

Aus dem Physiologischen Institut

der Universität Würzburg

Lehrstuhl für Physiologie I

Vorstand: Professor Dr. med. S. Silbernagl

**Wirkung nanomolarer Konzentrationen des Mykotoxins Ochratoxin A auf
Calciumhomöostase, Wachstumsverhalten und hormonelle Signaltransduktion
menschlicher proximaler Tubuluszellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Andreas Benesic

aus Amberg

Würzburg, Juni 2002

Referent: Professor Dr. M. Gekle

Korreferent: Professor Dr. N. Gordjani

Dekan: Professor Dr. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Juli 2003

Der Promovend ist Arzt

Gliederung

A	Einleitung.....	1
A.I	Vorkommen von Ochratoxin A.....	1
A.II	Chemische Eigenschaften von OTA.....	2
A.III	Toxokinetik.....	3
A.IV	Toxodynamik.....	4
A.V	Mögliche Angriffsmechanismen von OTA an der Niere.....	5
A.VI	Ziel dieser Studie.....	6
B	Methoden.....	7
B.I	Zellkultur.....	7
B.II	Meßmethoden.....	7
B.II.1	Intrazelluläre Calciumkonzentration.....	7
B.II.2	Die Mangan-Quench Technik.....	9
B.II.3	Bestimmung der Aktivität der Thapsigargin-sensitiven ATPase.....	9
B.II.4	Bestimmung der Zellzahl.....	10
B.II.5	Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH).....	10
B.II.6	Bestimmung der Aufnahme von ³ H-OTA.....	11
B.II.7	Bestimmung des zellulären cAMP-Gehalts.....	11
B.II.8	Materialien.....	13
B.II.9	Statistik.....	13
C	Ergebnisse.....	14
C.I	Der Effekt von OTA auf das Wachstumsverhalten von IHKE Zellen.....	14
C.II	Die Wirkung von OTA auf die zelluläre Ca ²⁺ Homöostase in IHKE Zellen....	16
C.II.1	Calciumoszillationen.....	16
C.II.2	Ca ²⁺ -Einstrom.....	21
C.II.3	Die Wechselwirkung von OTA mit dem IP ₃ -Signalweg.....	22
C.II.4	Der Effekt von OTA auf die Ca ²⁺ -ATPase.....	27
C.II.5	cAMP und PKA.....	30

C.II.6	Mitochondrien	33
C.II.7	Die Wirkung des BSA-OTA-Konjugates auf $[Ca^{2+}]_i$	35
C.III	Die Wechselwirkung von OTA mit hormonellen Ca^{2+} -Signalen.....	37
C.III.1	Angiotensin II	37
C.III.2	Epidermaler Wachstumsfaktor	40
C.III.3	Noradrenalin und Bradykinin	41
C.IV	Die Effekte von OTA > 10 nmol/l auf LDH-Freisetzung und Zellzahl.....	43
C.V	Die Effekte von OTA auf $[Ca^{2+}]_i$ in anderen Zelllinien renaler Herkunft	46
C.V.1	Opossum Kidney (OK) Zellen.....	46
C.V.2	MDCK-C7 Zellen.....	47
C.V.3	MDCK-C11 Zellen.....	48
D	Diskussion.....	50
D.I	Wirkungen von OTA auf Zellzahl und LDH-Freisetzung	50
D.II	Wirkungen von OTA auf die Calciumhomöostase	51
D.III	Wirkungen von OTA auf hormonelle Signaltransduktion.....	57
E	Zusammenfassung.....	59
F	Abkürzungsverzeichnis.....	61
G	Literatur	62

A Einleitung

A.I Vorkommen von Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) ist ein sekundärer Metabolit von verschiedenen Aspergillus- und Penicilliumspezies (16,45), der in einer großen Anzahl von Nahrungsmitteln und in der Mehrzahl menschlicher Blutproben gefunden werden kann (45,60,71). 1965 von van der Merwe et al. (53) entdeckt, konnte Ochratoxin A 1974 von Krogh et al. als Nephrotoxin und als ursächliches Agens für die dänische Schweinenephropathie identifiziert werden (43,44). Die potentielle Bedeutung von OTA für den Menschen erwächst aus dem nahezu ubiquitärem Auftreten des Toxins durch die weite Verbreitung der OTA-produzierenden Schimmelpilzspezies. Zwischen 0.4 und 56 % der Nahrungsmittel in Ländern, in denen nach Pilzbefall mit zur OTA-Bildung fähigen Spezies untersucht wurde, waren kontaminiert (40,71). Dies macht eine OTA-Exposition nahezu unvermeidlich. Eine besonders hohe OTA-Belastung, die mit dem vermehrten Auftreten von Tumoren der Nieren und der ableitenden Harnwege, sowie der endemischen "Balkannephropathie" korrelierte, zeigte sich in den Ländern Ex-Jugoslawiens (31, 60). Somit wird wahrscheinlich, daß OTA auch bei Nierenerkrankungen des Menschen eine Rolle spielt. Daß der Hauptangriffspunkt der toxischen Wirkung von OTA die Niere ist, liegt daran, daß aufgrund tubulärer Transportprozesse, die Konzentration von freiem OTA im Tubuluslumen die Plasmakonzentration um ein Mehrfaches übersteigt (1). Die ubiquitäre Verbreitung von Ochratoxin A, seine lange Halbwertszeit im Organismus (45) und die erwähnte Anreicherung des Toxins in der Niere machen es wahrscheinlich, daß OTA kausal oder begünstigend auf die Entstehung von Nierenerkrankungen beim Menschen wirkt.

A.II Chemische Eigenschaften von OTA

Von der chemischen Struktur her handelt es sich bei OTA um ein Dihydroisocumarinmolekül, an welches L-Phenylalanin durch eine Peptidbindung gekoppelt ist (siehe Abb. 1). Bedingt durch die Dissoziation des Protons an der OH-Gruppe ist OTA eine schwache organische Säure mit einem pK_a -Wert von 7.1. Im nichtdissoziierten Zustand ist die Substanz lipophil. Diese Eigenschaft ist einerseits verantwortlich für die hohe Plasmaproteinbindung des Moleküls, andererseits für seine Membrangängigkeit, so daß OTA auch ohne Transportproteine in Zellen gelangen kann. Seine chemischen Eigenschaften befähigen das Mykotoxin sowohl durch die hohe Proteinbindung lange im Organismus zu persistieren als auch durch gute Membrangängigkeit intrazelluläre Schäden hervorzurufen.

Abbildung 1

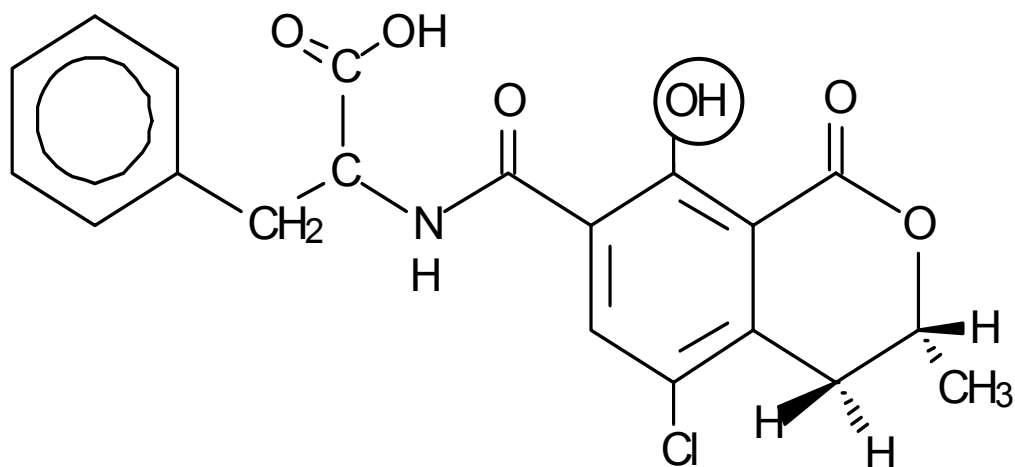


Abb. 1: Strukturformel von Ochratoxin A. Die schwache organische Säure (aufgrund Dissoziation des Protons an der OH-Gruppe; $pK_a = 7.1$) besteht aus einem L-Phenylalaninrest, der durch eine Amidbindung an ein Dihydroisocumarinmolekül gekoppelt ist.

A.III Toxokinetik

Die Toxokinetik von Ochratoxin A ist einerseits, wie oben dargestellt, auf die Lipophilie der Substanz zurückzuführen. Hierdurch erklärt sich die sehr hohe Bindung an Plasmaproteine von ca. 99% (8,11). Auch unterliegt das Mykotoxin dem enterohepatischen Kreislauf (8, 16), was zusätzlich zur Proteinbindung seine Ausscheidung verlangsamt. Andererseits ist OTA aufgrund seiner Struktur Substrat für zelluläre Transportproteine, wie den Transporter für organische Anionen (OAT 1) (14), den es auch, wie in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, schon in Konzentrationen im nanomolaren Bereich auf nichtkompetitive Weise hemmt (64,66). Die Inhibition der eigenen Ausscheidung, Rezirkulation des Toxins mit den Gallensäuren und die sehr hohe Proteinbindung, führen zu der extrem langen Halbwertszeit von OTA im Organismus z.B. von Affen ($t_{1/2}$ bis zu 510 h; (45)). Weiterhin verlangsamt OTA durch Hemmung des OAT auch die Elimination von anderen Xenobiotika und könnte somit auch indirekt schädigend wirken. Die chemischen und kinetischen Eigenschaften von Ochratoxin A, begünstigen eine Akkumulation des Toxins im Organismus, vor allem in den Nieren, die so der chronischen Einwirkung des Moleküls fortwährend ausgesetzt sind.

A.IV Toxodynamik

Ein Aspekt, der die potentielle Bedeutung von OTA für den Menschen unterstreicht, ist sein durch die weite Verbreitung der OTA-produzierenden Schimmelpilzspezies nahezu ubiquitäres Auftreten. Die Inzidenz des Befalls von Nahrungsmitteln mit Pilzarten, die befähigt sind OTA zu bilden, schwankt zwischen 0.4 und 56 % in Ländern wie USA, Kanada, Deutschland, Bulgarien, u.v.a. (40,71). Dies deutet darauf hin, daß eine OTA-Exposition nahezu unvermeidlich ist. Das Vorkommen einer besonders hohen OTA-Belastung in den Ländern Ex-Jugoslawiens (31, 60) und das vermehrte Auftreten von Tumoren der Nieren und der ableitenden Harnwege in dieser Gegend, wie auch die sogenannte Balkannephropathie, die von einigen Autoren mit der hohen OTA-Exposition der dortigen Bevölkerung in Verbindung gebracht wird, lassen vermuten, daß OTA auch bei Erkrankungen des Menschen eine Rolle spielt. Es konnte gezeigt werden, daß das Mycotoxin die Nierenfunktion beeinträchtigt (41,44) und OTA-Exposition auch die Inzidenz von Adenomen und Karzinomen der Nieren und der ableitenden Harnwege in der Maus erhöht (2). Ochratoxin A führt vermutlich eher zu langfristigen Veränderungen der Nierenfunktion, als zu akut toxischen Effekten (57). Frühere Studien, die akute Toxizität beschreiben, wie etwa den Verlust der zellulären Integrität, haben mikro- bis millimolare Ochratoxinkonzentrationen verwendet. Die Konzentrationen, welche durch ernährungsbedingte Exposition zu erwarten sind (16,45), liegen jedoch im nanomolaren Bereich. Bezüglich erhöhter OTA-Exposition und Nierenerkrankungen beim Menschen konnten epidemiologische Studien eine positive Korrelation zwischen Nephropathien beim Menschen - insbesondere bestimmte Formen der interstitiellen Nephritis - und entweder erhöhter OTA-Belastung der Nahrungsmittel oder Plasmakonzentrationen im nanomolaren Bereich, aufzeigen (26,50,60,75). Zusammengekommen weisen diese Daten darauf hin, daß OTA in "physiologischen", d.h. nanomolaren Konzentrationen, nicht als "klassisches" Toxin fungiert und nicht zu einer dramatischen Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen führt. Jedoch konnten die Mechanismen, die den durch OTA in nanomolaren Konzentrationen hervorgerufenen Veränderungen zugrundeliegen, bis jetzt noch nicht zufriedenstellend geklärt werden.

A.V Mögliche Angriffsmechanismen von OTA an der Niere

Da Ochratoxin A in der Lage ist, bei Schweinen eine schwere Nephropathie hervorzurufen, die histologisch einer interstitiellen Nephritis entspricht (43,44), liegt die Vermutung nahe, daß OTA auch beim Menschen Nephropathien vom interstitiellen Typ zu erzeugen vermag. Interstitielle Nephropathien können, zumindest teilweise, aus trophischen Veränderungen der Epithelzellen des Tubulus entstehen, die eine langfristige Verschlechterung der Gewebemöostase auslösen oder unterstützen (39). Im Hinblick auf die Wirkung von OTA, ist die mögliche Beteiligung von Angiotensin II an Hyperplasie und Hypertrophie proximaler Tubuluszellen von Bedeutung (76,77,79): Sowohl trophische Änderungen proximaler Tubuluszellen, im Sinne von Hypertrophie, Atrophie und Hyperplasie wurden in Tierversuchen und in der Zellkultur gezeigt, als auch eine positive Wirkung des Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten Losartan und des Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmers Enalapril auf die durch OTA bewirkten Veränderungen der renalen Hämodynamik (23). Des weiteren fanden sich Hinweise, daß Angiotensin II eine zentrale Rolle im Voranschreiten chronischer Dysfunktionen der Niere spielen könnte (77,78,80). Alles in allem eröffnen diese Daten die Möglichkeit, daß die Effekte von nanomolaren OTA-Konzentrationen teilweise Resultat einer Interaktion mit physiologischen Signaltransduktionsmechanismen sein könnte, insbesondere im Zusammenhang mit Angiotensin II. Weiterhin liegen Hinweise vor, OTA könne mit dem zellulären Calciumtransport interferieren, was zu einer Anreicherung von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Nierengewebe führt (4). Somit könnte die Interaktion von OTA mit hormonellen Signalen durch Interferenz mit der Ca^{2+} Homöostase erfolgen. Bis jetzt sind jedoch noch keine Studien über die Wirkung von OTA auf die freie zytosolische Calciumkonzentration oder seine Effekte auf Nierenepithelzellen menschlichen Ursprungs verfügbar.

A.VI Ziel dieser Studie

Die vorliegende Studie befaßt sich mit den Wirkungen von nanomolaren OTA-Konzentrationen und deren Wechselwirkungen mit Angiotensin II und epidermalem Wachstumsfaktor (EGF) im Hinblick auf die Zellproliferation, Zellintegrität und die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Sowohl EGF als auch Angiotensin II repräsentieren mitogene Stimuli für Nierenepithelzellen und es wird vermutet, daß Veränderungen im Zellumsatz zu der Entwicklung fortschreitender Nierenschädigung beitragen (39). Da bis jetzt keine Daten über den Effekt von OTA auf Nierenzellen menschlichen Ursprungs erhältlich sind, wurden für diese Studie immortalisierte menschliche Nierenepithelzellen (Immortalized Human Kidney Epithel, sog. IHKE-1 Zellen) für die Experimente verwendet. IHKE Zellen wurden bereits in vielerlei Hinsicht charakterisiert und es konnte gezeigt werden, daß sie verschiedene Eigenschaften von proximalen Tubulusepithelzellen besitzen, wie die Ausbildung eines dichten Epithels und charakteristische Transportproteine (36-38,74). Insofern stellen sie ein geeignetes Modell für die Untersuchung menschlicher Tubuluszellen in Kultur dar. Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse, scheinen die durch OTA in nanomolaren Konzentrationen bewirkten Änderungen der Nierenfunktion zumindest teilweise auf gestörte Ca^{2+} -Signalmechanismen zurückzuführen zu sein und nicht auf den Untergang von Zellen. Insofern fungiert OTA in toxikologisch relevanten Konzentrationen vermutlich als Funktionsmodulator und nicht als "klassisches" Toxin.

B Methoden

B.I Zellkultur

Als Modellzellen für den proximalen Tubulus wurden immortalisierte humane Nierenepithelzellen (IHKE-1) verwendet, die freundlicherweise von S. Møllerup, Department of Toxicology, Oslo, Norwegen zur Verfügung gestellt wurden (74). IHKE-1 Zellen sind ein geeignetes Modell zur Untersuchung proximaler Tubuluszellen *in vitro*, da sie zahlreiche Eigenschaften proximaler Tubuluszellen besitzen (36-38,74). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert (75 cm² Wachstumsfläche). Als Kulturmedium wurde HAM F-12/DMEM Medium verwendet, ergänzt mit 1.1 g/l NaHCO₃, 3.57 g/l HEPES, 5 mg/l (humanes Apo-) Transferrin, 5 mg/l (bovines) Insulin, 36 µg/l Hydrokortison, 10 µg/l Mäuse-EGF, 5µg/l Na-Selenit, 10% fetalem Kälberserum (Biochrom KG, Berlin, Deutschland). Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ aufbewahrt. Das Medium wurde dreimal die Woche erneuert und die Zellen wurden einmal pro Woche subkultiviert. Dazu wurden die Zellen für 5 min in 0.2 g/l EDTA-haltiger, Phosphat gepufferter Ringerlösung (PBS) inkubiert. PBS enthält (in g/l): NaCl 8, KCl 0.2, Na₂HPO₄ 1.15, und KH₂PO₄ 0.2. Anschließend wurden die Zellen für weitere 5-10 min in Trypsin-haltigem (0,25 g/l) EDTA-PBS inkubiert, bis sich alle Zellen abgelöst hatten. Die Trypsinwirkung wurde durch die Zugabe von Kulturmedium neutralisiert, 10 % der abgelösten Zellen wurden in einer neuen 75 cm² Kulturflasche angesät. Die restlichen Zellen wurden mit einer den experimentellen Anforderungen entsprechenden Dichte von 30.000 bis 50.000 Zellen/cm² auf Glasdeckgläsern oder Petrischalen angesät.

B.II Meßmethoden

B.II.1 Intrazelluläre Calciumkonzentration

Die intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium $[Ca^{2+}]_i$ wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes fura-2 (Molecular Probes, Leyden, Niederlande) gemessen (27). Dies geschah durch Anregung bei einer Wellenlänge von 334 nm und 380 nm. Das emittierte Licht wurde bei 510 nm aufgenommen. Die Fluoreszenzintensität von fura-2

hängt von der freien Calciumkonzentration ab. Bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm nimmt die Fluoreszenzintensität mit steigender Calciumkonzentration zu, während sie bei 380 nm sinkt. So kann über das Verhältnis 334/380 nm die Konzentration des intrazellulären Calciums unabhängig von der Farbstoffkonzentration bestimmt werden. Der Dissoziationskoeffizient (K_d) von fura-2 für Calcium beträgt 225 nmol/l und macht es deswegen besonders geeignet zur Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration, die unter physiologischen Bedingungen etwa 100 nmol/l beträgt. Die Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasdeckgläsern angesät und 24 h vor den Experimenten durch Entzug von Wachstumsfaktoren ruhiggestellt. Vor den Messungen wurden die Zellen 15 min bei 37 °C in HEPES Ringer mit fura-2-AM beladen, dreimal gewaschen, um den extrazellulär befindlichen Farbstoff zu entfernen. Anschließend wurde das Deckglas auf den Objektisch des Mikroskops gelegt. Die Hintergrundfluoreszenz wurde gemessen und von den erhaltenen Fluoreszenzwerten der Zellen subtrahiert. Die Messungen fanden mit dem Attofluor-Videoimaging-System (Zeiss) statt, ausgestattet mit einem Axiovert 100 TV Mikroskop (400-fache Vergrößerung, Ölimmersion; Zeiss). Das System ermöglichte, die Fluoreszenz einzelner Zellen zu messen, indem rechteckige Meßbereiche, sog. Regions of Interest (ROI), im „Live“-Bild auf die Zellen gelegt wurden. Bis zu 99 dieser ROI's können für eine Messung ausgewählt werden. In den hier vorgestellten Experimenten wurden üblicherweise zwischen 9 und 30 Zellen pro Deckglas untersucht. Die Bilder wurden mit einer Frequenz von einem Bildpaar pro Sekunde bis einem Bildpaar pro 10 Sekunden mit einer ICCD-Videokamera (Zeiss) aufgezeichnet und mit Hilfe der Attofluor Software digitalisiert. Am Ende jedes Experiments wurden die Zellen mit zwei Kalibrationslösungen (Ca^{2+} -freie EGTA-Lösung und 1mmol/l Ca^{2+} -Ringerlösung) überströmt, um das maximale Verhältnis 334/380 nm (R_{max}) und das minimale Verhältnis 334/380 nm (R_{min}) zu bestimmen. Beide Kalibrationslösungen enthielten den Calciumionophor Ionomycin (1 $\mu\text{mol/l}$), so daß die intrazelluläre der extrazellulär vorgegebenen Calciumkonzentration entsprach. Die Calciumkonzentration wurde mit folgender Gleichung berechnet (27):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \cdot \beta \cdot (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$$

wobei β dem Quotienten der Fluoreszenzintensität bei Anregung mit 380 nm in Abwesenheit von Ca^{2+} , dividiert durch die Intensität in Anwesenheit von 1 mmol/l Ca^{2+} ,

darstellt. Die Experimente wurden in mit HEPES oder HCO_3^- gepufferten Ringerlösungen durchgeführt.

B.II.2 Die Mangan-Quench Technik

Die Mangan-Quench Methode basiert auf der Eigenschaft von Mn^{2+} -Ionen durch Ca^{2+} -Kanäle in Zellen einzudringen und mit höherer Affinität als Ca^{2+} an fura-2 zu binden und dessen Fluoreszenz zu unterdrücken (52). Nach einer 15-minütigen Inkubation der Zellen bei 37 °C mit fura-2, wurden die Experimente in Ringerlösung durchgeführt, die 50 $\mu\text{mol/l}$ Mn^{2+} enthielt. Die Fluoreszenz wurde bei Anregung mit der isosbestischen Wellenlänge von fura-2 (365 nm) bestimmt, bei der die fura-2 Fluoreszenz unabhängig von Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration ist. Eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zeigt somit Mn^{2+} -Einstrom in die Zellen an und stellt einen qualitativen Indikator für Ca^{2+} -Einstrom dar.

B.II.3 Bestimmung der Aktivität der Thapsigargin-sensitiven ATPase

Die Aktivität der Thapsigargin-sensitiven ATPase wurde bestimmt, wie von (59,62) beschrieben. Die Zellen wurden für 15 min in HEPES Ringer (pH 7.4; 37 °C) inkubiert, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation mit 100 nmol/l OTA oder Kontrollringer. Anschließend wurden die Zellen 90 min mit 0.1 % Triton X-100 lysiert und 10 min bei 4 °C mit 10,000 g zentrifugiert. Die Thapsigargin-sensitive ATPase-Aktivität wurde in einer Ringerlösung bestimmt, die folgendermaßen zusammengesetzt war (mmol/l): HEPES 50, KCl 100, NaN_3 5, MgCl_2 2, CaCl_2 1 (pCa 5.2), EGTA 1, NADH 0.15, Phospho(*enol*)pyruvat 0.5, ATP 2, Pyruvatkinase 10 U/ml und Laktatdehydrogenase 20 U/ml. Die ATPase-Aktivität wurde als Abnahme der NADH-Extinktion bei 340 nm (ΔE) gemessen. Die Ca^{2+} -ATPase Aktivität wurde aus der Differenz der ATPase Aktivität in Gegenwart und Abwesenheit von 10 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin für jede Probe bestimmt. Diese Differenz entspricht der Thapsigargin-sensitiven ATPase Aktivität. Der Proteingehalt wurde nach der von Lowry beschriebenen Methode bestimmt (48).

