

„Modulation der nierenschädigenden Wirkung von Ochratoxin A durch
simultane Exposition mit Citrinin und durch tubulo-interstitielle
Kommunikation“

Dissertation

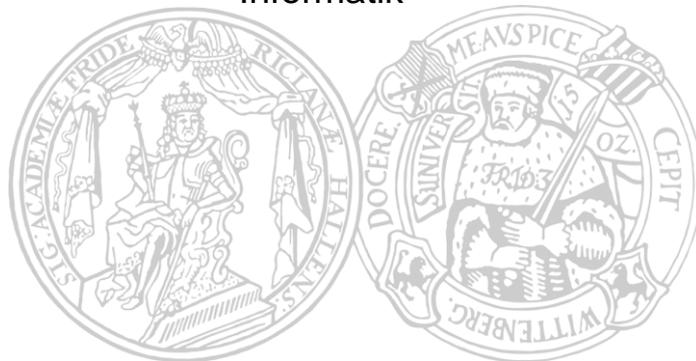
zur Erlangung des

Doktorgrades der Ernährungswissenschaften (Dr. troph.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät III

Agrar-und Ernährungswissenschaften, Geowissenschaften und
Informatik



der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

von

Frau Marie-Christin Schulz

geb. am 20.05.1989 in Neuruppin

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen

2. PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt

3. Apl. Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Gisela Degen

Tag der Verteidigung: 12.10.2020 in Halle (Saale)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV-V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII-VIII
1. Einleitung	1
1.1. Ochratoxin A (OTA)	1
1.2. Citrinin (CIT)	4
1.3. Nephropathie	5
1.4. mikroRNAs (miRs)	7
1.4.1. miR-21	9
1.4.2. miR-29b	9
1.4.3. miR-200a	10
1.5. Cyclooxygenase-2 (COX-2)	10
1.6. MAPK Weg	11
1.6.1. ERK1/2	12
1.6.2. JNK1/2	12
1.6.3. p38-MAPK	13
1.7. Zielsetzung der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Liste der Chemikalien und Gebrauchsgegenstände	15
2.2. Zellkultur	19
2.2.1. Zusammensetzung der Zellkulturmedien	19
2.2.2. Zelllinien und deren Kultivierung	21
2.3. Experimentelle Ansätze	22
2.4. Lipofektion	23
2.5. Zusammensetzung der Puffer	24
2.6. Bestimmung der Proteinmenge	25
2.7. Caspase-3 Aktivität	26
2.8. LDH Aktivität	26
2.9. Strukturindex (SI)	27
2.10. FITC-Dextran Diffusion	27
2.11. Messung des pH-Werts	27
2.12. RNA-Isolierung	28
2.12.1. RNA > 200 bp	28
2.12.2. MikroRNA (miR)	28
2.13. Bestimmung der RNA-Konzentration	29

2.13.1.	Spektralphotometrie	29
2.13.2.	Gelelektrophorese	29
2.14.	Reverse Transkription	29
2.15.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.16.	TaqMan-PCR	32
2.17.	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.18.	Western Blot	35
2.19.	ELISA	36
2.20.	Bewertung der Interaktion von OTA und CIT	37
2.21.	Statistik	38
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Teil I Effekt der simultanen Inkubation von HK-2 Zellen mit OTA und CIT auf nierenschädigende Prozesse	39
3.1.1.	Einfluss von Citrinin (CIT) auf die Viabilität von HK-2 Zellen	39
3.1.2.	Einfluss von CIT in Kombination mit OTA auf die Viabilität von HK-2 Zellen	40
3.1.3.	Einfluss von CIT und OTA auf die Expression inflammatorischer Zytokine und Enzyme in HK-2 Zellen	40
3.1.4.	Einfluss von CIT und OTA auf die Dedifferenzierung von HK-2 Zellen	42
3.1.5.	Einfluss von CIT und OTA auf die Morphologie von HK-2 Zellen	44
3.1.6.	Einfluss von CIT und OTA auf die FITC-Dextran Diffusion von HK-2 Zellen	44
3.1.7.	Einfluss von CIT und OTA auf die Expression von Kollagen IV in HK-2 Zellen	46
3.1.8.	Einfluss von CIT und OTA auf die Expression von Kollagen III in HK-2 Zellen	46
3.1.9.	Rolle des MAPK-Weg bei der Vermittlung von Mykotoxineffekten	48
3.1.9.1.	Abhängigkeit der Mykotoxineffekte vom MAPK-Weg	48
3.1.9.2.	Effekt der Mykotoxinkombination auf phosphorylierte MAP-Kinasen	49
3.2.	Teil II Modulation der nephrotoxische OTA-Wirkung durch die Kommunikation von Epithelzellen und Fibroblasten	50
3.2.1.	Einfluss der Kokultur auf Expressionsänderungen von mRNAs	50
3.2.2.	Einfluss von OTA auf die Zellviabilität von NRK-52E und NRK-49F Zellen	51
3.2.3.	Einfluss von OTA auf nephrotoxische Änderungen in Epithelzellen	52
3.2.3.1.	Einfluss von OTA auf das inflammatorische Zytokin TNF und das Enzym COX-2 in NRK-52E	52

3.2.3.2.	Einfluss von OTA auf die Dedifferenzierung von NRK-52E Zellen	53
3.2.3.3.	Einfluss von OTA auf die Morphologie von NRK-52E Zellen	54
3.2.3.4.	Einfluss von OTA auf die Expression von Matrixproteinen in NRK-52E Zellen	54
3.2.4.	Einfluss von OTA auf nephrotoxische Änderungen in Fibroblasten	55
3.2.4.1.	Einfluss von OTA auf das inflammatorische Zytokin TNF und das Enzym COX-2 in NRK-49F Zellen	55
3.2.4.2.	Einfluss von OTA auf die Differenzierung von NRK-49F Zellen	56
3.2.4.3.	Einfluss von OTA auf Expression von Matrixproteinen in NRK-49F Zellen	57
3.2.5.	Effekt von konditionierten Kokultur-Medium auf Zellen in Monokultur	58
3.2.6.	Effekt der Kokultur auf die Expression der miRs	59
3.2.7.	Effekt von OTA auf die Expression von miRs	60
3.2.8.	Abhängigkeit der OTA-induzierten Effekte von miRs	61
3.2.9.	Rolle der COX-2 Aktivität bei der Vermittlung der OTA-Effekte	61
3.2.10.	Abhängigkeit der OTA-vermittelten Effekten von MAP-Kinasen	63
3.2.11.	Effekt von OTA auf die Expression von ERK1/2 und pERK1/2	63
4.	Diskussion	65
4.1.	Teil I Effekt der simultanen Inkubation humaner Zellen aus dem proximalen Tubulus mit OTA und CIT	65
4.1.1.	HK-2 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von Mykotoxinen	65
4.1.2.	Wirkung von OTA und CIT auf den Zelltod von HK-2 Zellen	65
4.1.3.	Einfluss von OTA und CIT auf inflammatorische Prozesse in HK-2 Zellen	66
4.1.4.	Einfluss von OTA und CIT auf EMT in HK-2 Zellen	67
4.1.5.	Einfluss von OTA und CIT auf die Expression von Kollagen III in HK-2 Zellen	69
4.1.6.	Rolle von MAP-Kinasen bei der Vermittlung von Mykotoxin-induzierter Expressionserhöhung der TNF mRNA	69
4.1.7.	Relevanz der eingesetzten Mykotoxinkonzentrationen	70
4.2.	Teil II Modulation der nephrotoxischen OTA-Wirkung durch die Kommunikation von Epithelzellen und Fibroblasten	70
4.2.1.	Kokultur als Modell für zelluläre Kommunikation	70
4.2.2.	NRK-52E als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von OTA	71

4.2.3.	NRK-49F als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von OTA	71
4.2.4.	Effekt der Kokultur auf die Expression von mRNAs die an der Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose beteiligt sind	72
4.2.5.	Einfluss von OTA auf den Zelltod von Epithelzellen und Fibroblasten	73
4.2.6.	Einfluss von OTA die Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose in Epithelzellen in Mono- und Kokultur	73
4.2.7.	Einfluss von OTA die Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose in Fibroblasten in Mono- und Kokultur	74
4.2.8.	Rolle von miRs an der Vermittlung OTA-induzierter Effekte	74
4.2.9.	Rolle von COX-2 an der Vermittlung OTA-induzierter Effekte	75
4.2.10.	Rolle von MAPK an der Vermittlung OTA-induzierter Effekte	76
5.	Zusammenfassung	77
	Literaturverzeichnis	XC-XCIX

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von OTA 7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-L- β phenylalanin.	1
Abbildung 2: Vergleich der Strukturformeln von OTA und CIT.	4
Abbildung 3: Aufbau der Epithelzellen des proximalen Tubulus und Veränderungen im Verlauf einer Nephropathie.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signalvermittlung im MAPK-Weg.	13
Abbildung 5 Schematische Darstellung der Kokultur.	22
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Lipofektion.	23
Abbildung 7: Konzentrationsreihe von CIT (0-10 µM) zur Ermittlung der Viabilität der HK-2 Zellen.	39
Abbildung 8: Konzentrationsreihe von CIT (0-1 mM) zur Ermittlung Viabilität der HK- 2 Zellen.	42
Abbildung 9: Konzentrationsreihe von CIT in Kombination mit 10 nM OTA zur Ermittlung Viabilität der HK-2 Zellen.	41
Abbildung 10: Effekt der Mykotoxine auf die Expression inflammatorischer Zytokine und Enzyme in HK-2 Zellen.	42
Abbildung 11: Mykotoxin-Effekt auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Proteine und die für sie kodierenden mRNAs in HK-2 Zellen.	43
Abbildung 12: Mykotoxin-Effekt auf die Morphologie von HK-2-Zellen.	45
Abbildung 13: Mykotoxin-Effekt auf die Barrierefunktion von HK-2 Zellen.	45
Abbildung 14: Mykotoxin-Effekt auf die Expression von Kollagen IV (a-c) und Kollagen III in HK-2 Zellen.	46
Abbildung 15: Rolle von MAP-Kinasen Rolle von MAP-Kinasen an der Mykotoxin- induzierten Erhöhung der für TNF kodierenden mRNA.	48
Abbildung 16: Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf den pH-Wert im Zellkulturmedium und die Morphologie der Zellen.	49
Abbildung 17: Effekt der Kokultur auf die Änderung der mRNA-Expression.	50
Abbildung 18: OTA-Effekt auf die Viabilität von NRK52E und NRK-49F unter Mono- und Kokulturbedingungen.	51

Abbildung 19: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen des inflammatorischen Zytokins TNF und des Enzyms COX-2 in NRK-52E.	52
Abbildung 20: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Proteine und mRNAs in NRK-52E.	53
Abbildung 21: OTA-Effekt auf die Morphologie von NRK-52E.	54
Abbildung 22: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen von Matrixproteinen und mRNAs in NRK-52E.	55
Abbildung 23: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen des inflammatorischen Zytokins TNF und des Enzyms COX-2 in NRK-49F.	56
Abbildung 24: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Proteine und mRNAs in NRK-49F.	57
Abbildung 25: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen von Matrixproteinen und mRNAs in NRK-49F.	58
Abbildung 26: Medientransfer.	59
Abbildung 27: Expressionsänderungen von miRs.	60
Abbildung 28: Rolle von miRs bei der Vermittlung OTA-induzierter Effekte.	62
Abbildung 29: Rolle von COX-2 an der OTA-induzierten Expressionserhöhung des Fibronektin Proteins in NRK-52E.	62
Abbildung 30: Rolle von ERK1/2 bei OTA-induzierten Änderungen.	63
Abbildung 31: von OTA auf die Expression von ERK1/2 und phosphorylierten ERK1/2.	64
Abbildung 32: Zusammenfassung der Effekte der simultanen Inkubation von HK-2 mit OTA und CIT.	77
Abbildung 33: Signalwege OTA-induzierter Effekte in der Kokultur.	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Chemikalienliste	15
Tabelle 2 Liste der Materialien	16
Tabelle 3 Zusammensetzung DMEM/ HAM's F-12	19
Tabelle 4 Zusammensetzung DMEM	20
Tabelle 5 Verwendete Zelllinien	21
Tabelle 6 Kultivierung der Zelllinien	21
Tabelle 7 Inkubation der HK-2 Zellen	22
Tabelle 8 Verwendete Inhibitoren	23
Tabelle 9 Zusammensetzung der Puffer	24
Tabelle 10 Reaktionsansatz für die reverse Transkription	30
Tabelle 11 Humane Primer (für HK-2)	32
Tabelle 12 Primer für Ratten (NRK-52E und NRK-49F)	33
Tabelle 13 miR Sonden	33
Tabelle 14 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	34
Tabelle 15 Verwendete Antikörper	35
Tabelle 16 Verdünnungsreihen von Kollagen III und IV	37
Tabelle 17 Vergleich des Erwartungswerts mit der gemessenen Änderung der mRNA-Expression.	47
Tabelle 18 Vergleich des Erwartungswerts mit der gemessenen Expressionsänderung der Proteine.	47
Tabelle 19 Änderung des extrazellulären pH-Werts	49

1 **Abkürzungsverzeichnis**

A	Ampere
AFC	7-Amino-4-Trifluoromethylcumarin
AK	Antikörper
AKI	Akute Nierenfunktionsstörung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP1B1	Natrium-Kalium-ATPase
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-propansulfonat
CKD	Chronische Nierenerkrankung
CIT	Citrinin
COX	Cyclooxygenase
Ct	Schwellenwertzyklus
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
ddPCR	Digitale Tröpfchen Polymerase-Kettenreaktion
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DEVD-AFC	Caspase-3 Substrat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbens Assay
ERK1/2	Extrazelluläre-Signale regulierte Kinasen 1/2
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g (im Zusammenhang mit Masse)	Gramm
g (im Zusammenhang mit Zentrifugation)	Erdbeschleunigung [m/s^2]
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HK-2	Humane Nierenzellen aus dem proximalen Tubulus
HRP	Meerrettichperoxidase
HSP	Hitzeschockprotein
HWZ	Halbwertszeit
IL	Interleukin
JNK1/2	c-Jun N-terminale Kinasen 1/2
k	Kilo-
KG	Körpergewicht
KSR	Kinaserepressor von Ras
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
m	Milli-

MCP	Monozyten chemoattraktives Protein
min	Minute
mRNA	Boten-RNA
miR	MikroRNA
μ	Mikro-
M	Molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MMP	Matrix-Metalloprotease
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MW	Mittelwert
n (als Vorsilbe)	Nano-
n (im Zusammenhang mit Statistik)	Anzahl
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NFAT	Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen
NF-κB	Nuklearer Faktor „Kappa-Leichtketten Verstärker“ von aktivierten B-Zellen
NKCC2	Natrium/Kalium/Kalzium-Kotransporter
iNOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NRK-52E	Normale Epithelzellen aus der Rattenniere
NRK-49F	Normale Fibroblasten aus der Rattenniere
OAT	Organischer Anionentransporter
OTA	Ochratoxin A
p	Piko-
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PG	Prostaglandin
PIPES	Piperazin-N,N'-Bis(2-Ethansulfonsäure)
pKs	Säurekonstante
PLA₂	Phospholipase A ₂
RISC	RNA-induzierter Stilllegungskomplex
RNA	Ribonukleinsäure
RPTEC	primäre proximale Tubuluszellen aus dem Menschen
RT	Reverse Transkription
SEM	Standardfehler
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SI	Strukturindex
SGLT	Natriumabhängiger Glucosetransporter
α-SMA	α-Aktin der glatten Muskulatur
SNP	Polymorphismen einzelner Nukleotide
STAT	Signaltransducer und Aktivator der Transkription
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEER	Transepithelialer elektrischer Widerstand
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TNF	Tumornekrosefaktor
uPA	Urokinase
UV	Ultraviolett
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WISP	WNT1 Signalweg induzierbares Protein
ZEB	Zinkfinger E-Box-bindende Homeobox
ZO-1	Zonula Occludens -1

1. Einleitung

1.1. Ochratoxin A (OTA)

Schimmelpilze kommen ubiquitär vor und können Lebensmittel, Wohnräume oder Gebrauchsgegenstände kontaminieren. Dabei geht die allgegenwärtige Gefahr nicht immer vom Pilz selbst aus, sondern vielmehr von seinen toxischen Metaboliten, den so genannten Mykotoxinen, die mitunter stabil bleiben, obwohl der Schimmelpilz nicht mehr vorhanden ist. OTA ist ein Beispiel für ein Mykotoxin, das in diversen Lebensmitteln zu finden ist und damit zu einem täglich konsumierten Gift gehört, was eine korrekte Risikobewertung unerlässlich macht. OTA wird von Schimmelpilzen der Gattungen *Aspergillus*, *Penicillium* und *Petromyces* synthetisiert. Die Abbildung 1 zeigt die Strukturformel von OTA oder 7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-L- β -phenylalanin, wie sein IUPAC Name lautet [1-3]. Das Cumaringerüst stammt aus dem Polyketidweg, Phenylalanin wird mittels Shikimatweg synthetisiert. Der Chloridrest wird vermutlich durch eine Halogenase hinzugefügt [1]. OTA dient den Schimmelpilzen vermutlich unter anderem als Schutz vor durch NaCl hervorgerufenen osmotischen Stress. Hierbei kann, bei Erhöhung der extrazellulären NaCl-Konzentration, an OTA gebundenes Chlorid ausgeschieden werden [4, 5].

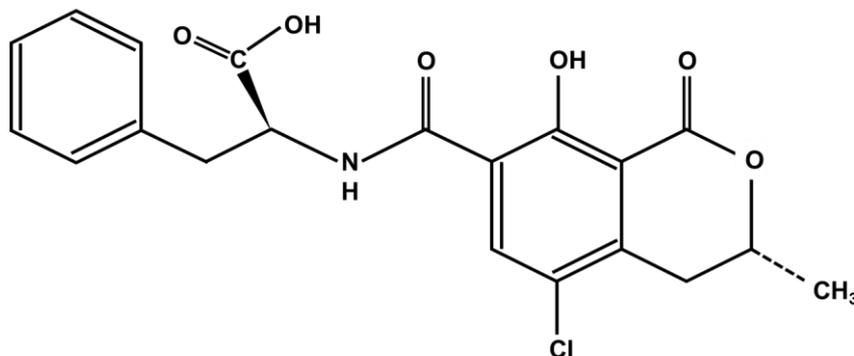


Abbildung 1: Strukturformel von OTA 7-Carboxy-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-L- β -phenylalanin.

Da Schimmelpilze, die OTA synthetisieren, vielfältig sind und in verschiedenen Habitaten gedeihen (z.B. *A. niger*, *carbonarius* und *ochraceus* in warmen tropischen Gebieten und *P. verrucosum* in gemäßigtem Klima), kommt OTA weltweit vor. In erster Linie sind Agrarprodukte wie z.B. Weizen, Gerste, Kakaobohnen und Weinbeeren in verschiedenen Stufen der Wertschöpfungskette von der Kontamination mit den genannten Schimmelpilzen betroffen. Hinzu kommt, dass OTA auch während hitzeintensiver Verarbeitungsprozesse wie Backen, Brauen oder Brühen nicht vollständig zerstört wird und so in Endprodukten wie Brot, Bier, Wein und Schokolade zu finden ist [6-12]. Daher nehmen die meisten Menschen weltweit OTA unvermeidlich mit ihrer Nahrung auf. Die tolerierbare tägliche Aufnahmemenge wird je nach Institution unterschiedlich eingeschätzt. Laut Europäischer Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) liegt sie bei ca. 17 ng/kg Körpergewicht (KG). Der

gemeinsame Sachverständigenausschuss für Lebensmittelzusatzstoffe der Ernährungs- und Landwirtschaftsorganisation der Vereinten Nationen und der Weltgesundheitsorganisation schätzt sie auf ca. 14 ng/kg KG. In Kanada liegt sie zwischen 1,5 - 5,7 ng/ kg KG und die europäische Kommission empfiehlt, nicht mehr als 5 ng OTA je kg KG pro Tag aufzunehmen [13, 14]. Diese Unterschiede zeigen, dass es noch keine abschließende und allgemeingültige Risikoeinschätzung für OTA gibt.

Nachdem OTA oral aufgenommen wurde, kann es pH-abhängig mit einer Bioverfügbarkeit von bis zu 97% im Jejunum resorbiert und ins Blut transportiert werden [15, 16]. OTA bindet zu über 99% an Plasmaproteine, vor allem Albumin [17, 18]. Im Blutserum gesunder Europäer können OTA-Konzentrationen von 0,25 – 35,9 nM gemessen werden [19]. Über die Pfortader gelangt OTA in die Leber, wo es zum Teil zu einer Hydroxylierung durch Cytochrom P450 1A1 und 3A4 zu 4(R)- und 4(S)-OH-OTA kommt. Des Weiteren kann der Metabolit OT α durch Spaltung der Peptidbindung entstehen [20]. OTA sowie seine Metabolite werden in verschiedene Organe wie Nieren, Muskeln oder Fett verteilt und letztendlich hauptsächlich renal ausgeschieden [21]. Die Halbwertszeit (HWZ) von OTA unterscheidet sich zwischen den Spezies massiv. Es hat sich herausgestellt, dass die HWZ im menschlichen Organismus, verglichen mit untersuchten Tieren, mit 35,5 Tagen besonders lang ist. Im Karpfen beträgt sie beispielsweise nur 40 Minuten und in Ratten 55 Stunden [15, 22, 23]. Der menschliche Organismus hat sich als besonders sensitiv gegenüber OTA-Exposition gezeigt und im Vergleich zu anderen Spezies wie z.B. Ratten sind geringere Dosen ausreichend, um toxische Effekte zu provozieren, was zum Teil der langen HWZ im Menschen geschuldet sein kann. Diese Speziespezifität bedeutet auch, dass tierexperimentell ermittelte OTA-Effekte nur bedingt auf den Menschen übertragbar sein können.

OTA ist laut Internationaler Agentur für Krebsforschung als Karzinogen der Klasse 2b eingestuft, es wird also als möglicherweise krebserregend für Menschen bewertet [24]. Die kanzerogenen Effekte konnten in verschiedenen Tiermodellen und Zellkulturversuchen mit mikro- und millimolaren Konzentrationen gezeigt werden [25]. Als mögliche Wirkmechanismen werden die Bildung von DNA-Addukten und die Synthese reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert [26, 27]. In mikromolaren Konzentrationen hat OTA auf diverse Organe akut schädigende Effekte. Schweine, denen täglich 1-2 mg/ kg KG verabreicht wurden, haben akute Vergiftungserscheinungen, wie Verminderung des Körpergewichts und der Futteraufnahme gezeigt. Außerdem traten Diarrhoe, Polyurie, Polydipsie und Dehydration auf und die Tiere verstarben nach ca. 5-6 Tagen [28]. Außerdem induziert OTA in mikro- oder millimolaren Konzentrationen Apoptose in Hepatozyten [29]. Darüber hinaus kann es in diesen hohen Konzentrationsbereichen mit Hilfe des Phenylalaninrestes kompetitiv die Phenylalanyl-tRNA-Synthase und somit die Proteinbiosynthese hemmen [30].

OTA kann in mikromolaren Konzentrationen auch Störungen des zellulären Ca^{++} -Haushalts und der mitochondrialen Atmungskette begünstigen [30, 31]. Des Weiteren vermindert es in mikromolaren Konzentration in der kolorektalen Adenokarzinomzelllinie CaCo-2, die Barrierefunktion, was sich in einem geringeren Gehalt der Zell-Zell-Kontakt bildenden Proteine wie Claudinen, Zonula Occludens Protein-1 (ZO-1) und Occludin zeigt. Ebenfalls verringert es den transepithelialen Widerstand (TEER) [32, 33]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass OTA in peritonealen Makrophagen und in CD4^{+} -Lymphozyten die Immunantwort moduliert [34, 35]. Viele OTA-Effekte treten dosisabhängig auf und es ist bekannt, dass durch OTA in nanomolaren Konzentrationen eher Signalwege moduliert werden, wie z.B. den Extrazelluläre-Stimuli-regulierte-Kinasen1/2 (ERK1/2)-Weg und so die Zellfunktion beeinflusst wird, während in höheren mikromolaren Dosen überwiegend adverse Effekte wie z.B. die Genotoxizität im Vordergrund stehen [21, 36].

Die Niere gilt als ein Zielorgan von OTA und im Speziellen hat sich der proximale Tubulus als Zielstruktur herauskristallisiert. In Schweinen, die eine Nephropathie entwickelt haben, wurden höhere OTA-Konzentrationen gemessen und eine gezielte Fütterung mit OTA begünstigte die Entstehung einer Nephropathie [37-41]. Ähnliches wurde auch bei Beaglen, Ratten und Puten beobachtet [42-44]. In Epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass in Marokko, Ägypten und Tunesien, in Gebieten mit erhöhten Auftreten chronischer Nierenerkrankungen (CKD), höhere OTA-Werte in Agrarprodukten gefunden wurden. Außerdem wurden im Blutplasma und Urin von Patienten mit CKD höhere OTA-Konzentrationen detektiert [45-49]. Folglich wurde postuliert, dass eine Akkumulation von OTA in der Niere zu pathologischen Veränderungen führt. Anhand von Experimenten, deren Ziel es war, mögliche Erklärungen für eine tubuläre Akkumulation zu finden, konnte gezeigt werden, dass OTA über verschiedene basolaterale organische Anionen Transporter (OATs) in die Zellen des proximalen Tubulus gelangt, hierzu gehören OAT1 und 3 [50, 51]. Zwar wird ein Teil des OATs apikal in das Lumen des proximalen Tubulus sezerniert, kann aber über Transportproteine wie OAT4 und 5 von dort wieder in die Zelle gelangen [52, 53]. Darüber hinaus ist in Zellen des proximalen Tubulus die Expression von OATs nach OTA-Inkubation erhöht [54]. Des Weiteren kann OTA pH-abhängiger in Zellen akkumuliert werden. Auf der apikalen Seite des proximalen Tubulus können unter physiologischen Bedingungen pH-Werte bis zu 6,6 erreicht werden. In diesem Milieu liegt OTA, als mittelstarke Säure mit einem pK_s von 7,1, protoniert vor und ist relativ gut membrangängig. Im Zytosol der Zellen dissoziiert OTA auf Grund des höheren pH-Werts wieder, ist nicht mehr membrangängig und verbleibt in den Zellen. Diese pH-abhängige Akkumulation von OTA wurde von Schwerdt et. al. für Zellen des distalen Tubulus beschrieben [55]. So können in Tubuluszellen höhere Konzentrationen freien OATs, als im Blutplasma erreicht werden. In diesen Konzentrationen bewirkt OTA beispielsweise in primären humanen proximalen

Tubuluszellen (RPTEC) eine Veränderung der Kollagensekretion, Apoptose und NF- κ B-Expression [56] (NF- κ B: Nuklearer Faktor „Kappa-Leichtketten Verstärker“ von aktivierten B-Zellen).

