ochratoxin A deranges pH homeostasis in Madin-Darby canine kidney cells. *J Membr Biol* 139: 183-190, 1994.

37. **Gekle, M., B. Gassner, R. Freudinger, S. Mildenberger, S. Silbernagl, W. Pfaller, and H. Schramek.** Characterization of an ochratoxin-A-dedifferentiated and cloned renal epithelial cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 152: 282-291, 1998.

38. **Schramek, H., D. Wilflingseder, V. Pollack, R. Freudinger, S. Mildenberger, and M. Gekle.** Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *J Pharmacol Exp Ther* 283: 1460-1468, 1997.

39. **Gekle, M., G. Schwerdt, R. Freudinger, S. Mildenberger, D. Wilflingseder, V. Pollack, M. Dander, and H. Schramek.** Ochratoxin A induces JNK activation and apoptosis in MDCK-C7 cells at nanomolar concentrations. *J Pharmacol Exp Ther* 293: 837-844, 2000.

40. **Raff, M.** Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119-122, 1998.

41. **Lieberthal, W. and J.S. Levine.** Mechanisms of apoptosis and its potential role in renal tubular epithelial cell injury. *Am J Physiol* 271: F477-F488, 1996.

42. **Gulbins, E., A. Jekle, K. Ferlinz, H. Grassme, and F. Lang.** Physiology of apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F605-F615, 2000.

43. **Trump, B.F. and I.K. Berezesky.** Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J* 9: 219-228, 1995.

44. **Kroemer, G., P. Petit, N. Zamzami, J.L. Vayssiere, and B. Mignotte.** The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J* 9: 1277-1287, 1995.

45. **Steinmassl, D., W. Pfaller, G. Gstraunthaler, and W. Hoffmann.** LLC-PK_1 epithelia as a model for in vitro assessment of proximal tubular nephrotoxicity. *In Vitro Cell.Dev.Biol.* 31: 94-106, 1995.

46. **Sachs, L.** *Angewandte Statistik*. Berlin, Heidelberg: Springer, 1997.

47. **Forth, W., D. Henschler, and W. Rummel.** *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Zürich: B.I.-Wissenschaftsverlag, 1983, p. 64-65.

48. **Bach, P.H., J.-P. Morin, and W. Pfaller.** Nephrotoxicity - What we have learned and what we still need to know! *TEN* 3: 4-13, 1996.

49. **Takeda, M., I. Shirato, M. Kobayashi, and H. Endou.** Hydrogen peroxide induces necrosis, apoptosis, oncosis and apoptotic oncosis of mouse terminal proximal straight tubule cells. *Nephron* 81: 234-238, 1999.

50. **Wang, L., Matsushita, K., Araki, I., and Takeda, M.** Inhibition of c-Jun N-Terminal Kinase Ameliorates Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide in the Kidney Tubule Epithelial Cells (NRK-52E). Nephron 91, 142-147. 2002.

51. **Wolf, G.** Angiotensin II is involved in the progression of renal disease: importance of non-hemodynamic mechanisms. *Nephrologie* 19: 451-456, 1998.

52. **Huwiler, A., J. Pfeilschifter, and H. van den Bosch.** Nitric oxide donors induce stress signaling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 274: 7190-7195, 1999.

53. **Nitsch, D.D., N. Ghilardi, H. Muhl, C. Nitsch, B. Brune, and J. Pfeilschifter.** Apoptosis and expression of inducible nitric oxide synthase are mutually exclusive in renal mesangial cells. *Am J Pathol* 150: 889-900, 1997.

54. **Parsons, P.P., H.O. Garland, E.S. Harpur, and S. Old.** Acute gentamicin-induced hypercalciuria and hypermagnesiuria in the rat: dose-response relationship and role of renal tubular injury. *Br J Pharmacol* 122: 570-576, 1997.

55. **Sundin, D.P., R. Sandoval, and B.A. Molitoris.** Gentamicin inhibits renal protein and phospholipid metabolism in rats: implications involving intracellular trafficking. *J Am Soc Nephrol* 12: 114-123, 2001.

56. **Christensen, S., K. Ladefoged, and N. Frimodt-Moller.** Experience with once daily dosing of gentamicin: considerations regarding dosing and monitoring. *Chemotherapy* 43: 442-450, 1997.

57. **Lash, L.H., J.J. Tokarz, and E.B. Woods.** Renal cell type specificity of cephalosporin-induced cytotoxicity in suspensions of isolated proximal tubular and distal tubular cells. *Toxicology* 94: 97-118, 1994

58. **Terada, T., H. Saito, M. Mukai, and K. Inui.** Recogniton of β-lactam antibiotics by rat peptide transporters, PEPT1 and PEPT2, in LLC-PK_1 cells. *Am.J.Physiol.* 273: F706-F711, 1997.

59. **Turnidge, J.D.** Pharmacodynamic (kinetic) considerations in the treatment of moderately severe infections with cefotaxime. *Diagn Microbiol Infect Dis* 22: 57-69, 1995.