B.II.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe eines Coulter Counter Systems bestimmt (Coulter Electronics GmbH, Krefeld). Die Zellen wurden auf Petrischalen (\varnothing 5.6 cm) angesät. Wenn Subkonfluenz des Zellrasens erreicht war (ca. 40.000 Zellen / cm^2), wurden die Zellen durch Entzug von Serum und Zusatzstoffen (MEM Medium, Biochrom KG, Berlin, Deutschland) für 24 h ruhiggestellt. Die Experimente wurden in Medium ohne Zusatzstoffe durchgeführt, um sicherzustellen, daß die Wachstumsstimulation allein auf die Zugabe von epidermalem Wachstumsfaktor, Angiotensin II oder OTA zurückzuführen war. Nach Ablauf der 24-stündigen Inkubationszeit wurden die Zellen wie oben beschrieben mit EDTA und Trypsin von den Petrischalen abgelöst, die Trypsinaktivität mit Medium inaktiviert. Daraufhin wurden die Zellen bei 4 °C mit 1,800 g abzentrifugiert und für die Zählungen in CASY®-Lösung (Schärfe GmbH, Reutlingen) resuspendiert. Danach wurde das Meßprogramm des Zählgerätes gestartet, wobei für eine Probe der Mittelwert aus drei Messungen bestimmt wurde.

B.II.5 Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH-Freisetzung wurde als Parameter für die Integrität der Zellen verwendet und ausgedrückt als Verhältnis von ins Medium freigesetzter LDH-Aktivität zur gesamten LDH-Aktivität der Probe (3). Die LDH wurde wie folgt bestimmt: Die Zellen wurden in Petrischalen (\varnothing 5.6 cm) angesät und vor den Experimenten 24 h durch Serumentzug ruhiggestellt. Danach wurden sie für den angegebenen Zeitraum mit den jeweils angegebenen Substanzen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 90 min mit 0.1 % Triton X-100 lysiert und das Zelllysate 10 min bei 4 °C mit 10,000 g zentrifugiert. Die spezifische Enzymaktivität der LDH wurde in Pyruvat-haltigem Puffer (Phosphatpuffer, wie unten beschrieben, 1 mM Pyruvat, 0.2 mM NADH, pH 7.0) anhand der Extinktionsabnahme von NADH (ΔE) mit Hilfe folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{spez. Aktivität (U/ml)} = (\Delta E/\text{min} \cdot \text{Vol}_{\text{Gesamt}} \cdot F) / (\epsilon \cdot \text{Vol}_{\text{Probe}} \cdot d)$$

wobei F der Verdünnung der Probe entspricht, d der Schichtdicke und ϵ dem Extinktionskoeffizienten von NADH, der $6.11 \text{ cm}^2/\mu\text{mol}$ beträgt.

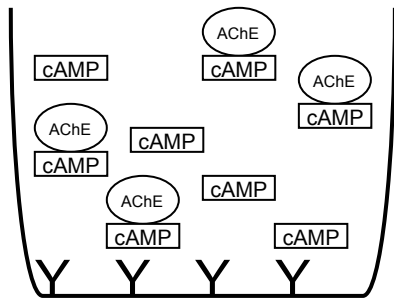
B.II.6 Bestimmung der Aufnahme von ^3H -OTA

Die Aufnahme von ^3H -OTA wurde bestimmt, wie in (69,70) beschrieben. Die Menge an Tritium-markierten OTA, das sich in den Zellen angereichert hatte, wurde nach Lyse der Zellen mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen.

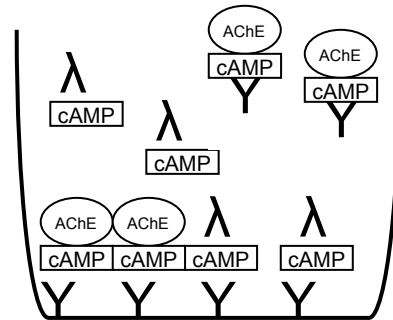
B.II.7 Bestimmung des zellulären cAMP-Gehalts

Der zelluläre Gehalt an zyklischem Adenosin-3',5'-Monophosphat (cAMP) wurde mit Hilfe eines cAMP-EIA-Kits bestimmt (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA). Die Zellen wurden auf Petrischalen (\varnothing 5 cm) angesät. Nach 24-stündigem Serumentzug wurden die Zellen 15 min mit HEPES Ringer (37 °C, pH 7.4) und anschließend 10 min mit HEPES Ringer als Kontrolle oder verschiedenen OTA Konzentrationen inkubiert. Die Zellen wurden bei 4 °C im Ultraschallbad homogenisiert. Nach 10 minütiger Inkubation des Zellmaterials bei 95 °C folgten 10 min Zentrifugation bei 1,500 g. Daraufhin wurden die Proben in eine mit Maus-Anti-cAMP-Antikörpern beschichtete 96-Well-Platte (im Kit enthalten) pipettiert. Ferner wurde eine Eichkurve mit bekannten cAMP-Konzentrationen erstellt. Im Folgenden wurden cAMP-Antiserum und mit cAMP konjugierte Acetylcholinesterase (AChE) zugegeben. Nach 18-stündiger Inkubation (Raumtemperatur) wurden die Inkubationslösungen entfernt und die 96-Well-Platte 5x mit Waschpuffer (im Kit enthalten) gewaschen und Ellman's Reagenz als Substrat für die AChE zugegeben. Nach ca. 60 min. wurde die Absorption der in den Wells enthaltenen Lösungen bei 412 nm sowie Leerwert, totale AChE-Aktivität und nicht spezifische Bindung mit Hilfe des Viktor²-Fluorometers (Fa. Wallac, Turku, Finnland) bestimmt. Die cAMP-Konzentration der Proben wurde nach Subtraktion der nicht spezifischen Bindung aus der mit Hilfe der cAMP-Standards erstellten Eichkurve errechnet. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf der cAMP-Messung.

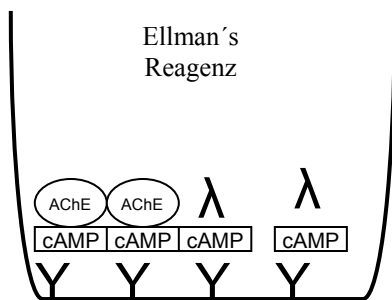
Abb. 2a



b



c



d

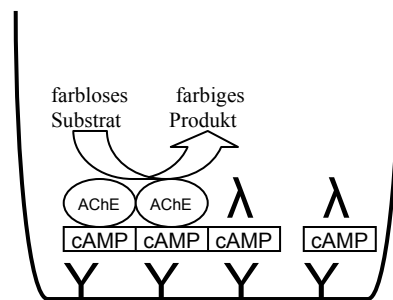


Abb. 2: Schemazeichnung des EIA-Verfahrens zur cAMP-Bestimmung. a) Das aus den Zellen gewonnene cAMP konkurriert mit cAMP-AChE Konjugat um Bindungsstellen an den Anti-cAMP-Antikörpern. b) Nicht antikörpergebundenes cAMP und cAMP-AChE-Konjugat werden mit freien Antikörpern gebunden und entfernt. c) Durch Zugabe von Ellman's Reagenz entsteht durch die AChE ein farbiges Produkt (d), dessen Absorption sich indirekt proportional zur vorhandenen Konzentration an cAMP verhält.

B.II.8 Materialien

Ionomycin, Thapsigargin, Ochratoxin A, an bovines Serum Albumin kovalent gebundenes OTA (BSA-OTA), Bisindolylmaleimide I, 1, 2-bis-(O-Aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-Tetraessigsäure-Acetomethoxyester (BAPTA-AM), Angiotensin II (Ang II), epidermaler Wachstumsfaktor (EGF), Noradrenalin, β -NADH, Phospho(*enol*)pyruvat, Laktatdehydrogenase and Pyruvatkinase wurden von Sigma, Deisenhofen, Deutschland erworben. SK&F 96365 stammte von Alexis, Grünberg, Deutschland und U 73122 von Biomol, Hamburg, Deutschland. Fura-2 AM wurde bei Molecular Probes, Leiden, Niederlande erworben. Alle anderen Chemikalien waren von höchstem Reinheitsgrad und von Merck, Darmstadt, Deutschland bezogen.

Die Ringerlösung war zusammengesetzt aus (mmol/l): NaCl 122.5, KCl 5.4, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 0.8, NaH₂PO₄ 1.0, D-Glucose 5.5, HEPES 10 (mit NaOH 1 mol/l bei 37 °C auf pH 7.4 titriert). Die HCO₃⁻-gepufferte Ringerlösung bestand aus (mmol/l): NaCl 106, KCl 5.4, CaCl₂ 1.2, MgCl₂ 0.8, NaH₂PO₄ 0.2, Na₂HPO₄ 0.8, D-Glucose 5.5 und wurde mit 5% CO₂ begast. Die Ca²⁺-freien Lösungen enthielten 1 mmol/l EGTA und kein Ca²⁺. Mikromolare Ca²⁺ Konzentrationen wurden erhalten, indem EGTA und Ca²⁺ in den jeweils berechneten Konzentrationen eingesetzt wurden. Als Eichlösungen wurde Phosphatringer (NaCl 141, KCl 4, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 0.4, Na₂HPO₄ 1.6 Angaben jeweils in mmol/l, pH 7.4) verwendet, dem 1 mmol/l CaCl₂ bzw. 1 mmol/l EGTA zugesetzt war.

B.II.9 Statistik

Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte \pm des mittleren Fehlers der Mittelwerte angegeben. Einzelne Mittelwerte wurden unter Verwendung des Student's t-Tests verglichen. Beim Vergleich von Werten verschiedener Untersuchungsobjekte wurde der t-Test für nicht-paarige Stichproben und die univariate Varianzanalyse (ANOVA) angewandt. Für die Testung von zeitverschiedenen Werten desselben Untersuchungsobjektes fand der t-Test für paarige Stichproben Verwendung. Für die Unterschiedlichkeit zweier Stichproben wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ zugrunde gelegt. Die Ca²⁺ Messungen wurden mit mindestens 4 Deckgläsern aus mindestens 2 verschiedenen Passagen durchgeführt. n repräsentiert die Zahl der untersuchten Zellen oder die Zahl der verwendeten Petrischalen.

C Ergebnisse

C.I Der Effekt von OTA auf das Wachstumsverhalten von IHKE Zellen

Da sowohl EGF als auch Angiotensin II Stimuli für das Wachstum von proximalen Tubuluszellen und anderen Zellen renalen Ursprungs darstellen (35,55,77-79), wurde die Wirkung von 10 µg/l EGF, 100 nmol/l Angiotensin II und 1 nmol/l OTA auf das Proliferationsverhalten von IHKE Zellen untersucht. Eine 24-stündige alleinige OTA-Exposition hatte keinen Effekt auf die Zellzahl. In Anwesenheit von EGF hatte OTA jedoch einen signifikanten Einfluß auf die Proliferation (Abb. 3a). Diese mitogene Wirkung von OTA konnte allerdings durch Komplexierung des intrazellulären Calciums mit 50 µmol/l BAPTA-AM vollständig aufgehoben werden. In Gegenwart von OTA, EGF und BAPTA-AM betrug die Zellzahl $96 \pm 3 \%$ im Verhältnis zu EGF und BAPTA-AM ($n = 12$). Im Gegensatz zu der Wirkung von OTA wurde der Effekt

Abb. 3a

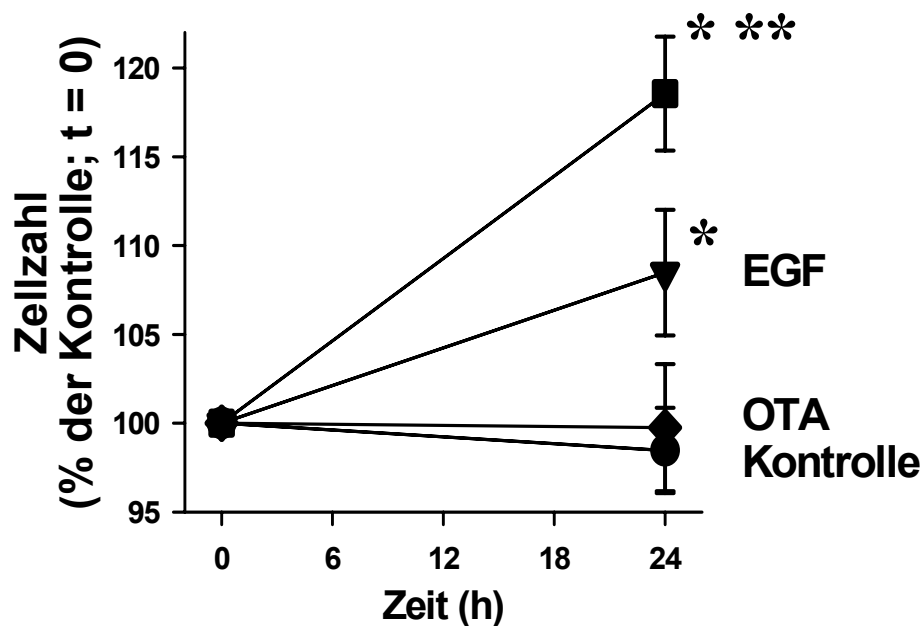


Abb. 3a: OTA in einer Konzentration von 1 nmol/l potenzierte die Wirkung von 10 ng/l EGF (* $p < 0.05$ gegenüber der Kontrolle; ** $p < 0.05$ gegenüber EGF; $n = 12$).

von EGF alleine nicht von BAPTA-AM beeinträchtigt: In Anwesenheit von BAPTA-AM + EGF betrug die Zellzahl 100 ± 4 % verglichen mit dem Effekt von EGF ($n = 9$). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Wirkung von OTA, nicht aber die von EGF, Ca^{2+} -abhängig ist, was auch mit der früheren Beschreibung einer Ca^{2+} -unabhängigen Wachstumsstimulation durch EGF vereinbar ist (56). Angiotensin II (Ang II) stimulierte gleichermaßen das Zellwachstum nur in Gegenwart, nicht aber in Abwesenheit von EGF. 100 nmol/l Ang II vergrößerten die Zellzahl in Anwesenheit von EGF auf 114 ± 8 % der Zellzahl in alleiniger Anwesenheit von EGF ($p < 0.05$; $n = 12$) in Übereinstimmung mit der Literatur (47). Die mitogene Wirkung von Ang II konnte ebenfalls durch BAPTA-AM verhindert werden (Die Zellzahl in Gegenwart von Ang II, EGF und BAPTA-AM betrug im Vergleich mit EGF und BAPTA-AM 101 ± 4 % ; $n = 6$), was auf eine Ca^{2+} abhängige Potenzierung des EGF-induzierten Wachstums von IHKE Zellen durch Ang II hinweist, ähnlich dem Effekt von Ang II, der für glatte Gefäßmuskelzellen gezeigt werden konnte (19). Da also sowohl Ang II als auch OTA das Wachstum auf Ca^{2+} -abhängige Weise beeinflussen, wurde als nächstes getestet, ob OTA in der Lage wäre, den Ca^{2+} -abhängigen Effekt von Ang II zu verstärken. Wie in Abb. 3b und c dargestellt, war das Ca^{2+} -abhängige Wachstum in der gleichzeitigen Anwesenheit von Ang II und OTA signifikant vermehrt gegenüber der Wirkung von OTA oder Ang II allein. Außerdem war der Effekt der gleichzeitigen Gabe von OTA und Ang II (+ 40 %) sogar größer als der errechnete additive Effekt beider Substanzen (+ 26 %), was anzeigt, daß OTA die Ang II-induzierte Zellproliferation potenziert. Für diese Experimente wurde OTA in einer Konzentration von 1 nmol/l verwendet. Oberhalb einer Konzentration von 10 nmol/l führte OTA innerhalb von 24 h zu einer Abnahme der Zellzahl und einem leichten Anstieg der LDH-Freisetzung, wohingegen eine kurzzeitige OTA-Exposition in Konzentrationen unterhalb von 10 nmol/l keinen Effekt auf die Zellintegrität hatte, wie weiter unten beschrieben ist. Da die verstärkende Wirkung von OTA auf die Zellproliferation Ca^{2+} abhängig ist, wurde im Folgenden der Einfluß von OTA auf die Ca^{2+} Homöostase untersucht.

Abb. 3b

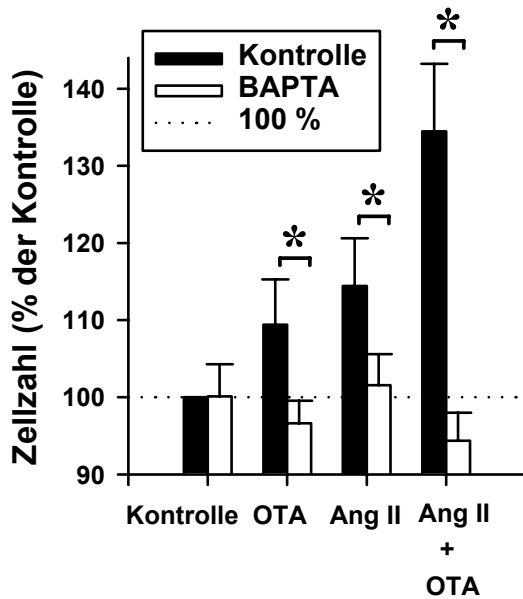


Abb. 3c

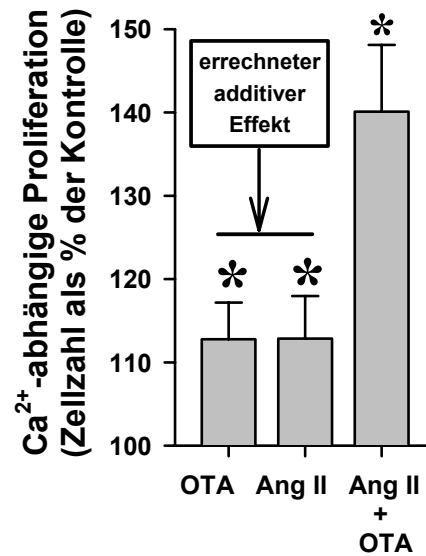


Abb. 3b und c: Ang II und OTA wirkten synergistisch auf das Ca²⁺-abhängige Wachstum (*p<0.05 gegenüber der Anwesenheit von BAPTA-AM; n = 8-16).

C.II Die Wirkung von OTA auf die zelluläre Ca²⁺ Homöostase in IHKE Zellen

C.II.1 Calciuoszillationen

Abb. 4a zeigt durch OTA hervorgerufene Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration [Ca²⁺]_i in IHKE Zellen, die nach Auswaschen von OTA vollständig reversibel waren. Dieser Effekt des Mykotoxins konnte sowohl in mit HEPES-, als auch in mit HCO₃⁻-gepufferter Ringerlösung beobachtet werden. Um eine Interferenz der Eigenfluoreszenz von OTA, die zwischen 213 und 335 nm maximale UV-Absorption und zwischen 428 und 490 nm das Maximum des Emissionsspektrums aufweist, mit der Messung auszuschließen, wurde das Experiment auch ohne Beladung der Zellen mit fura-2 AM durchgeführt. Es zeigte sich, daß die Eigenfluoreszenz des Toxins in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluß auf die Messungen hatte.

Abb. 4a

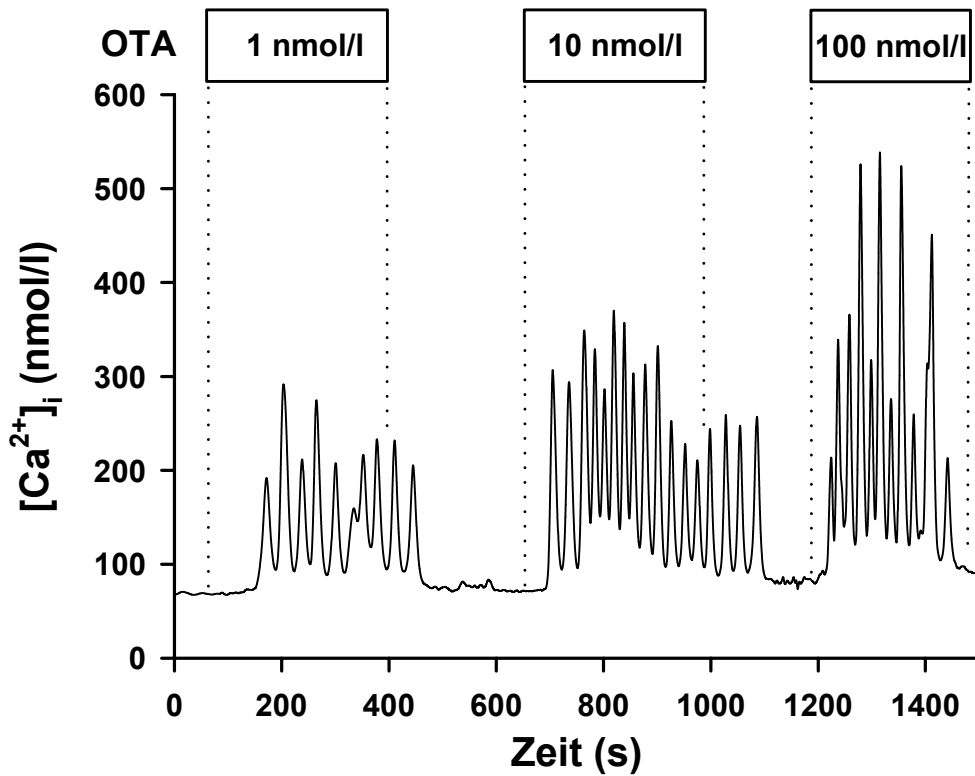


Abb. 4b

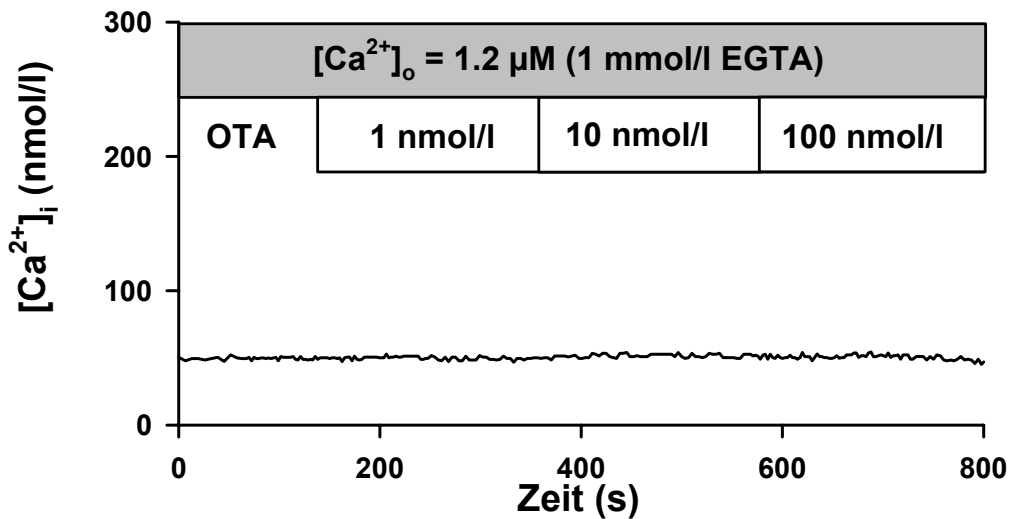


Abb. 4a: Durch OTA hervorgerufene Oszillationen der freien intrazellulären Calciumkonzentration in IHKE-Zellen (n=64).