1.2 Citrinin (CIT)

Das Mykotoxin CIT zählt zu den Benzocarbonsäuren, sein IUPAC Name lautet (3R,4S) -4,6-Dihydro- 8-hydroxy-3,4,5-trimethyl- 6-oxo-3H-2-benzopyran- 7-carbonsäure. Es wird im Rahmen des Polyketidwegs synthetisiert [57]. In Abbildung 2 ist ein Vergleich der Strukturformeln von OTA und CIT dargestellt. Hierbei wird ersichtlich, dass es strukturelle Ähnlichkeiten zwischen OTA und CIT gibt, welche den organischen Anionen zugeordnet werden können.

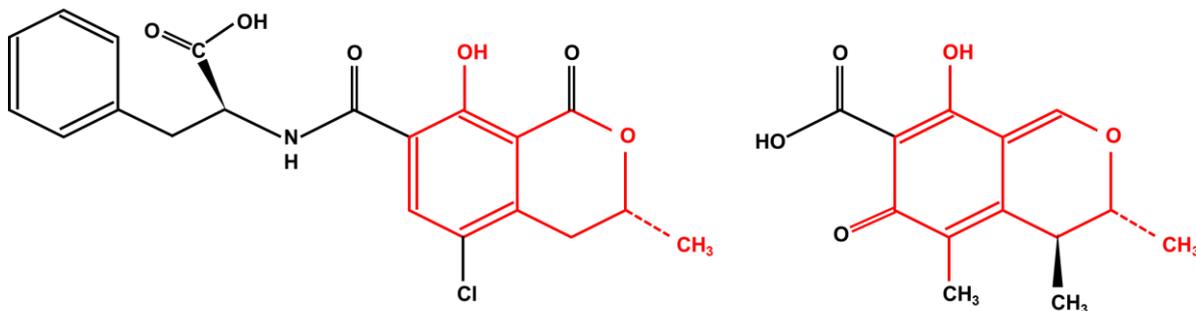


Abbildung 2: Vergleich der Strukturformeln von OTA und CIT. Rot markiert ist die gemeinsame Grundstruktur.

CIT wird von Schimmelpilzen der Gattungen *Penicillium* und *Monascus* synthetisiert [58]. Zum einen wirkt CIT antibakteriell und kann als Schutz vor Konkurrenten um Lebensräume und Nahrung eingesetzt werden [59]. Zum anderen kann es den Schimmelpilzen als Schutz vor ultravioletter (UV) Strahlung dienen [60, 61]. CIT tritt oftmals gemeinsam mit OTA auf [58, 62]. Gründe dafür sind zum einen Schimmelpilze, die sowohl OTA als auch CIT synthetisieren können (z.B. *P. verrucosum*) und zum anderen, dass Schimmelpilze, die entweder OTA oder CIT herstellen, vergesellschaftet vorkommen [63]. CIT kommt vor allem in Getreide wie Mais und Weizen vor, und so ist seine Aufnahme bei einer Durchschnittsernährung kaum zu vermeiden [64]. Nachdem CIT oral aufgenommen wurde, gelangt es durch Resorption im Jejunum ins Blut, wo es an Albumin bindet und in Konzentrationen von 0,4 - 1 nM nachweisbar ist [65-67]. Über die Pfortader gelangt CIT in die Leber, wo es zum weniger toxischen Dihydrocitrinon transformiert wird [68]. Im Gegensatz zu OTA wird CIT zu einem großen Teil in die Gallenflüssigkeit abgegeben und zu 80% fäkal ausgeschieden [69]. In der Niere kann CIT mit Hilfe von OATs sezerniert werden [53]. CIT hat in Konzentrationen, die im Plasma gefunden werden, wenig toxisches Potential, aber in der Niere kann es akkumuliert werden und unter Umständen schädigende Wirkungen entwickeln [70]. Im Urin von Probanden konnten höhere CIT-Konzentrationen gemessen werden (0,6 - 3,2 nM) als im jeweiligen Blutplasma (0,4 - 1 nM) [67]. CIT in mikro- bis millimolaren Konzentration ruft klassische allgemeine toxische Effekte hervor, wie z.B.

Immunsuppressivität, Fetotoxizität, Teratogenität, Genotoxizität [71, 72]. Aufgrund der Möglichkeit, in der Niere zu akkumulieren, wird die Niere als Zielorgan von CIT angesehen [58]. In geographischen Regionen mit erhöhter Prävalenz für Nephropathien können auch höhere CIT-Konzentrationen im Getreide detektiert werden [73]. Außerdem gibt es Daten, die auf einen Zusammenhang zwischen Nephropathien in Schweinen und erhöhten CIT-Vorkommen hinweisen [74].

Auf Basis dieser Datengrundlage wird CIT als Nephrotoxin diskutiert. Experimentell erhobene Ergebnisse zeigen, dass CIT in millimolaren Konzentrationen nierenschädigend wirkt und zu Polyurie und Absenkung der Urinosmolarität führt. Auf zellulärer Ebene zeigt sich dies in morphologischen Veränderungen und Zytotoxizität [75-77]. In Hinsicht auf die tatsächlichen CIT-Konzentrationen im Körper scheint es - isoliert betrachtet - ein eher geringes toxisches Potential zu besitzen. Nichtsdestotrotz könnte es mit anderen Mykotoxinen wie OTA interagieren und somit ein Gesundheitsrisiko darstellen. So haben Experimente mit Beaglen gezeigt, dass OTA (nM) und CIT (μM) synergistische Effekte auf die Na^+/K^+ -ATPase, Nicotinamadenindinukleotid (NADH)-cytochrom c Reduktase und Cytochromoxidase C in der Niere haben [78]. Des Weiteren konnte in Zellkulturversuchen gezeigt werden, dass OTA und CIT sich synergistisch auf die Zytotoxizität und die Entstehung oxidativen Stresses auswirken [79]. Diese Effekte wurden für CIT in mikro- bis millimolaren Konzentrationen beschrieben und weisen darauf hin, dass CIT die nephrotoxischen Effekte von OTA erhöht, aber für eine ausreichende Einschätzung des Risikos dieser Interaktion wäre es zielführend, niedrigere, im Körper zu erwartende Konzentrationen zu verwenden.

1.3. Nephropathie

20% der Patienten im Krankenhaus leiden unter einer akuten Nierenfunktionsstörung (AKI) und die Tendenz ist steigend [80]. AKI bezeichnet Krankheitsbilder, bei denen sich die Nierenfunktion binnen kurzer Zeit (7 Tage) verschlechtert. Häufige Ursachen sind Sepsis, Ischämie und nephrotoxische Substanzen. Während einer AKI kommt es zu strukturellen und funktionellen Veränderungen des Glomerulus und des Tubulussystems. Dies kann sich z.B. in Poly- oder Anurie zeigen [81]. Des Weiteren verdoppelt sich mit jeder AKI das Risiko, eine chronische Nierenerkrankung (CKD) zu erleiden [80, 82]. Eine AKI kann in eine CKD übergehen [80]. Als CKD werden Störungen der Nierenfunktionen bezeichnet, die seit mindestens 3 Monaten bestehen. Sie beinhalten unter anderen Störungen des Wassers und Elektrolythaushalts, der pH-Homöostase, Anämien und Osteopathien [83]. In der Endphase der CKD ist die Schädigung der Nieren so weit fortgeschritten, dass Patienten dialysepflichtig werden, was die Lebensqualität stark einschränkt, die Mortalität erhöht und mit enormen Kosten für das Gesundheitswesen einhergeht [84]. Oftmals birgt der Lebensstil

Risikofaktoren, eine CKD zu entwickeln. So erhöhen Adipositas, Diabetes mellitus und Hypertonie das Risiko, eine CKD zu entwickeln. Diese Risikofaktoren treten aber vorrangig in Industrieländern auf, in denen der Lebensstandard hoch ist. Erstaunlicherweise steigen aber auch in Entwicklungsländern die CKD Fallzahlen, die Gründe hierfür sind jedoch unklar. In 50% der CKD ist die Ursache unbekannt. Verschiedene Faktoren werden hierbei diskutiert: genetische Disposition, Umwelttoxine wie z.B. OTA oder CIT oder auch *single nucleotide polymorphisms* (SNP) [85-87]. Abbildung 3 zeigt schematisch wichtige Schritte die zur Entstehung einer CKD führen können. In der Pathogenese von CKD spielen Inflammation, Epithelial-zu-Mesenchymaler-Transition (EMT), Fibrose und morphologische Änderungen der Epithelzellen eine große Rolle [85]. Oftmals finden sich die Schäden vornehmlich in und um Zellen des proximalen Tubulus. Gründe dafür können die Transporterdichte, gepaart mit der hohen Durchblutung sein. Dadurch sind Zellen des proximalen Tubulus im Rahmen der Exkretionsfunktion mit potentiell schädlichen Substanzen konfrontiert [85]. In geschädigten Nieren gehen tubuläre Epithelzellen in einen G2/M-Zellzyklusarrest, um ihr Überleben zu sichern [82, 88]. Es folgt im Rahmen der EMT ein Verlust des Bürstensaums und der apikalen Mitochondrien, von Transportproteinen wie OATs und der Na⁺/K⁺-ATPase, was zusammengenommen eine verminderte Transportkapazität zur Folge hat. Die Zusammensetzung des Zytoskeletts wird verändert: u.a. wird Vimentin, ein typisches mesenchymales Protein, vermehrt exprimiert. Hierdurch kommt es zu morphologischen Veränderungen, die Zellen nehmen eine eher spindelartige Form an und verlieren ihre apikale-basolaterale Polarität. Mit voranschreitender EMT verändert sich auch die Verteilung der Adhäsionsmoleküle. So wird das epitheliale E-Cadherin und im Falle des proximalen Tubulus auch N-Cadherin entweder abgebaut oder umverteilt, was zu einer Auflösung des Zellverbands führt. Außerdem kommt es zu einer erhöhten Synthese typisch mesenchymaler Proteine wie Fibronectin oder des Uromodulin. Nach einer EMT zeigen die ehemals kubische Zellen typische Charakteristika multipotenter Stromazellen. Dies äußert sich u.a. in der Sekretion proinflammatorischer Zytokine, was zur Einwanderung von Makrophagen führt und ein inflammatorisches Milieu erzeugt [89]. Des Weiteren können durch diese löslichen Mediatoren umliegende Fibroblasten rekrutiert und zu Myofibroblasten aktiviert werden [82]. Myofibroblasten zeichnen sich durch ihre hohe Proliferationsrate und vor allem ihr hohes sekretorisches Potential aus. Sie sezernieren extrazelluläre Matrixproteine wie Kollagene und Elastin sowie Matrix-Metallo-Proteasen (MMP) und deren Inhibitoren (TIMPS) ins Interstitium. Dies alles führt zu fibrotischen Veränderungen, dem Endpunkt einer CKD [89, 90]. Im Laufe der Zeit hat sich besonders die zelluläre Kommunikation zwischen tubulären Epithelzellen und Fibroblasten als Schlüsselereignis in der Entstehung der tubulo-interstitiellen Fibrose ergeben [91]. Da bei dieser Art der interzellulären Kommunikation längere Distanzen überwunden werden müssen, wird sie durch lösliche Mediatoren wie

Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-6, Prostaglandine (PGs) oder auch Exosomen ausgeübt [92-94]. In Exosomen können sich Proteine, Rezeptoren, mRNAs oder mikroRNAs (miRs) befinden. Die Zusammensetzung von Exosomen weicht von der Zusammensetzung des Zytosols der Wirtszelle ab und wahrscheinlich handelt es sich um gezielt ausgesandte Mediatoren die von Epithelzellen genutzt werden um umliegende Zellen wie Fibroblasten und Makrophagen zu beeinflussen [95-97] .

1.4. MikroRNAs (miRs)

MikroRNAs sind Oligonukleotide mit einer Basenlänge von 19-23 bp, die hochkonserviert in so gut wie allen Lebewesen vorkommen [98]. Sie bilden einen Teil des zytosolisch vorkommenden „RNA-induced silencing complex“ (RISC), der an mRNA bindet und deren Translation reguliert. Hieraus wird ersichtlich, dass die Funktion von miRs die posttranskriptionelle Regulation ist. Welche mRNAs dabei Ziele der miRs sind, hängt von der sogenannten Seedregion der miRs ab. Die Seedregion beschreibt eine Folge von in der Regel 7 Basen, von denen eine bestimmte zwingend komplementär sein muss, damit eine mRNA als Zielstruktur erkannt werden kann. Jede weitere komplementäre Base verstärkt die Bindung des RISCs. Unabhängig vom Grad der Komplementarität führt die Bindung des RISC an eine Zielstruktur zu deren verminderter Expression. Dabei sind Mechanismen wie RNA-Degradation, Decapping, Deadenylierung, Verminderung der Ribosomenbelegung und Fernhalten der mRNA von der Translationsmaschinerie möglich. Eine zweite Möglichkeit der Interaktion der miRs ist die Bindung mehrerer miRs an eine Zielstruktur. Die Wirkung von miRs ist abhängig vom Mikromilieu [98]. Wenn sich dieses im Verlaufe einer Krankheitsentstehung wie z.B. bei der CKD verändert, kann auch die Expression von miRs verändert sein.

Beispielsweise wird die Expression von miR-21 in einem inflammatorischen Milieu erhöht, welche durch Hemmung von Signalwegen wie NF- κ B der Entzündung entgegenwirkt [99]. Darüber hinaus können auch durch SNPs die Bindung von miRs an Zielstrukturen verändert werden. So entsteht für bestimmte Krankheiten ein spezifisches miR-Muster. Aus diesem Grund können miRs z.B. in der Onkologie aber auch in der Nephrologie als Biomarker für bestimmte Krankheiten genutzt werden. Da die Gewinnung intrazellulärer miRs ein invasiver und aufwendiger Eingriff wäre, wäre dies im Klinikalltag nicht praktikabel. Allerdings hat sich herausgestellt, dass miRs auch außerhalb der Zelle im Blutplasma, Urin, Galle, Speichel etc. vorkommen können und somit die Probengewinnung erleichtert wird. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass auch hier für bestimmte Krankheiten wie z.B. CKD miR-Muster erkennbar sind und somit sezernierte miRs als Biomarker genutzt werden können. Die sezernierten miRs können in Exosomen verpackt oder auch Proteine wie z.B. Ago gebunden vorkommen. Dabei ist festzuhalten, dass es sich um teilweise spezifisch sezernierte miRs handelt.

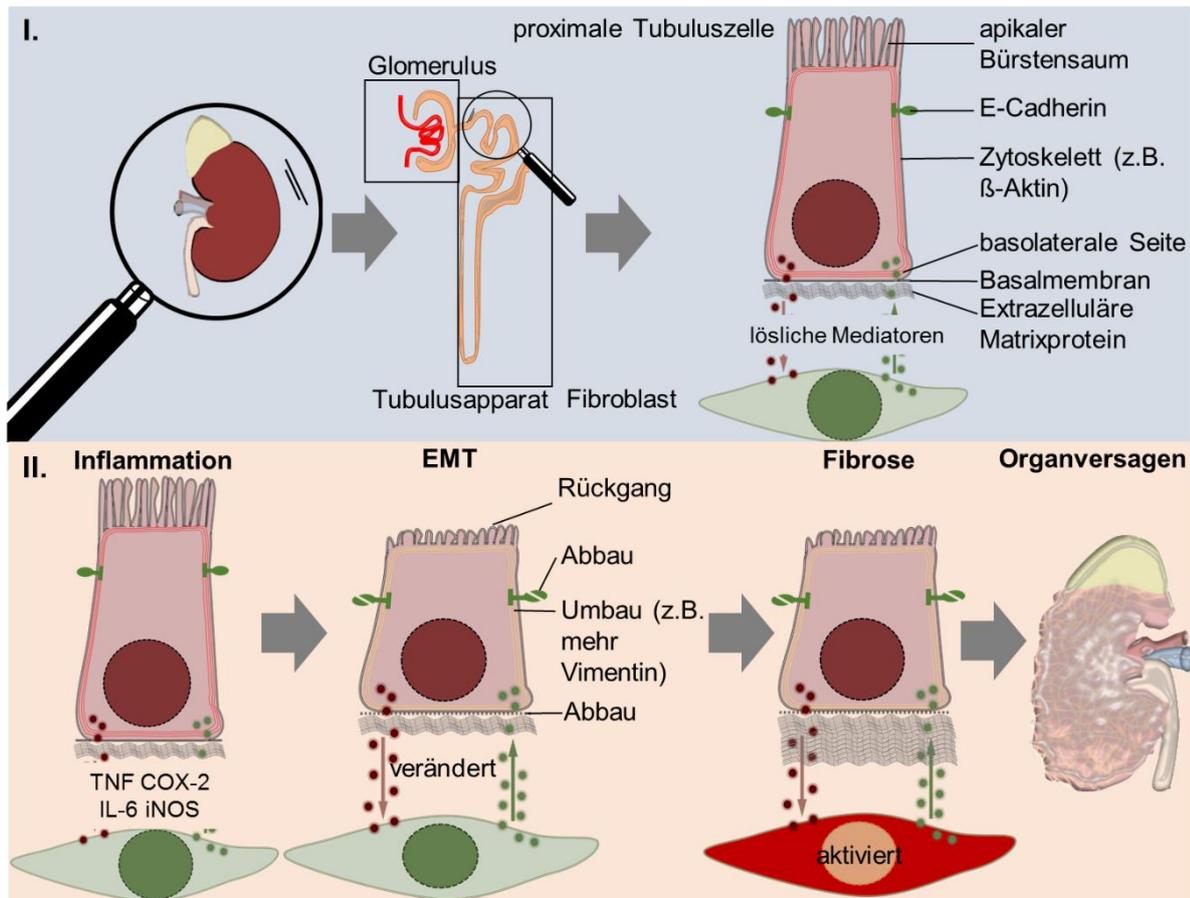


Abbildung 3: Aufbau der Epithelzellen des proximalen Tubulus und Veränderungen im Verlauf einer Nephropathie

Abschnitt I: Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das aus dem Glomerulus und dem Tubulusapparat besteht. Der Tubulusapparat ist in verschiedene Sektionen unterteilt, von denen vermutlich der proximale Tubulus eine Schlüsselrolle bei der Entstehung chronischer Nierenerkrankungen innehat. Epithelzellen des proximalen Tubulus verfügen über eine lange Bürstensaummembran, die ihnen einen Massentransport von Substanzen aus dem Primärharn in das Blut erleichtern. Ihre klassische isoprismatische Form erhalten die Tubuluszellen durch die Ausrichtung des Zytoskelettes, das von Mikrotubuli, β -Aktin und Intermediärfilamenten gebildet wird. Typisch für Epithelzellen sind auch die Polarität und die feste Integration an der Basalmembran, deren Hauptbestandteil Kollagen IV ist. Proximale Tubuluszellen stehen in ständiger Interaktion mit umliegenden Fibroblasten. Diese Kommunikation wird von löslichen Mediatoren vermittelt.

Abschnitt II: Die Pathogenese einer chronischen Nierenerkrankung ist oftmals durch Inflammation, EMT, Fibrose und letztendlich Organversagen gekennzeichnet. Nach Einwirkung eines zellulären Stressors reagieren Tubuluszellen oftmals mit der vermehrten Synthese proinflammatorischer Zytokine sowie proinflammatorisch wirkender Enzyme. Außerdem können gestresste Epithelzellen eine EMT durchlaufen, an deren Ende zum einen der Verlust epithelialer Merkmale wie der isoprismatischen Form, zellulärer Polarität, Adhäsionsmolekülen wie E-Cadherin und der spezifischen Funktionen steht. Zum anderen sind die Zellen robuster gegenüber Stress und verändern die Sekretion verschiedener Proteine und damit auch die Zusammensetzung löslicher Mediatoren. Dies kann dazu führen, dass umliegende Fibroblasten aktiviert werden, was ihre Proliferationsrate und die Sekretion von Zytokinen und Matrixproteinen erhöht. Dadurch kann es im Extrazellulärraum zur Akkumulation von Matrixproteinen und damit zur Entstehung einer Fibrose kommen. Am Ende dieses Prozesses steht das Nierenversagen.

Somit zeigt sich, dass extrazelluläre miRs für die Zell-Zell-Kommunikation genutzt werden können [100]. Die miRs-21, -29b -200a haben die Gemeinsamkeit, dass sie im Verlauf der Pathogenese einer Nephropathie und nach OTA-Inkubation in veränderten Konzentrationen vorliegen.

1.4.1. MiR-21

MiR-21 kommt ubiquitär vor und ist auf dem Chromosomabschnitt 17q23.2 kodiert [101]. Unter physiologischen Bedingungen ist sie an der Homöostase von Matrixproteinen, Proliferation und Stressantwort von Epithelzellen und Fibroblasten beteiligt. MiR-21 war die erste miR, die im Blutplasma als Biomarker für ein diffuses großes B-Zell-Lymphom identifiziert wurde [98]. Eine erhöhte Konzentration von miR-21 scheint die Entstehung von Fibrose, unter Beteiligung verschiedener Signalwege zu begünstigen [102]. Möglicherweise hemmt miR-21 die Matrix-Metallo-Peptidase-9 in der Niere und begünstigt dadurch die Entstehung einer Fibrose. Außerdem kann miR-21 das Protein smad7 hemmen. Smad7 hemmt den TGF- β Signalweg (TGF- β : *transforming growth factor*- β) und wirkt somit antifibrotisch, sodass seine Hemmung durch miR-21 eine Nierenfibrose nach sich zöge [102]. Darüber hinaus scheint auch die Phosphatase PTEN von miR-21 gehemmt zu werden, was die Entstehung einer EMT begünstigte. Außerdem induziert sie die Aktivität des ERK1/2 Signalwegs und kann antiinflammatorisch durch Hemmung vom NF- κ B wirken [101, 103-106]. Es wurde auch beschrieben, dass geschädigte Epithelzellen des proximalen Tubulus miR-21 sezernieren und diese dann von umliegenden Fibroblasten aufgenommen wird [107]. Des Weiteren zeigte sich, dass eine Überexpression von miR-21 in Gewebsfibroblasten teilweise über den ERK1/2 Weg zu deren Aktivierung führt [108-110].

1.4.2. MiR-29b

Zur Familie der miR-29 gehören miR-29a, -29b und -29c. Aufgrund einer identischen Seedregion haben die Mitglieder der miR-29 Familie ähnliche Funktionen. Die Einflüsse der miR-29b auf den Phänotyp verschiedener Zelltypen sind bisher am besten beschrieben. So reguliert miR-29b die Homöostase der Chondrogenese, fördert die Differenzierung multipotenter Stammzellen, moduliert das adaptive Immunsystem und beeinflusst die Tumorgenese, im Speziellen die Metastasierung [111-114]. Am besten beschrieben ist jedoch der antifibrotische Effekt der miR-29b. Eine erhöhte Expression von miR-29b mindert beispielsweise das fibrotische Potential kardialer Fibroblasten [115, 116], wohingegen eine verminderte Expression von miR-29b das Auftreten von Fibrosen in Lunge, Niere und Leber erhöht. Maßgeblich für diesen Effekt ist der Einfluss aktivierter Fibroblasten, die eine erhöhte TGF- β -Aktivität aufweisen. Dies hemmt miR-29b und fördert somit die Expression seiner Zielstrukturen wie z.B. Kollagene, Elastin und Fibrillin [117]. Des Weiteren wird die Expression von miR-29b abhängig von Angiotensin II in Zellen des proximalen Tubulus

vermindert was die die Entstehung einer EMT fördert [118]. Schließlich konnte ermittelt werden, dass OTA in embryonalen Nierenzellen die Aktivität von miR-29b hemmt und dadurch sein fibrotisches Potential entfaltet [119].

1.4.3. miR-200a

MiR-200a gehört neben miR-200b, -200c, -141 und -429 zur miR-200 Familie. MiR-200a findet sich in einem Cluster auf dem Chromosom 1. Sie ist vornehmlich in Epithelzellen exprimiert, während sie in mesenchymalen Zellen wie Fibroblasten nicht nachweisbar ist. MiR-200a reguliert die Expression typisch epithelialer Proteine wie ZEB 1 und 2, E-Cadherin und Claudin-3, wodurch letztendlich die Zellpolarität moduliert wird [120]. Ein Tierversuch mit Ratten zeigte, dass Nachkommen von Tieren, die eine Diät mit wenig Protein bekamen, Nierenschäden erleiden. Diese beschränkten sich auf den Glomerulus und beinhalteten Proteinurie sowie morphologische Veränderungen der Glomeruli. In diesem Zusammenhang wurden in Zellen der Glomeruli erhöhte Konzentrationen von TGF- β gemessen, was zu einer verminderten Konzentration der Mitglieder der miR-200 Familie führte und letztendlich in einer Fibrose endete [121]. Untersuchungen am Menschen haben aber gezeigt, dass die höchsten Konzentrationen an miR-200a in Zellen des proximalen Tubulus zu finden sind und nicht im Glomerulus [122]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass miR-200a in einem AKI Modell intrarenal in erhöhten Konzentrationen vorliegt. Außerdem kann sie im Plasma und im Urin als Biomarker für Nierenschäden genutzt werden, wobei die Konzentrationen im Urin sensitiver zu sein scheinen [122]. Messungen in Nierenproben aus Patienten mit hypertensiver Nephrosklerose, einem Endpunkt der CKD, haben ergeben, dass die Menge an miR-200a im Vergleich zu Gesunden erhöht ist. Außerdem gab es positive Korrelationen zwischen einer erhöhten Konzentration von miR-200a und verminderter Expression des ZEB2 (*Zincfinger E-Box binding homeobox*) und damit des E-Cadherins sowie erhöhte Gehalte an Fibronectin [123].