60. **Reyes, E., J. Cardona, A. Prieto, E.D. Bernstein, M. Rodriguez-Zapata, M.J. Pontes, and M. Alvarez-Mon.** Liposomal amphotericin B and amphotericin B-deoxycholate show different immunoregulatory effects on human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 181: 2003-2010, 2000.

61. **Marklund, L., R. Henriksson, and K. Grankvist.** Amphotericin B-induced apoptosis and cytotoxicity is prevented by the Na+, K+, 2Cl(-)-cotransport blocker bumetanide. *Life Sci* 66: L319-L324, 2000.

62. **Weiner, M.W. and C. Jacobs.** Mechanism of cisplatin nephrotoxicity. *Fed Proc* 42: 2974-2978, 1983.

63. **Walker, E.M.J., M.A. Fazekas-May, and W.R. Bowen.** Nephrotoxic and ototoxic agents. *Clin Lab Med* 10: 323-354, 1990.

64. **Fillastre, J.P. and G. Raguenez-Viotte.** Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicol Lett* 46: 163-175, 1989.

65. **Safirstein, R. and G. Deray.** Anticancer: Cisplatin/carboplatin. In: *Clinical Nephrotoxins*, edited by M.E. de Broe, G.A. Porter, W.M. Bennett, and G.A. Verpooten. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1998, p. 261-271.

66. **Okuda, M., K. Masaki, S. Fukatsu, Y. Hashimoto, and K. Inui.** Role of apoptosis in cisplatin-induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 59: 195-201, 2000.

67. **Hong, J.C. and B.D. Kahan.** Immunosuppressive agents in organ transplantation: past, present, and future. *Semin Nephrol* 20: 108-125, 2000.

68.**Kim, S.I., H.Y. Song, J.H. Hwang, D.L. Chong, H.Y. Lee, D.S. Han, J.I. Moon, Y.S. Kim, K.I. Park, K.S. Kim, and K.H. Choi.** Cyclosporine nephrotoxicity: the mechanisms of cell injury by cyclosporine A in renal proximal tubular cells. *Transplant Proc* 32: 1621-1622, 2000.

69. **Esposito, C., A. Fornoni, F. Cornacchia, N. Bellotti, G. Fasoli, A. Foschi, I. Mazzucchelli, T. Mazzullo, L. Semeraro, and A. Dal Canton.** Cyclosporine induces different responses in human epithelial, endothelial and fibroblast cell cultures. *Kidney Int* 58: 123-130, 2000.

70. **Dieperink, H., N. Perico, F.T. Nielsen, and G. Remuzzi.** Cyclosporine/tacrolimus (FK-506). In: *Clinical Nephrotoxins*, edited by M.E. de Broe, G.A. Porter, W.M. Bennett, and G.A. Verpooten. Dordrecht: Kluwer Academic Pumblishers, 1998, p. 275-300.

71. **Amore, A., S.N. Emancipator, P. Cirina, G. Conti, E. Ricotti, N. Bagheri, and R. Coppo.** Nitric oxide mediates cyclosporine-induced apoptosis in cultured renal cells. *Kidney Int* 57: 1549-1559, 2000.

72. **Belitsky, P., S. Dunn, A. Johnston, and G. Levy.** Impact of absorption profiling on efficacy and safety of cyclosporin therapy in transplant recipients. *Clin Pharmacokinet* 39: 117-125, 2000.

73. **Jarup, L., M. Berglund, C.G. Elinder, G. Nordberg, and M. Vahter.** Health effects of cadmium exposure--a review of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 24 Suppl 1: 1-51, 1998.

74. **Thevenod, F., J.M. Friedmann, A.D. Katsen, and I.A. Hauser.** Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor-kappaB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J Biol Chem* 275: 1887-1896, 2000.

75. **Hamada, T., T. Sasaguri, A. Tanimoto, N. Arima, S. Shimajiri, T. Abe, and Y. Sasaguri.** Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metallothionein. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 829-834, 1996.

76. **Yan, H., C.E. Carter, C. Xu, P.K. Singh, M.M. Jones, J.E. Johnson, and M.S. Dietrich.** Cadmium-induced apoptosis in the urogenital organs of the male rat and its suppression by chelation. *J Toxicol Environ Health* 52: 149-168, 1997.

77. **Kunduzova, O. R., Bianchi, P., Pizzinat, N., Escourrou, G., Seguelas, M-H., Parini, A., and Cambon, C.** Regulation of JNK/ERK activation, cell apoptosis, and tissue reganeration by monoamine oxidases after ischemia-reperfusion. FASEB J. 16, 1129-1131. 2002

78. **Filipovic, D. M., Meng, X., and Reeves, W. B.** Inhibition of PARP prevents oxidant-induced necrosis but not apoptosis in LLC-PK1 cells. Renal Physiol Biochem 46, F428-F436. 1999

79. **Aizawa, T., N. Ishizaka, K. Kurokawa, R. Nagai, H. Nakajima, J. Taguchi, and M. Ohno.** Different effects of angiotensin II and catecholamine on renal cell apoptosis and proliferation in rats. *Kidney Int* 59: 645-653, 2001.