Abb. 4b: Reduktion der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration hemmte OTA-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen in IHKE-Zellen (n = 43).

Der durch OTA erzeugte Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ war abhängig von der OTA-Konzentration (Abb. 5a und b), während die Frequenz der Oszillationen (~ 2.7 Anstiege/min) konzentrationsunabhängig war. Die Schwellendosis an OTA, bei der Oszillationen gerade noch auslösbar waren, lag bei 0.1 nmol/l. Bis zu einer Konzentration von 10 nmol/l war OTA nur in der Lage, transiente Ca^{2+} -Antworten hervorzurufen, die von 120 bis 300 s Dauer waren und noch in der Anwesenheit von OTA abklangen. Ab einer Konzentration von 100 nmol/l produzierte OTA andauernde Oszillationen, die in Gegenwart von OTA über einen Zeitraum von mindestens 30 min anhielten.

Abb. 5a

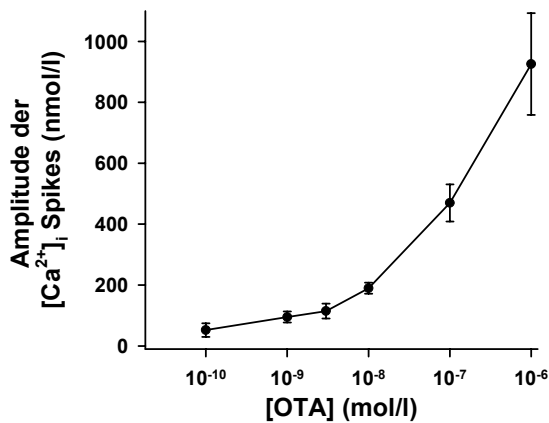


Abb. 5b

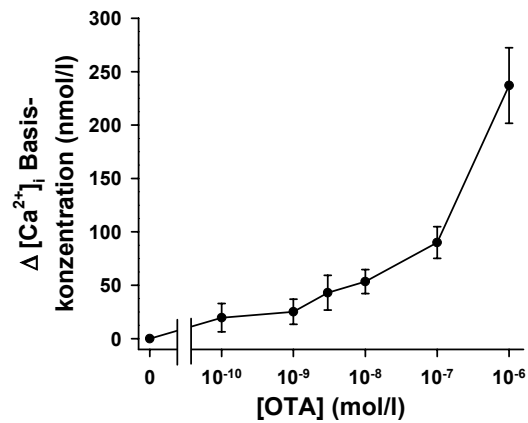


Abb. 5a und b: Die durch OTA erzeugten Oszillationen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ waren sowohl in der Höhe des Anstiegs der Ca^{2+} -Basiskonzentration als auch der Höhe der Ca^{2+} -Spitzenkonzentration dosisabhängig (n=64).

Die Oszillationen begannen mit einer leichten Verzögerung von ca. 60-120 s (Abb. 6a) und in ungefähr 50 % der untersuchten Zellen konnte vor dem Einsetzen der Oszillationen eine leichte Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden. Diese Verzögerungsphase und die Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$ konnte jedoch nur bei der ersten OTA-Exposition der Zellen beobachtet werden. Bei einer zweiten OTA-Gabe nach einigen Minuten der Superfusion mit Kontrollringer, antworteten die Zellen sofort (siehe Abb. 6a, zweite Antwort auf OTA). Eine Verzögerung der Ca^{2+} -Antwort wurde erst nach einer mindestens 15-minütigen Superfusion mit Kontrollringer wieder ausgelöst. Diese Beobachtungen legen nahe, daß OTA einen intrazellulären Angriffspunkt hat und die fehlende Verzögerung der Oszillationen bei mehrmaliger OTA-Exposition möglicherweise auf intrazellulär akkumuliertes OTA zurückzuführen ist.

Abb. 6a

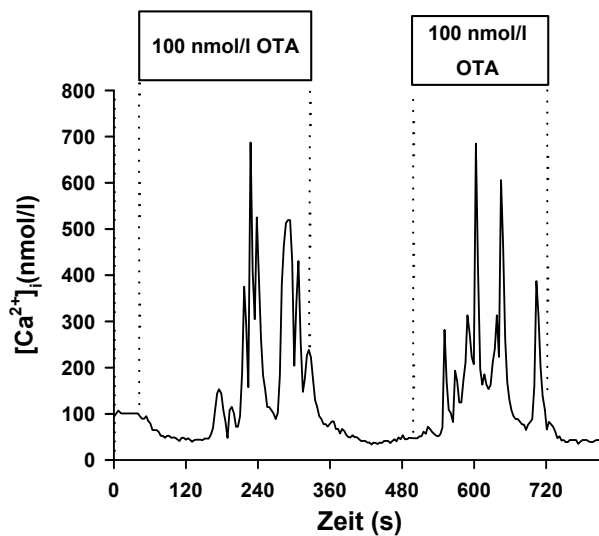


Abb. 6b

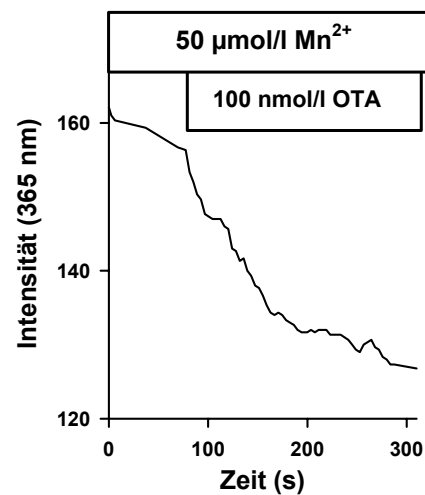


Abb. 6a: Bei Erstexposition traten die durch OTA stimulierten Ca^{2+} -Oszillationen mit einer Verzögerung von 60 - 120 s auf (n=58).

Abb. 6b: OTA bewirkte einen sofortigen Einstrom von Mn^{2+} -Ionen über die Plasmamembran (n=45).

Allerdings ist der verzögerte Beginn der Ca^{2+} -Oszillationen bei der ersten OTA-Gabe vermutlich nicht auf die verzögerte Aufnahme von OTA in die Zellen zurückzuführen, da diese wesentlich schneller erfolgt (Abb. 7) und bereits nach 60 s eine Plateauphase erreicht. Im Konzentrationsbereich, der für diese Untersuchung verwendet wurde, war die Aufnahme von OTA nicht gesättigt, da 900 nmol/l unmarkiertes OTA die Aufnahme von ^3H -OTA nicht verringerten (nicht abgebildet). Insofern scheint der Grund für den verzögerten Wirkungseintritt von OTA bezüglich der Ca^{2+} -Oszillationen weniger die Akkumulationsdauer des Toxins in der Zelle zu sein als vielmehr eine "Sensitivierung" intrazellulärer Signalwege, wofür auch die unten dargelegten Ergebnisse sprechen. Um mehr über den Mechanismus zu erfahren, durch den OTA Oszillationen der freien zellulären Ca^{2+} bewirkt, wurde ferner die Rolle von extrazellulärem Ca^{2+} und die Bedeutung von Ca^{2+} -Einstrom für die OTA-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen untersucht.

Abb. 7

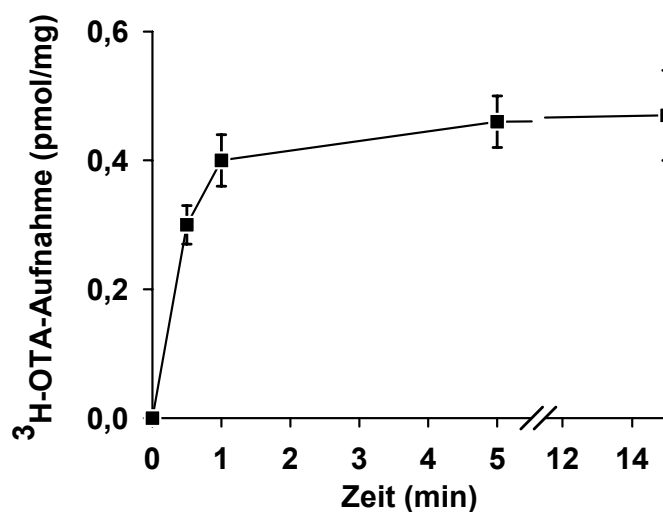


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der Aufnahme von ^3H -OTA in IHKE-Zellen.

C.II.2 Ca²⁺-Einstrom

Mangan-Quench Experimente, als qualitativer Indikator für Ca²⁺-Einstrom, gaben Hinweise darauf, daß OTA einen Ca²⁺-Influx über die Plasmamembran stimulierte, der unmittelbar nach Zugabe des Mykotoxins einsetzte (Abb. 6b). Überraschenderweise konnte ein Anstieg in der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration erst ca. 60 Sekunden nach dem Beginn des Einstroms beobachtet werden. Diese offensichtliche Diskrepanz könnte durch rapide Sequestration des einströmenden Calciums in intrazelluläre Speicherorganellen erklärt werden (sog. "leiser Ca²⁺-Einstrom"). Dies wird im Detail weiter unten erläutert werden. Eine Verminderung des extrazellulären Calciums ([Ca²⁺]_o) auf mikromolare Konzentrationen und die damit verbundene Verringerung der Triebkraft für den Ca²⁺-Einstrom verhinderte einen Effekt von OTA vollständig (Abb. 4b). Zusätzlich konnte auch mit 30 µmol/l SK&F 96365, einem Blocker von spannungs- und ligandengesteuerten Calciumkanälen (6), ein Effekt von OTA auf die zelluläre Calciumkonzentration vollständig unterdrückt werden (Abb. 8a). Auch im Mn²⁺-Quench war die Wirkung von SK&F 96365 als eine Verringerung der Intensitätsabnahme/Zeit gut zu sehen (Abb. 8b). Nicht abgebildet sind Experimente mit anderen Substanzen, wie z.B. Verapamil und Nifedipin, die als Inhibitoren von spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanälen nicht in der Lage waren, die durch OTA hervorgerufenen Oszillationen von [Ca²⁺]_i zu verhindern. Zusammengefaßt deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß das auslösende Moment für die OTA-induzierten Ca²⁺-Oszillationen ein durch OTA verursachter Ca²⁺-Influx durch SK&F 96365-sensitive Kanäle ist.

Abb. 8

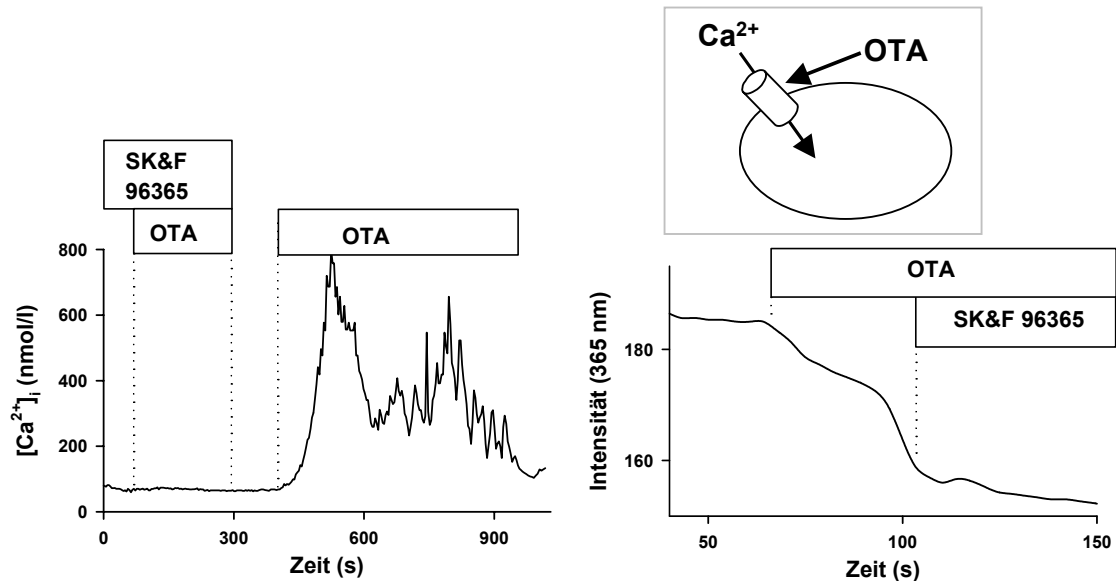


Abb. 8: Der Ca^{2+} -Kanalblocker SK&F 96365 ($30 \mu\text{mol/l}$) hemmte den Effekt von OTA auf $[Ca^{2+}]_i$ ($n=36$). Die Hemmung der OTA-induzierten Calcium-oszillationen war vollständig reversibel.

Im Mn^{2+} -Quench-Experiment (rechts) sieht man eine Reduktion des OTA-getriggerten Einstroms von Mn^{2+} -Ionen ($n = 31$). SK&F 96365 hemmt also OTA-induzierte Calciumoszillationen und Calciumeinstrom.

(Schemazeichnung: OTA induziert Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran)

C.II.3 Die Wechselwirkung von OTA mit dem IP_3 -Signalweg

Viele Hormone sind in der Lage intrazelluläre Ca^{2+} -Antworten durch eine G_i - und/oder G_q -Protein-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) und der damit verbundenen Produktion von Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) auszulösen (10). Das durch IP_3 freigesetzte Ca^{2+} aktiviert zusammen mit DAG die Proteinkinase C, die ihrerseits die Aktivität der PLC hemmt. Über diesen Rückkopplungsmechanismus können auch Ca^{2+} -Oszillationen erklärt werden (12). Um nun die Bedeutung von G_i - bzw. G_q -Proteinen, PLC und PKC für die OTA-induzierten Oszillationen zu bestimmen, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt: Eine 5-stündige Inkubation mit $5 \mu\text{g/l}$ Pertussistoxin (PTX) sollte durch ADP-Ribosylierung von G_i - und G_q -Proteinen deren Aktivierung verhindern. Dieser Eingriff hatte jedoch keinen Einfluß auf die Wirkung von 100 nmol/l OTA auf den

Ca²⁺-Haushalt der IHKE Zellen. Durch OTA wurde in PTX-inkubierten Zellen ein $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht, das $96 \pm 5\%$ der Kontrollen entsprach (Abb. 9). Dieses Ergebnis spricht gegen eine Beteiligung PTX-sensitiver G-Proteine am Wirmechanismus von OTA.

Abb. 9

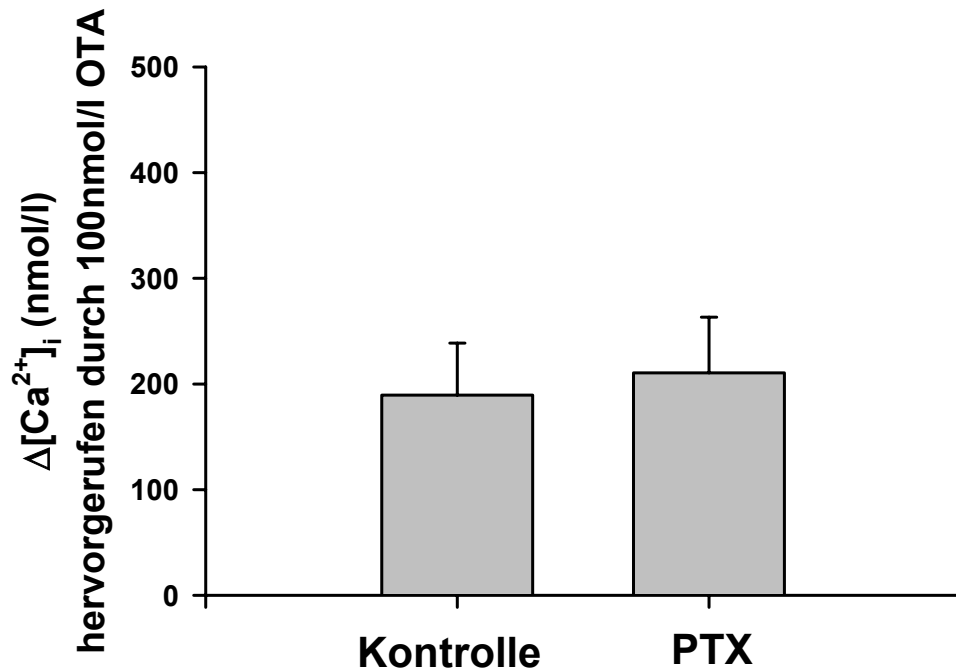


Abb. 9: Der Ca²⁺-Anstieg auf 100 nmol/l OTA war unbeeinflusst von 5-stündiger Inkubation mit Pertussistoxin (5 μ g/l; n=53).

Die Bedeutung der PLC für Ca^{2+} -Antworten auf OTA sollte mit dem PLC-Inhibitor U 73122 (72) untersucht werden. Nach einer 15-minütigen Inkubation mit $1 \mu\text{mol/l}$ U 73122 konnte kein Ca^{2+} -Anstieg auf 100 nmol/l OTA mehr beobachtet werden (Abb. 10a). Jedoch zeigte sich in Mn^{2+} -Quench Experimenten, daß durch OTA weiterhin der Einstrom von Mn^{2+} -Ionen verstärkt wurde (Abb. 10b). Hieraus läßt sich schließen, daß die PLC an der Ca^{2+} - Freisetzung beteiligt ist, nicht aber am OTA-induzierten Ca^{2+} -Einstrom.

Abb. 10a

Abb. 10b

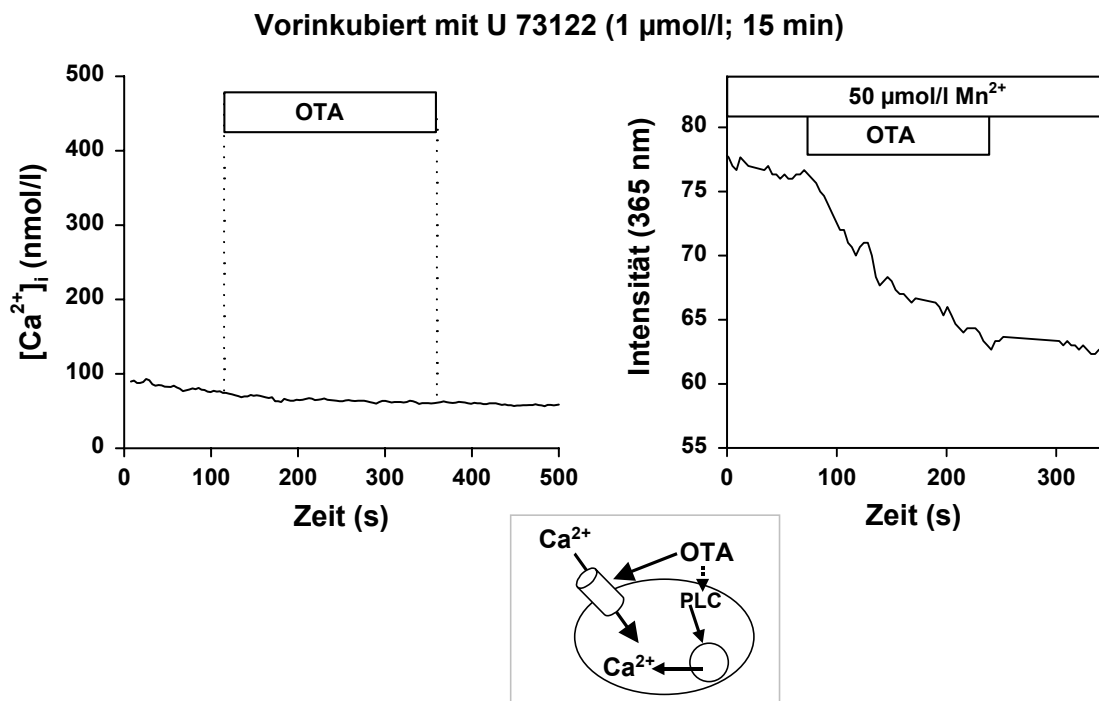


Abb. 10a und b: Hemmung der PLC mit U 73122 unterdrückte die OTA-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen, jedoch nicht den Influx von Mn^{2+} -Ionen (n=63 bzw. 38).
(Schema: OTA-induzierte Ca^{2+} -Antworten sind PLC-abhängig)

Der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid I (BIM I) (5) hatte in einer Konzentration von 100 nmol/l ebenfalls keinen Effekt auf den OTA-induzierten Ca^{2+} -Influx, wie im Mn^{2+} -Quench dargestellt (Abb. 11b) und konnte auch nicht verhindern, daß durch OTA oszillatorisch Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern freigesetzt wurde (Abb. 11a).

Abb. 11a

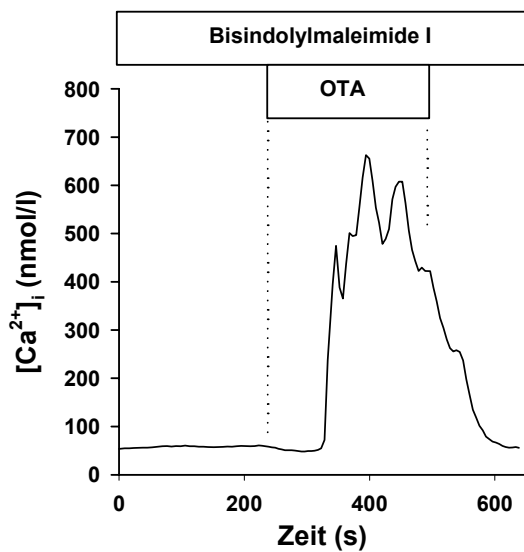


Abb. 11b

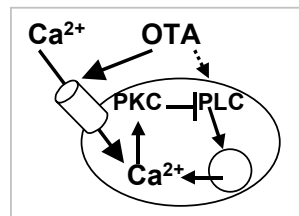
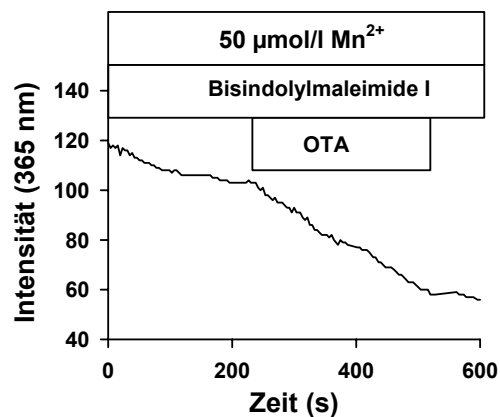


Abb. 11a: Der PKC-Inhibitor BIM I erhöhte die Basiskonzentration der durch OTA hervorgerufenen Ca^{2+} -Oszillationen (n=33).

Abb. 11b: Der durch OTA verursachte Mn^{2+} -Einstrom blieb von BIM I unbeeinflusst (n=29).

(Schema: PKC-PLC-Rückkopplung ist für den oszillatorischen Charakter der Ca^{2+} -Antwort auf OTA mitverantwortlich)

Allerdings konnte beobachtet werden, daß die Basiskonzentration an Ca^{2+} während der Oszillationen auf einem höheren Niveau lag, als in den Kontrollzellen. Dies könnte durch eine verringerte Inaktivierung der PLC durch die PKC (12) erklärt werden, was wiederum zu einem erhöhten IP_3 -Gehalt der Zellen führen würde. Die durch die gestörte

Rückkopplungshemmung erhöhte IP_3 Konzentration könnte ihrerseits für die höhere Ca^{2+} -Basiskonzentration verantwortlich sein. Aufgrund dieser Daten liegt nahe, daß OTA, um die weiter oben beschriebenen Ca^{2+} -Oszillationen auszulösen, sowohl auf die Aktivität der PLC, als auch auf die Rückkopplungshemmung derselben durch die PKC angewiesen ist. Außerdem scheint die OTA-Wirkung von PTX-sensitiven G-Proteinen unabhängig zu sein. Dafür sprächen auch Daten aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Karl-Norbert Klotz, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg, die keine spezifische Wirkung von OTA auf die [^{35}S]GTP γ S – Bindung an das $G_{\alpha i}$ -Protein zeigen konnten (42).