1.5. Cyclooxygenase-2 (COX-2)

COX-2 ist ein induzierbares Enzym, das aus freien Arachidonsäuren verschiedene Metabolite synthetisiert, die als klassische lösliche Mediatoren gelten. Funktionell und quantitativ am wichtigsten sind die Prostaglandine (PG) E₂, F₂ und I₂. Ihre Signaltransduktion an den Zielzellen erfolgt über membranständige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Klassischerweise wird COX-2 durch verschiedene Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Endotoxinen induziert und vermittelt Fieber, Schmerz und Entzündungsreaktionen. Darüber hinaus spielt COX-2 in der Niere eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Glomerulus und Tubuluszellen und in der Aufrechterhaltung physiologischer Funktionen [124]. COX-2 reguliert in der Niere den vaskulären Druck, den

Salz- und Wasserhaushalt und den tubulo-glomerulären Feedbackmechanismus [125]. Kommt es in der Niere zur Erhöhung des Blutdrucks, führt dies über Aktivierung des MAPK-Wegs zu einer erhöhten COX-2 Aktivität und damit zu einer vermehrten Ausschüttung von PG, die vornehmlich vasodilatorisch wirken und damit dem erhöhten Blutdruck entgegenwirken [125, 126]. Die Zellen der Macula densa im distalen Tubulus stellen eine Messstelle für die NaCl Filtration bzw. Ausscheidung dar. Die Ausstattung mit einem Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Kotransporter ist entscheidend für diese Funktion und wird durch COX-2 moduliert. Fällt der extrazelluläre Chlorid-Spiegel ab, steigt die COX-2 Aktivität in Macula Densa Zellen und wirkt sich auf den Natrium/Kalium/Kalzium-Kotransporter 2 (NKCC2) aus [127]. Außerdem wirkt sich die COX-2 Aktivität auf das Sammelrohr aus und reguliert damit die Wasser- und Kochsalzausscheidung [126, 128]. Bei dieser vielfältigen Beteiligung an physiologischen Funktionen in der Niere ist es nicht verwunderlich, dass Störungen der COX-2 in der Niere pathophysiologische Veränderungen nach sich ziehen. Wird die COX-2-Aktivität gehemmt, können auf Grund der verminderten Wasserausscheidung Ödeme entstehen [128]. Im Rahmen einer obstruktiven Nierenerkrankung kann eine erhöhte COX-2 Aktivität Entzündungsprozesse vermitteln und ist auch mit der Entwicklung einer interstitiellen Fibrose assoziiert. Bei der Entstehung der Fibrose sezernieren Tubuluszellen COX-2 Metabolite, die über den MAPK-Weg umliegende interstitielle Zellen wie Fibroblasten beeinflussen und somit die Akkumulation von Matrixproteinen unterstützen [129]. Darüber hinaus vermitteln PGs die zelluläre Kommunikation zwischen Makrophagen und Tubuluszellen, was ihre Bedeutung als lösliche Mediatoren unterstreicht [125, 127, 130].

1.6. MAPK Weg

Bisher wurden sezernierte Substanzen als mögliche Kandidaten der zellulären Kommunikation beschrieben. Weitergehend stellt sich die Frage, wie die Zellen ankommende Signale verarbeiten. Durch den bereits erwähnten MAPK-Weg erkennen und reagieren Zellen auf extrazelluläre Stimuli (Abbildung 4). Daher stellt dieser Signalweg einen möglichen Ansatzpunkt für die Vermittlung zellulärer Kommunikation dar. Vertreter des MAPK-Wegs sind die ERK1/2, c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und p38-MAPK. Im Groben wird nach Bindung des extrazellulären Stimulus eine Kaskade aktiviert, die letztendlich zur Phosphorylierung von MAPK führt und diese damit aktiviert. Die MAPK ihrerseits phosphorylieren ihre Zielstruktur z.B. Transkriptionsfaktoren, Enzyme oder das Zytoskelett und bewirken eine zelluläre Antwort auf den extrazellulären Stimulus. Beendet wird diese Kaskade u.a. mit Hilfe von Phosphatasen, welche die MAPK dephosphorylieren und damit inaktivieren.

1.6.1. ERK1/2

Die Proteine ERK1/2 haben eine molekulare Größe von 42/44 kDa, ihre Gene sind auf den Chromosomen 16q11 und 22q11 lokalisiert und sie haben eine 83%ige Übereinstimmung in ihrer Aminosäuresequenz. Sie kommen ubiquitär im Körper vor, wobei ERK2 quantitativ überwiegt. Die Kinasen haben zu 100% gleiche katalytisch aktive Zentren und gelten somit als funktionell gleichwertig [131]. Adäquate Stimuli, die zur ERK1/2-Aktivierung führen, sind mitogene Wachstumsfaktoren, Mikrotubulidepolarisierung, Zytokine, osmotischer Stress aber auch OTA und CIT. Trotz gleicher Endstrecke können Stimuli diskriminiert werden z.B. durch spezifische Substratbindungsdomänen auf den Kinasen [132]. Entscheidend für die intrazelluläre Integration extrazellulärer Signale sind Gerüstproteine. Beispiele hierfür sind β -Arrestin, MEK-partner 1 und 2 und Kinase Repressor von Ras (KSR). Sie modulieren Reaktionen auf einen Stimulus, indem sie die räumliche Lokalisation verschiedener Reaktionspartner bestimmen. Außerdem beeinflussen sie die Kinetik der Kinasen [133, 134]. Phosphorylierung von ERK1/2 führt zu Konformationsänderungen, die einen Anstieg des katalytischen Potentials nach sich ziehen. Im Rahmen dessen entstehen Wasserstoffbrückenbindungen in der Substratbindungsseite, P-Tyr wird an die Oberfläche gebracht und formt eine katalytische Tasche für Substrate. ERK1/2 Substrate kommen zu 50% im Zellkern und zu 50 % extrazellulär vor. ERK1/2-Substrate im Zellkern sind zum Beispiel Transkriptionsfaktoren wie Elk1 und c-Fos. Die Substrate im Zytosol sind vielfältiger z.B. Enzyme wie Phospholipase A2, Gerüstproteine wie Paxillin, Vinexin oder Calnexin, Rezeptoren oder Apoptoseeffektorproteine [134]. ERK1/2 moduliert eine Vielzahl von Prozessen, die für das Zellüberleben entscheidend sind z.B. Apoptose, Proliferation und Differenzierung. Es ist nicht verwunderlich, dass eine Dysfunktion von ERK1/2 die Pathogenese vieler Krankheiten unterstützt. Beispiele hierfür sind Kanzerogenese aber auch wie in Abschnitt 1.3. beschriebene nephropathische Veränderungen, ausgelöst durch beispielsweise OTA, Zink oder Celecoxib [135].

1.6.2. JNK1/2

Die Familienmitglieder der JNK werden von 3 Genen codiert. Die Kinasen haben eine Größe von 46-55 kDa und sind zu 85% identisch. Sie werden ubiquitär exprimiert. Aktiviert werden sie durch MEK4/7, beide können synergistisch wirken [131].

Adäquate Stimuli sind inflammatorische Zytokine, Umweltstress, Hitzeschock, UV-Strahlen, Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress oder DNA-Schäden. Die JNK vermitteln Prozesse, die auch während der Pathogenese von Nephropathien entscheidend sind wie z.B. Inflammation, Apoptose, Aktinreorganisation, Transformation, Insulinempfindlichkeit, Proliferation und Zelldifferenzierung [131, 133].

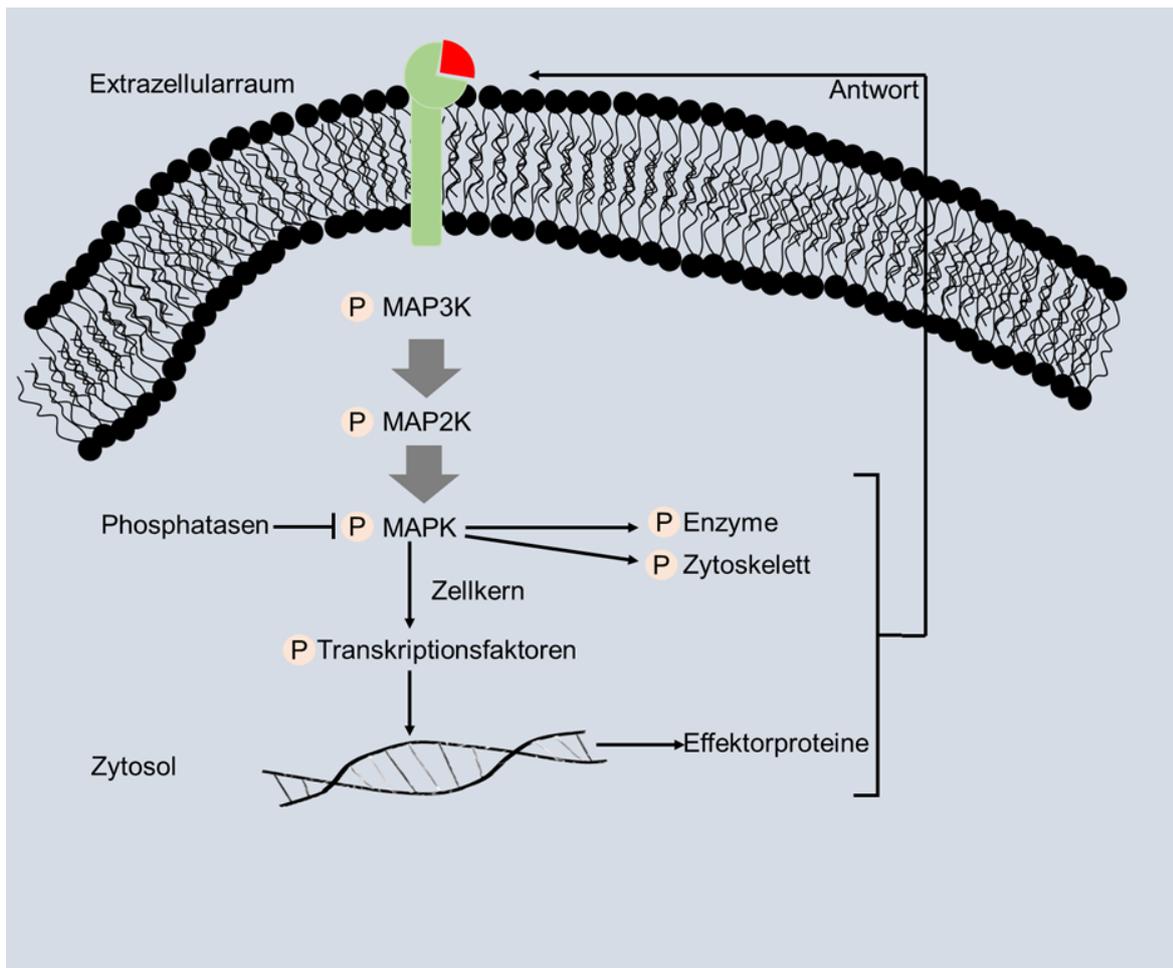


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Signalvermittlung im MAPK-Weg.

Nach Bindung eines extrazellulären Stimulus an seinen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellmembran wird eine Signalkaskade aktiviert. Diese beinhaltet eine Reihe von Phosphorylierungen, deren Ziel letztendlich die Aktivierung von MAPK ist. Aktive MAPK phosphoryliert ihre Zielstrukturen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Enzyme oder Bestandteile des Zytoskelettes, wodurch eine zelluläre Antwort auf den eingangs wirkenden extrazellulären Stimulus bewirkt wird. Dieser Vorgang wird durch das Einwirken von Phosphatasen auf pMAPK beendet.

1.6.3. p38-MAPK

Die p38-MAPK bestehen aus 4 Familienmitgliedern (p38 α , β , γ , δ), von denen p38 α und β ubiquitär vorkommen und durch SB203580 pharmakologisch gehemmt werden können. Die Kinasen p38 γ und δ werden gewebsspezifisch exprimiert und sprechen nicht auf die gängige pharmakologische Hemmung an.

Daraus geht hervor, dass in Inhibitionsstudien und auch in der vorliegenden Arbeit vornehmlich die Effekte von p38 α und β beschrieben werden können [133]. Im Vergleich zu den ERKs und JNKs haben die Mitglieder der p38 Familie in ihrer Aminosäuresequenz nur eine Übereinstimmung von 60%, was die Diversität der Funktionen einzelner Mitglieder untermauert.

Adäquate Reize, die zur Aktivierung von p38 führen, sind UV-Strahlung, osmotischer Stress, Hypoxie, proinflammatorische Zytokine, LPS und Umweltgifte wie Arsenit [133, 136]. Aktiviert

werden die p38-Kinasen durch MEK3/ 6. Substrate sind u.a. Caseinkinase 2, STAT1, Nuklearfaktor von aktivierten T-Zellen 1 (NFAT1), PLA₂, MMPs und der Na⁺/H⁺-Austauscher. Außerdem ist p38 als posttranskriptioneller Regulator beschrieben, der AU-reiche Bereiche auf mRNAs inflammatorischer Proteine wie TNF, COX-2, uPA, IL-3, -6, -8 stabilisiert [136]. Sind die p38 Kinasen dysreguliert, kann dies die Entstehung von Malignomen, Arthritis, neurodegenerativen Krankheiten oder Fibrosierung von Organen, charakteristisch für das Endstadium einer CKD, begünstigen [131].

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziel 1

Ziel 1 dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob sich eine simultane Inkubation mit OTA und CIT auf die Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose auswirkt. Um sich der Situation im menschlichen Körper anzunähern, sollten humane Nierenzellen aus dem proximalen Tubulus (HK-2), der Zielstruktur dieser Toxine, genutzt werden. Die HK-2 Zellen sollten für 48 h mit 10 nM OTA, 1 nM CIT oder einer Kombination aus beiden Substanzen inkubiert werden. Diese Konzentrationen können im menschlichen Körper erreicht werden. Um zu analysieren, wie sich diese Mykotoxine alleine oder in Kombination, Proteine die an der Entstehung von Inflammation, EMT oder Fibrose beteiligt sind, auswirken, wurde die Präsenz der Proteine mittels Western Blot oder ihre Menge mittels ELISA sowie die Expression der für sie kodierenden mRNA mittels RT-qPCR gemessen.

Ziel 2

Für die Niere ist bekannt, dass die Kommunikation zwischen Gewebsfibroblasten und tubulären Epithelzellen für die physiologische Funktion der Niere bedeutend ist. Außerdem kann eine Veränderung dieser Kommunikation die Entstehung nephropathischer Veränderungen begünstigen. Darum sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Wirkung von OTA durch zelluläre Kommunikation verändert wird. Für die Beantwortung dieser Fragestellung sollte ein Kokultur System genutzt werden, das mit Hilfe von Filtereinsätzen realisiert werden sollte. Unter diesen Bedingungen haben die Zellen keinen direkten Kontakt und können nur über lösliche Mediatoren miteinander interagieren. Für diese Versuche sollten Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus der Ratte (NRK-52E) und normale Fibroblasten aus der Ratte (NRK-49F) genutzt werden. Diese Zellen sollten allein in Monokultur sowie gemeinsam in Kokultur für 48 h mit 10-100 nM OTA inkubiert werden. Anschließend sollte die Präsenz von Proteinen die an der Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose beteiligt sind, mittels Western Blot und die für sie kodierende mRNA mittels RT-qPCR gemessen werden.

Darüber hinaus sollten COX-2, miRs und der MAPK-Weg als mögliche Mediatoren der zu beobachteten Effekte überprüft werden.

2. Material und Methoden

2.1. Liste der Chemikalien und Gebrauchsgegenstände

Tabelle 1 Chemikalienliste

Chemikalienname	Summenformel	Firma
Acrylamid	C ₃ H ₅ NO	Bio-Rad, München, DE
AFC	C ₁₀ H ₆ F ₃ NO ₂	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Albumin Standard	/	Pierce Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
β-Aminopropionitril	C ₃ H ₆ N ₂	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
APS	(NH ₄) ₂ S ₂ O ₈	Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE
Ascorbinsäure	C ₆ H ₈ O ₆	Merck KGaA, Darmstadt, DE
BCA	C ₂₀ H ₁₂ N ₂ O ₄	Pierce Thermo Fisher scientific, Schwerte, DE
Bis-Acrylamid	C ₇ H ₁₀ N ₂ O ₂	Bio-Rad, München, DE
Bromphenolblau	C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
BSA	/	Sigma-Aldrich, München; Deutschland
CHAPS	C ₃₂ H ₅₈ N ₂ O ₇ S	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Chloroform	CHCl ₃	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Zitronensäure-1-Hydrat	C ₆ H ₈ O ₇ x H ₂ O	Merck KGaA, Darmstadt, DE
DEVD-AFC	C ₃₀ H ₃₄ F ₃ N ₅ O	Biomol GmbH, Hamburg, DE
dATP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₂ P ₃	Peqlab, Erlangen, DE
dCTP	C ₉ H ₁₆ N ₃ O ₁₃ P ₃	Peqlab, Erlangen, DE
2 x ddPCR Supermix für Sonden (noUTP)	/	Hersteller?
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Na ₂ HPO ₄	Merck KGaA, Darmstadt, DE
dGTP	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	Peqlab, Erlangen, DE
DMSO	C ₂ H ₆ OS	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
DNase I	/	New England BioLabs, Massachusetts, USA
DNase I Puffer	/	New England BioLabs, Massachusetts, USA
DTT	C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
dTTP	C ₁₀ H ₁₇ N ₂ O ₁₄ P ₃	Peqlab, Erlangen, DE
EDTA	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
ECL-Substrat (Clarity™ Western ECL Substrate)	/	Bio-Rad, München, DE
FCS	/	Merck KGaA, Darmstadt, DE
5x First Strand Buffer	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
FITC-Dextran (10/ 70 kDa)	C ₂₀ H ₁₂ O ₅ (C ₆ H ₁₀ O ₅) _{xn}	+ Sigma-Aldrich (München; Deutschland)
Glycerin	C ₃ H ₈ O ₃	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, DE
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Invitak InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit	/	Stratec Molecular, Berlin, DE
Isopropanol	C ₃ H ₈ O	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Kaliumchlorid	KCl	SERVA Electrophoresis GmbH,

		Heidelberg, DE
Kaliumdihydrogenphosphat	KH_2PO_4	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Kalziumchlorid	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kollagen	/	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Kupfersulfat	CuSO_4	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Lipofectamin®2000	/	Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Magnesiumchloridhexahydrat	$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
β-Mercaptoethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Methanol	CH_3OH	
Molekularbiologisches Wasser	H_2O	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, DE
Natriumdihydrogenphosphat	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Natriumcarbonat	Na_2CO_3	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO_3	Merck KGaA, Darmstadt, DE
NADH	$\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_7\text{O}_{14}\text{P}_2$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
PIPES	$\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Ortho-Phenyldiamin	$\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Ponceau S-Solution	$\text{C}_{22}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_{13}\text{S}_4$	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Proteinmarker (PageRuler™ Prestained Protein Ladder)	/	Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Proteinmarker (Spectra™ Multicolor HighRange Protein Ladder)	/	Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Pyruvat	$\text{C}_3\text{H}_4\text{O}_3$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
RandomPrimer	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Reverse Transkriptase	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
RNaseOut	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
SDS	$\text{NaC}_{12}\text{H}_{25}\text{SO}_4$	Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, DE
SYBR® Green Mastermix	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
TEMED	$\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Trizma-Base	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Illinois Tool Works, Illinois, USA
Tris-Hydrochlorid	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \times \text{HCl}$	Carl Roth GmbH+CoKG, Karlsruhe, DE
Triton X	$\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O}(\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n(n=9-10)$	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, DE
Trizol Reagenz	/	Invitrogen, Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Tröpfchen erzeugendes Öl für ddPCR	/	Bio-Rad, München, DE
Trypsin	$\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_7\text{O}_{10}$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Tween-20	$\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA
Wasserstoffperoxid	H_2O_2	Sigma-Aldrich Co, St. Louis, USA

Tabelle 2 Liste der Materialien

Name	Firma
Bedarfsartikel für die Zellkultur	Corning, Massachusetts, US
	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Bioanalyzer 2100	Agilent Technology, Waldbronn, DE
Brutschrank für Zellkultur (Hera Cell 150)	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
CFX Manager™ Software	Bio-Rad, München, DE
ddPCR™ 96-Well Plates	Bio-Rad, München, DE
C1000 Touch™ Thermal Cycler with 96–Deep Well Reaction Module	Bio-Rad, München, DE
Chromatographiepapier	A. Hartenstein, Würzburg, DE
Digitales invertierendes Mikroskop (EVOSxl)	Advanced Microscopy Group, Washington, USA
DG8™ Kartuschen	Bio-Rad, München, DE
DG8™ Dichtungsgummi	Bio-Rad, München, DE
Eismaschine	ZIEGRA Eismaschinen GmbH, Isenhagen, DE
EVOM Voltohmmessgerät	World Precision Instruments (Sarasota; FL)
Filterspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, DE
Gefrierschrank (-80°C)	Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Geldokumentationsgerät	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, DE
Gelkammer	Biometra GmbH, Jena, DE
Glasplatten (f.PAGE Gele)	Bio-Rad, München, DE
Allgemeine Glasartikel	Simax (Kavalier), Prag, Tschechische Republik
	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, DE
	Jenaer Glas, Leipzig, DE
Heizblock (TS-100)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE
7900 HT Fast Real-Time PCR System	Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
ImageJ Software	Open Source Image Bildbearbeitungsprogram, entwickelt am LOCI, University of Wisconsin
8-Kanalpipette	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
	Socorex Isba S.A, Ecublens, Schweiz
Kühl-Gefrierkombination	Liebherr, Biberach an der Riß, DE
Lichtmikroskop	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE
NanoVue (Spektralphotometer + Drucker)	Thermo Fisher-Scientific, Leicestershire, UK
Nitrozellulose Blotmembran	A. Hartenstein, Würzburg, DE
Parafilm	A. Hartenstein, Würzburg, DE
pH-Meter (tragbar)	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, DE
PX1 Plattenpetschaft	Bio-Rad, München, DE
Pipetten (+Spitzen)	Eppendorf, Hamburg, DE
	Gilson (Thermo Fisher Scientific), Schwerte, DE
	Abimed, Langenfeld, DE
Pipettierhilfe	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, DE
Quantity One 1-D Analysis Software	Bio-Rad, München, DE
QX200 Droplet Generator	Bio-Rad, München, DE
QX200 Droplet Reader	Bio-Rad, München, DE
Reinstwasseranlage	Wilhelm Werner GmbH, Leverkusen, DE
Schüttler	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE

		Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE
		GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE
SDS Software v2.4		Thermo Fisher-Scientific, Schwerte, DE
Semi-Dry Blotter		Bio-Rad, München, DE (Trans-Blot® SD)
		Scie-Plas, Cambridge, UK
		Sigma-Aldrich Techware, Darmstadt, DE
		Biometra GmbH, Jena, DE
Sicherheitswerkbank Instruments Typ HSP12)	(Heraeus	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
SigmaPlot 12.5		Systat Software GmbH, Erkrath
Stepper Pipette		Eppendorf, Hamburg, DE (Multiply® M4)
		Eppendorf, Hamburg, DE (Multiply® plus)
		Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, DE
Stromanschluss für Gelkammern/ Semi-Dry Blotter (Consort E835)		Sigma-Aldrich/ Merck, München, DE
Thermocycler		Biometra GmbH, Jena, DE
Tisch-Folienschweißgerät GEHOES.300.1)	(Typ:	GEHO PACK Service GmbH, Heidgraben, DE
Versiegelungsfolien (Microseals®)		Bio-Rad, München, DE
Vortexer		IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE (VF2)
		IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE (MS2 Minishaker)
		Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, DE (REAX 2000)
		IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, DE (MS3 – für Bioanalyser Chips))
Waage		Gottl. Kern&Sohn, Albstadt, DE (Kern 510)
		Sartorius AG, Göttingen, DE (BL 1500S)
		Gottl. Kern&Sohn, Albstadt, DE (ABT 100-5NM))
Wasserbad (aufheizbar)		Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE (DC10)
		GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, DE (1086)
Zentrifugen		Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, DE (Tischzentrifuge)
		Eppendorf, Hamburg, DE (ohne Kühlung)
		Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE (mit Kühlung)
		Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE (Heraeus, ohne Kühlung)
		Thermo Fisher Scientific (Heraeus™ Biofuge™ Stratos™ Zentrifuge mit Kühlung)
		Heathrow Scientific, Illinois, USA (SPROUT® MINI CENTRIFUGE)
		Peqlab, Erlangen, DE (für 96-Well/ 384-Well Platten)

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zusammensetzung der Zellkulturmedien

Tabelle 3 Zusammensetzung DMEM/ HAM's F-12

Substanz	Konzentration (mg/l)
NaCl	6999,5
KCl	311,8
CaCl ₂	116,6
MgSO ₄ ×7H ₂ O	100,0
MgCl ₂ ×6H ₂ O	61,0
NaH ₂ PO ₄ ×H ₂ O	62,5
Na ₂ HPO ₄	71,0
Fe(NO ₃) ₃ ×9H ₂ O	0,05
FeSO ₄ ×7H ₂ O	0,4
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0,001
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,4
D-Glucose	3151,0
NaHCO ₃	2438,0
Na-Pyruvat	55,0
Phenolrot	12,5
L-Alanin	4,5
L-Arginin-HCl	147,5
L-Asparagin×H ₂ O	7,5
L-Asparaginsäure	6,7
L-Cystin	24,0
L-Cystein-HCl	15,8
L-Glutamin	365,3
L-Glutaminsäure	7,4
L-Prolin	17,3
L-Histidin×HCl×H ₂ O	31,5
L-Isoleucin	54,5
L-Leucin	59,0
L-Lysin-HCl	91,3
L-Methionin	17,2
L-Phenylalanin	35,5
L-Threonin	53,5
L-Tryptophan	,0
L-Tyrosin	38,7
L-Valin	52,9
Glycin	18,8
L-Serin	26,3
Cholinchlorid	9,0
α-Biotin	0,004
Folsäure	2,7
Myo-Inositol	7,2
Nicotinamid	4,0
D-Ca-Pantothenat	2,2
Pyridoxal×HCl	2,0
Pyridoxin-HCl	0,03
Riboflavin	0,2
Thiamin×HCl	2,2
Cobalamin	0,7
Hypoxanthin	2,1
Thymidin	0,4

Liponsäure	0,1
Linolsäure	0,04
Putrescin×2HCl	0,08

Tabelle 4 Zusammensetzung DMEM

Substanz	Konzentration (mg/l)
NaCl	6400,0
KCl	400,0
CaCl₂	200,0
MgSO₄ x 7H₂O	200,0
NaH₂PO₄	124,0
D-Glucose	1000,0
Fe(NO₃)₃×9H₂O	0,1
Na-Pyruvat	110,0
Phenolrot	15,0
NaHCO₃	3700,0
L-Arginin-HCl	84,0
L-Cystin	48,0
L-Glutamin	580,0
L-	42,0
Histidin×HCl×H₂O	
L-Isoleucin	105,0
L-Leucin	105,0
L-Lysin-HCl	146,0
L-Methionin	30,0
L-Phenylalanin	66,0
L-Threonin	95,0
L-Tryptophan	16,0
L-Tyrosin	72,0
L-Valin	94,0
Glycin	30,0
L-Serin	42,0
Cholinchlorid	4,0
Folsäure	4,0
Myo-Inositol	7,2
Nicotinamid	4,0
D-Ca-Pantothenat	4,0
Pyridoxal×HCl	4,0
Riboflavin	0,4
Thiamin×HCl	4,0

2.2.2. Zelllinien und deren Kultivierung

Tabelle 5 Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Hersteller	Zellkulturmedium
HK-2	Humane Nierenepithelzellen des proximalen Tubulus	ATCC, Manassas, VA, USA	DMEM/HAM's F-12
NRK-52E	Ratten Nierenepithelzellen des proximalen Tubulus	ATCC, Manassas, VA, USA	DMEM
NRK-49F	Gewebsfibroblasten aus der Ratte	ATCC, Manassas, VA, USA	DMEM

Alle in Tabelle 5 aufgelisteten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Petrischalen aus Kunststoff (100x20 mm) kultiviert. Dem Medium wurde vor der ersten Nutzung 10 % fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt. FCS enthält unter anderem Wachstumsfaktoren, Vitamine, Hormone und Zytokine, die ein optimales Wachstum der Zellen gewährleisten. Die Subkultivierung erfolgte bei HK-2 und NRK-52E Zellen nach Erreichen der Konfluenz (in der Regel nach 7 Tagen). Die Subkultivierung bei NRK-49F hingegen wurde durchgeführt, wenn die Zellschicht noch subkonfluent war, um eine Differenzierung der Zellen zu vermeiden.