80. **Wolf, G. and R.A. Stahl.** Angiotensin II-stimulated hypertrophy of LLC-PK1 cells depends on the induction of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1. *Kidney Int* 50: 2112-2119, 1996.

81. **Sandau, K., J. Pfeilschifter, and B. Brüne.** Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int.* 52: 378-386, 1997.

82. **Patel, P., E. Varghese, G. Ding, S. Fan, A. Kapasi, K. Reddy, N. Franki, N. Nahar, and P. Singhal.** Transforming growth factor beta induces mesangial cell apoptosis through NO- and p53-dependent and -independent pathways. *J Investig Med* 48: 403-410, 2000.

83. **Harris, R.C.** Molecular basis of injury and progression in focal glomerulosclerosis. *Nephron* 82: 289-299, 1999.

84. **Dahlmann, A., W.H. Dantzler, S. Silbernagl, and M. Gekle.** Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 157-162, 1998.

85. **Kumagai, S.** Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats. *Food Cosmet.Toxicol.* 26(9): 753-758, 1988.

86. **Kuramochi, G., M. Gekle, and S. Silbernagl.** Derangement of pH homeostasis in renal papilla: Ochratoxin A increases pH in vasa recta blood. *Nephron* 76: 472-476, 1997.

87. **Gekle, M., R. Vogt, H. Oberleithner, and S. Silbernagl.** The mycotoxin ochratoxin A deranges pH homeostasis in Madin- Darby canine kidney cells. *J.Membrane Biol.* 139: 183-190, 1994.

88. **Moreno-Manzano, V., Ishikawa, Y., Lucio-Cazana, J., and Kitamura, M.** Selektive Involvement of Superoxide Anion, but Not Downstream Compounds Hydrogen Peroxide and Peroxynitrite, in Tumor Necrosis Factor-a-induced Apoptosis of Rat Mesangial Cells. J Biol Chem 275(17), 12684-12691. 2000.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle, der mir die Möglichkeit gab, die vorliegende Dissertation am Institut für Physiologie der Universität Würzburg anzufertigen. Die Bereitstellung des Dissertationsthemas und das Angebot vielseitiger Forschungsmöglichkeiten haben es mir ermöglicht, mich auf dem interessanten Gebiet der Nierenphysiologie einzuarbeiten. Während all der Jahre war mir Prof. Gekle stets ein offener, anregender und verständnisvoller Ansprechpartner. Herzlichen Dank!

Herrn Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Institut und für die Möglichkeit in seiner Abteilung wissenschaftlich arbeiten zu dürfen.

Die hilfsbereite Unterstützung aller Mitglieder der Arbeitsgruppe sowie das angenehme Arbeitsklima haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Ruth Freudinger für die geduldige Einführung in die Zellkultur und die verschiedenen angewendeten Messtechniken sowie Herrn Dr. Gerald Schwerdt, für seine Unterstützung und Hilfe bei Methodik und Auswertung.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir das Studium und damit diese Dissertation ermöglichten und die mir während all der Jahre liebevoll zur Seite standen. Vielen Dank!

Lebenslauf

Name, Vorname:	Weber, Florian
Geburtsdatum:	09.01.1977
Geburtsort:	Marktheidenfeld
Bekenntnis:	römisch-katholisch
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung:	09/1983-07/1987	Anton Kliegl-Grundschule Bad Kissingen
	09/1987-06/1996	Gymnasium Bad Kissingen
	28.06.1996	Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
Wehrdienst:	07/1996-04/1997	Grundwehrdienst
Hochschulbildung:	05/1997-10/2003	Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
	12.03.1999	Ärztliche Vorprüfung
	23.03.2000	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	03.09.2002	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	10/02-09/03	Praktisches Jahr
	21.10.2003	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr:	10/2002-02/2003	Institut für Röntgendiagnostik, Universität Würzburg
	02/2003-05/2003	Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
	06/2003-09/2003	Innere Medizin, Klinikum Coburg
AIP:	seit 01.01.2004	AiP am Klinikum Bamberg, Nephrologie

Wissenschaftliche Erfahrung:

seit 10/2000	Promotion am Physiologischen Institut der Universität Würzburg zum Thema: Screening der Synergismen apoptoseinduzierender Nephrotoxine unter besonderer Berücksichtigung von Ochratoxin A.
10/2000-05/2001	Forschungsfreisemester

Veröffentlichungen:

Weber F., Schwerdt G., Freudinger R. und Gekle M. „Rapid Screening of proapoptotic synergism of nephrotoxins, with special emphasis inochratoxin a.“ Kidney Blood Press Res 24, 339, 2001

Schwerdt, G., F. Weber, R. Freudinger, C. Schuster, S. Silbernagl und M. Gekle. „Effect of mitochondrial inhibition and extracellular pH on apoptosis of human proximal tubule cells.“ J. Am. Soc. Nephrol. 12, A3231, 2001

Weber F., Schwerdt G., Freudinger R. und Gekle M. „Programmed cell death by interaction of ochratoxin a with other nephrotoxins“ Mykotoxin Research 2003

Bad Kissingen, den 20.07.2003