C.II.4 Der Effekt von OTA auf die Ca^{2+} -ATPase

Die Wirkung von Thapsigargin, einem Hemmstoff der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums, ist in Abb. 12a dargestellt. Nach Behandlung der Zellen mit 100 nmol/l Thapsigargin, war OTA nicht mehr in der Lage, Oszillationen hervorzurufen (Abb. 17c). Es kam allerdings zu einem transienten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, ebenso wie den vorher beschriebenen Ca^{2+} -Influx (Abb. 17c und d). Zusätzlich beeinflusste OTA den durch Thapsigargin aktivierten kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom nicht, wie in Abb. 12b gezeigt. Der Anstieg der Konzentration an freiem intrazellulären Calcium, der aus der Zugabe von 1.2. mmol/l extrazellulärem Calcium resultierte, betrug 874 ± 43 nmol/l in den Kontrollen und 919 ± 51 nmol/l in Gegenwart von 100 nmol/l OTA ($n = 37$).

Abb. 12a

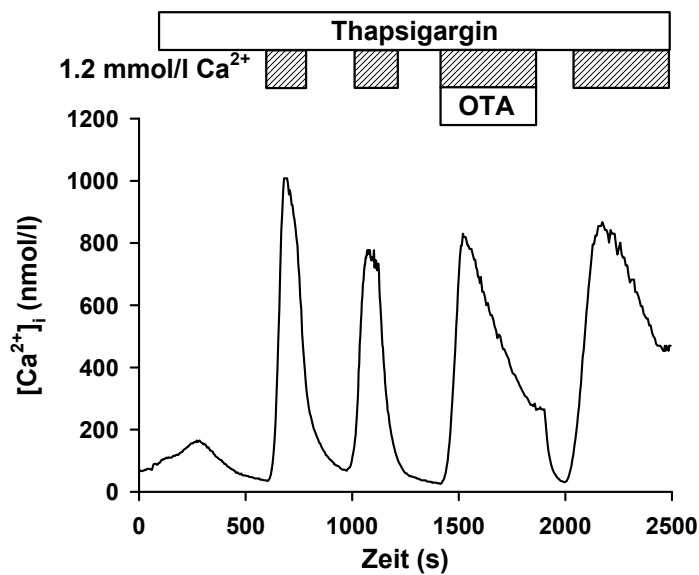


Abb. 12b

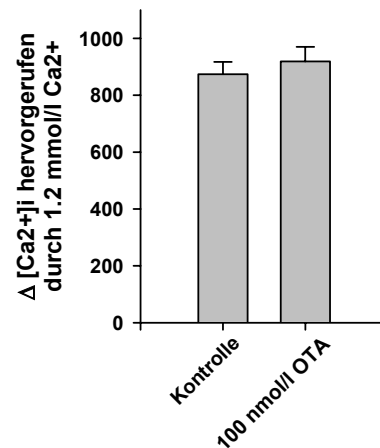


Abb. 12a: Thapsigargin (100 nmol/l) entleert intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher. Der durch die Speicherdepletion aktivierte, kapazitative Ca^{2+} -Einstrom wird sichtbar, wenn die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration von 0 auf 1.2 mmol/l erhöht wird ($n=32$).

Abb. 12b: OTA-Exposition ließ den kapazitiven Ca^{2+} -Einstrom unbeeinflusst.

Diese Ergebnisse deuten an, daß die durch OTA induzierten Ca^{2+} -Oszillationen von Thapsigargin-sensitiven intrazellulären Calciumspeichern ausgehen und diese Speicher auch an der Sequestration von Calcium beteiligt sind, das durch OTA-Wirkung in die Zelle eingedrungen ist. Außerdem scheint die OTA-induzierte Öffnung von calciumpermeablen Membrankanälen nicht mit dem, durch Speicherentleerung getriggerten, kapazitiven Calciumeinstrom in Verbindung zu stehen, da OTA selbst nach maximaler Aktivierung des kapazitiven Calciumeinstroms durch Thapsigargin noch einen im Mn^{2+} -Quench sichtbaren Ca^{2+} -Einstrom aktiviert. Zur Überprüfung der Hypothese, OTA aktiviere einen sog. "leisen" Ca^{2+} -Influx, wurde die durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin hervorgerufene Erhöhung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Kontrollzellen und in Zellen, die 90 s lang 100 nmol/l OTA exponiert waren, verglichen (54). Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abb. 13a und b dargestellt und zeigen, daß in den mit OTA behandelten Zellen durch Thapsigargin eine signifikant größere Ca^{2+} -Antwort ausgelöst werden konnte, was dafür spricht, daß der Füllungszustand der Ca^{2+} -Speicher der OTA-exponierten Zellen erhöht war. Um dies weiter zu klären wurde die Aktivität der Thapsigargin-hemmbareren Ca^{2+} -ATPase direkt bestimmt.

Wie Abb. 13d zu entnehmen ist, wurde die Thapsigargin-sensitive ATPase-Aktivität, die der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums entspricht (62), durch 10-minütige OTA-Inkubation der Zellen nahezu verdoppelt, und zwar von $0.10 \pm 0.02 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ auf $0.19 \pm 0.04 \text{ pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg Protein})^{-1}$ ($n = 8$; $p < 0.05$). Da die OTA-induzierten Oszillationen durch Thapsigargin gehemmt werden konnten, scheint Calciumaufnahme in intrazelluläre Speicher eine Voraussetzung für die Oszillationen zu sein. Des weiteren könnte durch die stimulierte Sequestration das verzögerte Einsetzen der Oszillationen erklärt werden. Natürlich schließt dies eine Beteiligung der Plasma-Membran- Ca^{2+} -ATPase nicht aus.

Aus den bisher geschilderten Ergebnissen läßt sich folgern, daß die OTA-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen einerseits auf Ca^{2+} -Einstrom über SK&F 96365-hemmbarere Kanäle und eine Aktivierung der Ca^{2+} -ATPase des endoplasmatischen Retikulums als Voraussetzung angewiesen sind. Das IP_3 – PLC – PKC ist System verantwortlich für die Unterhaltung der Oszillationen.

Abb. 13a

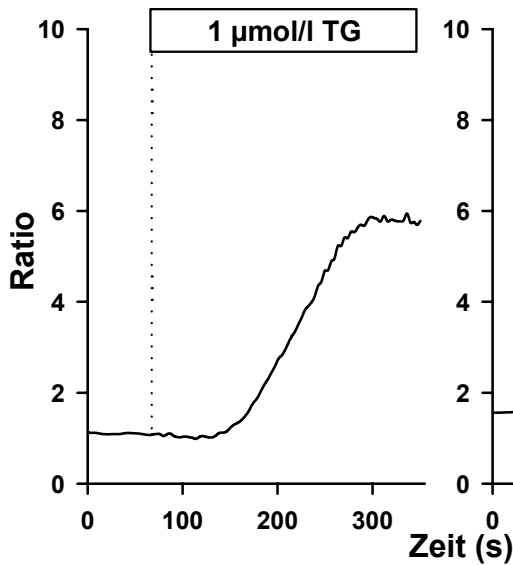


Abb. 13b

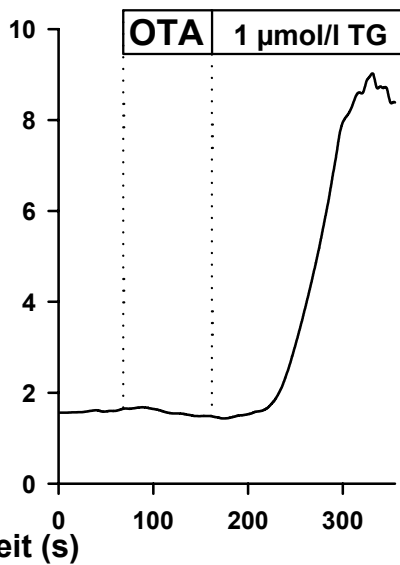


Abb. 13c

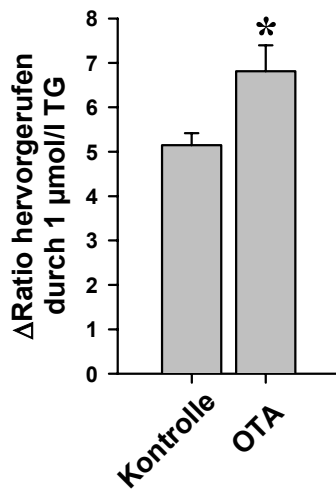


Abb. 13d

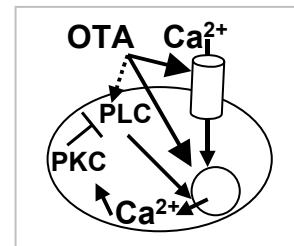
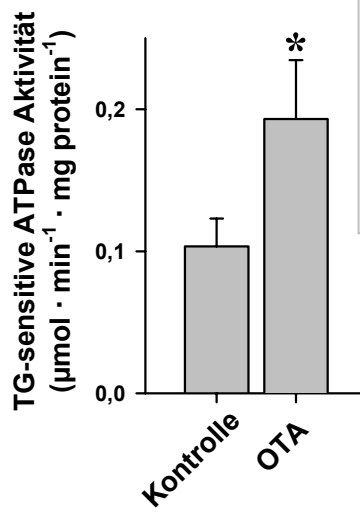


Abb. 13a, b und c: Die $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch Gabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin wurde nach kurzer Exposition mit OTA (100 nmol/l) deutlich verstärkt (n=39-45; *p<0.05).

Abb. 13d: Die Aktivität der Thapsigargin-sensitiven Ca^{2+} -ATPase wurde durch 100 nmol/l OTA nahezu verdoppelt (n=32; p<0.05).

(Schema: OTA erzeugt Ca^{2+} -Oszillationen über erhöhten Calciumeinstrom, gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in Speicher und Interaktion mit dem IP_3 -Signalweg)

C.II.5 cAMP und PKA

Um die Mechanismen, durch die OTA zu einer Stimulation der Thapsigargin-hemmbareren Ca^{2+} -ATPase führt, weiter zu erhellen, wurde der zelluläre Gehalt an zyklischen 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP) bestimmt, einem sekundären Botenstoff, der über Aktivierung der Protein Kinase A (PKA) eine Ca^{2+} -Aufnahme z.B. in das endoplasmatische Retikulum bewirken kann (29,67). Wie aus Abb. 14a ersichtlich ist führte OTA innerhalb von 10 min zu einem signifikanten Anstieg der cAMP-Konzentration, der abhängig von der jeweils verwendeten OTA-Konzentration war. Unter Kontrollbedingungen betrug die cAMP-Konzentration 6.5 ± 0.4 pmol/Petrischale. Da die aus der cAMP-Formation resultierende PKA-Aktivierung nicht nur die ATP-abhängige Ca^{2+} -Sequestration stimulieren, sondern auch eine Sensitivierung von IP_3 -Rezeptoren bewirken kann (9,29), wurde der Effekt von H-89, einem Hemmstoff der PKA (15) auf die OTA-Wirkung bezüglich der Ca^{2+} -Homöostase in IHKE Zellen untersucht. In Abb. 14b und c ist zu sehen, daß 15-minütige Inkubation mit $100 \mu\text{mol/l}$ H-89 die Ca^{2+} -Antwort der Zellen auf OTA zwar signifikant, aber nicht vollständig vermindert. Auch ist der im Mn^{2+} -Quench Experiment indirekt beobachtete Ca^{2+} -Influx noch feststellbar (Abb. 14d). Die qualitative und quantitative Veränderung des OTA-Effekts durch PKA-Hemmung mit Hilfe von H-89 ähnelt der Wirkung von Thapsigargin, was die Hypothese unterstützt, OTA stimuliere die Ca^{2+} -ATPase durch Aktivierung der PKA.

Abb. 14a

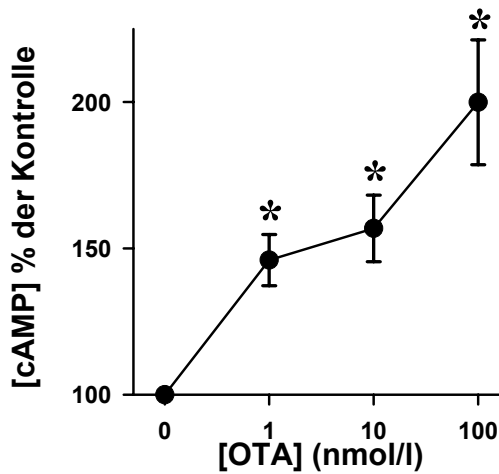


Abb. 14b

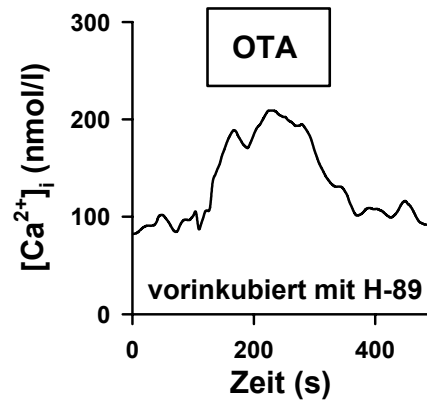


Abb. 14c

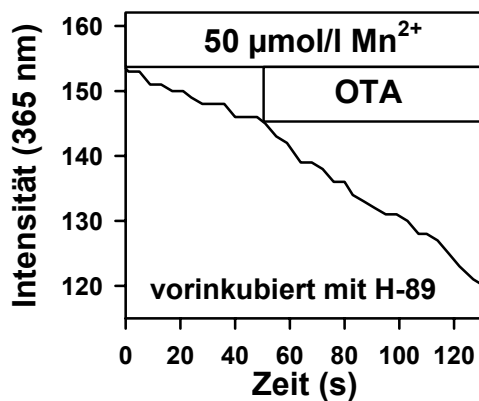


Abb. 14d

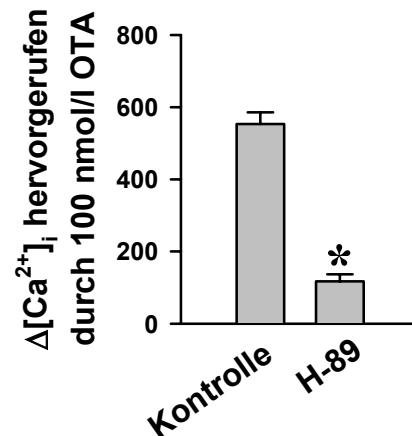


Abb. 14a: 10-minütige OTA-Exposition bewirkte einen Anstieg der zellulären Konzentration an cAMP (* $p < 0.05$; $n = 8-12$).

Abb. 14b und c: Die Ca^{2+} -Antwort auf 100 nmol/l OTA fiel nach Inkubation mit H-89 (15 min; 100 $\mu\text{mol/l}$) deutlich geringer aus als in Kontrollzellen ($n = 25 - 32$).

Um die Fragestellung zu klären, ob der OTA-induzierte Ca^{2+} -Einstrom direkt von der erhöhten cAMP-Konzentration abhängt, wurde das membrangängige cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP verwendet. Die Effekte von Dibutyryl-cAMP sind in Abb. 15 dargestellt: Im Mn^{2+} -Quench gab es keinen Anhalt dafür, daß ein verstärkter Einstrom von Mn^{2+} -Ionen aktiviert wurde, allerdings weist der Zeitgang von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (in Abb. 15

dargestellt als der Zeitverlauf der Ca^{2+} -sensitiven Emission bei einer Anregungswellenlänge von 334 nm, bzw. des Verhältnisses 334nm/365nm) mit einem initialen Absinken gewisse Ähnlichkeiten zu der OTA-Wirkung auf. Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, daß ein Teil der OTA-Wirkung, insbesondere die Stimulation der ATP-getriebenen Ca^{2+} -Aufnahme in das endoplasmatische Retikulum, über den cAMP - PKA - Signalweg vermittelt wird.

Abb. 15a

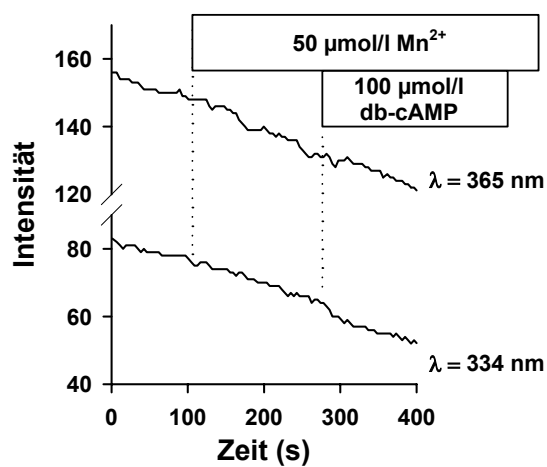


Abb. 15b

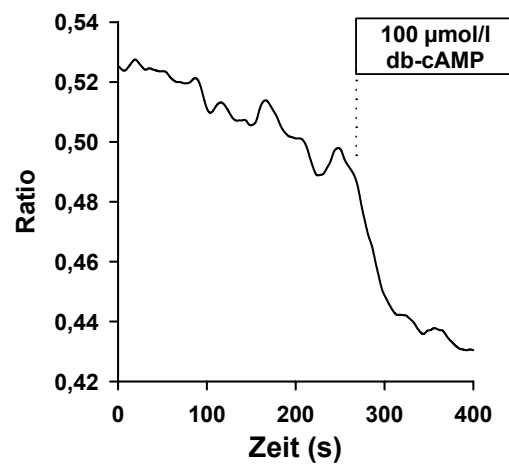


Abb. 15a: Der Influx von Mn^{2+} -Ionen wurde durch Dibutyryl-cAMP nicht verstärkt (Die Fluoreszenz bei Anregung mit 365 nm ist Ca^{2+} -unabhängig, diejenige bei Anregung mit 334 nm verhält sich proportional zu $[\text{Ca}^{2+}]_i$).

Abb. 15b: Dibutyryl-cAMP bewirkte eine Abnahme von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in IHKE-Zellen (n=35).

C.II.6 Mitochondrien

Weiterhin wurde noch eine potentielle Beteiligung der Mitochondrien als Ca^{2+} -puffernde Organellen überprüft (17,30). Komplette Hemmung der Atemkette mit 5 mmol/l Cyanid, 5 $\mu\text{mol/l}$ Antimycin A und 7.5 $\mu\text{mol/l}$ Rotenon (sog. CAR-Cocktail, nach Eder et al. (18)) bewirkten einen Anstieg der Basiskonzentration von freiem intrazellulären Ca^{2+} von $78 \pm 10 \text{ nmol/l}$ auf $146 \pm 14 \text{ nmol/l}$ ($n = 45$, $p < 0.05$). Zugabe von 10 nmol/l OTA in Gegenwart der Hemmstoffe der Elektronentransportkette bewirkte immer noch eine initiale leichte Erniedrigung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, gefolgt von einem Ca^{2+} -Anstieg. Jedoch war die Ca^{2+} -Freisetzung durch OTA in Anwesenheit der mitochondrialen Inhibitoren wesentlich größer als in Kontrollzellen (10 nmol/ OTA bewirkten in mit ETC-Hemmern behandelten Zellen ein $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ von $526 \pm 116 \text{ nmol/l}$ während in Kontrollzellen nur $156 \pm 15 \text{ nmol/l}$ erreicht wurden, $n = 37$, $p < 0.05$; siehe dazu auch Abb. 16a, b und c). (Anmerkung: Der Unterschied zwischen $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ in Abb. 16 a und b erklärt sich daraus, daß in Abb. 16a die Antwort einer einzelnen Zelle dargestellt ist, während Abb. 16b die durchschnittlichen maximalen Ca^{2+} -Konzentrationen in allen untersuchten Zellen zeigt, die unter Einfluß des CAR-Cocktails teils sehr hohe Werte annahmen). Des weiteren war auch die Dauer der Ca^{2+} -Spitzen, gemessen als die Breite auf halber Höhe, durch die ETC-Inhibitoren stark verlängert (von $19 \pm 2 \text{ s}$ in den Kontrollen auf $58 \pm 4 \text{ s}$, $n = 45$, $p < 0.05$). Diese Daten unterstützen die Annahme, daß es eine Interaktion zwischen den OTA-induzierten Ca^{2+} -Veränderungen und den Mitochondrien gibt (17,18,30). Außerdem könnte auch die Funktion der Mitochondrien durch diese Ca^{2+} -Antworten verändert werden (18).

Abb. 16a

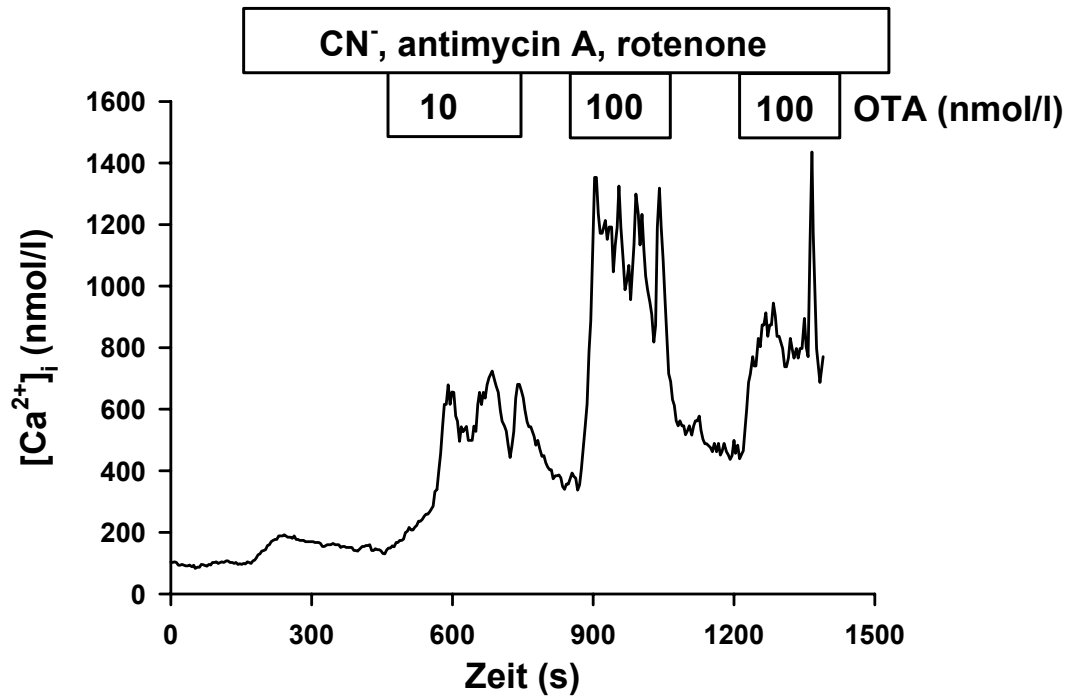


Abb. 16b

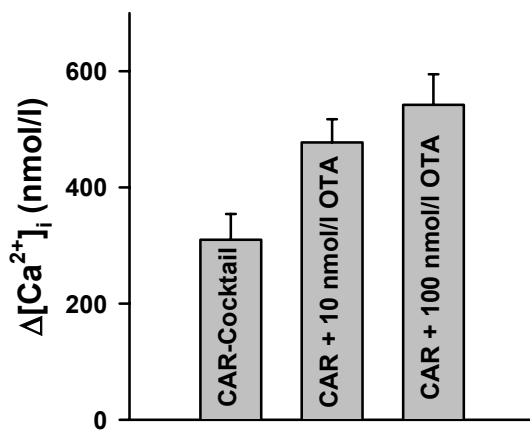


Abb. 16c

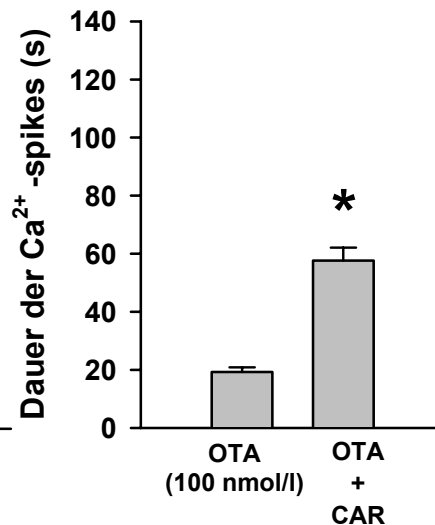


Abb. 16a und b: Hemmung der mitochondrialen Elektronentransportkette mit Cyanid (5 mmol/l), Antimycin A (5 μ mol/l) und Rotenon (7.5 μ mol/l) konnte die Ca^{2+} -Antwort auf OTA (100 nmol/l) nicht verhindern (n=37).