Bei den vorliegenden Zelllinien handelt es sich um adhärenente Zellen, daher ist ein Ablösen von der Petrischale bei Subkultivierung nötig. Dafür wurde das Medium entfernt, anschließend wurden die Zellen mit 6 ml des Komplexbildners EDTA inkubiert, um für Zell-Zell-Kontakte essentielle Ca⁺⁺-Ionen zu binden. Nach Entfernen der EDTA-Lösung folgte die Zugabe von 1 ml Trypsin, um die Zellen endgültig vom Gefäß zu lösen. Zu guter Letzt wurden die abgelösten Zellen in 10 ml serumhaltigem Medium aufgenommen (Stammlösung) und entweder in 100x20 mm großen Petrischalen (Stammschale) weiter kultiviert oder für experimentelle Ansätze auf entsprechende Gefäße überführt (Tabelle 6).

Tabelle 6 Kultivierung der Zelllinien

	Stamm lösung/ Stamm schale	Medium wechsel/ Woche	Subkulti vierung/ Woche	Stamm lösung /Well (24-Well Platte)	Stamm lösung /Well (6-Well Platte)	Stamm lösung / Filter insert
HK-2	1 ml	2 x	1-2 x	½ Tropfen	3 Tropfen	/
NRK- 52E	1 ml	1 x	1 x	1 Tropfen	/	1 ml
NRK- 49F	1 Tropfen	1 x	1-2 x	½ Tropfen	1 Tropfen	/

2.3. Experimentelle Ansätze

Prinzipiell erfolgte, bevor die Zellen inkubiert wurden, ein 24-stündiger Serumentzug, um die Zellen zu synchronisieren und unkontrollierte Wirkungen der eingangs genannten Serumbestandteile auf die Zellen zu minimieren.

HK-2 Zellen wurden für 24 h oder 48 h inkubiert. Die insgesamt 4 experimentellen Gruppen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7 Inkubation der HK-2 Zellen

1. Kontrollgruppe	2. OTA	3. CIT	4. Kombination
ohne Behandlung/ Lösungsmittel der Stimulantien	10 nM (Erfahrungswert)	1-10000 nM	10 nM OTA + 1 nM CIT

Nach der Inkubation wurden die Zellen fotografiert und ausgemessen oder für weitere Experimente lysiert und aufgearbeitet.

NRK-49F/NRK-52E Zellen wurden für 24 h oder 48 h mit 10-1000 nM OTA behandelt.

NRK-49F Zellen wurden für die Versuche auf dem Boden von 6 Well Platten in 4 ml Medium ausgesät. NRK-52E Zellen wurden auf Kunststofffiltern für 6-Well Platten kultiviert. Dafür wurden in die Kavitäten 2,5 ml Medium vorgelegt. Anschließend wurden die Filter eingesetzt und auf die Filtermembran die Zellen nebst 0,5 ml Medium gegeben. Die Seite unter dem Filter wird im Folgenden als „basolateral“ und die Seite über dem Filter als „apikal“ bezeichnet.

Nach Erreichen der gewünschten Zelldichte wurde das serumreiche durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen entweder als Monokultur allein oder als Kokultur zusammen weiterverwendet. Zur Umsetzung der Kokultur, wurde der mit Epithelzellen bewachsene Filter in die mit Fibroblasten bewachsene 6-Well-Platte gesetzt. Die Zellen haben unter diesen Umständen keinen direkten Kontakt (Abbildung 5). Sie wurden unter anderem mit den in Tabelle 8 aufgeführten Inhibitoren behandelt.

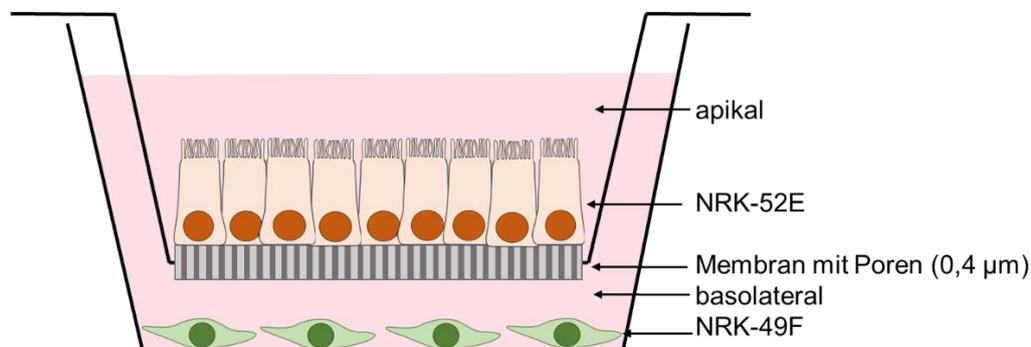


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Kokultur

Tabelle 8 Verwendete Inhibitoren

Substanz	Zielstruktur	Konzentration	Firma
U0126	MEK1/2	10 μ M	Merck KGaA, Darmstadt, GER
SP600125	JNK1/2	10 μ M	Merck KGaA, Darmstadt, GER
SB203580	p38	10 μ M	Merck KGaA, Darmstadt, GER
SC-58125	COX-2	1 μ M	Biomol GmbH, Hamburg, GER
N-(2-phenylethyl)-Indomethacinamid	COX-2	1 μ M	Biomol GmbH, Hamburg, GER
RNO-MIR-21-5P	miR-21	25 nM	Qiagen®, Düsseldorf, GER
RNO-MIR-200a-3P	miR-200a	25 nM	Qiagen®, Düsseldorf, GER
Negativkontrolle A	unspezifisch	25 nM	Qiagen®, Düsseldorf, GER

2.4. Lipofektion

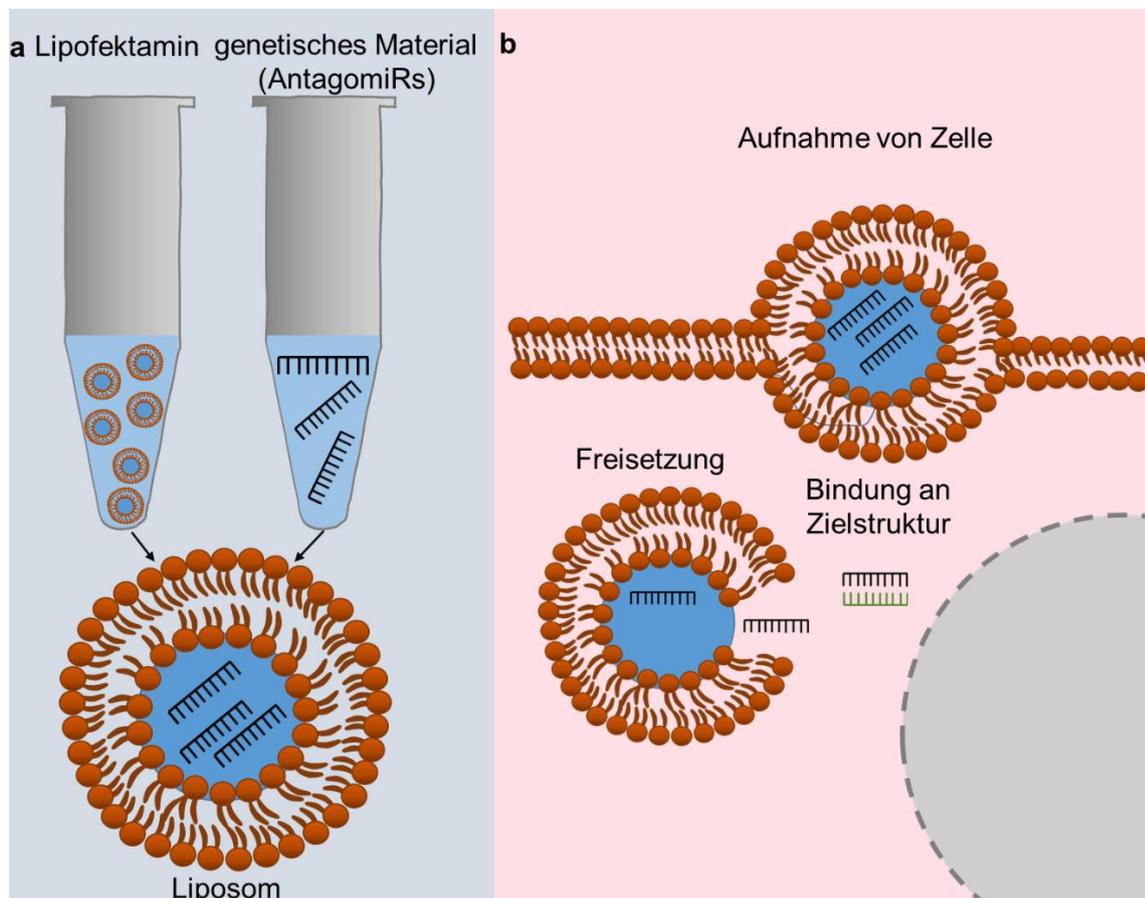


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Lipofektion.

a) Das Lipofektamin 2000 Reagenz und das genetische Material (AntagomiRs) werden separat in Zellkulturmedium gegeben und anschließend gemischt. Auf diese Weise entstehen Liposomen, welche das genetische Material enthalten.

b) Die Liposomen sind membrangängig und werden von der Zelle ins Zytosol aufgenommen. Dort geben die Liposomen das genetische Material (die AntagomiRs) ab. Diese binden dann an ihre Zielstruktur und vermindern ihre Verfügbarkeit und damit ihre Aktivität.

Die Zellen wurden so 24 h inkubiert. Anschließend wurden sie für weitere 48 h mit OTA inkubiert.

Die Lipofektion beschreibt eine transiente Transfektion, deren Ziel es ist, Fremd-DNA oder -RNA zeitweilig in Zelllinien einzubringen. Bei der Lipofektion wird das genetische Material von einer Lipiddoppelschicht umgeben und das so entstandene Liposom kann mittels Endozytose von den Zellen aufgenommen werden. In den Zellen wird das eingebrachte Material frei und kann an seine Zielstruktur binden (Abbildung 6). In der vorliegenden Arbeit wurde das Lipofektamin 2000 Reagenz in 48 µl Zellkulturmedium gegeben. Parallel dazu wurden spezifische miR-Inhibitoren (AntagomiRs) gegen miR-21, -29b und -200a sowie eine unspezifische negative Kontrolle in ebenfalls 48 µl Zellkulturmedium gegeben. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, sodass sich die Liposomen bilden. Nach der Inkubationszeit wurden die Liposomen auf die Zellen überführt, sodass die AntagomiRs mit einer Endkonzentration von 25 nM vorhanden waren.

2.5. Zusammensetzung der Puffer

Tabelle 9 Zusammensetzung der Puffer

Puffer	Konzentration	Substanz
Caspasereaktionspuffer	10 mM	$C_8H_{18}N_2O_6S_2K_2$ (PIPES)
	2 mM	$C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA)
	0,1 %	$C_{32}H_{58}N_2O_7S$ (CHAPS)
	1 %	$C_4H_{10}O_2S_2$ (DTT, frisch hinzu gegeben) pH 7,5
EDTA	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	6,5 mM	$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$
	1,5 mM	KH_2PO_4
	0,54 mM	$C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA) pH 7,1-7,3
First strand buffer	50 mM	$C_4H_{11}NO_3 \times HCl$
	75 mM	KCl
	3 mM	$MgCl_2$ pH 8,3
HEPES-Puffer	122,5 mM	NaCl
	5,4 mM	KCl
	0,8 mM	$MgCl_2 \times 6H_2O$
	1,2 mM	$CaCl_2 \times 2H_2O$
	1 mM	$NaH_2PO_4 \times H_2O$
	10 mM	$C_8H_{18}N_2O_4S$ (HEPES) pH 7,4
HRP-Substrat	83 mM	Na_2HPO_4
	4,6 mM	$C_6H_8N_2$ (ortho)
	34,7 mM	$C_6H_8O_7 \times H_2O$
	0,0004 mM	30 % H_2O_2
Laufpuffer	25,5 mM	$C_4H_{11}NO_3$
	3,4 mM	$NaC_{12}H_{25}SO_4$ (SDS)
	383 mM	$C_2H_5NO_2$ (Glycin)

MOPS-Triton	10 mM	$C_4H_{11}NO_3$
	100 mM	NaCl
	1 mM	$C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA)
	0.01 %	Triton X-100
		pH 7,5
PBS	13,7 mM	NaCl
	0,3 mM	KCl
	0,8 mM	$Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$
	0,2 mM	KH_2PO_4
		pH 7,4
Redmix/Lämmllibuffer	500 mM	$C_4H_{11}NO_3$
	4 %	$NaC_{12}H_{25}SO_4$ (SDS)
	1,42 mM	C_2H_6OS (β -Mercaptoethanol)
	2,73 mM	$C_3H_8O_3$ (Glycerin)
	0,01 %	$C_{19}H_{10}Br_4O_5S$ (Bromphenolblau)
		pH 6,8
TBS	3 mM	$C_4H_{11}NO_3$
	0,017 mM	$C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$
	140 mM	NaCl
		pH 7,4
Transferpuffer	25 mM	$C_4H_{11}NO_3$
	192 mM	$C_2H_5NO_2$
	4650 mM	CH_3OH
	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
Trypsin-Lösung	6,5 mM	Na_2HPO_4
	1,5 mM	KH_2PO_4
	0,54 mM	$C_{10}H_{16}N_2O_8$ (EDTA)
	0,1 %	Trypsin
		pH 7,1-7,3
Vollerspuffer	150 mM	Na_2CO_3
	3400 mM	$NaHCO_3$

2.6. Bestimmung der Proteinmenge

Zur Herstellung von Zelllysaten für die Proteinbestimmung wurde das Medium von den Zellen entfernt, die Zellen mit 1 ml 4°C kaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Lysepuffer (MOPS-Triton Siehe Tabelle 9) inkubiert, gelöst und in ein Reaktionsgefäß überführt. Um unter anderem Membranreste aus dem Lysat zu entfernen, wird das Gemisch 10 Minuten bei 17000 g und 4°C zentrifugiert. Dabei entsteht ein zähes Pellet, das verworfen wird und ein klarer Überstand, der die Proteine enthält. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Assay. Hierbei wurde eine Doppelbestimmung jeder Probe sowie der Referenzproteine vorgenommen. Bei dem BCA-Assay handelt es sich um eine kolorimetrische Messung, bei der zu jeder Probe (5µl) bzw. Referenzprotein (15 µl) 196 µl BCA und 4 µl $CuSO_4$ gegeben wird. Dieser Reaktionsansatz wurde im Wasserbad bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Dabei läuft in Anwesenheit von Proteinen die Biuret-Reaktion ab,

bei der die Proteine in alkalischer Lösung mit Cu^{2+} einen Komplex bilden. Wahrscheinlich wird Kupfer dabei reduziert (Cu^+) und kann so mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden, der ein Absorptionsmaximum von 562 nm hat. Die unbekannte Proteinkonzentration der Proben konnte mit Hilfe einer Eichkurve ermittelt werden. Hierbei wurde BSA in Konzentrationen zwischen 0-700 mg/l eingesetzt.

2.7. Caspase-3 Aktivität

Caspase-3 ist eine Cysteinprotease, die im Verlauf der Apoptose durch Proteolyse aktiviert wird. Somit gibt eine erhöhte Caspase-3 Aktivität einen Hinweis auf eine beginnende Apoptose. Um die Caspase-3 Aktivität zu messen, wurden 60 μl frischen Zelllysats mit 60 μl Caspase Reaktionspuffer (Tabelle 9) gemischt, anschließend wurden 5 μl Caspase-3 Substrat hinzugegeben. Hierbei handelt es sich um DEVD-AFC. DEVD bezeichnet im Einbuchstabencode die Aminosäuresequenz Asp-Glu-Val-Asp die sich auch innerhalb von PARP-1, einem DNA-Reparatur-Enzym, befindet. Caspase-3 kann diese Aminosäuresequenz erkennen und abspalten. AFC ist eine fluoreszierende Substanz mit einer Anregungswelle von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm. Solange AFC an DEVD gebunden ist, liegt nur eine basale Fluoreszenz vor. Mit steigender Caspase-3 Aktivität wird mehr AFC von DEVD abgespalten und kann sein volles fluoreszierendes Potential entfalten, was mit einem Anstieg der Fluoreszenz einhergeht. Mittels Eichkurve konnten die gemessenen Werte zu einer AFC Konzentration umgerechnet werden. Hierzu wurde AFC in Konzentrationen zwischen 0 und 8 μM verwendet. Die berechnete AFC Konzentration wurde auf den Proteingehalt bezogen.

2.8. LDH-Aktivität

LDH ist ein Enzym, das im Zytoplasma nahezu jeder Zelle vorkommt. Ist eine LDH-Aktivität extrazellulär messbar, gibt das einen Hinweis auf Schädigungen der Zellmembran, wie es während der Nekrose vorkommen kann. Daher ist die extrazelluläre LDH-Aktivität ein Marker für Nekrose. Für die Messung wurden 2 μl Zelllysats bzw. 100 μl Zellkulturmedium auf 200 μl mit dem LDH-Reaktionspuffer aufgefüllt. LDH katalysiert die Reduktion von Pyruvat zu Laktat unter Oxidation von NADH zu NAD^+ . Dabei wurde die Abnahme der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 340 nm, gemessen. Die Messung wurde nach 30 Minuten beendet und es wurde der anfängliche, lineare Teil der Messung zur Auswertung verwendet.

Die LDH-Aktivität wurde mit folgender Formel, in mU/ml berechnet

$$\text{Aktivität}_{LDH} = \frac{\Delta E \times V_{\text{gesamt}}}{\epsilon \times d \times \Delta t \times V_{\text{Probe}}}$$

ΔE = Extinktionsänderung, V_{gesamt} = Gesamtvolumen in ml, ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH ($0,63 \text{ ml} \times \text{mmol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$), d = Schichtdicke in cm. Δt = Dauer der Messung in Minuten, V_{Probe} = Probenvolumen in ml

Anschließend konnte der prozentuale Anteil der extrazellulären LDH-Aktivität in Bezug auf die gesamte LDH-Aktivität mit folgender Formel berechnet werden.

$$\text{extrazelluläre Aktivität}_{LDH} [\%] = \frac{\text{extrazelluläre Aktivität}_{LDH}}{\text{intrazelluläre Aktivität}_{LDH} + \text{extrazelluläre Aktivität}_{LDH}} \times 100$$

2.9. Strukturindex (SI)

Mit dem SI lässt sich eine Aussage über die Zellform treffen. Um ihn zu ermitteln, wurden mittels eines digitalen inversen Mikroskops Fotos der Zellen nach Ablauf der Inkubationszeit aufgenommen. Mit Hilfe des Bildbearbeitungs- und Verarbeitungsprogramms ImageJ wurden exemplarisch 20 zufällig ausgewählte Zellen pro Kavität ausgemessen. So erhielt man die Parameter, Zellfläche (A) und Zellumfang (U). Mit der von Stock et al. beschriebenen Formel

$$SI = \frac{4\pi \times A}{U^2}$$

wurde der dimensionslose Strukturindex berechnet [137]. Liegt dieser Quotient bei, 1 so ist eine Kreisform beschrieben. Die meisten Epithelzellen haben einen SI um 0,85. Diese Form entspricht einer kubischen Form, und ein SI von 0.4 deutet auf eine Spindelform hin, wie sie für viele mesenchymale Zellen (z. B. Fibroblasten) beschrieben ist.

2.10. FITC-Dextran Diffusion

Dextrane sind hochmolekulare verzweigte Polysaccharide, die via Diffusion physiologische Epithelzellverbände passieren können. FITC gekoppeltes Dextran lässt sich fluorometrisch messen. Um zu ermitteln, ob sich die Permeabilität von HK-2 verändert, wurden die Zellen wie in Punkt 3.3. beschrieben auf Filtereinsätzen angesät. Mit Beginn der Stimulation wurde allen Gruppen 1 g/l FITC-Dextran in das basolaterale Kompartiment gegeben. Nach 6, 24, und 48 h folgte eine Abnahme von 25 µl Medium sowohl von der apikalen, als auch von der basolateralen Seite. Des Weiteren wurde ein leerer Filter unter gleicher Behandlung als Kontrolle mitgeführt. Die Mediumproben wurden gesammelt und zum selben Zeitpunkt bei einer Anregung von 480 nm und einer Emission von 520 nm gemessen. Anschließend wurde der Anstieg der Fluoreszenz über die Zeit ermittelt, welcher die Diffusionsrate darstellt. Der Kehrwert dieser Rate gibt eine Aussage über den mechanischen Widerstand des Zellverbands.

2.11. Messung des pH-Werts

Mittels Blutgasanalysator wurde der pH-Wert im Medium gemessen. Diese Messmethode wurde einer pH-Elektrode vorgezogen, weil sie sensitiver ist. Hierzu wurde das Medium der Zellen nach der Inkubationszeit gesammelt. Da es sich beim Kohlensäure-Bikarbonat-Puffer um ein offenes System handelt, war es notwendig, die Proben vor der Messung im Inkubator für 30 Minuten zu äquilibrieren. Unmittelbar vor der Messung am Blutgasanalysator wurde das Medium in Glaskapillaren aufgenommen und dem Gerät zugeführt.

2.12. RNA-Isolierung

Die Lagerung von isolierter RNA erfolgte bei -80°C .

2.12.1. RNA > 200 bp

Für die Isolierung von RNA > 200 bp wurde das InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit verwendet. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit mit 1 ml/ Well 1 x PBS gewaschen. Nachdem dieser entfernt war, erfolgt die Zugabe des Lysepuffers aus dem Kit.

Dieser Lysepuffer enthält unter anderem DTT, um die Disulfidbrücken von RNasen zu reduzieren und sie damit zu inaktivieren. Des Weiteren wurde dem Lysepuffer 1 % β -Mercaptoethanol zugesetzt, um ebenfalls Disulfidbrücken von RNasen zu reduzieren. Der Lysepuffer enthielt darüber hinaus mineralische Trägerpartikel, an die genomische DNA bindet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 2 Minuten bei 17000 g, bei dem sich die gebundene genomische DNA und Zellmembranbestandteile als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes absetzen. Der klare Überstand wurde in einem neuen Gefäß mit 330 μl 96% Ethanol gemischt. Diese Flüssigkeit wurde auf einen im Kit enthaltenen Spinfilter pipettiert. Durch die Zugabe des Ethanols wird die RNA dehydriert, fällt aus und bleibt im Filter hängen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 1 Minute bei 10600 g, nach dem sich unter anderem Proteine im Durchfluss befinden. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden die Spinfilter einmal mit 500 μl Waschpuffer R1 und zweimal mit 700 μl Waschpuffer R2 für eine Minute bei 10600 g zentrifugiert. Da diese Waschpuffer 96 % Ethanol enthalten, verweilt die RNA in der Membran des Spinfilters. Nach einem Trockenschritt von 5 Minuten bei 13800 g wurde die RNA durch Zugabe von 30 μl Wasser mittels Zentrifugation (10600 g für eine Minuten), aus der Membran gelöst.

2.12.2. MikroRNA (miR)

In der Herstellerangabe des InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kits wird beschrieben, dass die Bindungseffizienz von RNA < 200 bp abnimmt. Um eine optimale Ausbeute von miRs, die definitionsgemäß unter diesen Wert fallen (21-23 bp), zu erhalten, wurde hier die Isolation mittels Trizol-Reagenz angewendet. Nach dem Waschen der Zellen mit 1 ml PBS, wurde 1 ml Trizol auf die Zellen gegeben und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reagenz enthält Guanidinisothiocyanat, ein chaotropes Salz, das Proteine (also auch RNasen) denaturiert und inaktiviert. Außerdem enthält das Reagenz Phenol, in dem sich später auf Grund des niedrigeren pH-Werts Proteine und DNA-Fragmente lösen. Im Anschluss wurde dem Ansatz 200 μl Chloroform beigemischt, um eine schwere organische Phase von einer leichten wässrigen Phase zu separieren. Um diesen Effekt zu verstärken, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 Minuten bei 12000 g und 4°C . Auf Grund der unterschiedlichen Dichte bildet sich unten die organische Phase, oben die wässrige Phase

und dazwischen eine Interphase. Die wässrige Phase enthält RNA und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Das Isopropanol dehydriert die RNA und führt folglich zu ihrer Fällung. Nach Entfernung des Überstands folgten 2 Waschschrte mit 75% Ethanol bei 12000 g für 10 Minuten. Letztendlich wurde das verbleibende Pellet in 30 – 50 µl Wasser gelöst.

2.13. Bestimmung der RNA-Konzentration

2.13.1. Spektralphotometrie

Da Nukleinsäuren ein Absorptionsspektrum von $\lambda=260$ nm haben, können sie mit Hilfe eines Spektralphotometers (NanoVue Plus™) quantifiziert werden. Das Gerät berechnet mittels des Lambert-Beer Gesetzes die RNA Konzentration: Konzentration [$\mu\text{g/ml}$] = $\text{Abs}_{260} \times \text{Faktor}$. Der Faktor beträgt für RNA 40 und beschreibt die RNA-Konzentration (40 $\mu\text{g/ml}$), mit der sich bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette mit 1 cm Schichtdicke ein Messwert von 1 ergibt. Proteine haben ihr Absorptionsmaximum bei $\lambda=280$ nm und so eignet sich der Quotient aus A_{260}/A_{280} dazu, Hinweise über Proteinkontaminationen zu finden., Für reine RNA gilt, dass dieser Quotient zwischen 1,7-1,9 liegt. Für Pufferbestandteile wie EDTA oder Guanidinisothiocyanat, die bei der RNA-Isolation genutzt werden, liegt das Absorptionsmaximum bei 230 nm. Wenn der Quotient aus A_{260}/A_{230} für RNA unter 2,0 liegt, ist das ein Hinweis auf Verunreinigung mit diesen Substanzen. Abhängig vom Ergebnis dieser Qualitätskontrolle wurde entschieden, ob die Proben sich für weitere Experimente eignen.

2.13.2. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde mittels Bioanalyzer 2100 durchgeführt. Dieses Gerät führt eine automatisierte Kapillar-Elektrophorese mittels Chiplabor durch und erlaubt neben sensitiver Messung der RNA-Konzentration auch zuverlässigere Aussagen über die RNA-Integrität als das Spektralphotometer. Alle für die Messung notwendigen Chemikalien waren Teil des Agilent RNA 6000 Nano Kit. Zunächst wurden zu 65 µl Gel 1 µl des Farbstoffs (RNA 6000 Nano dye) beigefügt. 9 µl dieses Gemischs wurden in jede Kavität des Chips pipettiert, die mit „G“ markiert war. Für eine Verteilung des Gels in das Kapillarsystem des Chiplabors wurde eine 1 ml Spritze in einer Halterung benutzt. In die übrigen Wells des Chips wurden 5 µl RNA 6000 Nano Marker (fluoreszierend) gegeben. Anschließend folgte 1 µl einer RNA-Leiter mit bekannten Konzentrationen und jeweils 1 µl der Probe. Das Gerät verfügt über ein Elektrodenset, über das Spannung anlegt und die Elektrophorese durchgeführt wurde.

2.14. Reverse Transkription

Der reversen Transkription ging ein DNase-Verdau voran, um DNA, die bei der Aufreinigung nicht entfernt wurde, zu degradieren. Hierzu wurden in einem Reaktionsgefäß pro µg RNA 8

µl Wasser, 1 µl DNase und 1 µl DNase-Puffer vermischt. Dieser Ansatz wurde in einem Heizblock für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Es folgte ein Heizschritt von weiteren 10 Minuten bei 75°C, um das Enzym zu denaturieren und so unwirksam zu machen.

Diesem Ansatz wurden 4 µl Wasser hinzugefügt und anschließend wurde er aufgeteilt, wobei 10 µl für das Umschreiben in cDNA und 4 µl für einen Kontrollansatz ohne reverse Transkriptase (RT) genutzt wurden.

Tabelle 10 zeigt auf, wie sich die Reaktionslösungen zusammensetzten. Der *first strand buffer* stellt den optimalen pH-Wert ein und liefert Mg^{2+} , das Bestandteil des aktiven Zentrums der RT ist und somit essentiell für seine Funktion. DTT verfügt, wie eingangs beschrieben, über reduzierende Eigenschaften, die es erlauben, Disulfidbrücken zu zerstören. Dadurch wird gewährleistet, dass die RNA in primärer Struktur vorliegt und die RT binden kann. Die Desoxynukleotide werden als Bausteine der cDNA benötigt. RnaseOut ist ein Inhibitor für RNAsen und schützt somit die RNA vor ihrem Abbau. Bei der reversen Transkriptase (RT) handelt es sich um eine virale RNA-abhängige DNA-Polymerase, die es erlaubt, RNA in DNA zu übersetzen. Nach Fertigstellung der unterschiedlichen Gruppen wurden die Proben im Heizblock erst für 5 Minuten auf 25 °C erhitzt, um die Primeranlagerung zu gewährleisten, für 30 Minuten auf 42 °C, um der RT die optimale Reaktionstemperatur zu bieten und schlussendlich für 5 Minuten bei 95°C, um das Enzym zu denaturieren und die RNA von den cDNA-Strängen zu trennen.

Tabelle 10 Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Substanzen	Gruppe mit RT	Kontrollgruppe ohne RT
H₂O	15,47	7,33
5 x first strand buffer	5,71	2,29
100 mM DTT	0,36	0,14
je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	1,43	0,57
40 U/µl RnaseOut	0,71	0,29
0,3 µg/µl RandomPrimer	0,96	0,38
200 U/µl RT	0,72	

2.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine molekularbiologische Methode, die dem Prinzip der DNA-Replikation nachempfunden ist. Mit Hilfe der PCR können ausgesuchte Abschnitte der DNA vervielfältigt werden. Im Gegensatz zur DNA-Replikation *in vivo*, kommt bei der PCR nur ein Enzym zum Einsatz, die hitzestabile Taq (*Thermus aquaticus*)-Polymerase. Die Taq-Polymerase ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die eine Hydroxygruppe erfordert, um am DNA-Strang zu

binden. Diese wird von speziell hergestellten Oligonukleotiden (Primer) bereitgestellt. Eine Übersicht der verwendeten Primer findet sich in Tabelle 11 und Tabelle 12. Die Primer bzw. deren Sequenz werden speziell für die gewünschte Zielstruktur entworfen. Wobei ein Primer am Leitstrang („forward“) und der andere etwas versetzt am gegenüberliegenden Komplementärstrang (*reverse*) der DNA bindet. An diese durch Primer markierte Stellen kann die Polymerase binden und den Komplementärstrang herstellen. Diese Abläufe finden zyklisch immer wiederkehrend im Heizblock statt. Das Heizprogramm beginnt mit einer Denaturierungsphase von 10 Minuten bei 95 °C. Die in Schritt 3.14. entstandene cDNA liegt zwar als Einzelstrang vor, dennoch können sich sekundäre Strukturen bilden, welche durch diese erste Denaturierungsphase zerstört werden. Weiterhin wird die Polymerase aktiviert. Folgende Schritte wurden zyklisch wiederholt: zuerst erfolgte die Hybridisierung von Primer und cDNA bei einer für den Primer spezifischen Temperatur (meistens 60°C) für 30 Sekunden. Es folgte eine Inkubation bei 72°C für 30 Sekunden. Diese Temperatur stellt die optimale Arbeitstemperatur der Taq-Polymerase dar und es findet eine Elongation des neuen Stranges statt. Im dritten Schritt findet eine weitere Temperaturerhöhung auf 95°C statt, diese dauert 15 Sekunden an. Bei dieser Temperatur wird der gebildete Doppelstrang getrennt und die Polymerase löst sich. Diese Reaktionen wurden über insgesamt 40 Zyklen wiederholt. Anschließend wurde zur Qualitätskontrolle der Primer eine Schmelzkurve erstellt, indem eine graduelle Temperaturerhöhung von 65°C auf 95°C stattfand. Hierbei wurde eine Schmelztemperatur ermittelt, welche die Temperatur angibt, bei der 50 % der Wasserstoffbrückenbindungen des PCR-Produkts aufgebrochen sind. Um diese Prozesse zu quantifizieren, wurde der Farbstoff SYBR Green I genutzt, der in Doppelstränge der DNA interkalieren kann und dann eine messbare Fluoreszenz abgibt. Zur Bewertung wurde die theoretische Größe Ct (Schwellenwertzyklus) benutzt. Der Ct gibt an, wann die gemessene Fluoreszenz erstmals exponentiell die Hintergrundfluoreszenz übertrifft. In der vorliegenden Arbeit wurde der Platinum™ SYBR™ Green qPCR SuperMix-UDG benutzt. Dieser Mix enthält die Taq-Polymerase, Mg⁺⁺ für deren aktives Zentrum, einen optimalen pH-Wert und dNTPs, sodass zu 6,25 µl Super Mix lediglich noch 0,5 µl der spezifischen Primer (Stammlösung: 10 pmol/µl), 2 µl der jeweiligen cDNA Probe und 3,25 µl Wasser hinzugegeben werden mussten. Die PCR wurde mit dem 7900 HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Dabei erfolgte für jede Probe eine Dreifachbestimmung. Aus diesen Triplets wurde ein Mittelwert gebildet. Die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Hierbei erfolgt die Subtraktion des Ct des Zielgens vom Ct eines Referenzgens, von dem bekannt ist, dass seine Expression durch die angewandte Behandlung in der vorliegenden Zelllinie nicht verändert wird (ΔCt). Als Referenzgene wurden 18S rRNA und/oder GAPDH und/oder β -Aktin verwendet. Im zweiten Schritt wurde von jedem Einzelwert der Mittelwert der Kontrollgruppe subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Im Mittel ergibt

dieser Wert für die Kontrollgruppe 0 und Abweichungen davon in den behandelten Gruppen zeigen eine geänderte Expression in der behandelten Gruppe. Die mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechneten Änderungen geben an, um wie viele Zyklen sich die Kontrollgruppe von der behandelten Gruppe unterscheidet. Es wird davon ausgegangen, dass sich die cDNA in jedem Zyklus verdoppelt. Daher ist es möglich mit der Formel $2^{\Delta\Delta C_t}$ die x-fache Änderung zu berechnen.

2.16. TaqMan-PCR

Zum Nachweis von miRs wurde das TaqMan Reverse Transcription Kit und TaqMan microRNA Assay von Invitrogen genutzt. Da miRs mit 21-23 bp sehr klein sind, sind die in 3.14 und 3.15 beschriebenen Methoden ungeeignet. Für die reverse Transkription bedarf es spezieller Primer, die neben der passenden Sequenz eine Schleifenstruktur enthalten. Diese Schleife verlängert und stabilisiert den Primer und gewährleistet eine Spezifität zur Zielstruktur. Die qPCR wurde mit Hilfe von TaqMan™ Sonden durchgeführt. Eine Liste der verwendeten Sonden findet sich in Tabelle 13 Hierbei handelt es sich um Sonden, die am 5'-Ende ein Fluorophor (FAM) und am 3'-Ende einen Quencher enthalten. Bei räumlicher Nähe absorbiert der Quencher das Signal des Fluorophors. Während der PCR, entfernen sie sich voneinander und FAM kann durch eine Wellenlänge von 492 nm angeregt werden und erzeugt eine Emission bei 517 nm, die gemessen werden kann. Als Referenzstruktur wurde die nukleäre RNA U6 verwendet.

Tabelle 11 Humane Primer (für HK-2)

(Gen) Name	Beschaffungsnummer	forward 5'-3'	backward 5'-3'	Anlagerungstemperatur[°C]
ACTA2	NM_001141945.1	CGAGATCTCACTG ACTACCTCATGA	AGAGCTACATA ACACAGTTTCT CCTTGA	60
CDH1	NM_004360.3	GGTTCAAGCTGCT GACCTTC	CTCAAATCCT CCCTGTCCA	55
COL3A1	NM_000090.3	GGAGTAGCAGTAG GAGGAC	AGGACTGACCA AGATGGGAA	60
COL4A1	NM_001845.4	GGTATTCCAGGAT GCAATGG	TCTCACCTGGA TCACCCTTC	60
GAPDH	NM_002046.4	AAGGTGAAGGTCG GAGTCAA	AATGAAGGGGT CATTGATGG	60
Il-6	NM_000600.5	CCTCGACGGCATC TCAGCCC	TGTGGTTGGGT CAGGGGTGGT	60
Nos2	NM_000625.4	ATGCAATGAATGG GGAAAAA	ATTCTGCTGCT TGCTGAGGT	60
PTGS2	NM_000963.2	CTTACAATGCTGA CTATGGCTAC	AAACTGATGCG TGAAGTGCTG	58
OCLN	NM_002538.3	TATGGAGGAAGTG GCTTTGG	TCATTCACTTTG CCATTGGA	60
RNA45S5	NR_046235.1	CTCAACACGGGAA ACCTCAC	CGGACATCTAA GGGCATCAC	58
SLC5A1	NM_000343	CCTCTTCGCCATT TCTTTCATC	ATGCACATCCG GAATGGGT	60

TNF	NM_000594.3	AGTTGTGTCTGTA ATCGCCCTAC	CTAAGCAAACCT TTATTTCTCGCC	60
VIM	NM_003380.3	CGAAAACACCCTG CAATCTT	TCCAGCTTCCT GTAGGT	55

Tabelle 12 Primer für Ratten (NRK-52E und NRK-49F)

(Gen) Name	Accession Nummer	Forward 5'-3'	Backward 5'-3'	T [°C]
Actb	NM_031144.2	TGACGGTCAGGTCATC ACTATC	GGCATAGAGGTCTTT ACGGATG	56
Col1a1	NM_053304.1	CGGCTCCTGCTCCTCT TAG	GCCATTGTGGCAGAT ACAGA	58
Col3A1	NM 032085	TCTTCTCACCCCTGCTT CACC	CAGAGGACAGATCC CGA	58
Col4A1	NM_001135009.1	GAAAGGAGAGAGAGC TGCCCTTG	GGCAATCCTTCAAGA CCATC	58
Ptgs2	S67722.1	TACAAGCAGTGGCAA GGCC	CAGTATTGAGGAGAA CAGATGGG	60
Cdh1	NM_031334.1	AGTTCTGCCAGAGAAA CCCG	GTTGACGGTCCCTTC ACAGT	60
Cdh2	NM_031333.1	CAGGGCCCTTTGCATT TGAC	CACGATCCTGTCTAC GTCGG	60
Fn1	NM_019143	CACCGAAACCGGAA GAG	TTGCCTAGGTAGGTC CGTTC	58
Gapdh	NM_017008.4	CGGCAACTTCAACGG CACAGTCA	GGTTTCTCCAGGCG GCATGTCA	60
Il-6	NM_012589.2	AGCCAGAGTCATTCAG AGCA	AGCATTGGAAGTTGG GGTAGG	60
Mcp-1	AF079313.1	CCCAGAAACCAGCCA ACT	TGCTGCTGGTGATTC TCTTG	60
Acta2	JX430794.1	TGAACCCTAAGGCCAA CCG	TCCAGAGTCCAGCAC AATACCA	60
Tgfb1	NM_021578.2	TCCATGACATGAACCG ACCC	GAAGTTGGCATGGTA GCCCT	60
Tnf	NM_012675.3	CCACCACGCTCTTCTG TCTACTGAACT	CCATTGGCCAGGAG GGCGTT	60
Vim	NM_031140.1	AATGACCGCTTCGCCA ACTA	GGTCAAGACGTGCC AGAGAA	60
Wisp1	NM_031716.1	GACTTCCAGGCATGA GGTG	AATCGTTTCTCCAG TGGTG	60
Rn18s	NR_003278.3	GTAACCCGTTGAACCC CATT	CCATCCAATCGGTAG TAGCG	60

Tabelle 13 miR Sonden

Assay Name	Assay ID	Firma
hsa-miR-21	000397	
hsa-miR-29b	000413	Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific, MA, USA
hsa-miR-200a	000502	
U6 snRNA	001973	

2.17. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Tabelle 14 Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Komponente	5% Sammelgel	14 Trenngel	% 12 Trenngel	% 10 Trenngel	% 8 Trenngel
Acrylamid/Bis (26:0,7)	0,425 ml				
Acrylamid/Bis (29,3:0,53)		3,225 ml	2,550 ml	2,140 ml	1,715 ml
10% APS	0,025 ml	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml	0,075 ml
10% SDS	0,025 ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml	0,125 ml
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	0,625 ml				
1,5 M Tris-HCl pH 8,8		1,563 ml	1,563 ml	1,563 ml	1,563 ml
Wasser	1,39 ml	1,205 ml	1,880 ml	2,285 ml	2,713 ml
TEMED	0,005 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml	0,02 ml

Das Ziel der SDS-PAGE ist es, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen. Hierzu müssen die Proteine in einem vorbereitenden Schritt denaturiert und gleichmäßig mit SDS beladen werden. Dazu wird dem Zelllysat Lämmli-puffer zugesetzt, der β -Mercaptoethanol enthält, das kovalente Bindungen, wie Disulfidbrücken zwischen Cysteinen, auftrennt. Anschließend werden die Lysate bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt, um nicht-kovalente Bindungen wie z.B. Wasserstoffbrücken zu lösen. Nach dieser Behandlung liegen Proteine entfaltet (in der Primärstruktur) vor. Dies ermöglicht eine gleichmäßige Anlagerung des negativ geladenen SDS. Durch die Anlagerung haben die Proteine eine Nettoladung, die proportional zu ihrer Größe ist. Anschließend wird eine diskontinuierliche PAGE nach Lämmli durchgeführt. Das Gel besteht aus 2 Komponenten: dem grobporigen Sammel- und dem feinporigen Trenngel und wird in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer gegeben. Tabelle 14 führt die Zusammensetzung der Polyacrylamidgele auf. Im Sammelgel werden die Proteine konzentriert. Sobald eine Spannung angelegt wird, entstehen Leitonen (Chlorid aus dem Gel) und Folgeionen (Glycin aus dem Laufpuffer). Die Proteine aus der Probe befinden sich zwischen Folge- und Leitonen und werden in einer eng begrenzten Zone konzentriert und die später sichtbaren Banden schärfer begrenzt. Das Trenngel hat einen höheren pH-Wert als das Sammelgel. Das führt dazu, dass am Übergang der Gele Glycinmoleküle vollständig dissoziieren, somit eine höhere Nettoladung haben und rasch aus dem Trenngel wandern und die Proteine nicht mehr begrenzt sind. Im engmaschigen Trenngel werden die Proteine der Größe nach aufgetrennt. Hierbei gilt: je Größer ein Protein ist, desto stärker wird es durch die Maschen des Gels abgebremst und desto langsamer bewegt es sich durch das Gel. Hierbei ist zu beachten, dass die Maschenweite des Trenngels durch die eingesetzte Acrylamidkonzentration beeinflusst werden kann. Die Maschenweite wird der Größe des nachzuweisenden Proteins angepasst. Als Marker des Molekulargewichts wurden Proteine mit einem Größenbereich von 10 – 170 kDa bzw. 43 – 315 kDa genutzt.

2.18. Western Blot

Nachdem die Proteine mittels SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden, folgte die elektrophoretische Übertragung auf eine negativ geladene Nitrozellulosemembran. Um die Proteinbindungsstellen der Membran zu aktivieren, wurde ein Transferpuffer, der 20 % Methanol enthält, verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 2 mA/cm² für 40-90 Minuten in einer Halbtrockenzelle. Anschließend wurde die Membran in TBS-Tween gewaschen und mit einer Blocklösung (5 % fettarmes Trockenmilchpulver in TBS-Tween) für eine Stunde inkubiert. Dadurch werden Proteinbindungsstellen der Membran besetzt und somit blockiert. Die Membran wurde anschließend erneut mit TBS-Tween gewaschen und mit einem spezifischen Antikörper (Erstantikörper), der in einer Lösung aus TBS-Tween und 5% BSA gelöst wart, über Nacht inkubiert. Der Erstantikörper bindet spezifisch an sein Antigen. Eine Liste der verwendeten Antikörper findet sich in Tabelle 15. Die Membran wurde erneut gewaschen und mit einem Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten oder Fluoreszenzgekoppelten Antikörper (Zweitantikörper), gelöst in Blocklösung, für 2 Stunden inkubiert. Nachdem der Zweitantikörper am Erstantikörper gebunden hatte, erfolgten weitere Waschschrte und die Detektion. Es wurden entweder Zweitantikörper genutzt, die an ein Fluorophor gebunden sind. In diesem Fall wurde das Signal mittels *Odyssey infrared imaging system* von Li-Cor, Biosciences gemessen. Oder es wurden Zweitantikörper, die an HRP gekoppelt sind, verwendet. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol durch H₂O₂. Dadurch entsteht eine Chemolumineszenz, die mittels Image Quant LAS4000 von GE Health care gemessen werden konnte. Die Auswertung der Proteinbanden erfolgte mit der Software QuantityOne (Biorad, CA, USA). Auf jeder Membran wurden neben den zu detektierenden Proteinen auch Referenzproteine detektiert (Bsp. GAPDH, β -Aktin, HSP70, HSP90). Es wurde ein Quotient aus dem Ziel und Referenzprotein gebildet, um die Ergebnisse zu normieren. Anschließend wurde ein Verhältnis aus den Werten der behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe gebildet, um Unterschiede zu berechnen. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine semiquantitative Auswertung.

Tabelle 15 Verwendete Antikörper

Name	Wirtsspezies	Verdünnung	Firma
β-Aktin	Maus/ Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
COX-2	Kaninchen, monoklonal	1:500	Abcam, Cambridge, UK
E-Cadherin	Maus, monoklonal	1:500	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Fibronektin	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Biomol, Hamburg, DE
HSP70	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main,

HSP90	Kaninchen, polyklonal	1:1000	DE Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Kollagen I	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Biozol, Eching, DE
Kollagen III	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Biomol, Hamburg, DE
Kollagen IV	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Biomol, Hamburg, DE
N-Cadherin	Maus, monoklonal	1:500	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
p38 (Thr180/Tyr182)	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Kaninchen,polyklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
p44/42-MAPK (ERK1/2)	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Phosphor-p44/p42 MAPK (ERK1/2)	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Phosphor SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Maus, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
α-SMA	Kaninchen, monoklonal	1:500	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
TGF-β	Kaninchen, polyklonal	1:500	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
TNF-α	Kaninchen, monoklonal	1:200	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
Vimentin	Kaninchen, monoklonal	1:1000	Cell Signaling, Frankfurt am Main, DE
WISP1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Merck Milipore, CA, USA

2.19. ELISA

Um die Expression von extrazellulären Matrixproteinen zu messen, wurde ein Direkt-ELISA verwendet. Es wurden Kollagen III und IV im Medium gemessen. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils verschiedene Volumina des Mediums (Tabelle 16) mit je 200 μ l Vollerspuffer (Tabelle 9) in eine 96-Well Immunosorb-Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde geleert und es folgten drei Waschschrte mit PBS/0,05% Tween-20. Danach wurde der

Ansatz mit 200 µl PBS/0,05% Tween-20 und 2% bovinen Serumalbumin für 2 h blockiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden 50 µl eines spezifischen Antikörpers (1:1000 in BSA-Lösung) auf die entsprechenden Proben gegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert. Bevor der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (1:5000 in 2%-BSA-Lösung) auf die Proben gegeben wurde, wurde drei Mal mit PBS/0,05% Tween-20 gewaschen. Nach einer Stunde und weiteren drei Waschschrritten erfolgte für 15 Minuten die Inkubation mit HRP-Substrat im Dunkeln. Wenn viele Komplexe aus Erst- und Zweitantikörper entstanden sind, befindet sich eine große Menge HRP in den Wells. Nach Zugabe des HRP-Substrats beginnt die Peroxidase, das Substrat zu einem Farbkomplex abzubauen. Anschließend wurden 25 µl Schwefelsäure zu jeder Probe gegeben, was zur Denaturierung der Proteine und somit zum Stopp der Reaktion führte. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen. Die Kalibrierung erfolgte durch Lösungen mit verschiedenen bekannten Konzentrationen der gesuchten Matrixproteine.

Tabelle 16 Verdünnungsreihen von Kollagen III und IV

	Kollagen III	Kollagen IV
Stammlösung	5 mg/ml	1 mg/ml
	10000 ng/well	100 ng/well
	3000 ng/well	30 ng/well
Verdünnungsreihe	1000 ng/well	10 ng/well
	300 ng/well	3 ng/well
	100 ng/well	1 ng/well

2.20. Bewertung der Interaktion von OTA und CIT

Um zu ermitteln, ob es sich bei den Kombinationseffekten der Mykotoxine CIT und OTA um additive oder synergistische Effekte handelt, wurden zwei Szenarien definiert.