Abb. 16c: Die Dauer der Ca^{2+} -Spikes OTA-induzierter Oszillationen wurde durch die ETC-Hemmer verlängert (*p<0.05 gegenüber alleiniger OTA-Exposition).

C.II.7 Die Wirkung des BSA-OTA-Konjugates auf $[Ca^{2+}]_i$

Um unterscheiden zu können, ob ein Teil der OTA-Wirkung auf Interaktion des Mykotoxins mit der äußeren Zellmembran zustande kommt, wurde an bovines Serumalbumin kovalent gebundenes OTA (BSA-OTA) verwendet, so daß OTA nicht in die Zellen einzudringen vermochte. Dabei sind 4-5 OTA-Moleküle an 1 Molekül bovines Serumalbumin kovalent gebunden, somit entsprechen 20 nmol/l BSA-OTA 100 nmol/l freiem OTA. Die Wirkung des BSA-OTA Konjugates auf die intrazelluläre freie Ca^{2+} Konzentration und auf Ca^{2+} -Einstrom, dargestellt durch den Mn^{2+} -Quench, wird in Abb. 17a und b gezeigt. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ringerlösung superfundiert, die eine entsprechende Menge an unkonjugiertem BSA enthielt. BSA-OTA bewirkt im Gegensatz zu freiem OTA keine Ca^{2+} -Oszillationen, aber einen transienten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$. Auch setzt der Effekt des Konjugates unmittelbar ein, ohne die Verzögerung, die bei der Gabe von unkonjugiertem OTA beobachtet wurde. Im Mn^{2+} -Quench rief auch das Konjugat eine Abnahme der Fluoreszenzintensität hervor, was darauf hinweist, daß auch durch BSA-OTA ein Influx von Ca^{2+} -Ionen in die Zellen ausgelöst wird, wobei das Ca^{2+} jedoch nicht, wie für freies OTA gezeigt, in intrazelluläre Speicherorganellen aufgenommen wird. Somit wird der Ca^{2+} -Influx als Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ im Zytoplasma sichtbar. Insofern ähnelt die Wirkung des BSA-OTA-Konjugates dem Effekt von freiem OTA in Thapsigargin-behandelten Zellen, wie weiter oben dargestellt.

Abb. 17a

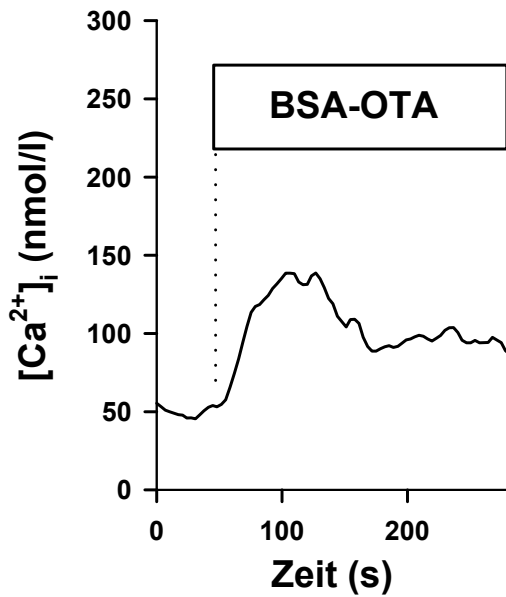


Abb. 17b

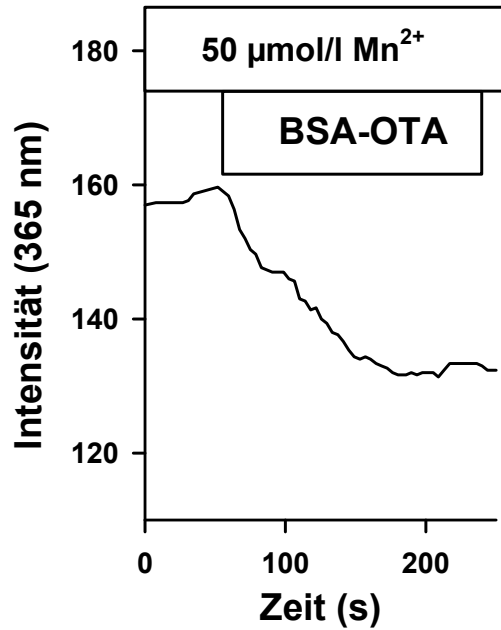


Abb. 17c

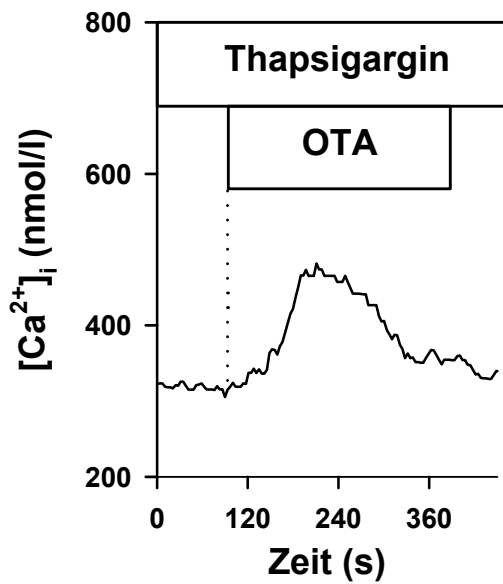


Abb. 17d

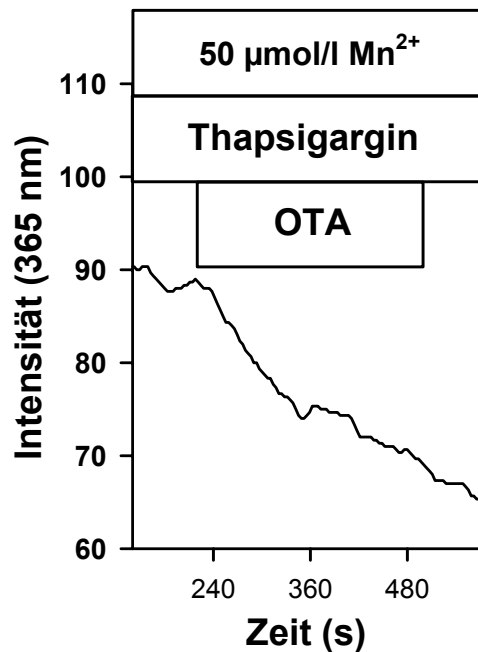


Abb. 17a und b: Das BSA-OTA-Konjugat bewirkte einen transienten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ und eine Zunahme des Einstroms von Mn^{2+} -Ionen ($n=48$ bzw. 26).

Abb. 17c und d: War die Ca^{2+} -ATPase mit Thapsigargin (100 nmol/l) inhibiert, rief OTA (100 nmol/l) einen transienten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ hervor. Der Effekt auf den Mn^{2+} -Einstrom blieb erhalten ($n=57$ bzw. 41).

C.III Die Wechselwirkung von OTA mit hormonellen Ca^{2+} -Signalen

C.III.1 Angiotensin II

Wie in Abb. 18 gezeigt, wirkt OTA synergistisch mit Ang II auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und zwar schon in Konzentrationen von 1 nmol/l. In Gegenwart von OTA wurde nicht nur die Quantität der durch Ang II hervorgerufenen Ca^{2+} -Antwort verändert, sondern auch das Muster wurde von einer klassischen Spike-Plateau-Antwort in anhaltende Oszillationen umgeformt. Anzumerken ist, daß dies in Konzentrationen geschah in denen keine der beiden Substanzen für sich alleine in der Lage war einen anhaltenden Effekt zu produzieren. Auch die für eine Ca^{2+} -Freisetzung nötige Schwellenkonzentration an Ang II wurde durch OTA um mindestens zwei Größenordnungen verringert, ebenso wurde der maximale Effekt von Ang II gesteigert (Abb. 18 a und b).

Die Wirkung von Ang II ebenso wie ihre Potenzierung durch OTA konnte durch den spezifischen AT-1-Rezeptorblocker Losartan (1 $\mu\text{mol/l}$) gehemmt werden (Abb 18c), während der Effekt von OTA unbeeinflusst blieb (Tab. 1). Somit scheint OTA den Signalweg zu beeinflussen der bei Interaktion von Ang II mit dem AT1-Rezeptor aktiviert wird. Hierbei war insbesondere die oben erwähnte verstärkte Füllung von Ca^{2+} -Speichern durch OTA von Interesse. Durch diese könnte die Potenz von Ang II, Ca^{2+} -Antworten hervorzurufen, verstärkt werden.

Abb. 18a

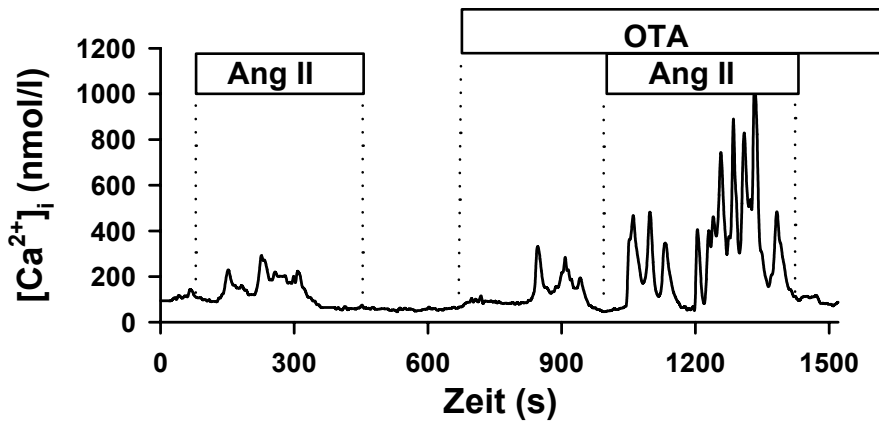


Abb. 18b

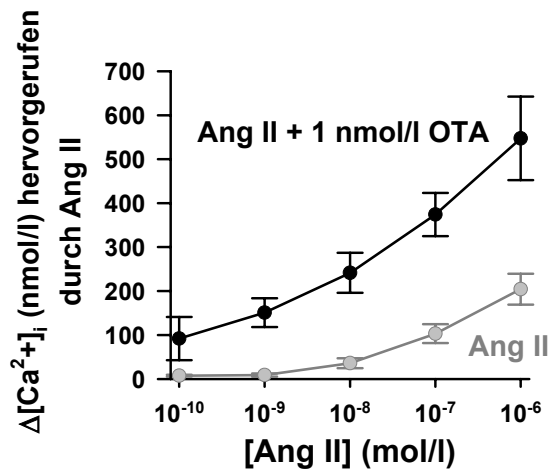


Abb. 18c

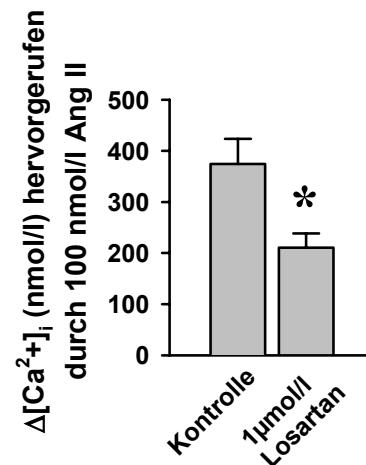


Abb. 18a: 1 nmol/l OTA potenzierte die Ca^{2+} -Antwort auf Ang II (100 nmol/l) (n=64).

Abb. 18b: Im Hinblick auf die Fähigkeit Ca^{2+} freizusetzen, wurde die Dosiswirkungskurve von Ang II durch OTA um mehrere Größenordnungen nach links verschoben (n=29-64).

Abb. 18c: Losartan (1 μ mol/l) hemmte die Ang II induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (n=49; *p<0.05).

Die Bedeutung der OTA-induzierten Ca^{2+} -Sequestration in intrazelluläre Speicher wurde untersucht, indem verschiedene extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) von 1.2 mmol/l und 12 $\mu\text{mol/l}$ verwendet wurden. Die Experimente liefen vergleichbar dem in Abb. 18a ab, dabei wurden folgende Parameter bestimmt: $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, hervorgerufen durch 100 nmol/l Ang II bei $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.2 \text{ mmol/}$ bzw. 12 $\mu\text{mol/l}$; des weiteren die Wirkung von Ang II und OTA, nachdem die vorherige OTA-Gabe mit $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.2 \text{ mmol/}$ bzw. 12 $\mu\text{mol/l}$ erfolgte. Wie aus Tab. 2 zu entnehmen ist, hatte die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration keinen Einfluß auf die Wirkung von Ang II auf $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$, während die OTA-Wirkung, wie auch schon weiter oben besprochen bei 12 $\mu\text{mol/l}$ $[\text{Ca}^{2+}]_o$ ausblieb. War bei OTA-Gabe die extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration 12 $\mu\text{mol/l}$, so entfiel, gleichgültig, ob die zusätzliche Ang II-Gabe bei $[\text{Ca}^{2+}]_o = 1.2 \text{ mmol/l}$ oder 12 $\mu\text{mol/l}$ erfolgte, die Potenzierung. Dies läßt darauf schließen, daß der Ca^{2+} -Einstrom und die Sequestration von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher nicht nur eine Voraussetzung für die OTA-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen, sondern auch für seine potenzierende Wirkung auf die Ang II-induzierte Ca^{2+} -Antwort ist.

Tabelle 1.

$\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$	Kontrolle	1 $\mu\text{mol/l}$ Losartan
1 nmol/l OTA	94 \pm 18	93 \pm 13
100 nmol/l Ang II	100 \pm 21	9 \pm 3 *
100 nmol/l Ang II +1 nmol/l OTA	374 \pm 49	210 \pm 27 *

Tab. 1: Die Wirkung des AT1-Rezeptorblockers Losartan auf $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nmol/l), hervorgerufen durch OTA, Ang II oder Ang II + OTA (n 37 - 65; *p<0.05 im Vergleich zur Kontrolle).

Tabelle 2.

	$[Ca^{2+}]_o = 1.2 \text{ mmol/l}$	$[Ca^{2+}]_o = 12 \text{ } \mu\text{mol/l}$
1 nmol/l OTA	94 ± 18	kein meßbarer Effekt
100 nmol/l Ang II	100 ± 21	69 ± 40
100 nmol/l Ang II + 1 nmol/l OTA	374 ± 49	64 ± 25 *

Tab. 2: Der Einfluß der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auf $\Delta[Ca^{2+}]_i$ (nmol/l), hervorgerufen durch OTA, Ang II oder Ang II + OTA (n = 22 - 65; *p<0.05, im Vergleich zu $[Ca^{2+}]_o = 1.2 \text{ mmol/l}$)

C.III.2 Epidermaler Wachstumsfaktor

Ähnlich wie für Ang II dargestellt, verhält es sich mit der Wirkung von OTA auf die durch EGF produzierte Ca^{2+} -Erhöhung. Wie Abb. 19a und b zeigt, wurde auch bei EGF sowohl der maximale Effekt, als auch das Muster der Antwort verändert. Wiederum entsteht durch OTA ein Ca^{2+} -Anstieg, der persistiert, solange die beiden Substanzen anwesend sind. Für dieses Experiment wurden Konzentrationen verwendet (1 nmol/l OTA und 10 $\mu\text{g/l}$ EGF), die alleine keine dauerhafte Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ erzielen konnten, bei gleichzeitiger Gabe kommt es allerdings zu einem anhaltenden Effekt. Diese Ergebnisse unterstützen die eingangs beschriebene synergistische Wirkung von OTA auf die EGF-stimulierte Proliferation der IHKE Zellen, die, ebenso wie die Wirkung von Ang II von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig war.

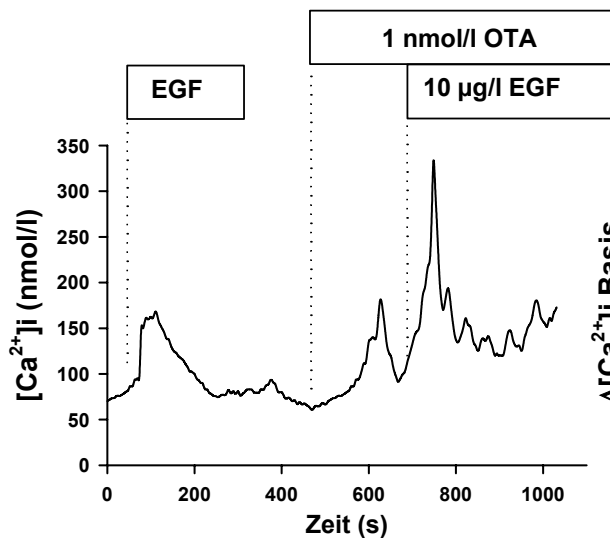
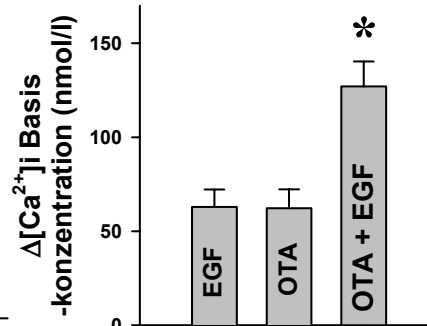
Abb. 19a**Abb. 19b**

Abb. 19a und b: 1 nmol/l OTA veränderte die Ca²⁺-Antwort auf EGF (10 µg/l) hinsichtlich ihrer Höhe und Dauer (n=38; *p<0.05 gegenüber EGF).

C.III.3 Noradrenalin und Bradykinin

Um zu überprüfen, ob die durch OTA bewirkte verstärkte Füllung von Ca²⁺-Speichern in der Lage ist auch die Wirkung von anderen Ca²⁺-freisetzenden Hormonen zu verstärken, fanden Noradrenalin und Bradykinin Verwendung. In Abb.20 ist dargestellt, wie 1 nmol/l OTA auf durch 10 nmol/l Noradrenalin hervorgerufene Ca²⁺-Erhöhung wirkt. Ebenso wie bei Ang II und EGF ist eine Potenzierung zu beobachten. Ein Effekt der überraschenderweise bei Bradykinin ausblieb (Abb. 21). Der Ca²⁺-Anstieg durch Gabe von 100 nmol/l Bradykinin blieb von OTA völlig unbeeinflusst, während die Anwesenheit von OTA, einen Effekt von 10 nmol/l Bradykinin verhinderte. Diese unerwartete Wirkung ließe sich mit Daten aus der Literatur erklären, die zeigen, daß eine Ca²⁺-Antwort auf Bradykinin durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel unterdrückt wird, da die Aktivierbarkeit der PLC PKA-abhängig bei hohen cAMP-Spiegeln abnimmt (49). Da ein Teil des Wirkmechanismus von OTA in einer Erhöhung von [cAMP] besteht, könnte dies zu einer Unterdrückung der Wirkung niedrigerer Bradykinindosen führen.

Abb. 20

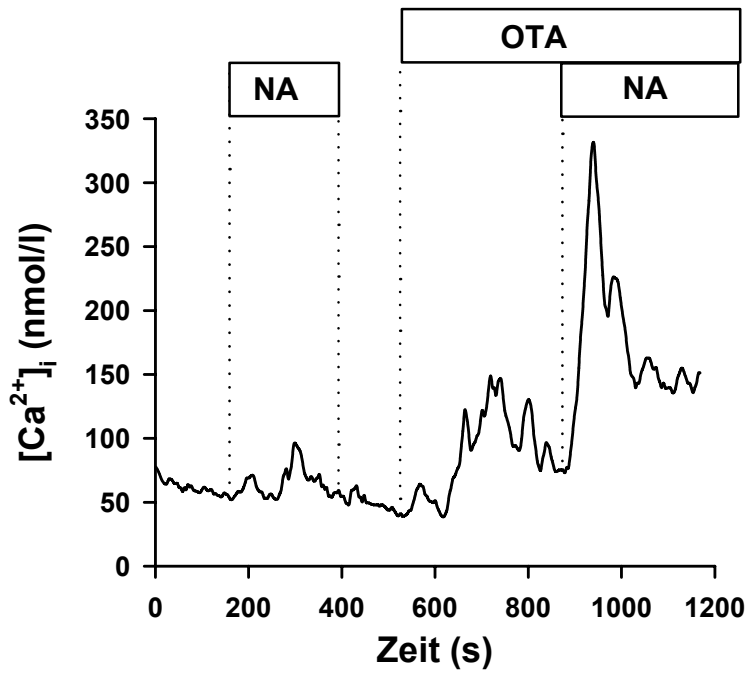


Abb. 20: Potenzierung der durch 10 nmol/l Noradrenalin (NA) hervorgerufenen Ca^{2+} -Antwort durch 1 nmol/l OTA (n=35).

Abb. 21a

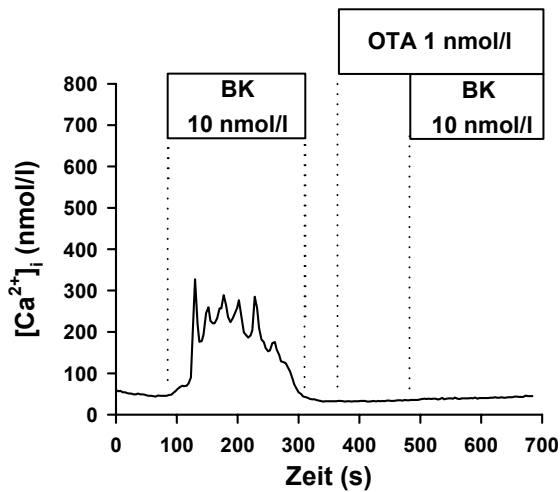


Abb. 21b

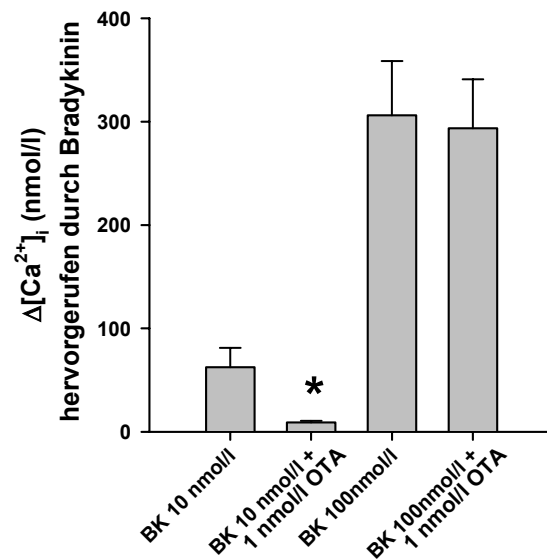


Abb. 21 a und b: Der Effekt von 10 nmol/l Bradykinin (BK) wurde durch 1nmol/l OTA unterdrückt (n=56, *p<0.05).