1. Qualitativer Synergismus: Weder OTA noch CIT verursacht für sich alleinstehend eine statistisch signifikante Änderung. Ihre Kombination hingegen verursacht, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, eine statistisch signifikante Änderung.

2. Quantitativer Synergismus: Wenn beide Toxine für sich allein einen statistisch signifikanten Effekt verursachen, wurde mit Hilfe der von Weber et al. gezeigten Formeln ein Erwartungswert und seine Varianz berechnet [137]. Damit ist es möglich, einen t-Test-Wert zu berechnen. Unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades und der Irrtumswahrscheinlichkeit für den zweiseitigen Test, kann der t-Test-Wert genutzt werden, Signifikanzschranken zu ermitteln. Wenn ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen berechnetem und gemessenem Kombinationseffekt vorliegt, deutet das auf eine synergistische Interaktion oder eine verstärkende Hemmung hin. Wenn die Werte sich nicht signifikant unterscheiden, ist das ein Hinweis für einen additiven Effekt.

Berechnung der erwarteten Mittelwerte, S.E.M. und t-Test Wert:

$$1: \text{Erwartungswert [\%]} = \text{Mittelwert}_{\text{OTA}} [\%] + \text{Mittelwert}_{\text{CIT}} [\%] - 100\%$$

$$2: \text{S.E.M.}_{\text{Erwartungswert}} = \sqrt{S.E.M.^2_{\text{OTA}} + S.E.M.^2_{\text{CIT}}}$$

$$3: \text{t-Test Wert} = \frac{|\text{Mittelwert}_{\text{gemessen}} - \text{Mittelwert}_{\text{berechnet}}|}{\sqrt{S.E.M.^2_{\text{gemessen}} + S.E.M.^2_{\text{berechnet}}}}$$

2.21. Statistik

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm S.E.M. angegeben. Signifikante Unterschiede zweier Gruppen wurden mittels ungepaartem Student's t-test berechnet, Unterschiede von mehr als zwei Gruppen wurden mittels ANOVA und anschließender Post-Hoc-Testung mittels Holm-Sidak Methoden gegen die Kontrollgruppe ermittelt und bei nicht normal verteilten Daten wurde der Wilcoxon-Rangsummentest herangezogen (dies war für die Ergebnisse in Abbildung 15 b notwendig). Ein Unterschied wird als statistisch signifikant definiert, wenn $p \leq 0,05$ und ist mit einem „*“ in den Abbildungen markiert. Der Unterschied bezieht sich immer auf den Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. „n“ ist die Anzahl der Petrischalen (biologisch unabhängige Replikate).

3. Ergebnisse

3.1. Teil I Effekt der simultanen Inkubation von HK-2 Zellen mit OTA und CIT auf nierenschädigende Prozesse

3.1.1. Einfluss von Citrinin (CIT) auf die Viabilität von HK-2 Zellen

Das Mykotoxin CIT gilt als Nephrotoxin, daher wurde überprüft, in welcher Konzentration es den Zelltod einer humanen Nierenzelllinie aus dem proximalen Tubulus (HK-2) nach sich ziehen. Zur Ermittlung der Zellviabilität wurden das zelluläre Gesamtprotein mittels BCA-Assay, Caspase-3 Aktivität (Apoptosemarker) und LDH- oder Caspase-3 Freisetzung (Nekrosemarker) nach 24 bzw. 48 h bestimmt. Abbildung 7 zeigt, dass CIT bis zu Konzentrationen von 10 μM weder zelluläres Gesamtprotein, die Caspase-3 Aktivität noch die LDH-Freisetzung, nach 24 h oder 48 h veränderte.

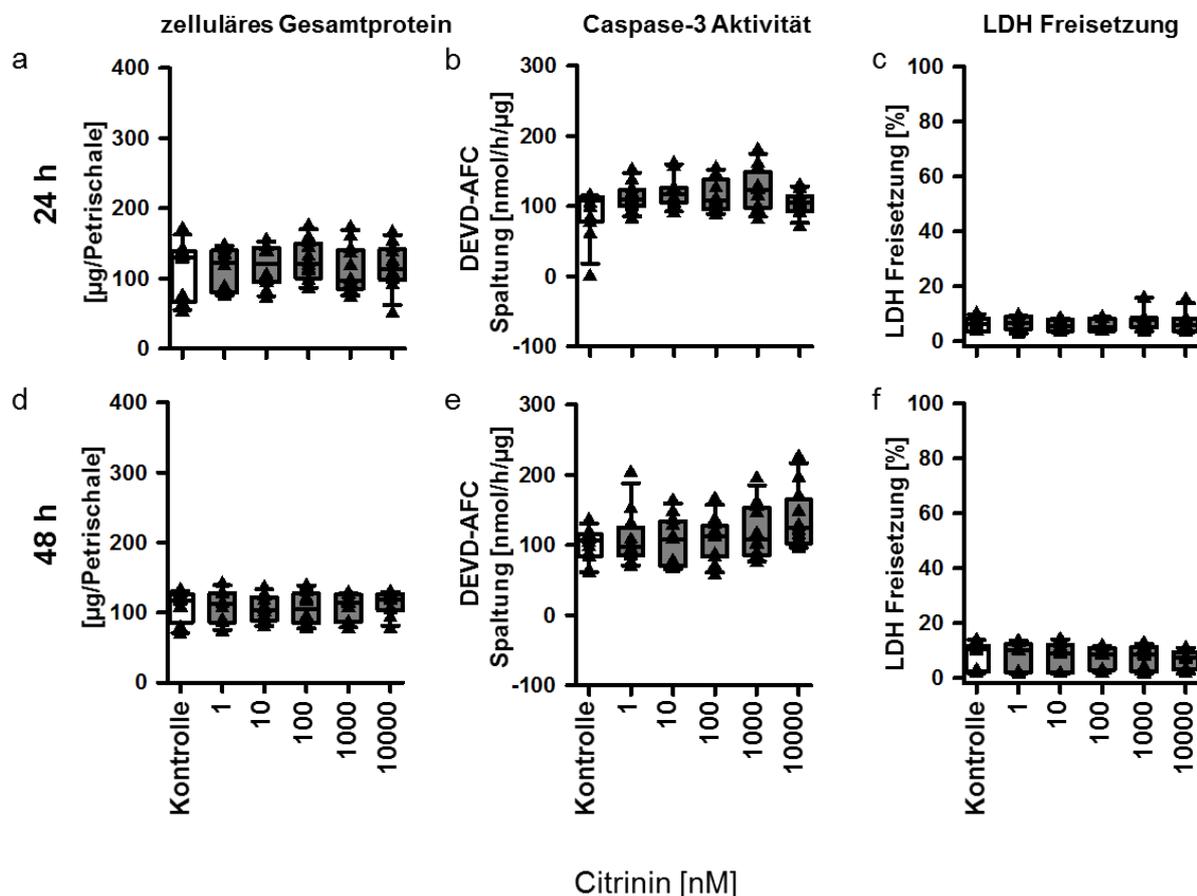


Abbildung 7: Konzentrationsreihe von CIT (0-10 μM) zur Ermittlung der Viabilität der HK-2 Zellen. Zelluläres Gesamtprotein (a, d), Caspase-3 Aktivität (b, e) und LDH-Freisetzung (c, f) wurden nach 24 h (a-c) oder 48 h (d-f) Inkubation mit CIT gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “**” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=7-12$. Anschließend wurde eine weitere Konzentrationsreihe durchgeführt, bei der CIT in Konzentrationen 10 – 1000 μM eingesetzt wurde (Abbildung 8). Die Ergebnisse zeigen, dass eine 48-stündige Inkubation von HK-2 Zellen mit 100 μM CIT die Aktivität von Caspase-3 signifikant erhöhte. Dieser Effekt verschwand beim Einsatz von 1000 μM , stattdessen stieg die extrazelluläre Caspase-3 Aktivität signifikant an.

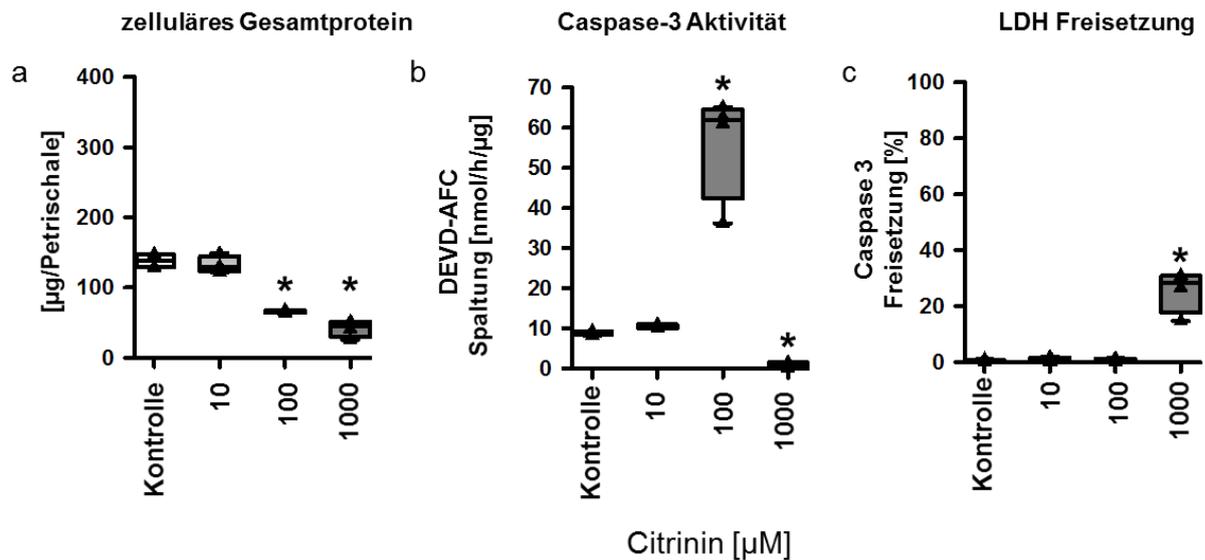


Abbildung 8: Konzentrationsreihe von CIT (0-1 mM) zur Ermittlung der Viabilität der HK-2 Zellen. Zelluläres Gesamtprotein (a), Caspase-3 Aktivität (b) und LDH-Freisetzung (c) wurden nach 48 h Inkubation mit CIT gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle werden mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4$

Diese Daten deuten darauf hin, dass CIT ab Konzentrationen von 100 µM Apoptose induziert, während 1000 µM eher den Zelltod durch Nekrose begünstigen.

3.1.2. Einfluss von CIT in Kombination mit OTA auf die Viabilität von HK-2 Zellen

Um zu überprüfen, ob die adverse Wirkung von CIT in Anwesenheit von OTA verändert ist, wurden zelluläres Gesamtprotein, Caspase-3 Aktivität und LDH-Freisetzung nach 48 h gemessen. Hierzu wurden HK-2 Zellen simultan mit CIT in Konzentrationen von 10 nM – 10 µM und 10 nM OTA inkubiert. CIT hatte in Konzentrationen bis 10 µM, auch in Anwesenheit von 10 nM OTA, keinen Einfluss auf die Zellviabilität (Abbildung 9 a-c). In nachfolgenden Experimenten wurden OTA und CIT nur noch in Konzentrationen eingesetzt die im Blutplasma von Menschen zu finden sind. Für OTA war dies weiterhin eine Konzentration von 10 nM und für CIT eine Konzentration von 1 nM.

3.1.3. Einfluss von CIT und OTA auf die Expression inflammatorischer Zytokine und Enzyme in HK-2 Zellen

Interstitielle Inflammation ist häufig Teil des Krankheitsverlaufs einer chronischen Nephropathie und begünstigt ihre Progression. Um zu testen, ob die Mykotoxinkombination die Entstehung inflammatorischer Vorgänge unterstützt, wurde die intrazelluläre Expressionsänderung des inflammatorischen Zytokins TNF und des Enzyms COX-2 überprüft. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, führte die Inkubation mit der Mykotoxinkombination nach 48 h zu einem Expressionsanstieg des TNF Proteins und zu einer Expressionsverminderung des COX-2 Proteins.

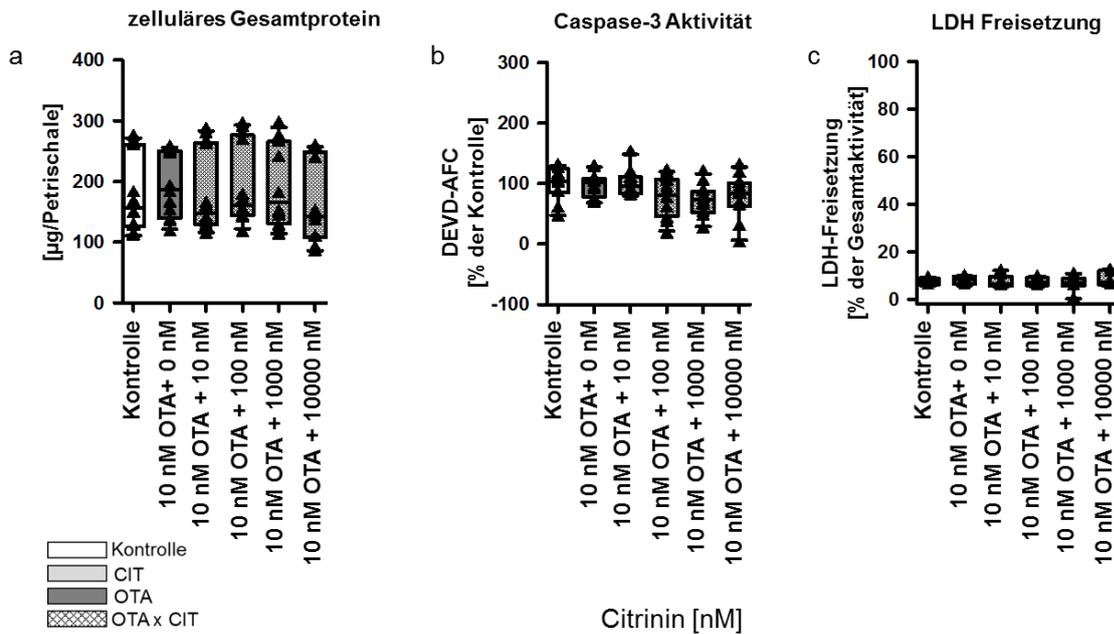


Abbildung 9: Konzentrationsreihe von CIT in Kombination mit 10 nM OTA zur Ermittlung der Viabilität der HK-2 Zellen. Zelluläres Gesamtprotein (a), Caspase-3 Aktivität (b) und LDH-Freisetzung (c) wurden nach 48 h Inkubation mit CIT gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “**” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=10-12$

Im Gegensatz dazu hatte weder die Inkubation mit OTA noch mit CIT alleine einen Einfluss auf die Proteinexpression von TNF und COX-2. Diese Ergebnisse deuten auf eine qualitative synergistische Interaktion von OTA und CIT hin. Um zu überprüfen, ob die Expressionsänderungen von TNF und COX-2 durch direkte transkriptionelle Änderungen zu erklären sind, wurden Expressionsänderungen der für TNF und COX-2 kodierenden mRNAs gemessen. Weder OTA noch CIT allein verursachten eine statistisch signifikante Expressionsänderung der für TNF und COX-2 kodierenden mRNA (Abbildung 10 c,f).

Im Gegensatz dazu führte die simultane Inkubation von HK-2 Zellen mit OTA und CIT zu einem Expressionsanstieg der für TNF kodierenden mRNA und einer Expressionsverminderung der für COX-2 kodierenden mRNA. In Tabelle 17 sind die berechneten Erwartungswerte \pm S.E.M. der mRNA-Expression, den gemessenen Kombinationseffekten gegenübergestellt. Im Fall der für TNF kodierenden mRNA wird ersichtlich, dass ein additiver Effekt beider Mykotoxine eine ca. 6-fache Expressionserhöhung des TNF Proteins nach sich zöge, während der gemessene Effekt eine Erhöhung um das 17-fache zeigte. Es konnte ermittelt werden, dass es sich dabei um eine synergistische Interaktion von OTA und CIT handelte. Der Kombinationseffekt auf die Expression der für COX-2 kodierenden mRNA hingegen war additiv (Tabelle 17). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Expressionsänderung des TNF- und COX-2 Proteins transkriptionell vermittelt werden. Zusätzlich wurde die Expression der für das proinflammatorische Zytokin IL-6 und das Enzym iNOS kodierende mRNA

bestimmt. Keine der genutzten Inkubationsbedingungen führte zu signifikanten Expressionsänderungen der für IL-6 oder iNOS kodierenden mRNA (Abbildung 10 g, h).

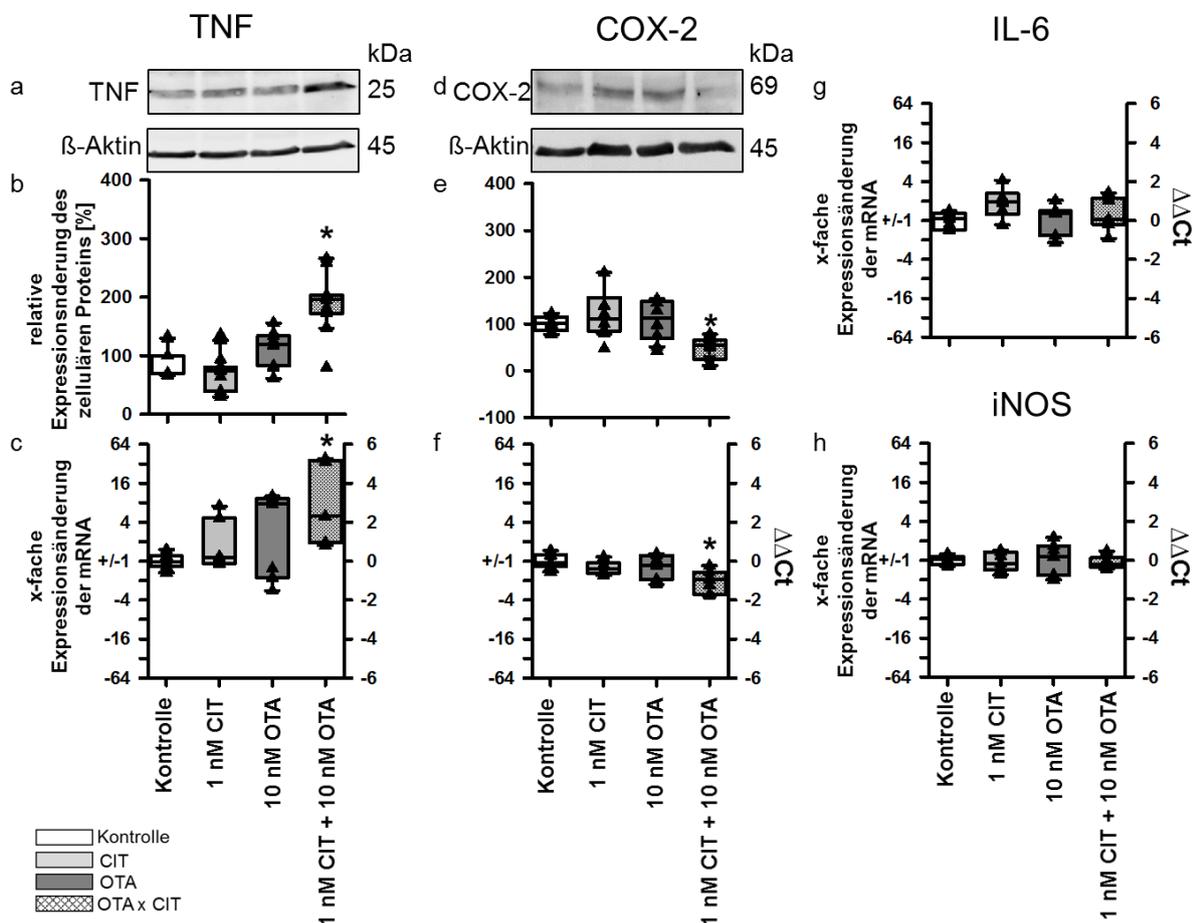


Abbildung 10: Effekt der Mykotoxine auf die Expression inflammatorischer Zytokine und Enzyme in HK-2 Zellen. (a, d) Repräsentative Western Blots von Proteinen aus Zellen nach Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT. Expressionsänderungen der Proteine von TNF und COX-2 verglichen mit der Kontrollgruppe (b, e) und relative Änderungen der mRNA-Expression von TNF, COX-2, IL-6 und iNOS (c, f, g, h). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=7-9$, Inkubationszeit = 48 h.

3.1.4. Einfluss von CIT und OTA auf die Dedifferenzierung von HK-2 Zellen

Zunächst wurde die Expression zweier epithelialer (E-Cadherin und Occludin), sowie zweier mesenchymaler Proteine (Vimentin und α -SMA) bestimmt. Das Occludin Protein war mittels Western Blot nicht detektierbar. Die Expression von E-Cadherin-, Vimentin- und α -SMA Protein wurde weder durch Inkubation mit CIT noch mit OTA verändert. Die Mykotoxinkombination hingegen bewirkte eine statistisch signifikante Expressionsverminderung des E-Cadherin Proteins und eine Expressionserhöhung des Vimentin und α -SMA Proteins Abbildung 11 (a, b, d, e, g, h).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion von OTA und CIT bezüglich der epithelialen und mesenchymalen Proteine qualitativ synergistisch war. Es wurden die Expressionsänderungen der für diese Proteine kodierenden mRNAs gemessen, um Hinweise auf eine transkriptionelle Regulation zu erhalten. Die Expression der für E-Cadherin kodierende mRNA war nach Inkubation mit OTA vermindert, CIT verursachte keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abbildung 11 c). Der Vergleich des berechneten und gemessenen Kombinationseffektes in Tabelle 17 zeigt, dass sich die Kombination von CIT und OTA additiv auf die Expression der E-Cadherin mRNA auswirkte und diese verminderte. Die für Occludin kodierende mRNA war im Gegensatz zum Protein detektierbar. Weder die Inkubation mit CIT noch mit OTA allein bewirkte eine veränderte Expression der für Occludin kodierenden mRNA, während die Mykotoxinkombination zu einer Verminderung führte. Bei dieser Interaktion handelte es sich um einen qualitativen Synergismus (Abbildung 11 j). Die Expression der für Vimentin kodierenden mRNA war nach der Behandlung mit CIT und OTA allein nicht verändert, während die Mykotoxinkombination zu einer Verminderung der Expression dieser mRNA führte, auch bei diesem Effekt handelte es sich um einen qualitativen Synergismus (Abbildung 11 f).

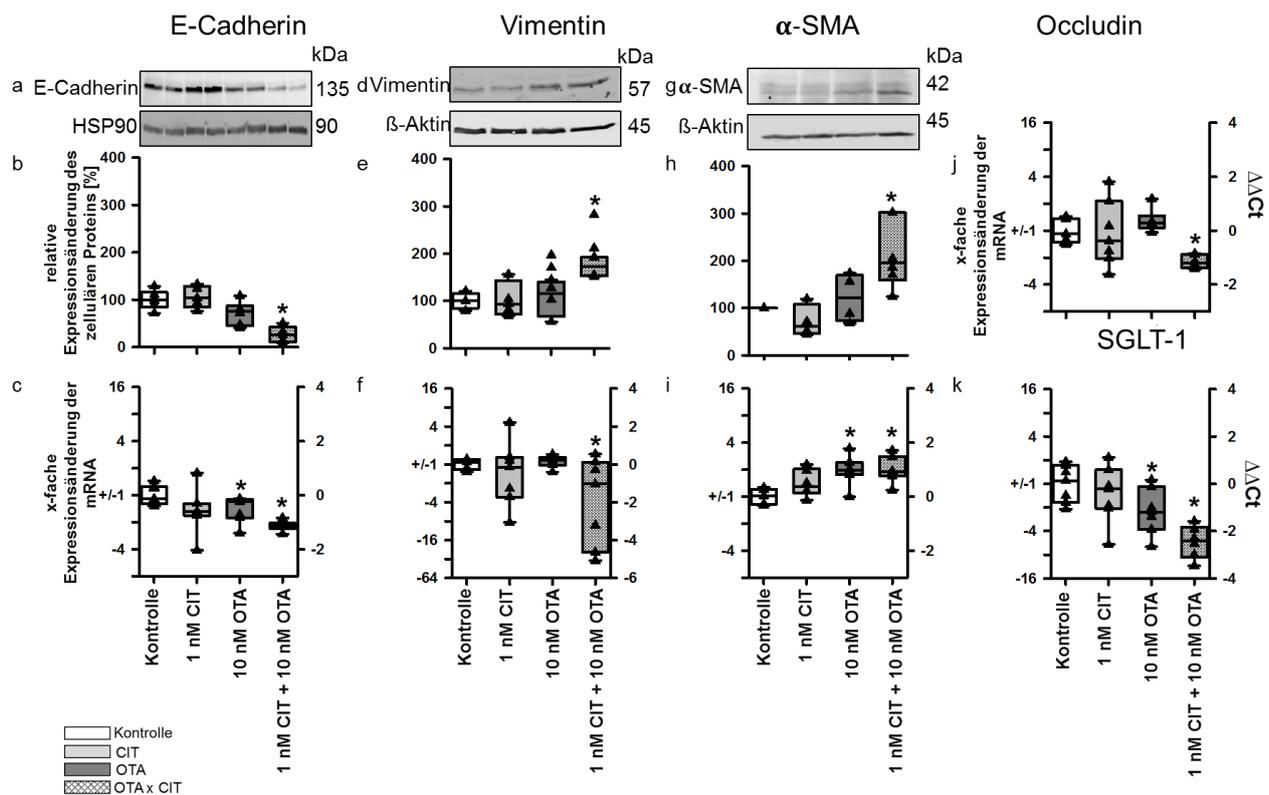


Abbildung 11: Mykotoxin-Effekt auf die Expression epithelialer und mesenchymaler Proteine und der für sie kodierenden mRNA in HK-2 Zellen. Repräsentative Western Blots von Proteinen aus Zellen nach Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT (a, d, g). Expressionsänderungen der E-Cadherin-, Vimentin- und α -SMA Proteine verglichen mit der Kontrollgruppe (b, e, h) und relative Änderungen der mRNA Expression von E-Cadherin, Vimentin, α -SMA, Occludin, SGLT-1 (c, f, i, j, k). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=7-9$, Inkubationszeit = 48 h.