Abb. 21c

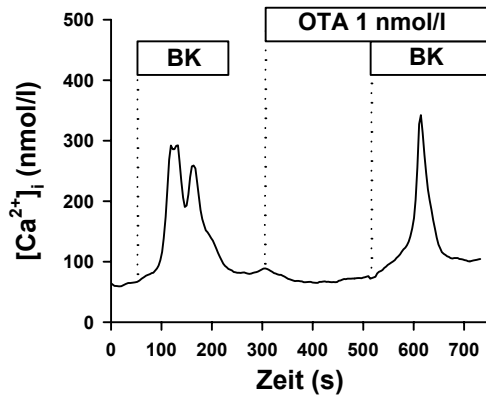


Abb. 21d

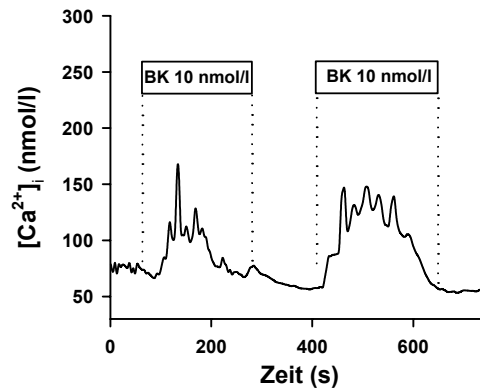


Abb. 21c: Die Wirkung von 100 nmol/l Bradykinin blieb von OTA unbeeinflusst (siehe auch Abb. 21b) (n=44).

Abb. 21d: 10 nmol/l Bradykinin zeigte bei IHKE-Zellen auch bei Wiederholter Exposition einen konstanten Effekt (n=29).

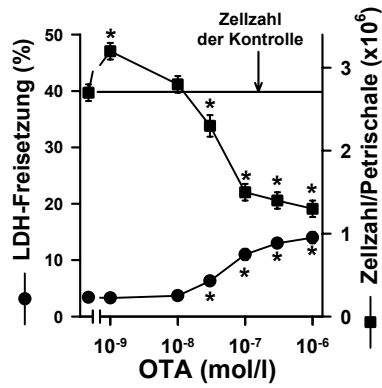
C.IV Die Effekte von OTA > 10 nmol/l auf LDH-Freisetzung und Zellzahl

Wie in Abb. 22a zu sehen ist, führt eine 24-stündige Gabe von OTA in Konzentrationen über 10 nmol/l, zu einer Abnahme der Zellzahl und einem leichten Anstieg der LDH-Freisetzung. Zugabe von EGF oder Ang II hatten keinen Einfluß auf die Effekte von OTA > 10 nmol/l (nicht abgebildet), im Gegensatz zu der mitogenen Wirkung in Konzentrationen unterhalb von 100 nmol/l (siehe oben). Somit hat OTA einen konzentrationsabhängigen biphasischen Effekt auf IHKE Zellen, wie er auch schon für Tubuluszellen von Ratten gezeigt werden konnte (22). Interessanterweise ist der Anstieg der LDH-Freisetzung im Verhältnis zur Abnahme der Zellzahl geringer, als zu erwarten wäre (bei 100 nmol/l OTA für 24 h stieg die LDH-Freisetzung um 11 % an, während die Zellzahl um 45 % abnahm). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, daß die abgestorbenen Zellen aufgrund apoptotischer Mechanismen zugrunde gegangen sind, was nicht zu erhöhter LDH-Freisetzung führen würde. Der geringfügige LDH-Anstieg im Medium könnte darauf zurückzuführen sein, daß die apoptotischen Zellen nicht wie in vivo phagozytiert werden. Auch andere Daten weisen auf eine Aktivierung von Apoptosemechanismen durch OTA in Konzentrationen > 10 nmol/l hin (68).

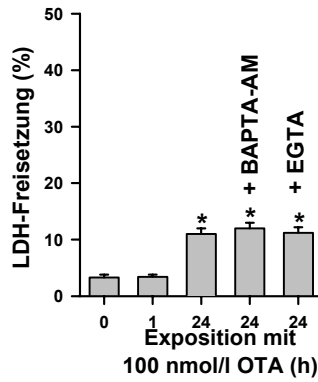
Allerdings konnte ein Anstieg der LDH-Freisetzung oder eine Abnahme der Zellzahl nicht in den ersten Stunden nach OTA-Exposition beobachtet werden, wie in Abb. 22b

gezeigt. Der Effekt von 100 nmol/l OTA auf die LDH-Freisetzung konnte, ganz im Gegensatz zu der Wirkung von 1 nmol/l OTA auf die EGF-induzierte Proliferation, durch BAPTA-AM nicht verhindert werden.

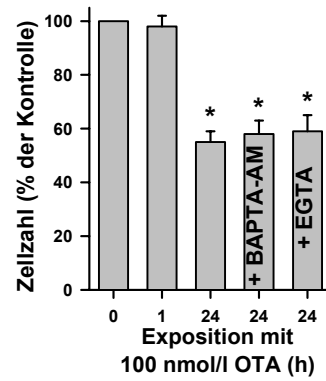
Abb. 22a



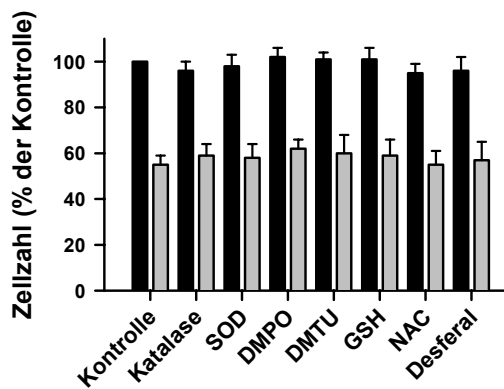
b



c



d



e

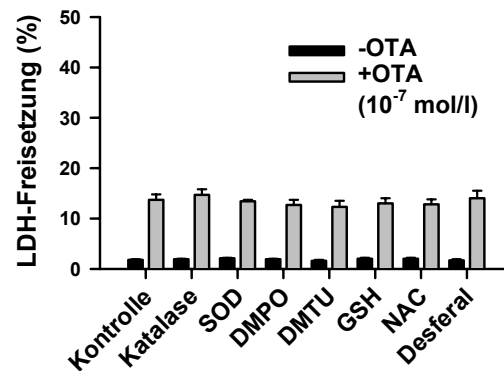


Abb. 22 a: Die Wirkung von OTA auf LDH-Freisetzung (●) und Zellzahl (■).

Abb. 22b und c: Die nach 24 h durch OTA erhöhte LDH-Freisetzung war wie auch die Abnahme der Zellzahl durch Komplexierung von intra- oder extrazellulärem Calcium (BAPTA-AM bzw. EGTA) nicht zu verhindern.

Abb. 22d und e: Verschiedene Radikalfänger wie auch Eisenchelatoren zeigten keinen protektiven Effekt auf OTA-induzierte LDH-Freisetzung oder Abnahme der Zellzahl.

Ebenso wenig hatte Komplexierung von extrazellulärem Ca^{2+} mit EGTA einen protektiven Effekt (Abb. 22c, weder EGTA noch BAPTA-AM hatten alleine einen signifikanten Effekt auf Zellzahl oder LDH-Freisetzung), was darauf hinweist, daß die oben beschriebenen Wirkungen auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und zelluläre Signalwege zwar in Zusammenhang mit der mitogenen Wirkung von OTA in niedrig nanomolaren Konzentrationen steht, nicht aber mit der Verminderung der zellulären Integrität. Der exakte Mechanismus, durch den hochnanomolare OTA-Konzentrationen zu Zellschädigungen führen ist gegenwärtig noch nicht bekannt. Der Versuch die schädlichen Wirkungen von 24-stündiger Inkubation mit 100 nmol/l OTA durch verschiedene Radikalfänger und einem Eisenchelator (33,34,73) zu verringern (Abb. 22d und e) erwies sich als nicht erfolgreich.

Die Konzentrationen der unterschiedlichen Substanzen wurden nach Angaben aus den erwähnten Veröffentlichungen gewählt, in denen gezeigt wurde, daß eine protektive Wirkung erzielt wird. Insofern scheint die Schädigung der Zellen in dem Zeit- und Konzentrationsfenster, daß für diese Studie gewählt wurde nicht durch vermehrte Entstehung von Sauerstoffradikalen oder eine beeinträchtigte Eisenhomöostase vermittelt zu sein. Dasselbe gilt auch für die Wirkung von OTA auf die Proteinbiosynthese (Daten nicht abgebildet). Diese Ergebnisse zeigen eine hohe Übereinstimmung mit anderen Daten aus der Literatur, die zeigen konnten, daß OTA erst in Konzentrationen von $> 10 \mu\text{mol/l}$ zu einer vermehrten Radikalbildung führt (34).

C.V Die Effekte von OTA auf $[Ca^{2+}]_i$ in anderen Zelllinien renaler Herkunft

C.V.1 Opossum Kidney (OK) Zellen

Opossum Kidney (OK) Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie von proximalen Tubuluszellen aus der Niere des amerikanischen Opossums und ein weitverbreitetes Modell für Studien von Transportvorgängen im proximalen Tubulus (24,25,46,65,66). Sie wurden hier verwendet, ebenso wie die unten erwähnten MDCK Zellen, um zu testen, inwieweit OTA $[Ca^{2+}]_i$ auch in anderen Zelllinien beeinflusst. Für OK Zellen konnte des weiteren schon gezeigt werden, daß nanomolare OTA-Konzentrationen in Transportvorgänge des proximalen Tubulus durch Interaktion mit hormonellen Signalen eingreifen (63). Die Wirkung von verschiedenen OTA-Konzentrationen auf $[Ca^{2+}]_i$ in OK Zellen ist in Abb. 23a und b zu sehen. Dargestellt sind zwei typische Antworten. Insgesamt wurden 4 Deckgläser zu je ca. 20 Zellen aus zwei verschiedenen Passagen untersucht. OTA hat auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration einen weniger dramatischen Effekt als bei IHKE Zellen. Jedoch zeigen die Ergebnisse der Experimente mit OK Zellen, daß OTA auch in diesem Zelltyp mit Calciumsignalwegen interagiert: OTA beeinflusst die $[Ca^{2+}]_i$ Homöostase in OK Zellen. Einerseits können durch OTA Ca^{2+} -Antworten in OK-Zellen erzeugt werden, andererseits werden bereits vorhandene Ca^{2+} -Signale qualitativ und quantitativ verändert, bzw. terminiert.

Abb. 23a

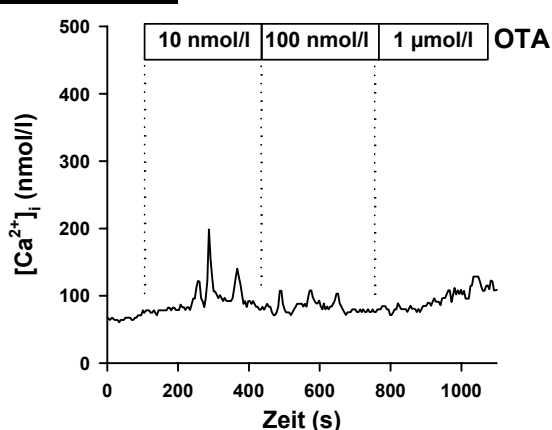


Abb. 23b

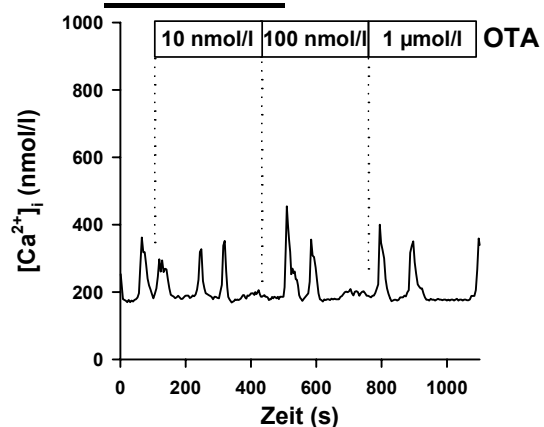


Abb. 23a: Auch in OK Zellen war OTA in der Lage Ca^{2+} -Antworten zu erzeugen.

Abb. 23b: In spontan oszillierenden OK Zellen beeinflusste OTA die Frequenz der Ca^{2+} -Spikes (n=25-32).

C.V.2 MDCK-C7 Zellen

Madin Darby Canine Kidney (MDCK) Zellen sind eine Zelllinie die aus dem Sammelrohr des Cockerspaniels stammen und haben wesentliche Eigenschaften des Sammelrohrs beibehalten, wie z.B. Ausstattung mit Ionenkanälen, Transportproteinen und Enzymen, Stimulierbarkeit durch Hormone und cAMP, sowie Ausbildung eines dichten Epithels mit hohem epithelialen Widerstand (7,20,28,32). Wie frühere Studien zeigten, lassen sich bei MDCK Zellen zwei Subtypen unterscheiden, wobei der eine den Haupt- und der andere den Schaltzellen des Sammelrohrs entspricht (61). Der Subtyp C7 weist Eigenschaften der Hauptzellen des Sammelrohrs auf. Der Einfluß von OTA auf MDCK-C7 Zellen ist aus Abb. 24a und b zu entnehmen. Ähnlich wie bei den OK Zellen konnten auch hier wieder Zellen mit und ohne spontane Ca^{2+} -Oszillationen beobachtet werden. Ähnlich wie im vorigen Experiment konnte durch OTA-Gabe entweder eine neue Ca^{2+} -Antwort generiert werden, im Sinne von neu einsetzenden Oszillationen verbunden mit einem Anstieg der Calciumbasiskonzentration, oder bereits vorhandene Calciumsignale verändert bzw. abgebrochen werden. Diese Wirkung von OTA ist vereinbar mit einem Eingriff in zelluläre Regulationsmechanismen auch in MDCK-C7 Zellen.

Abb. 24a

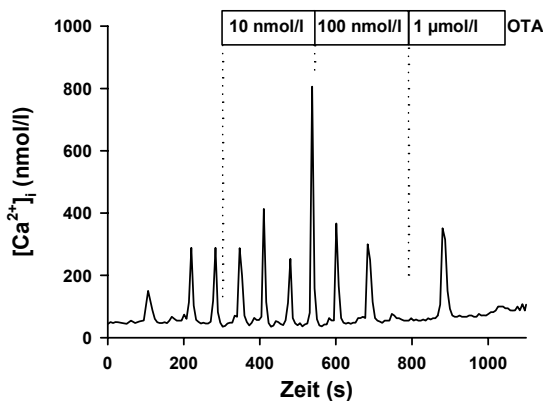


Abb 24b

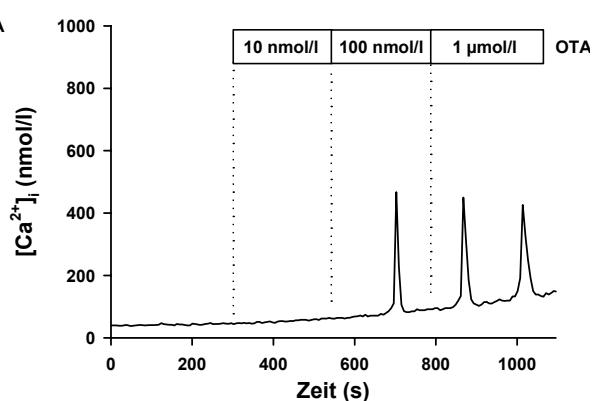


Abb. 24a: Spontane Ca^{2+} -Oszillationen in MDCK-C7 Zellen wurden durch OTA in ihrer Frequenz verlangsamt (n=17).

Abb. 24b: Nicht spontanaktive MDCK-C7 Zellen reagierten auf OTA-Exposition mit Ca^{2+} -Spikes (n=23).

C.V.3 MDCK-C11 Zellen

Die MDCK-C11 Zellen sind der zweite Subtyp der MDCK Zellen. Sie entsprechen den Zwischenzellen des Sammelrohrs (61). Im Gegensatz zu den beiden oben erwähnten Zelltypen verhielten sich MDCK-C11 Zellen bezüglich der Wirkung von OTA auf ihre Ca^{2+} -Homöostase sehr homogen, da bei den hier untersuchten Zellen (4 Deckgläser, 2 verschiedene Passagen) keine Spontanaktivität auszumachen war. Wie bei den IHKE Zellen konnte hier eine Dosisabhängigkeit der Ca^{2+} -Antwort festgestellt werden, die jedoch nicht aus Oszillationen, sondern aus einem transienten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bestand (Abb. 25). Weiter ist zu bemerken, daß OTA nicht in der Lage war eine anhaltende Ca^{2+} -Erhöhung in MDCK-C11 Zellen hervorzurufen, auch nicht in der sehr hohen Konzentration von $1 \mu\text{mol/l}$.

Abb. 25

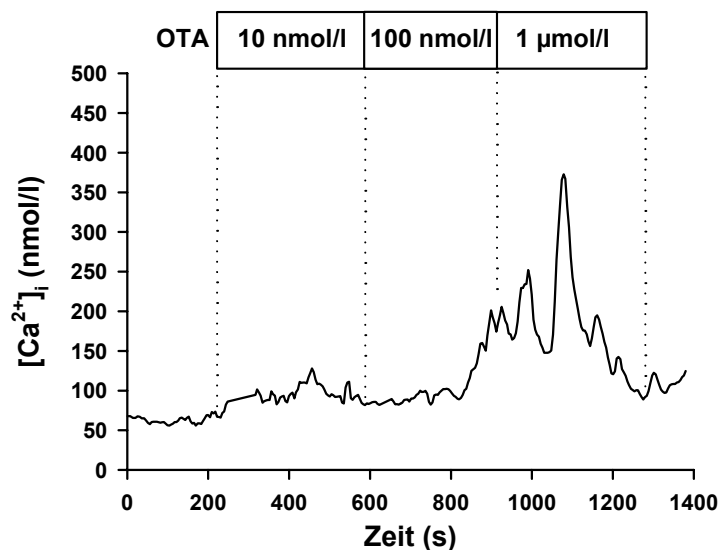


Abb. 25: In MDCK-C7 Zellen waren selbst durch hohe OTA-Konzentrationen ($1 \mu\text{mol/l}$) nur transiente Ca^{2+} -Anstiege auszulösen ($n=23$).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, die aus den Experimenten mit diesen anderen Zelllinien hervorgingen, daß es ein gemeinsames Wirkprinzip für OTA in unterschiedlichen Zelllinien renaler Herkunft gibt: In jedem der untersuchten Zelltypen konnte OTA entweder eine Ca^{2+} -Antwort hervorrufen, oder aktivierte bzw. spontan vorhandene Ca^{2+} -Signale potenzieren oder unterdrücken. Dies deutet auf eine Interaktion des Toxins mit Ca^{2+} -Signalwegen hin, die in verschiedenen renalen Zelltypen gefunden werden konnte. OTA erweist sich also als potenter Modulator von Calciumsignalen in jeder der hier untersuchten Zelllinien, wobei allerdings unterschiedliche, vom Zelltyp abhängige, Effekte hervorgerufen werden.

D Diskussion

D.I Wirkungen von OTA auf Zellzahl und LDH-Freisetzung

Wie die Ergebnisse dieser Studie zeigen hat eine 24-stündige OTA-Exposition einen konzentrationsabhängigen, biphasischen Effekt auf die Zellzahl von IHKE Zellen, was auch schon für andere Zellen renalen Ursprungs gezeigt werden konnte (22). In Konzentrationen von > 0.1 nmol/l bis 10 nmol/l wirkt OTA in Gegenwart von Wachstumsfaktoren wie EGF und Ang II synergistisch auf deren proliferativen Effekt, während es allein ohne Wirkung bleibt. Dieser Effekt von OTA hängt deutlich von der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ab, da eine gleichzeitige Inkubation mit dem membrangängigen Calciumchelator BAPTA-AM den Effekt von OTA völlig aufhob. Im Gegensatz dazu bleibt die Wachstumsstimulation durch EGF unbeeinflusst von diesem Eingriff in die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase. Ebenso wie OTA, übt auch Ang II eine Ca^{2+} -abhängige, BAPTA-AM-hemmbarere Potenzierung des Wachstumseffekts von EGF aus. Sowohl die Ca^{2+} -unabhängige mitogene Wirkung von EGF als auch deren Ca^{2+} -abhängige Potenzierung durch Ang II sind bereits in der Literatur beschrieben wurden (19). Wie bei EGF sind niedrige OTA Konzentrationen in der Lage mit Ang II synergistisch auf das Wachstum der IHKE Zellen zu wirken, wobei hier die Wirkung beider Substanzen auf die Anwesenheit von EGF angewiesen und von der intrazellulären Calciumkonzentration abhängig ist. Dies zeigt, daß OTA bereits in toxikologisch relevanten, d.h. nanomolaren Dosen, die bei Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln auftreten können (31,60), Auswirkungen auf renale Epithelzellen hat. Einerseits eröffnet diese Proliferationsstimulation die Möglichkeit der Entstehung von Neoplasien, wie Adenomen oder Karzinomen, deren gehäuftes Auftreten während OTA-Exposition im Tierversuch gezeigt werden konnte (2). Andererseits kann sich überschießende Proliferation auslösend oder unterstützend auf chronisch interstitielle Nephropathien auswirken, deren Korrelation mit OTA-belasteten Nahrungsmitteln oder Blutproben auch für den Menschen in epidemiologischen Studien gezeigt werden konnte (13,50,51). Charakteristika tubulointerstitieller Nephropathien sind die Vermehrung von Fibroblasten sowie von proximalen Tubuluszellen, wobei auch mitogen aktiven Substanzen wie EGF und insbesondere Ang II eine zentrale Rolle in der Pathogenese nachgesagt wird (39).

Die 24-stündige Inkubation von IHKE Zellen mit OTA in Dosen > 10 nmol/l führte zu einer Abnahme der Zellzahl, die im Gegensatz zu der oben beschriebenen proliferativen Wirkung bei Konzentrationen < 10 nmol/l absolut unabhängig sowohl von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren als auch vom intrazellulären Calcium war. Weder die Komplexbildung von extrazellulärem Ca^{2+} durch EGTA noch die von intrazellulärem durch BAPTA-AM konnte eine Abnahme der Zellzahl verhindern. Weiterhin läßt die fehlende protektive Wirkung der unterschiedlichen eingesetzten Radikalfänger eine Beteiligung von Radikalen am zytotoxischen Effekt von OTA eher unwahrscheinlich erscheinen. Auch eine gestörte Eisenhomöostase scheint im verwendeten Zeit und Konzentrationsfenster keine Rolle zu spielen. Ferner war die LDH-Freisetzung nach 24 h im Vergleich zur Abnahme der Zellzahl nur sehr gering. Dies weist darauf hin, daß auch im Hinblick auf diese Wirkung, OTA in einen zellulären Regulationsmechanismus eingreifen könnte und nicht zu einer unspezifischen Zellzerstörung führt. So ist zum Beispiel vorstellbar, daß OTA in den Zellen das Apoptoseprogramm auslöst, wofür es auch schon erste Hinweise gibt (68). Dadurch würde sich die Abnahme der Zellzahl mit einer vergleichsweise geringen Freisetzung von LDH erklären, die dadurch zustande kommt, daß die apoptotischen Zellen nicht wie in vivo phagozytiert werden und durch Auflösung der Zellmembranen abgestorbener Zellen LDH ins Medium gelangt. Zusammengefasst gibt es also zwei OTA-Effekte: Einen toxischen, von Ca^{2+} - und Wachstumsfaktoren unabhängigen bei $[\text{OTA}] > 10$ nmol/l, und einen von Wachstumsfaktoren und Ca^{2+} abhängigen proliferativen Effekt von OTA-Konzentrationen zwischen 0.1 und 10 nmol/l, aufgrund dessen sich diese Studie auch mit der Wirkung von OTA auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration von IHKE Zellen beschäftigte.