Die Expression der für α -SMA kodierenden mRNA war nach Inkubation mit OTA allein und der Mykotoxinkombination erhöht (Abbildung 11 i). Tabelle 17 zeigt, dass es sich hierbei um eine additive Wirkung handelt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Gegensatz zur Expressionsänderung des Vimentin Proteins die Expressionsänderungen des E-Cadherin und α -SMA Proteins durch transkriptionelle Änderungen erklärbar sind.

Der Na⁺-Glukose-Kotransporter 1 (SGLT-1) ist ein für den proximalen Tubulus typischer Transporter, der im Laufe einer EMT verschwindet. Daher wurde eine mögliche Expressionsänderung der für den SGLT-1 kodierenden mRNA gemessen. Die Expression der für SGLT-1 kodierenden mRNA war nach Inkubation mit OTA vermindert. Dieser Effekt wurde durch simultane Inkubation mit CIT und OTA verstärkt (Abbildung 11 k). Der Vergleich von berechnetem Effekt und gemessenen Effekt ergab, dass es sich hierbei um eine additive Interaktion handelte (Tabelle 17).

3.1.5. Einfluss von CIT und OTA auf die Morphologie von HK-2 Zellen

Während einer EMT kann es wegen der Expressionsveränderung epithelialer und mesenchymaler Proteine zu morphologischen Änderungen kommen. Der Strukturindex (SI) wurde genutzt, um Aussagen über die Zellmorphologie zu treffen. Bei einer gesunden, kubisch geformten Epithelzelle ist ein SI von 0,85 zu erwarten. Abbildung 12 a zeigt, dass die unbehandelte Gruppe der HK-2 Zellen mit einem SI von 0.87 dieses Kriterium erfüllte. Ein verminderter SI deutet auf eine Veränderung der Zellmorphologie von kubisch zu spindelförmig hin. Abbildung 12 a zeigt, dass OTA allein zu einem leichten Absinken des SI führte. Die Kombination aus OTA und CIT verstärkte diesen Effekt. Es konnte berechnet werden, dass es sich hierbei um eine synergistische Interaktion handelte. Abbildung 12 a-b verdeutlicht, dass die Mykotoxinkombination zu einer Verminderung des SI, ohne den Flächeninhalt der Zellen zu verändern.

3.1.6. Einfluss von CIT und OTA auf die FITC-Dextran Diffusion von HK-2 Zellen

Wenn Zellkontakte wie *tight junctions* oder *adherens junctions* verändert werden kann das die Barrierefunktion der Zellen beeinflussen. Daher wurde die FITC-Dextran Diffusion durch eine Zellschicht aus HK-2 Zellen gemessen. Diese Messungen zeigten, dass sich weder CIT oder OTA alleine noch ihre Kombination auf die Barrierefunktion der Zellen auswirkten (Abbildung 13 a, b). Allerdings ist anzumerken, dass HK-2 Zellen eine sehr durchlässige Zellschicht bilden. Dies ist ein typisches Merkmal für Zellen des proximalen Tubulus und erschwert es, vor allem kleinere Änderungen ihrer Barrierefunktion zu erkennen.

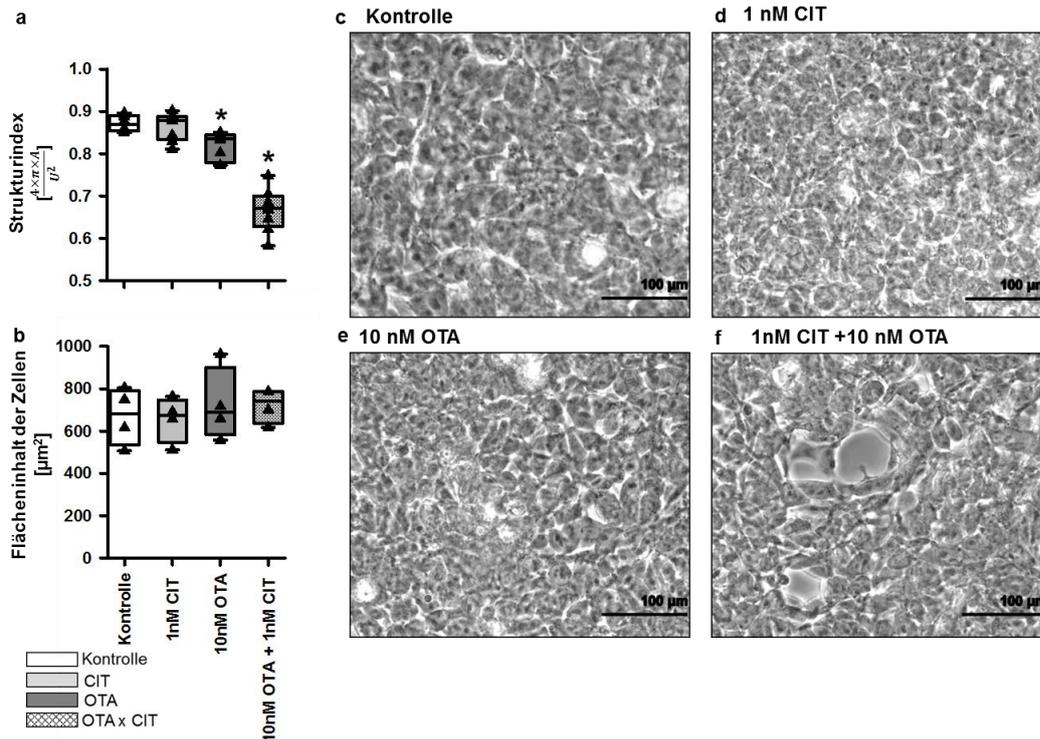


Abbildung 12: Mykotoxin-Effekt auf die Morphologie von HK-2 Zellen. Mykotoxin-Effekt auf die Zellform (a), Flächeninhalt der Zellen (b) nach Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT (c-f) Fotos der Zellen. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=9$, Inkubationszeit = 48 h.

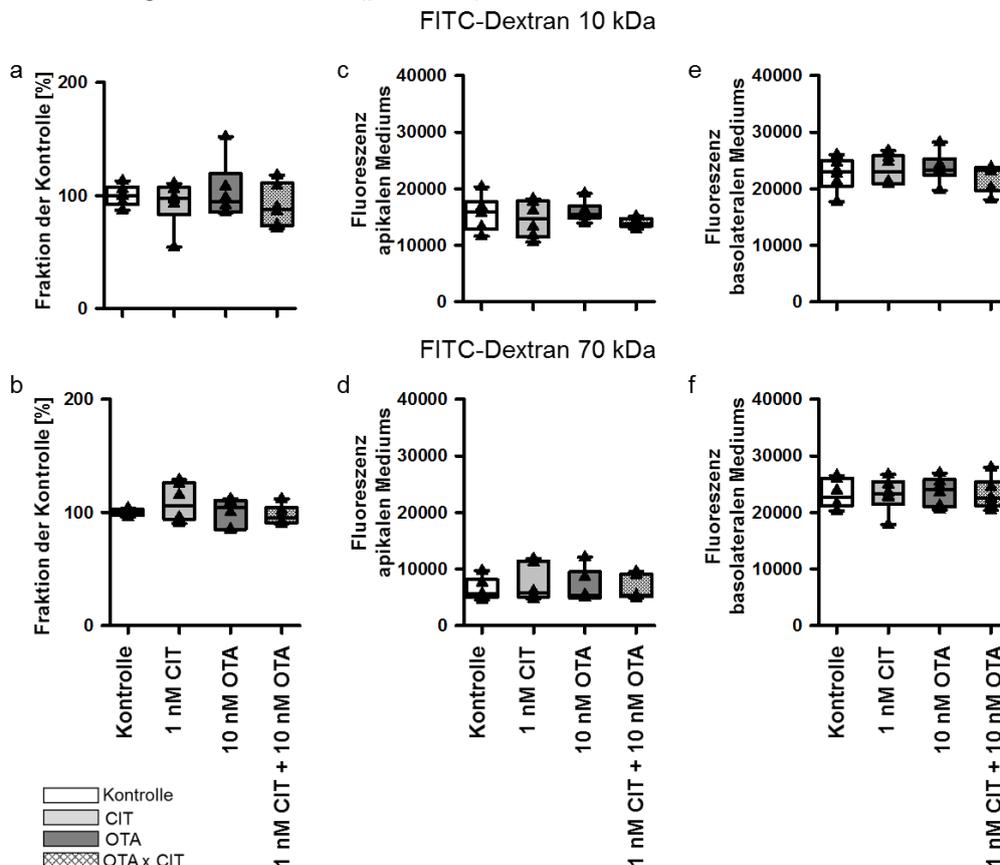


Abbildung 13: Mykotoxin-Effekt auf die Barrierefunktion von HK-2 Zellen. Diffusion von 10 kDa großen Dextran (a) und 70 kDa großen Dextran (b) nach 24 h Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT. (c, d) Fluoreszenz von apikalen und (e, f) basolateralen FITC-Dextran enthaltenden Medium nach 24 h Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT. $n = 9$.

3.1.7. Einfluss von CIT und OTA auf die Expression von Kollagen IV in HK-2 Zellen

Kollagen IV ist Hauptbestandteil der Basalmembran. Diese wird im Laufe einer EMT degradiert. Abbildung 14 a zeigt, dass die Menge sezernierten Kollagen IV nach Inkubation mit CIT leicht vermindert war. Dieser Effekt ist nach Inkubation mit der Mykotoxinkombination nicht verändert. Im Gegensatz dazu führte weder die Inkubation mit OTA und CIT einzeln, noch deren Kombination zu veränderten Expressionen des intrazellulären Kollagen IV Proteins oder der für Kollagen IV kodierenden mRNA (Abbildung 14 b-c).

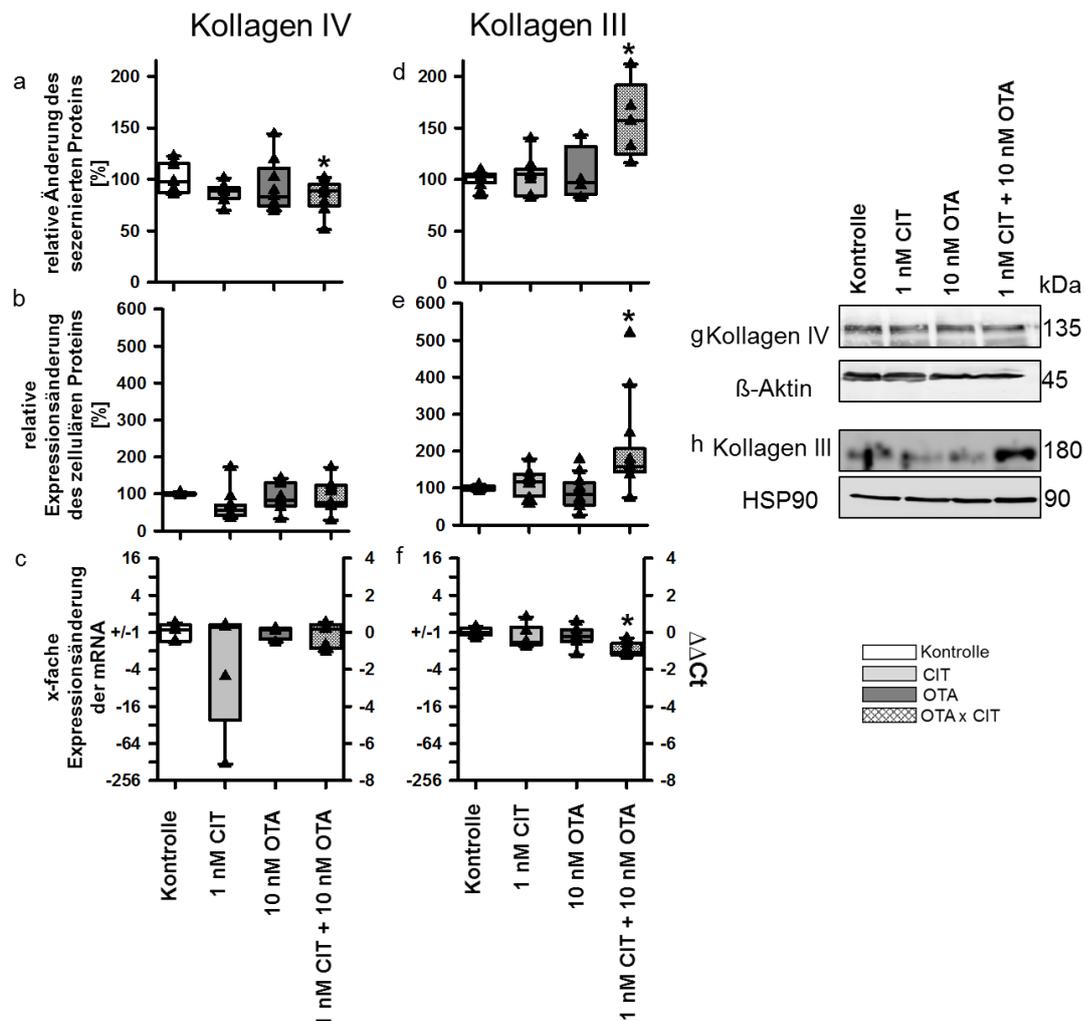


Abbildung 14: Mykotoxin-Effekt auf die Expression von Kollagen IV und Kollagen III in HK-2 Zellen. Mykotoxin-Effekt auf sezernierte Kollagene (a,d), intrazelluläre Expressionsänderungen (b, e) und relative Änderungen der mRNA-Expression (c, f) nach 48 h Inkubation mit 10 nM OTA und/oder 1 nM CIT. Repräsentative Western Blots (g, h). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-12$, Inkubationszeit = 48 h.

3.1.8. Einfluss von CIT und OTA auf die Expression von Kollagen III in HK-2 Zellen

Kollagen III ist ein Vertreter der fibrösen extrazellulären Matrixproteine. In Abbildung 14 d ist zu sehen, dass die Inkubation mit OTA oder CIT keinen Einfluss auf die Menge von sezerniertem Kollagen III hat, während die Kombination aus beiden zu einer Expressionserhöhung von extrazellulärem Kollagen III führt.

Dies spricht für eine qualitativ synergistische Wirkung von OTA und CIT. Dieser Effekt ließ sich auch für intrazelluläres Kollagen III messen (Abbildung 14 e). Im Gegensatz dazu fand sich dieses Muster in der Expression der für Kollagen III kodierenden mRNA nicht wieder (Abbildung 14 f), dies spricht für eine posttranskriptionelle Regulation, z.B. eine veränderte Enzymaktivität Matrixprotein-abbauender Proteine oder ihrer Inhibitoren.

Tabelle 17 Vergleich des Erwartungswerts mit der gemessenen Änderung der mRNA-Expression.

mRNA	berechneter Erwartungswert [X-Fache Änderung]	Gemessener Kombinationseffekt [X-Fache Änderung]	Signifikanter* Unterschied
IL-6	+1,3 ± 1,3	+0,5 ± 0,7	nein
TNF	+6,1 ± 2,5	+17,4 ± 6,6	ja
iNOS	+0,3 ± 0,9	-0,4 ± 0,5	nein
COX-2	-1,8 ± 0,8	-2,2 ± 0,3	nein
E-Cadherin	-2,9 ± 0,7	-2,4 ± 0,2	nein
Occludin	+0,3 ± 1,1	-2,3 ± 0,2	ja
Vimentin	-0,3 ± 1,6	-9,8 ± 5,3	ja
α-SMA	+4,1 ± 1,0	+2,1 ± 0,3	nein
SGLT-1	-3,6 ± 1,3	-5,4 ± 1,3	ja
Kollagen III	-1,2 ± 0,8	-1,9 ± 0,2	nein
Kollagen IV	-7,8 ± 4,5	-0,5 ± 0,8	nein

* Signifikanter Unterschied: nein = additive Interaktion, ja = synergistische Interaktion

Tabelle 18 Vergleich des Erwartungswerts mit der gemessenen Expressionsänderung der Proteine mit Angabe der statistischen Signifikanz.

Protein	berechneter Erwartungswert relative Änderung [%]	Gemessener Kombinationseffekt relative Änderung [%]	Signifikanter* Unterschied
TNF	0 ± 15	+85 ± 17	ja
COX-2	-11 ± 12	-51 ± 7	ja
E-Cadherin	-23 ± 14	-74 ± 7	ja
Vimentin	+17 ± 22	+98 ± 20	ja
α-SMA	-7 ± 31	+115 ± 30	ja
Kollagen III	0 ± 18	+106 ± 36	ja
Kollagen IV	-40 ± 20	-5 ± 15	nein

* Signifikanter Unterschied: nein = additive Interaktion, ja = synergistische Interaktion

3.1.9. Rolle des MAPK-Weg bei der Vermittlung von Mykotoxineffekten

3.1.9.1. Abhängigkeit der Mykotoxineffekte vom MAPK-Weg

Um zu testen, ob die bisher beschriebenen Mykotoxineffekte vom MAPK-Weg abhängen, wurde der Einfluss von MAPK auf die Expression der für TNF kodierenden mRNA überprüft. Um dies umzusetzen wurden spezifische Inhibitoren der drei Hauptgruppen der MAP-Kinasen ERK1/2, JNK1/2 und p38 genutzt. Abbildung 15 a zeigt, dass die Inhibition von ERK1/2 mittels 10 μ M U0126 sowie die Inhibition von JNK1/2 mittels 10 μ M SP600125 den Effekt der Mykotoxinkombination auf die Expression von für TNF kodierenden mRNA verminderte. Im Gegensatz dazu blieb der Mykotoxineffekt bei Hemmung von p38 mit 10 μ M SB203580 unverändert. Die daraus folgende Annahme ist, dass eine simultane Hemmung von ERK1/2 und JNK1/2 den Mykotoxineffekt minimiert. Allerdings führte allein die gleichzeitige Behandlung mit jeweils 10 μ M U0126 und SP600125 zu markanten Änderungen. Dies zeigte sich in Veränderungen der Zellmorphologie und des extrazellulären pH-Werts (Abbildung 16). Die pH-Änderungen sind in Tabelle 19 aufgeführt. Beispielsweise sank der pH-Wert nach 18 h um $0,23 \pm 0,03$ pH-Einheiten in der Kontrollgruppe und in der Mykotoxingruppe um $0,28 \pm 0,04$. Nach gleichzeitiger Inkubation mit ERK1/2 und JNK1/2-Inhibitoren verminderte sich der pH-Wert bereits um $0,44 \pm 0,03$ Einheiten, was zeigt, dass der pH-Wert im Medium deutlich abnimmt und die Zellen zusätzlich gestresst werden.

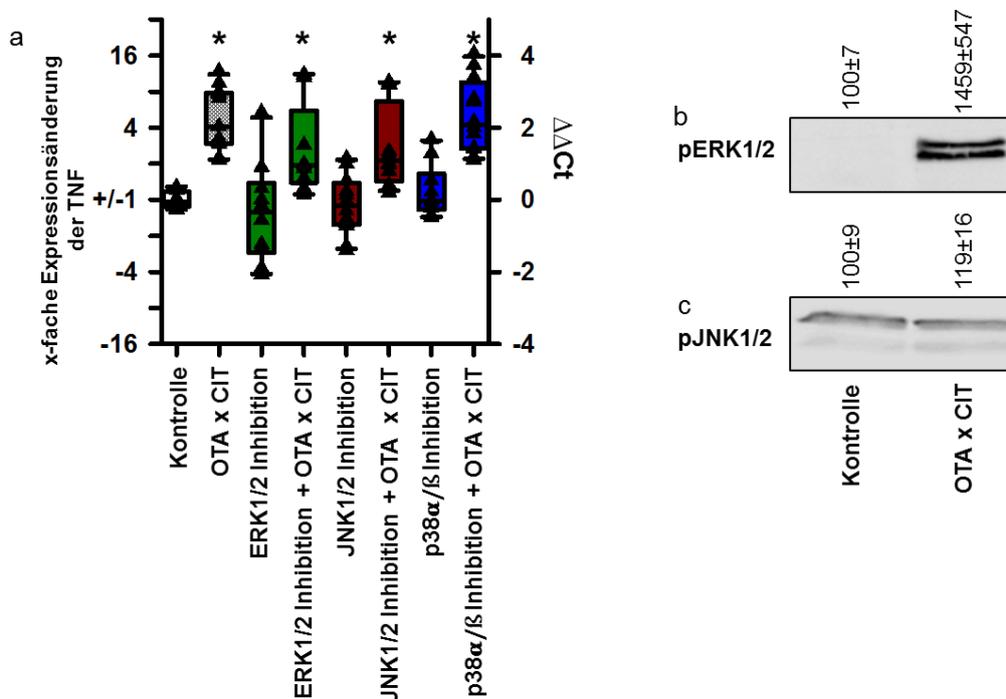


Abbildung 15: Rolle von MAP-Kinasen an der Mykotoxin-induzierten Erhöhung der für TNF kodierenden mRNA. Der Effekt von MAPK-Inhibitoren auf die mRNA-Expression von TNF. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "***" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-12$, Inkubationszeit = 48 h (a). Repräsentative Western Blots von (b) phospho-

ERK1/2 und (c) phospho-JNK1/2. Die Zahlen über den Blots geben die Veränderung im Vergleich zur Kontrolle an.

Nach Exposition mit der Mykotoxinkombination und gleichzeitiger ERK1/2 und JNK1/2-Hemmung fiel der pH-Wert um $0,46 \pm 0,02$ Einheiten. Weil die Kombination der Inhibitoren adverse Effekte hervorriefen, war es nicht möglich zu überprüfen, ob eine simultane Hemmung der MAPK ERK1/2 und JNK1/2 den Mykotoxineffekt auf die Expression von TNF mRNA vermindert oder nicht.

3.1.9.2. Effekt der Mykotoxinkombination auf phosphorylierte MAP-Kinasen

Weil die MAPK ERK1/2 und JNK1/2 sich als potentielle Mediatoren der Mykotoxineffekte herauskristallisiert haben, wurde im Folgenden überprüft, ob die Mykotoxinkombination die Expression von phosphorylierten, und damit aktiviertem, ERK1/2 bzw. JNK1/2 verändert. Im Falle von ERK1/2 zeigen die Ergebnisse, dass sowohl CIT (292 ± 112 %), als auch OTA (557 ± 179 %) die Expression von phosphorylierten ERK1/2 erhöhten. Die Mykotoxinkombination hatte einen noch größeren Effekt auf die Expression von phosphorylierten ERK1/2 ($1459 \pm 47\%$), der einen additiven Effekt überstieg. Die Expression von phosphorylierten JNK1/2 wurde im Gegensatz dazu durch keine Behandlung verändert. Dies legt nahe, dass ERK1/2 durch die Mykotoxinkombination aktiviert wird und so einige Effekte vermittelt, während JNK1/2 mehr eine passive Rolle innehat, und die Mykotoxine, eine basale JNK1/2 Aktivität benötigen, um Veränderungen zu vermitteln.

Tabelle 19 Änderung des extrazellulären pH-Werts

	Kontrolle	OTA + CIT	U0126 + SP125600	OTA+CIT+U0126+SP125600
0 h	pH 7,6			
18 h	$7,32 \pm 0,03$	$7,32 \pm 0,03$	$7,16 \pm 0,03$	$7,14 \pm 0,02$
24 h	$7,16 \pm 0,03$	$7,20 \pm 0,04$	$6,98 \pm 0,03$	$6,98 \pm 0,05$
48 h	$6,93 \pm 0,09$	$7,00 \pm 0,11$	$6,64 \pm 0,09$	$6,41 \pm 0,10$

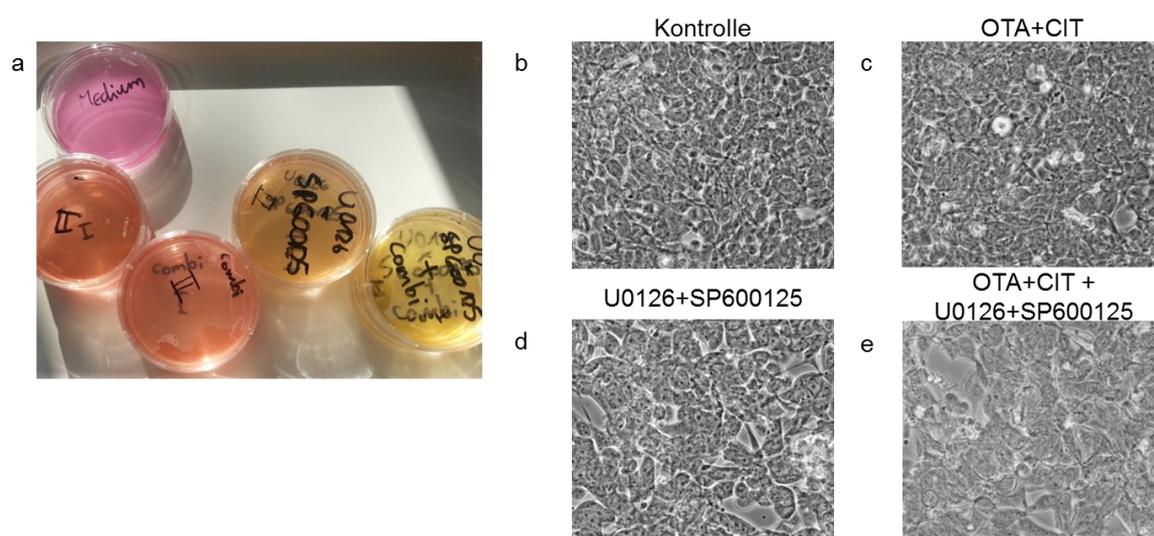


Abbildung 16: Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf den pH-Wert im Zellkulturmedium und die Morphologie der Zellen. Kombination aus U0126 und SP600125 vermindert den extrazellulären pH-Wert (a) und führt zu morphologischen Änderungen der HK-2 Zellen (b-e).