D.II Wirkungen von OTA auf die Calciumhomöostase

Wie im Ergebnisteil gezeigt wurde, bewirkt OTA in IHKE Zellen Oszillationen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die in ihrer Amplitude und der Erhöhung der Ca^{2+} -Basiskonzentration dosisabhängig sind. Die Schwellenkonzentration für den Calciumeffekt lag bei 0.1 nmol/l, vergleichbar mit der Schwelle für die proliferative Wirkung. Des Weiteren wurde bei ca. 10 nmol/l OTA ein Übergang von transienten Effekten zu einer anhaltenden Wirkung von OTA beobachtet. Die durch OTA ausgelösten Ca^{2+} -

Oszillationen waren aber bei Superfusion mit Kontrolllösung reversibel. Interessanterweise ging den Oszillationen bei Erstexposition mit OTA eine 60 - 120-sekündige Verzögerungsphase voraus, während derer in etwa 50 % der Zellen eine initiale Abnahme von $[Ca^{2+}]_i$ beobachtet werden konnte. Im Kontrast hierzu standen die Resultate der Mn^{2+} -Quench Experimente, die für eben diesen Zeitraum einen Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} in die Zellen anzeigten. Die Hemmung dieses Einstroms unterdrückte jeglichen Effekt von OTA auf $[Ca^{2+}]_i$, was darauf hindeutet, daß es sich bei dem Ca^{2+} -Einstrom um den Auslöser für die OTA-induzierten Calciumoszillationen handelt. Die Erklärung für den scheinbaren Widerspruch zwischen dem Eindringen von Calcium in die Zellen und der Abnahme der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ergibt sich aus der Aktivierung der Thapsigargin-hemmbareren Ca^{2+} -ATPase. Die durch OTA-Exposition erhöhte cAMP-Konzentration bewirkt eine Zunahme der PKA-Aktivität und stimuliert somit die Sequestration von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher durch die Ca^{2+} -ATPase. Dies ist auch vereinbar mit der Abhängigkeit der OTA-induzierten Ca^{2+} -Oszillationen von Thapsigargin-sensitiven Ca^{2+} -Speichern. Außerdem hat die cAMP - PKA - Signalwegaktivierung eine Sensitivierung der IP_3 -Rezeptoren des endoplasmatischen Retikulums zur Folge (9). Diese Sensitivierung wiederum führt zur Öffnung von IP_3 -Rezeptor-Kanälen durch die basale zytoplasmatische IP_3 -Konzentration. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß OTA-induzierte Ca^{2+} -Oszillationen auf eine funktionsfähige PLC angewiesen sind. Dies läßt jedoch keine Aussage darüber zu, ob eine Aktivitätszunahme der PLC erforderlich ist. Auch die Rückkopplungshemmung der PLC durch die PKC kann eine Rolle in der Generation der durch OTA hervorgerufenen Ca^{2+} -Oszillationen spielen, analog zu dem in der Literatur beschriebenen Hepatozyten- Ca^{2+} -Oszillator (12), der nach folgendem Prinzip arbeitet: Hormonelle Stimulation aktiviert über ein G-Protein die PLC, was zur Produktion von IP_3 und DAG führt. IP_3 setzt Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern frei, welches zusammen mit DAG die PKC aktiviert. Die PKC ihrerseits hemmt die PLC und bewirkt so eine Abnahme der IP_3 -Konzentration. Die wieder zurückgehende IP_3 -Konzentration führt zu einer Reduktion der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration durch Wiederaufnahme in die Speicherorganellen, bzw. Extrusion über Plasmamembran-ATPasen. Durch persistierende Rezeptor- oder G-Proteinaktivität kann der Zyklus von Neuem beginnen. Die OTA-Wirkung unterscheidet sich von diesem Modell jedoch in folgenden Punkten:

(a) Das Mykotoxin wirkt wahrscheinlich nicht über einen extrazellulären Rezeptor, sondern besitzt einen intrazellulären Angriffspunkt. (b) Eine Beteiligung von PTX-sensitiven G-Proteinen an dem Effekt von OTA konnte in dieser Studie nicht nachgewiesen werden. (c) Ein Anstieg des cAMP-Spiegels in der Zelle spielt zusätzlich eine entscheidende Rolle in den durch OTA ausgelösten oder modifizierten Signalkaskaden.

Aufgrund einiger Hinweise aus der Literatur, die eine enge Koppelung von Ca^{2+} -Oszillationen, Ca^{2+} -Speichern und Mitochondrien beschreiben sowie einer möglichen Funktion der Mitochondrien als Puffer für erhöhte zyttoplasmatische Ca^{2+} -Spiegel (17,30) wurde der Einfluß der Hemmung der mitochondrialen Atmungskette auf die OTA-induzierte Ca^{2+} -Antwort geprüft. Der hieraus resultierende verstärkte Ca^{2+} -Anstieg, wie auch der veränderte Zeitgang der Oszillationen lassen eine Beteiligung der Mitochondrien an der Modulation der Zellfunktion vermuten. Hierfür gibt es auch Hinweise aus anderen Studien (18). Im Hinblick auf den postulierten intrazellulären Angriffspunkt von OTA, soll noch einmal der Effekt des BSA-OTA-Konjugates erwähnt werden. Wird OTA daran gehindert, in die Zellen einzudringen, konnte ein Einstrom von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum beobachtet werden, der in einem transienten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ resultierte. Eine ähnliche Wirkung zeigte freies OTA in Thapsigargin-inkubierten Zellen. Da BSA-gebundenes OTA nicht in die Zellen gelangen konnte, fand auch keine Aktivierung der Sequestration von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher statt, so daß der Ca^{2+} -Einstrom nun sichtbar wird. Ob der durch BSA-OTA verursachte Ca^{2+} -Influx auf einen extrazellulären Angriffspunkt von OTA schließen läßt, soll hier offengelassen werden, da nicht auszuschließen ist, daß freies OTA an der Zellmembran aus dem Konjugat abgespalten wird und so geringe Mengen an freiem OTA in die Zellen eindringen können. Dies würde darauf schließen lassen, daß für den durch OTA hervorgerufene Ca^{2+} -Einstrom eine niedrigere Schwellendosis erforderlich ist, als für die gesteigerte Aufnahme von Ca^{2+} in Speicher und damit die Entstehung der Oszillationen. Hier sei auf Abb. 26 verwiesen, in der der Prozentsatz der Zellen dargestellt ist, die mit Anstieg der Ca^{2+} -Basiskonzentration, bzw. der Generation von Ca^{2+} -Spikes reagierten. Wie zu sehen ist, ist die OTA-Schwellenkonzentration, die einen Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erzeugt, wesentlich niedriger als die für Entstehung von Ca^{2+} -Spikes benötigte Mycotxinkonzentration (der EC_{50} für den $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstieg liegt bei 0.13

nmol/l OTA, während der EC_{50} für Ca^{2+} -Spikes bei 4.0 nmol/l liegt). Außerdem war zu beobachten, daß diejenigen Zellen, die auf 0.1 nmol/l OTA mit einem Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ reagierten, dieser mitunter sofort einsetzte. Möglicherweise ist der Effekt des BSA – OTA – Konjugates also auf eine geringe Konzentration ungebundenen Toxins zurückzuführen, die nur in der Lage ist Ca^{2+} -Influx zu stimulieren.

Abb. 26

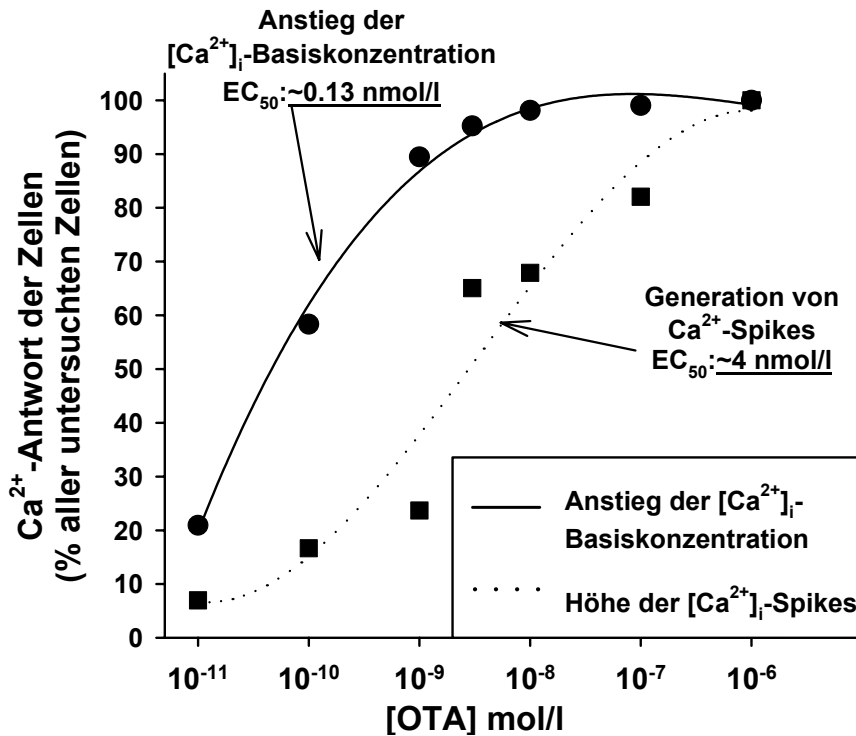


Abb. 26: Dosiswirkungskurve für den OTA-induzierten Ca^{2+} -Anstieg (●) bzw. Ca^{2+} -Spikes (■). Die Schwellenkonzentration für Ca^{2+} -Oszillationen lag bei 4 nmol/l, während ein Ca^{2+} -Anstieg schon bei niedrigeren OTA-Konzentrationen zu beobachten war (n=46-73).

Die Wirkung von OTA auf die Ca^{2+} -Homöostase in IHKE Zellen läßt sich mit folgendem hypothetischen Wirkmechanismus beschreiben (vergleiche dazu auch Abb. 27):

Das auslösende Moment für die Oszillationen ist ein Einstrom von Ca^{2+} in die Zelle, der über SK&F 96365-sensitive Kanäle erfolgt. Der Einstrom ist unabhängig von allen hier überprüften Parametern, wie der cAMP-Konzentration, der PKA-Aktivität, der PLC-Aktivität, der PKC-Aktivität, der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase sowie der oxidativen Phosphorylierung. Des weiteren erfolgt ein Anstieg der cAMP-Konzentration, der über eine Aktivierung der PKA eine vermehrte Aufnahme von Ca^{2+} in Speicher bewirkt. Der vermehrte Füllungsstatus der Speicher, die Sensitivierung der IP_3 -Rezeptoren durch cAMP und evtl. eine PLC-Aktivierung führen schließlich zur Ca^{2+} -Ausschüttung aus Speicherorganellen. Aufrechterhalten werden die Oszillationen vermutlich wie oben beschrieben durch PLC – PKC - Rückkopplung, Mitochondrien und Ca^{2+} -ATPasen. An dieser Stelle soll noch erwähnt werden, daß die vermehrte Sequestration von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher an sich einen Stimulus zur oszillatorischen Freisetzung von Ca^{2+} darstellen kann, wie auch für die arrhythmogene Wirkung von Digitalisglykosiden an Herzmuskelzellen postuliert (21).

Die Wirkung von OTA auf die anderen untersuchten Zelllinien deutet einen generellen Wirkmechanismus von OTA bezüglich seiner Interaktion mit Signaltransduktionsmechanismen an, insbesondere denjenigen, die Ca^{2+} involvieren. OTA ist in der Lage, Ca^{2+} -Antworten in allen hier verwendeten Zelllinien hervorzurufen, bzw. die Oszillationsfrequenz der spontanaktiven OK und MDCK-C7 Zellen zu modulieren. Da viele Ca^{2+} -Signale frequenzmoduliert sind (30, 58), d.h. daß unterschiedliche Oszillationsfrequenzen verschiedenartige zelluläre Reaktionen hervorrufen können, könnte die Wirkung von OTA in der Veränderung von physiologischen Reaktionen bestehen.

Die hormonähnliche Wirkung von OTA auf die freie intrazelluläre Calcium- und cAMP-Konzentration von IHKE Zellen in den verwendeten nanomolaren Konzentrationen zeigt, daß OTA bereits unterhalb von 10 nmol/l, also in Konzentrationen, die keinen toxischen Effekt auslösen, ein potenter Modulator von zellulären Signalwegen ist.

Abb. 27a

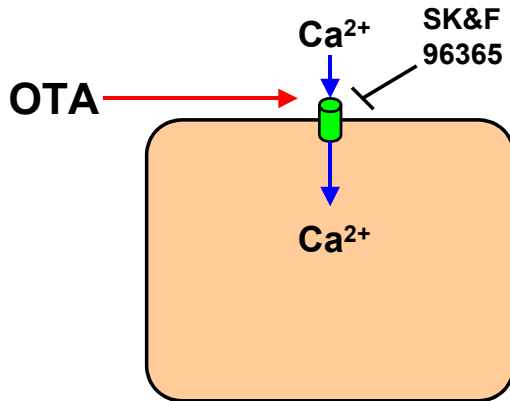


Abb 27b

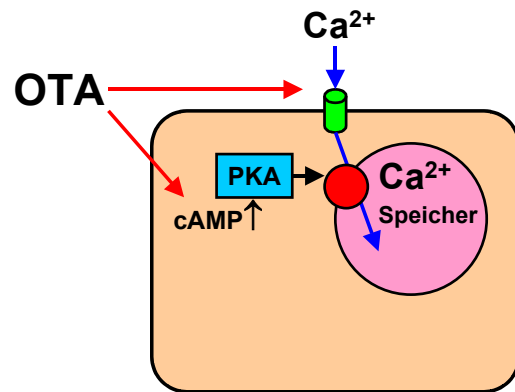


Abb. 27c

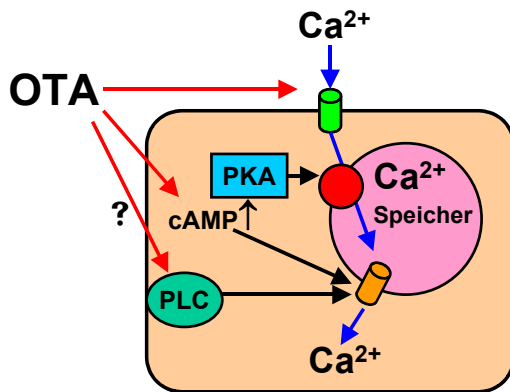


Abb 27d

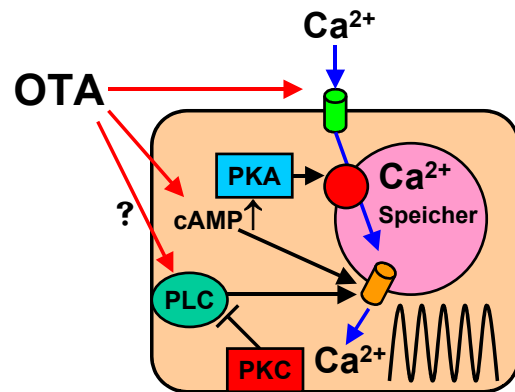


Abb. 27: Hypothetischer Wirkmechanismus von OTA:

- a) OTA induziert Ca^{2+} -Einstrom über SK&F 96365-sensitive Kanäle.
 - b) OTA ruft einen Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration hervor. Die erhöhte cAMP-Konzentration stimuliert über die PKA die Sequestration von Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher. Dies geschieht durch PKA-vermittelte Aktivitätszunahme von Ca^{2+} -ATPasen.
 - c) PLC-abhängig wird nun aus Ca^{2+} -Speichern Calcium freigesetzt („?“: Ob eine direkte Aktivierung der PLC durch OTA eine Rolle spielt, und/oder IP_3 -Rezeptoren über die erhöhte cAMP-Konzentration sensitiviert werden, soll in weiteren Studien festgestellt werden).
 - d) PKC-PLC-Rückkopplung läßt Ca^{2+} -Oszillationen entstehen.
- (Die Angriffspunkte von OTA sind rot dargestellt, der Weg des Calciums blau und Interaktionen zwischen zellulären Komponenten schwarz.)

D.III Wirkungen von OTA auf hormonelle Signaltransduktion

Die Fähigkeit von OTA als potenter Modulator zellulärer Reaktionen auf physiologische Stimuli zu agieren, weist darauf hin, daß hinsichtlich seiner Nephrotoxizität die Wechselwirkung mit hormonellen Signalen eine ausschlaggebende Rolle spielen könnte. In den dargestellten Experimenten lag der Schwerpunkt des Interesses auf Ang II und EGF mit denen OTA, wie oben dargestellt, auch bezüglich des Wachstums interagierte. In Gegenwart von OTA wurde die Fähigkeit von Ang II, Ca^{2+} zu mobilisieren, erhöht und ebenso die für Ca^{2+} -Antworten nötige Schwellenkonzentration von Ang II um mehrere Größenordnungen herabgesetzt. Die Beeinflussung der Ang II-Wirkung war durch den AT1-spezifischen Ang II-Nichtpeptid-Rezeptorantagonisten Losartan hemmbar. Somit erwies sich die Ca^{2+} -Elevation nach Ang II-Gabe im wesentlichen als Wechselwirkung von Ang II mit dem AT1-Rezeptor. Losartan hatte keinen Einfluß auf den Effekt von OTA, was eine Interaktion von OTA mit dem AT1-Rezeptor unwahrscheinlich macht. Als weitere Bestätigung der oben beschriebenen Wirkmechanismen, die OTA auf die Ca^{2+} -Homöostase hat, konnte gezeigt werden, daß einer der Gründe für die Potenzierung des Ang II-Effektes die OTA-induzierte vermehrte Füllung von Ca^{2+} -Speichern ist.

Auch für EGF und dessen Effekt auf $[\text{Ca}^{2+}]_i$ zeigte sich eine Modulation der Hormonantwort sowohl im Bezug auf Quantität als auch auf die Qualität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Proliferationsstimulation durch OTA, die Ca^{2+} -abhängig war. Sieht man die in der Literatur beschriebenen protektiven Effekte von Losartan und dem ACE-Hemmer Enalapril auf die Nierenfunktion in OTA-exponierten Ratten in diesem Zusammenhang (23), verstärken sich die Hinweise darauf, daß OTA eher als Funktionsmodulator in die Nierenfunktion eingreift, denn als direkt toxische Substanz.

Des weiteren wurde versucht die vermutlich durch vermehrte Speicherfüllung und IP_3 -Rezeptorsensitivierung OTA-induzierte Potenzierung von Hormonantworten auch für Noradrenalin und Bradykinin, zwei weitere Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe, zu realisieren. Die durch Noradrenalin hervorgerufene Ca^{2+} -Antwort ließ sich durch OTA potenzieren, während der Effekt von 10 nmol/l Bradykinin gehemmt wurde. Im Gegensatz dazu war die Ca^{2+} -Antwort auf 100 nmol/l Bradykinin allerdings völlig unbeeinflusst von der OTA-Exposition. Dies ließe sich durch eine Unterdrückung der

Bradykininantwort durch erhöhte zytoplasmatische cAMP-Konzentrationen erklären, wie auch schon in der Literatur beschrieben (49). Diese Interaktion zwischen der durch Bradykinin aktivierten Signalkaskade und dem cAMP-Signalweg findet über eine PKA-vermittelte reduzierte Aktivierbarkeit der PLC statt.

Die Wechselwirkungen von OTA mit hormonell induzierten Ca^{2+} -Signalen zeigen deutlich, daß das Toxin nicht nur Ca^{2+} -Oszillationen in IHKE Zellen hervorzurufen vermag, sondern auch mit Ca^{2+} -Signalmechanismen in solcher Weise interagiert, daß physiologische Regulationsprozesse stark verändert werden. Daraus folgt im Falle von EGF und Ang II eine Änderung des Proliferationsverhaltens der Zellen. Herauszufinden, inwieweit Transportmechanismen oder anderer Funktionen der proximalen Tubuluszellen durch diese Wirkungen beeinflußt werden, ist Ziel zukünftiger Untersuchungen.

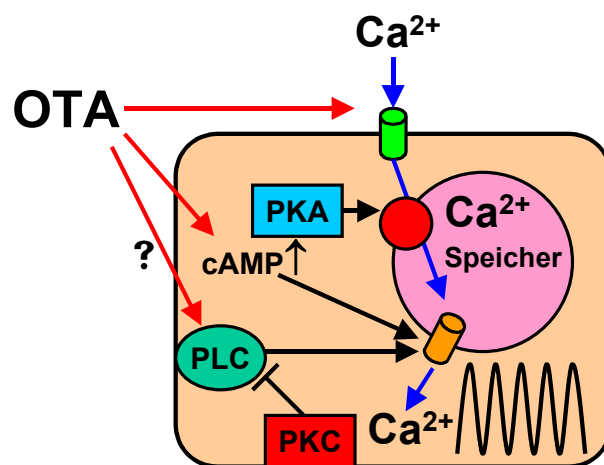
E Zusammenfassung

Ziel dieser Studie war es, die Wirkung von OTA in toxikologisch relevanten, d.h. nanomolaren Konzentrationen, auf Nierenepithelzellen humanen Ursprungs zu untersuchen. Von besonderem Interesse waren hierbei Effekte auf die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und das Zellwachstum. Auf letzteres übte OTA eine biphasische Wirkung aus. Von 0.1 bis 10 nmol/l bewirkte OTA eine Ca^{2+} -abhängige Potenzierung des EGF- und Ang II-induzierten Wachstums. Oberhalb von 10 nmol/l führte 24-stündige OTA-Inkubation zu einer Abnahme der Zellzahl und geringfügiger LDH-Freisetzung, die von Ca^{2+} -Signalen völlig unabhängig waren und auch nicht in einer vermehrten Radikalbildung oder einem gestörten zellulären Eisenstoffwechsel begründet lagen.

OTA ist in der Lage ab einer Schwellenkonzentration von 0.1 nmol/l Oszillationen von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auszulösen, die durch Ca^{2+} -Einstrom, vermehrte Sequestration von Ca^{2+} in das endoplasmatische Retikulum und Interaktion mit dem IP_3 -Signalweg zustandekommen.

(Abb. 27d, nebenstehend abgebildet)

Die Aufnahme von einströmenden Ca^{2+} in intrazelluläre Speicher durch Thapsigargin-sensitive- Ca^{2+} -ATPasen wird über einen Anstieg der zellulären cAMP-Konzentration und daraus resultierender PKA-Aktivierung stimuliert. Die Oszillationen in der freien zytoplasmatischen Ca^{2+} -



Konzentration werden durch den PLC - PKC - Signalweg aufrechterhalten. Dies geschieht entweder als Folge einer Sensitivierung der IP_3 -Rezeptor-kanäle durch den OTA-induzierten Anstieg des intrazellulären cAMP-Spiegels, oder aufgrund einer Steigerung der PLC-Aktivität durch OTA.

Auf diese Weise kann OTA auch Hormonantworten auf Ca^{2+} -mobilisierende Botenstoffe potenzieren, wie für EGF, Ang II und Noradrenalin gezeigt. Dabei scheint für die potenzierende Wirkung auf die Calciumantwort neben Wechselwirkungen von OTA mit intrazellulären Botenstoffen und Signalkaskaden, wie dem cAMP- und dem IP_3 -Signalweg, die vermehrte Füllung der Speicher eine Rolle zu spielen, wie für Ang II

gezeigt werden konnte. Die unter OTA-Einfluß verstärkte Wirkung von Ang II und EGF auf die Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern zeigte sich auch verantwortlich für die erhöhte mitogene Potenz dieser beiden Hormone in Gegenwart von OTA.

Andererseits kann es auch zur Unterdrückung eines Ca^{2+} -Signals führen, wie am Beispiel von Bradykinin dargestellt wurde. Der antagonistische Effekt auf die Bradykinin-induzierte Ca^{2+} -Antwort ist am ehesten der durch OTA erhöhten cAMP-Konzentration zuzuschreiben, welche durch verminderte Aktivierbarkeit der PLC durch G-Proteine den BK-Effekt hemmt (49).

Hinsichtlich seiner Interaktion mit intrazellulären Signalwegen erzeugt OTA ein „trojanisches Signal“, das durch Modulation intrazelluläre Signale physiologische Stimuli unterdrückt, verstärkt, oder, wie im Falle von Ang II sogar unterschwellige Reize dazu befähigt, ein Signal auszulösen. Andererseits kann OTA auch in Abwesenheit physiologischer Botenstoffe Calciumsignale in IHKE-Zellen generieren und somit Einfluß auf zelluläre Funktionen nehmen.

Die Ergebnisse dieser Studie legen nahe, daß OTA in nanomolaren Konzentrationen in der Lage ist, Regulationsmechanismen der Zellfunktionen in menschlichen Nierenepithelzellen zu beeinflussen. Aufgrund seiner Wirkung ist es weniger ein "klassisches" Toxin, sondern ein potenter Modulator der Zellfunktion.

F Abkürzungsverzeichnis

[Ca ²⁺] _i	freie intrazelluläre Calciumkonzentration
Abb.	Abbildung
AChE	Acetylcholinesterase
Ang II	Angiotensin II
AT1-Rezeptor	Angiotensin II-Rezeptor Typ 1
BAPTA-AM	1,2-bis-(O-Aminophenoxy)ethanN,N,N',N',- Tetraessigsäure-Acetomethoxyester
BIM I	Bisindolylmaleimide I
BK	Bradykinin
BSA-OTA	Konjugat von Ochratoxin A und bovinem Serumalbumin
cAMP	cyclisches Adenosin- 3', 5' -Monophosphat
CAR	Cyanid, Antimycin A und Rotenon
DAG	Diacylglycerol
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
et. al.	et altera
ETC	Elektronentransportkette
IHKE	immortalized human kidney epithelial cells
IP ₃	Inositol- 1, 4, 5, -Trisphosphat
LDH	Lactat Dehydrogenase
MDCK	Madin Darby canine kidney cells
NA	Noradrenalin
OAT 1	organischer Anionentransporter Typ 1
OK	Opossum kidney cells
OTA	Ochratoxin A
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PTX	Pertussistoxin
TG	Thapsigargin

G Literatur

1. Bahnemann, E., Kerling, H. P., Ensminger, S., Schwerdt, G., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1997) Renal transepithelial secretion of ochratoxin A in the non-filtering toad kidney. *Toxicology* 120: 11-17
2. Bendele, A. M., Carlton, W. W., Krogh, P., and Lillehoj, E. B. (1985) Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *J.Natl.Cancer Inst.* 75: 733-742
3. Bergmeyer, H. U. and Berndt, E. (1974). Lactat-Dehydrogenase , Methoden der enzymatischen Analyse: 607-612
4. Berndt, W. O., Hayes, A. W., and Baggett, J. MC. (1984) Effects of fungal toxins on renal slice calcium balance. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 74: 78-85
5. Bit, R. A., Davis, P. D., Elliott, L. H., Harris, W., Hill, C. H., Keech, E., Kumar, H., Lawton, G., Maw, A., and Nixon, J. S. (1993) Inhibitors of protein kinase C. 3. Potent and highly selective bisindolylmaleimides by conformational restriction. *J.Med.Chem.* 36: 21-29
6. Blayney, L. M., Gapper, P. W., and Newby, A. C. (1991) Inhibition of a receptor-operated calcium channel in pig aortic microsomes by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Biochem.J.* 273: 803-806
7. Cereijido, M., Robbins, E. S., Dolan, W. J., Rotunno, C. A., and Sabatini, D. D. (1978) Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J.Cell Biol.* 77: 853-880
8. Chang, F. C. and Chu, F. S. (1977) The fate of ochratoxin A in rats. *Food Cosmet.Toxicol.* 15: 199-204

9. Chatton, J.-Y., Cao, Y., Liu, H., and Stucki, J. W. (1998) Permissive role of cAMP in the oscillatory Ca²⁺ response to inositol 1,4,5-trisphosphate in rat hepatocytes. *Biochem.J.* 330: 1411-1416
10. Chiavaroli, C., Bird, G. S. J., and Putney, J. W. (1994) Delayed "All-or-None" activation of Inositol 1,4,5-Triphosphate-dependent calcium signaling in single rat hepatocytes. *J.Biol.Chem.* 269: 25570-25575
11. Chu, F. S. (1971) Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin. *Arch Biochem Biophys.* 147: 359-366
12. Cobbold, P. H., Sanchez-Bueno, A., and Dixon, C. J. (1991) The hepatocyte calcium-oscillator. *Cell Calcium* 12: 87-95
13. Creppy, E. E., Betbeder, A.-M., Godin, M., Fillastre, J.-P., AMG, K. S., Simon, P., Lasseur, C., Combe, C., and Aparicio, M. (1995) Ochratoxin A in human blood and chronic interstitial nephropathy: cases report in France. 17. Mykotoxin-Workshop, Braunschweig
14. Dahlmann, A., Dantzler, W. H., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1998) 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
15. De la Rosa, L. A., Vilarino, N., Vieytes, M. R., and Botana, L. M. (2001) Modulation of thapsigargin-induced calcium mobilisation by cyclic AMP-elevating agents in human lymphocytes is insensitive to the action of the protein kinase A inhibitor H-89. *Cell Signal* 13: 441-449
16. Delacruz, L. and Bach, P. H. (1990) The role of Ochratoxin A metabolism and biochemistry in animal and human nephrotoxicity. *J.Biopharm.Sci.* 1(3): 277-304
17. Duchen, M. R. (1999) Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J.Physiol.* 516: 1-17

18. Eder, S., Benesic, A., Freudinger, R., Engert, J., Schwerdt, G., Drumm, K., and Gekle, M. (2000) Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflügers Archiv* 440(4): 521-529
19. Eguchi, S., Numaguchi, K., Iwasaki, H., Matsumoto, T., Yamakawa, T., Utsunomiya, H., Motley, E. D., Kawakatsu, H., Owada, K. M., Hirata, Y., Marumo, F., and Inagami, T. (1998) Calcium-dependent epidermal growth factor receptor transactivation mediates the angiotensin II-induced mitogen-activated protein kinase activation in vascular smooth muscle cells. *J.Biol.Chem.* 273: 8890-8896
20. Eker, P., Holm, P. K., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1994) Selective regulation of apical endocytosis in polarized Madin-Darby canine kidney cells by mastoparan and cAMP. *J.Biol.Chem.* 269: 18607-18615
21. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., and Starke, K. (1998). Kapitel 14; *Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: Das Herz , Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*: 389
22. Gekle, M., Pollock, C. A., and Silbernagl, S. (1995) 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
23. Gekle, M. and Silbernagl, S. (1993) Mechanism of ochratoxin A-induced reduction of glomerular filtration rate. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 276: 316-321
24. Gekle, M. and Silbernagl, S. (1995) Modulation of the kinetics of albumin uptake in OK-cells. *Pflügers Archiv* 430: R72
25. Gekle, M., Silbernagl, S., Mildenerger, S., and Freudinger, R. (1993) Effect on dome formation and uptake of Ochratoxin A in proximal tubule-derived Opossum kidney cell monolayers. *Cellular Physiology and Biochemistry* 3: 68-77

26. Godin, M., Fillastre, J.-P., Simon, P., Francois, A., Le Roy, F., and Morin, J.-P. (1997) Is Ochratoxin A nephrotoxic in human beings? *Advances in Nephrology* 26: 181-204
27. Gryniewicz, G., Poenie, M., and Tsien, R. Y. (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J.Biol.Chem.* 260: 3440-3450
28. Gstraunthaler, G., Pfaller, W., and Kotanko, P. (1985) Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK₁ and MDCK). *Am.J.Physiol.* 248: F536-F544
29. Hajnoczky, G., Gao, E., Nomura T., Hoek J.B., and Thomas, A. P. (1993) Multiple mechanisms by which protein kinase A potentiates inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca^{2+} mobilization in permeabilized hepatocytes. *Biochem. J.* 293 (Pt 2): 413-422
30. Hajnóczky, G., Robb-Gaspers, L. D., Seitz, M. B., and Thomas, A. P. (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* 82: 415-424
31. Hald, B. (1991) Ochratoxin A in human blood in european countries. in: *Mycotoxins, Endemic nephropathy and urinary tract tumors, IARC Lyon*
32. Haller, T., Völkl, H., Deetjen, P., and Dietl, P. (1996) The lysosomal Ca^{2+} pool in MDCK cells can be released by $\text{Ins}(1,4,5)P_3$ -dependent hormones or thapsigargin but does not activate store-operated Ca^{2+} entry. *Biochem.J.* 319: 909-912
33. Hasinoff, B. B., Rahimtula, A. D., and Omar, R. F. (1990) NADPH-cytochrome-P-450 reductase promoted hydroxyl radical production by the iron(III)-ochratoxin A complex. *Biochim Biophys Acta* 1036(1): 78-81
34. Hoehler, D., Marquardt, R. R., McIntosh, A. R., and Xiao, H. (1996) Free radical generation as induced by Ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*). *J.Biol.Chem.* 271: 27388-27394

35. Humes, H. D., Cieslinski, D. A., Johnson, L. B., and Sanchez, I. O. (1992) Triiodothyronine enhances renal tubule cell replication by stimulating EGF receptor gene expression. *Am.J.Physiol.* 31: F540-F545
36. Jessen, H. (1994) Taurine and beta-alanine transport in an established human kidney cell line derived from the proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1194: 44-52
37. Jessen, H., Roigaard, H., and Jacobsen, C. (1996) Uptake of neutral alpha- and beta-amino acids by human proximal tubular cells. *Biochim Biophys Acta* 1282: 225-232
38. Jessen, H., Roigaard, H., Riahi-Esfahani, S., and Jacobsen, C. (1994) A comparative study on the uptake of alpha-aminoisobutyric acid by normal and immortalized human embryonic kidney cells from proximal tubule. *Biochim Biophys Acta* 1190: 279-288
39. Johnson, D. W., Saunders, H. J., Baxter, R. C., Field, M. J., and Pollock, C. A. (1998) Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells. *Kidney Int.* 54: 747-757
40. Jorgensen, K. and Bilde, B. (1996) Occurrence and estimated dietary intakes of ochratoxin A in European countries - results from a SCOOP project. *Food Addit.Contam.* 13: 15-16
41. Kiessling, K. H., Pettersson, H., Sandholm, K., and Olsen, M. (1984) Metabolism of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, and three trichothecenes by intact rumen fluid, rumen protozoa, and rumen bacteria. *Appl.Environ.Microbiol.* 47(5): 1070-1073
42. Klotz, K. N. and et al. (2001) Wirkung von Ochratoxin A auf die [³⁵S]GTPS – Bindung an das G_{αi}-Protein. Personal Communication

43. Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gryd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Larsen, A. E., Madsen, A., Mortensen, H. P., Moller, T., Petersen, O. K., Ravnskov, U., Rostgaard, M., and Aalund, O. (1974) Experimental porcine nephropathy. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.A. Suppl.No.246*: 1-21
44. Krogh, P., Axelsen, N. H., Elling, F., Gyrd-Hansen, N., Hald, B., Hyldgaard-Jensen, J., Larsen, A. E., Madsen, A., Mortensen, H. P., Moller, T., Petersen, O. K., Ravnskov, U., Rostgaard, M., and Aalund, O. (1974) Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A- contaminated feed. *Acta Pathol.Microbiol.Scand.A. 246*: 1-21
45. Kuiper-Goodman, T. and Scott, P. M. (1989) Risk assessment of the mycotoxin Ochratoxin A. *Biomed.Environ.Sci. 2*: 179-248
46. Leiderman, L. J., Tucker, J. A., and Dennis, V. W. (1989) Characterization of proliferation and differentiation of opossum kidney cells in a serum-free defined medium [published erratum appears in *In Vitro Cell Dev Biol* 1990 Jan;26(1):102]. *In Vitro Cell.Dev.Biol. 25*: 881-886
47. Lovisolo, D., Distasi, C., Antoniotti, S., and Munaron, L. (1997) Mitogens and calcium channels. *News in Physiological Sciences 12*: 279-285
48. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem. 193*: 265-275
49. Luo S.F., Chiu C.T., sao H.L., an L.W., and Tsai C.T., Pan S. L. Yang C. M. (1997) Effect of forskolin on bradykinin-induced calcium mobilization in cultured canine tracheal smooth muscle cells. *Cell Signal 9*: 159-167
50. Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A. M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E. E., and Bacha, H. (1995) Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia. *Arch.Toxicol. 69*: 552-558

51. Maaroufi, K., Achour, A., Hammami, M., el May, M., Betbeder, A. M., Ellouz, F., Creppy, E. E., and Bacha, H. (1995) Ochratoxin A in human blood in relation to nephropathy in Tunisia. *Hum.Exp.Toxicol.* 14: 609-614
52. Merritt, J. E., Jacob, R., and Hallam, T. J. (1989) Use of Manganese to Discriminate between Calcium Influx and Mobilization from Internal Stores in Stimulated Human Neutrophils. *J.Biol.Chem.* 264: 1522-1527
53. Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, D. B., and Theron, J. J. (1965) Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205: 1112-1113
54. Mooren, F. C., Geada, M. M., Singh, J., Stoll, R., Beil, W., and Domschke, W. (1997) Effects of extracellular Mg^{2+} concentration on intracellular signalling and acid secretion in rat gastric parietal cells. *Biochim Biophys Acta* 1358: 279-288
55. Norman, J., Badie-Dezfooly, B., Nord, E. P., Kurtz, I., Schlosser, J., Chaudhari, A., and Fine, L. G. (1987) EGF-induced mitogenesis in proximal tubular cells: Potentiation by angiotensin II. *Am.J.Physiol.* 253: F299-F309
56. Perisic, O. and Traugh, J. A. (1985) Protease-activated kinase II as the mediator of epidermal growth factor-stimulated phosphorylation of ribosomal protein S6. *FEBS Lett.* 183: 215-218
57. Purchase, I. F. and Van-der-Watt, J. J. (1971) The long-term toxicity of Ochratoxin A to rats. *Food Cosmet.Toxicol.* 9: 681-682
58. Putney, J. W. (1998) Calcium signaling: Up, down, up, down.... What's the point? *Science* 279: 191-192

59. Racay, P., Qteishat, A. W., ElKambergy, H. M., Mezesova, V., and Lehotsky, J. (1998) Fe²⁺-induced inhibition of gerbil forebrain microsomal Ca²⁺-ATPase: effect of stobadine, glutathione and combination of both antioxidants. *Biochim Biophys Acta* 1370: 119-126
60. Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M., and Lucic, A. (1997) Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia. *Toxicol.Lett.* 91: 105-109
61. Richardson, J. C. W., Scalera, V., and Simmons, N. L. (1981) Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments. *Biochim Biophys Acta* 673: 26-36
62. Salvador, J. M. and Mata, A. M. (1998) Characterization of the intracellular and the plasma membrane Ca²⁺-ATPases in fractionated pig brain membranes using calcium pump inhibitors. *Arch Biochem Biophys.* 351: 272-278
63. Sauvant, C. and Gekle, M. (2001) Modulation of the basolateral and apical step of transepithelial organic anion secretion in proximal tubular opossum kidney cells. Acute effects of epidermal growth factor and mitogen-activated protein kinase. *J.Biol.Chem.* 276: 14695-14703
64. Sauvant, C., Gekle, M., and Silbernagl, S. (1996) Effect of chronic exposure to ochratoxin A on the organic anion transporter in Ok cells. *Kidney and Blood Pressure Research* 19: 355
65. Sauvant, C., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1997). Effect of chronic exposure to ochratoxin A on organic anion transport systems in OK-cells. *Proceedings 19th Mykotoxin-Workshop.*: 100-104
66. Sauvant, C., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1998) Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal tubule-derived OK-cells. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 287(1):13-20

67. Schmidt, U., Hajjar, R. J., Kim, C. S., Lebeche, D., Doye, A. A., and Gwathmey, J. K. (1999) Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca^{2+} -ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am. J. Physiol.* 277(2 Pt 2): H474-H480
68. Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999) The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biol Toxicol* 15: 405-415
69. Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1998) Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A into Madin-Darby canine kidney cells. *Toxicology* 131(2-3): 193-202
70. Schwerdt, G., Gekle, M., Freudinger, R., Mildenerger, S., and Silbernagl, S. (1997) Apical uptake of radiolabelled ochratoxin A into MDCK cells. *Pflügers Archiv* 433: R162
71. Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lau, B. P. Y., Lewis, D. A., Hayward, S., Ryan, J. J., and Kuiper-Goodman, T. (1998) Survey of Canadian human blood plasma for ochratoxin A. *Food Addit. Contam.* 15: 555-562
72. Smith, R. J., Sam, L. M., Justen, J. M., Bundy, G. L., Bala, G. A., and Bleasdale, J. E. (1990) Receptor-coupled signal transduction in human polymorphonuclear neutrophils: effects of a novel inhibitor of phospholipase C-dependent processes on cell responsiveness. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 253: 688-697
73. Stormer, F. C. and Hoiby, E. A. (1996) Citrinin, ochratoxin A and iron. Possible implications for their biological function and induction of nephropathy. *Mycopathologia* 134: 103-107
74. Tveito, G., Hansteen, I., Dalen, H., and Haugen, A. (1989) Immortalization of normal human kidney epithelial cells by nickel(II). *Cancer Res.* 49: 1829-1835

75. Wafa, E. W., Yahya, R. S., Sobh, M. A., Eraky, I., el-Baz, M., el-Gayar, H. A., Betbeder, A. M., and Creppy, E. E. (1998) Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study. *Hum.Exp.Toxicol.* 17: 124-129
76. Wolf, G., Müller, E., Stahl, R. A. K., and Ziyadeh, F. N. (1993) Angiotensin II-induced Hypertrophy of Cultured Murine Proximal Tubular Cells Is Mediated by Endogenous Transforming Growth Factor- β . *J.Clin.Invest.* 92: 1366-1373
77. Wolf, G. and Neilson, E. G. (1990) Angiotensin II induces cellular hypertrophy in cultured murine proximal tubular cells. *Am.J.Physiol.* 259: F768-F777
78. Wolf, G. and Neilson, E. G. (1993) Angiotensin II as a hypertrophogenic cytokine for proximal tubular cells. *Kidney Int.* 43: S-100-S-107
79. Wolf, G., Thaiss, F., Schoeppe, W., and Stahl, R. A. K. (1992) Angiotensin II-Induced Proliferation of Cultured Murine Mesangial Cells: Inhibitory Role of Atrial Natriuretic Peptide. *J.Am.Soc.Nephrol.* 3: 1270-1278
80. Wolf, G., Zahner, G., Mondorf, U., Schoeppe, W., and Stahl, R. A. K. (1993) Angiotensin II stimulates cellular hypertrophy of LLC-PK₁ cells through the AT₁ receptor. *Nephrol Dial Transplant* 8: 128-133

Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Allen Mitarbeitern des physiologischen Instituts für ihre Unterstützung und das hervorragende Arbeitsklima

An erster Stelle Prof. Dr. Michael Gekle, der mir mit dieser Arbeit ermöglichte, einen Einblick in die wissenschaftliche Tätigkeit zu erhalten. Durch seine Art stets mit Rat und Tat beiseite zu stehen, sein umfangreiches Wissen und die Möglichkeit weitgehend selbständig zu arbeiten, hat er in mir Begeisterung für die Wissenschaft geweckt. Auch möchte ich ihm für die zahlreichen Gespräche danken, in denen er viele hilfreiche Beiträge zur Vollendung dieser Arbeit machte und die Zeit, die er dafür investiert hat.

Des weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Stefan Silbernagl für die freundliche Aufnahme und die Möglichkeit in seinem Institut arbeiten zu dürfen. Außerdem für die wertvollen Ratschläge und Anregungen in den Laborbesprechungen.

Vielen Dank auch an die technischen Assistentinnen, insbesondere Sigrid Mildenberger, Ruth Freudinger, Birgit Gassner und Katharina Völker, die mir halfen die labortechnischen Fähigkeiten zu erwerben, die nötig waren, diese Arbeit zu vervollständigen und mit den Problemen fertigzuwerden, die im Laboralltag unweigerlich auftreten.

Darüberhinaus möchte ich meinen Eltern dafür danken, daß sie mir das Studium und damit diese Dissertation ermöglichten und mir immer liebevoll zur Seite standen.

Lebenslauf

Name: Andreas Benesic
Geburtsdatum: 06.05.1975
Geburtsort: Amberg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung: 08/1981-07/1985 an der Albert-Schweizer-Grundschule in Amberg
08/1985-05/1994 am Erasmus-Gymnasium in Amberg
Zivildienst: 04/1995-10/1996 im Klinikum St.Marien in Amberg

Hochschulbildung: 10/1994-03/1995 Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
10/1996-06/2002 Fortsetzung und Abschluß des Medizinstudiums an der Universität Würzburg
08/1997 Ärztliche Vorprüfung
03/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr: 04/2001-08/2001 Chirurgische Universitätsklinik Würzburg
08/2001-12/2001 Klinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universität Würzburg
12/2001-3/2002 Medizinische Klinik der Universität Würzburg

Seit 10/1997 Doktorarbeit am physiologischen Institut der Universität Würzburg zur Wirkung von Ochratoxin A auf die Calciumhomoöstase und hormonelle Signaltransduktion in menschlichen proximalen Tubuluszellen

Veröffentlichungen:

Benesic A, Mildenerger S, Gekle M.

Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. Pflügers Arch. 2000 Jan;439(3):278-87.

Eder S, Benesic A, Freudinger R, Engert J, Schwerdt G, Drumm K, Gekle M.

Nephritogenic ochratoxin A interferes with mitochondrial function and pH homeostasis in immortalized human kidney epithelial cells. Pflügers Arch. 2000 Aug;440(4):521-9.

Proceedings:

Benesic A, Eder S, Sauvant C, Schwerdt G, Gekle M

Ochratoxin A induces proliferation of immortalized human kidney epithelial cells at low nanomolar concentration by interference with cellular Ca^{2+} -homeostasis.

21. Mykotoxin Workshop der Gesellschaft für Mykotoxinforschung, 1999 Jena