3.2. Teil II Modulation der nephrotoxischen OTA-Wirkung durch die Kommunikation von Epithelzellen und Fibroblasten

3.2.1. Einfluss der Kokultur auf Expressionsänderungen von mRNAs

Zunächst sollte geklärt werden, inwiefern bereits die Kokultur, eine Auswirkung auf die Zellen hat. Hierzu wurde mittels RT-qPCR der Schwellenwertzyklus (Ct) von mRNAs gemessen, die bekanntermaßen während einer Inflammation, EMT und/oder Fibrose verändert sind. Dies erfolgte in Mono- und Kokultur. Zunächst wurden die Ct-Werte wie in Kapitel 2.15. beschrieben mit einer internen Kontrolle normalisiert (ΔCt). Anschließend wurden die ΔCt -Werte der Monokultur mit den ΔCt -Werten der Kokultur verglichen ($\Delta\Delta Ct$) um so eine Aussage über Expressionsänderungen der mRNAs zu treffen. Nach drei Tagen in Kokultur stieg in Epithelzellen der mRNA-Expression von IL-6, MCP-1 und TNF, während die mRNA-

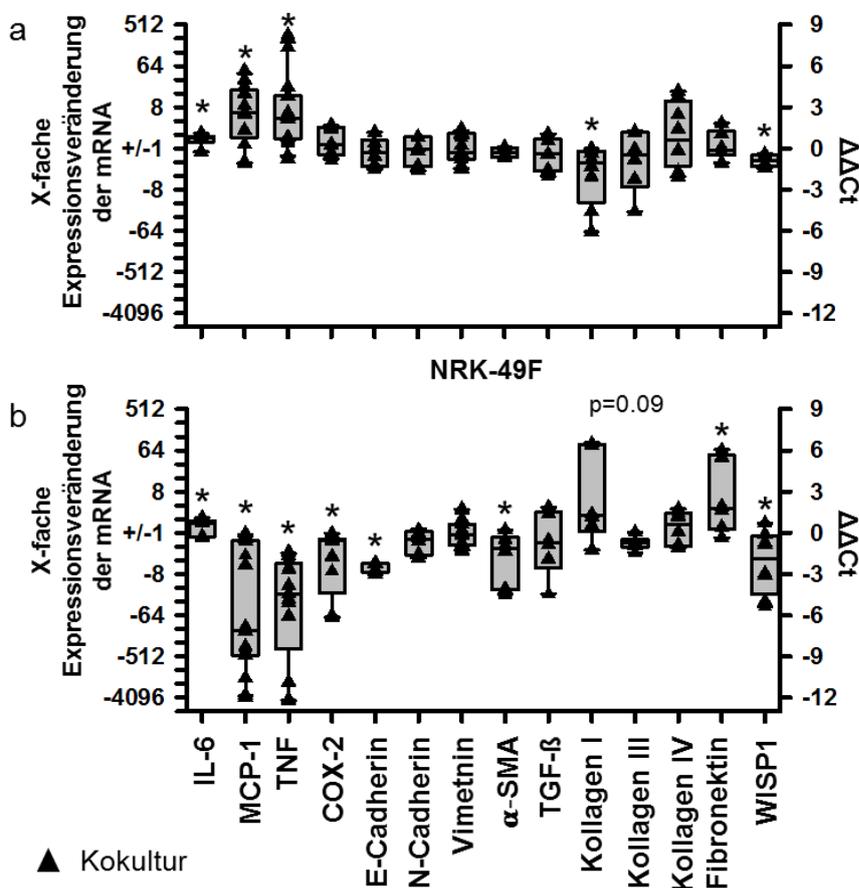


Abbildung 17: Effekt der Kokultur auf die Änderung der mRNA-Expression. Kokultur-Effekt auf die Expression an der Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose beteiligter mRNAs in NRK-52E (a) und NRK-49F (b)

Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=6-15$, Inkubationszeit = 48 h

Expression von Kollagen I und WISP1 vermindert war. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Expression der für COX-2, E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin, α -SMA, TGF- β , Kollagen III, IV und Fibronectin kodierenden mRNAs unverändert war (Abbildung 17 a).

In Fibroblasten wiederum konnte nach 3 Tagen in Kokultur eine Expressionsverminderung der für IL-6, MCP-1, TNF, COX-2, E-Cadherin, α -SMA und WISP1 kodierenden mRNAs gemessen werden, während die Expression der für Kollagen I und Fibronectin kodierenden mRNAs erhöht war. Außerdem war in Fibroblasten die Expression der für N-Cadherin, Vimentin, TGF- β , Kollagen III und IV kodierenden mRNAs unverändert (Abbildung 17 b).

3.2.2. Einfluss von OTA auf die Zellviabilität von NRK-52E und NRK-49F Zellen

OTA in Konzentrationen von 10-1000 nM hatte in Epithelzellen in Monokultur keinen Einfluss auf die Caspase-3 Aktivität, während 1000 nM OTA zu einem Absinken des zellulären Gesamtproteins und zu einem Anstieg der LDH-Freisetzung führte (Abbildung 18 a-c). In der Fibroblasten Monokultur führte die OTA-Exposition nicht zu einer Änderung des zellulären Gesamtproteins sowie der LDH-Freisetzung. Allerdings hatte die Inkubation mit 1000 nM OTA einen Anstieg der Caspase-3 Aktivität zur Folge (Abbildung 18 d-f).

In Kokultur hatte OTA keinen Einfluss auf das zelluläre Gesamtprotein, die Caspase-3 Aktivität und die LDH-Freisetzung beider Zelllinien. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Zellen in Kokultur gegenüber der OTA-Effekte auf die Viabilität in den hier verwendeten Konzentrationen geschützt sind (Abbildung 18 g-k).

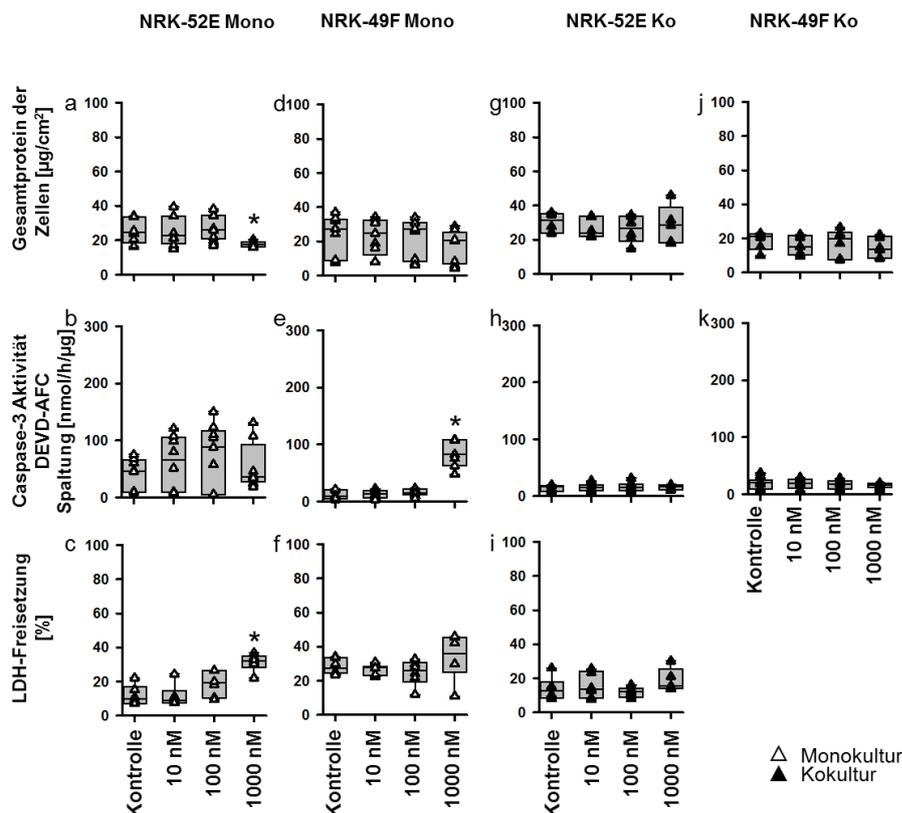


Abbildung 18: OTA-Effekt auf die Viabilität von NRK52E und NRK-49F unter Mono- und Kokulturbedingung. Gesamtprotein der Zellen (a, d, g, j), Caspase-3 Aktivität (b, e, h, k) und LDH-Freisetzung (c, f, i) wurden nach 48 h Inkubation mit OTA in NRK-52E unter Mono- (a-c-) und Kokulturbedingungen (g-i) und in NRK-49F in Mono- (d-f) und Kokultur (j-i) gemessen. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=6-9$.

3.2.3. Einfluss von OTA auf nephrotoxische Änderungen in Epithelzellen

Zunächst einmal ist zu bemerken, dass OTA in den Epithelzellen (NRK-52E) in Monokultur die Expression von keinem der im Folgenden beschriebenen Proteine oder mRNAs verändert hat (Abbildung 19, 20, 22), daher beziehen sich die im Folgenden beschriebenen Änderungen auf den OTA-Effekt in NRK-52E unter Kokulturbedingungen.

3.2.3.1. Einfluss von OTA auf das inflammatorische Zytokine TNF und das Enzym COX-2 in NRK-52E Zellen

Um zu testen, ob OTA zu inflammatorischen Änderungen führen kann, wurde die Expression der bei einer Inflammation typischerweise beteiligten Proteine TNF und COX-2 gemessen. Nach 48-stündiger Inkubation von NRK-52E mit 10 nM OTA sank die Expression des TNF Proteins. Exposition mit 100 nM OTA führte zu einer Expressionsverminderung des TNF Proteins und des COX-2 Proteins (Abbildung 19 b, e).

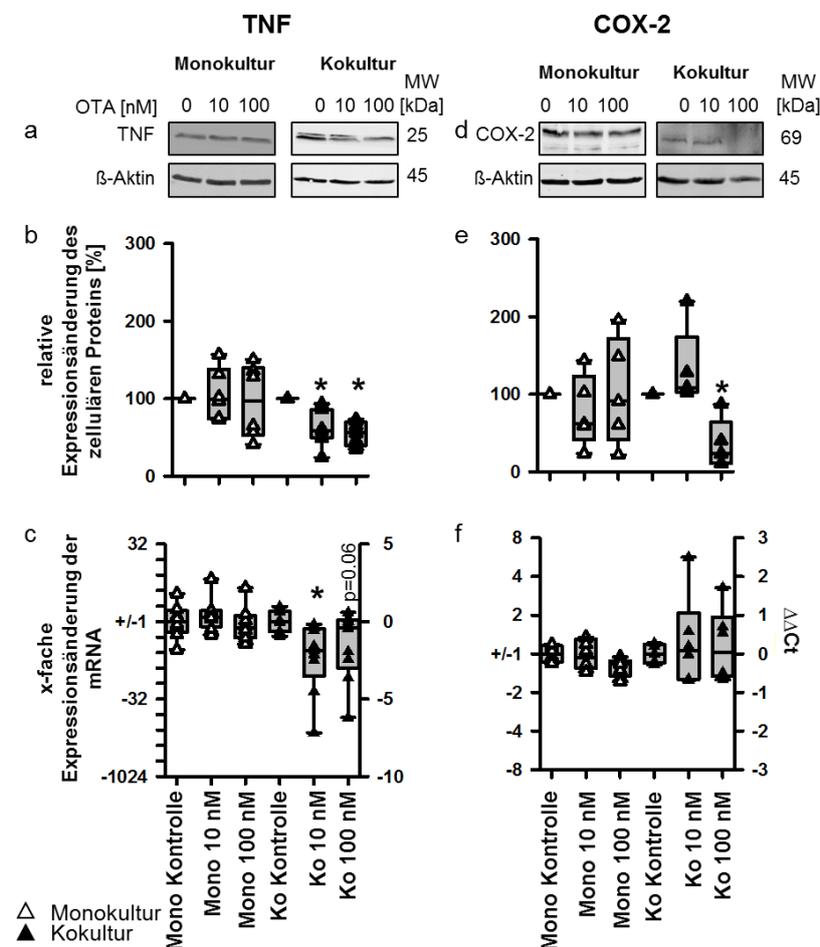


Abbildung 19: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen des inflammatorischen Zytokins TNF und des Enzyms COX-2 in NRK-52E. OTA-Effekt auf TNF- und COX-2 Protein (a, b, d, e) und mRNAs (c, f) in Mono- und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnenen Proteine nach OTA-Inkubation (a, d). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “**” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-9$.

Um Hinweise auf eine direkte transkriptionelle Regulation zu erhalten, wurde die Expressionsänderung der für TNF und COX-2 kodierenden mRNA gemessen, aber OTA hatte keinen Einfluss auf die Expression dieser mRNAs (Abbildung 19 c, f). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine proinflammatorische Wirkung von OTA auf Epithelzellen in Kokultur.

3.2.3.2. Einfluss von OTA auf die Dedifferenzierung von NRK-52E Zellen

Die Inkubation mit 10 nM OTA führte nach 48 h in Epithelzellen zu einer Expressionsverminderung des epithelialen Proteins E-Cadherin und zu einer Expressionserhöhung der mesenchymalen Proteine Vimentin und Fibronektin. 100 nM OTA bewirkten weiterhin eine Expressionsverminderung des E-Cadherin Proteins und einen Expressionsanstieg des Fibronektin Proteins, hatte aber keinen Einfluss auf Vimentin (Abbildung 20 b, e, h). Die Expression der für diese Proteine kodierenden mRNAs war in NRK-52E unverändert (c, f, i).

Diese Änderungen deuten darauf hin, dass OTA in Epithelzellen exklusiv unter Kokulturbedingungen die Entstehung einer EMT begünstigt.

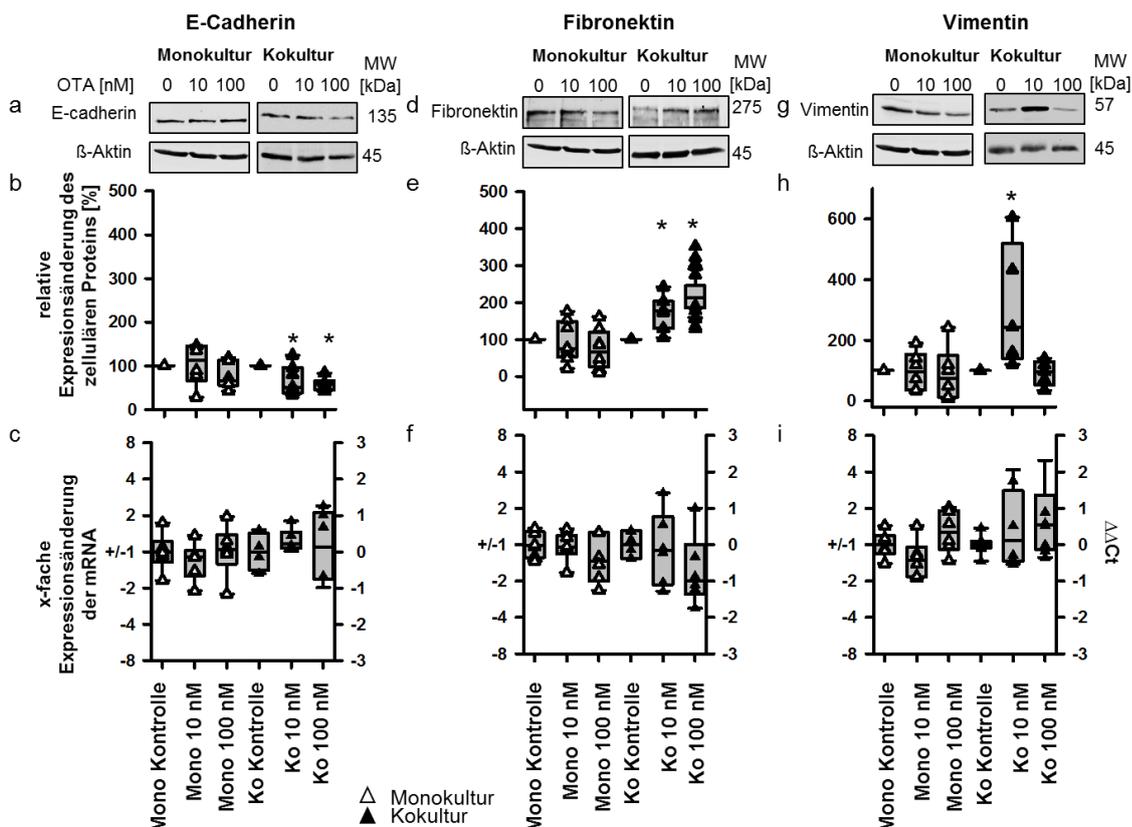


Abbildung 20 Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Proteine und mRNAs in NRK-52E. OTA-Effekt auf E-Cadherin, Fibronektin und Vimentin Protein (a, b, d, e, g, h) und mRNAs (c, f, i) in Mono- und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnenen Proteinen nach OTA-Inkubation (a, d, g). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-50$.

3.2.3.3. Einfluss von OTA auf die Morphologie von NRK-52E Zellen

Um die Morphologie Epithelzellen zu beurteilen, wurde der Strukturindex (SI) ermittelt. Im Falle der Epithelzellen konnte für die unbehandelte Kontrollgruppe ein SI von $0,85 \pm 0,02$ ermittelt werden. Dies ist ein Wert, der für gesunde Epithelzellen zu erwarten ist.

Die Inkubation mit 10 und 100 nM OTA führte zu einem moderaten Absinken des SI und liefert einen Hinweis auf morphologische Änderungen der kubischen Epithelzellen hin zu mehr spindelförmigen mesenchymalen Zellen hin (Abbildung 21 a-b).

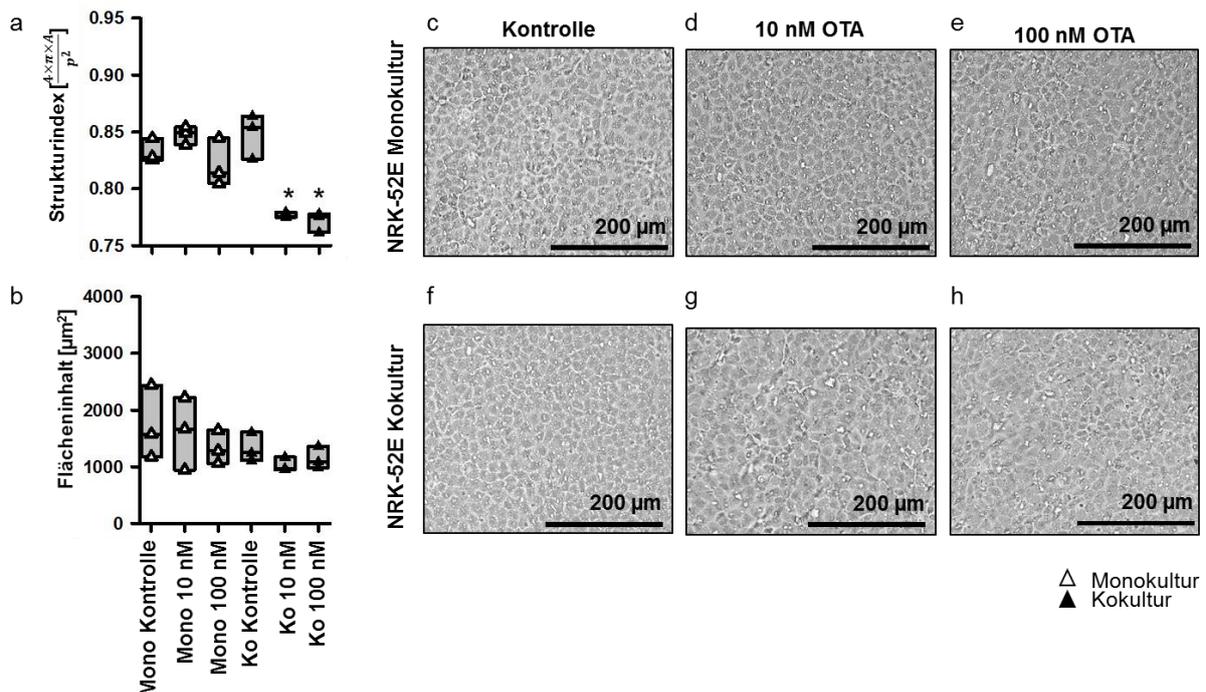


Abbildung 21: OTA-Effekt auf die Morphologie von NRK-52E. (a) OTA-Effekt auf die Zellform und (b) auf den Flächeninhalt der Zellen. (c-f) Repräsentative Bilder. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$, $n=3$).

3.2.3.4. Einfluss von OTA auf die Expression von Matrixproteinen in NRK-52E Zellen

Nach Exposition mit 10 nM OTA war die Expression von Kollagen III und WISP1 Protein nicht verändert. 100 nM OTA führten hingegen zu einer Expressionsverminderung des Kollagen III Proteins, während die WISP1 Proteinexpression weiterhin unverändert vorlag (Abbildung 22 b, e). OTA (10 nM) hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von Kollagen III während 100 nM OTA eine erhöhte WISP1 mRNA-Expression verursachten (Abbildung 22 c, f). Diese Ergebnisse liefern keine Hinweise darauf, dass OTA eine profibrotische Wirkung in den Epithelzellen Zellen hervorruft.

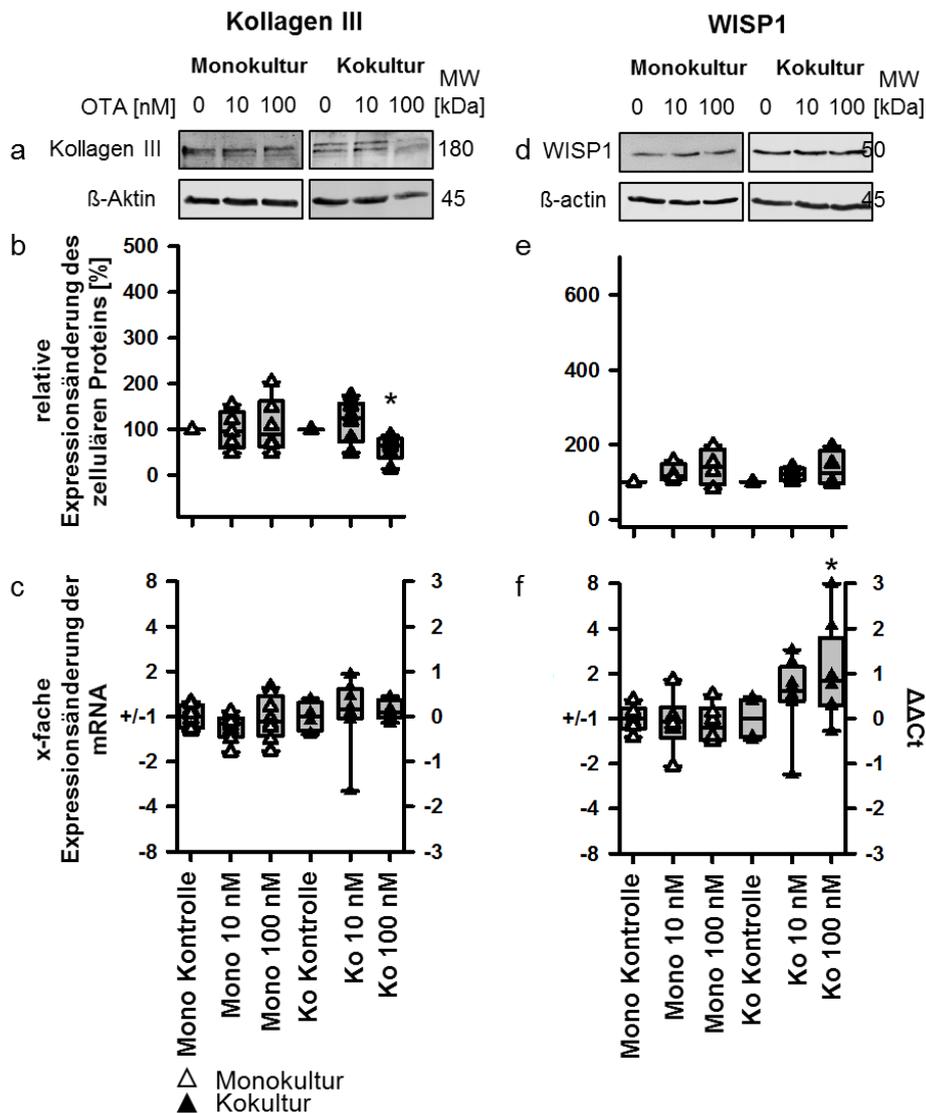


Abbildung 22: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen von Matrixproteinen und mRNAs in NRK-52E. OTA-Effekt auf Kollagen III, und WISP1 Protein (a, b, d, e) und mRNAs (c, f) in Mono und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnenen Proteine nach OTA-Inkubation (a, d). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-8$.

3.2.4. Einfluss von OTA auf nephrotoxische Änderungen in Fibroblasten

3.2.4.1. Einfluss von OTA auf das inflammatorische Zytokin TNF und das Enzym COX-2 in NRK-49F Zellen

In der Monokultur führte OTA in NRK-49F Zellen zu einer Expressionsverminderung von TNF und hatte keinen Einfluss auf die Expression des COX-2 Proteins (Abbildung 23 b, e). Die Expression der für diese Proteine kodierenden mRNAs war nicht verändert (Abbildung 23 c, f). In Kokultur verschwand die OTA-induzierte Expressionsverminderung des TNF-Proteins und die Expression des COX-2 Proteins war erhöht. Nach Inkubation mit 100 nM OTA war die Expression der TNF- und COX-2 mRNA erhöht (Abbildung 23 b, c, e, f).

Diese Daten weisen auf eine proinflammatorische Wirkung von OTA auf NRK-49F Zellen in Kokultur hin.

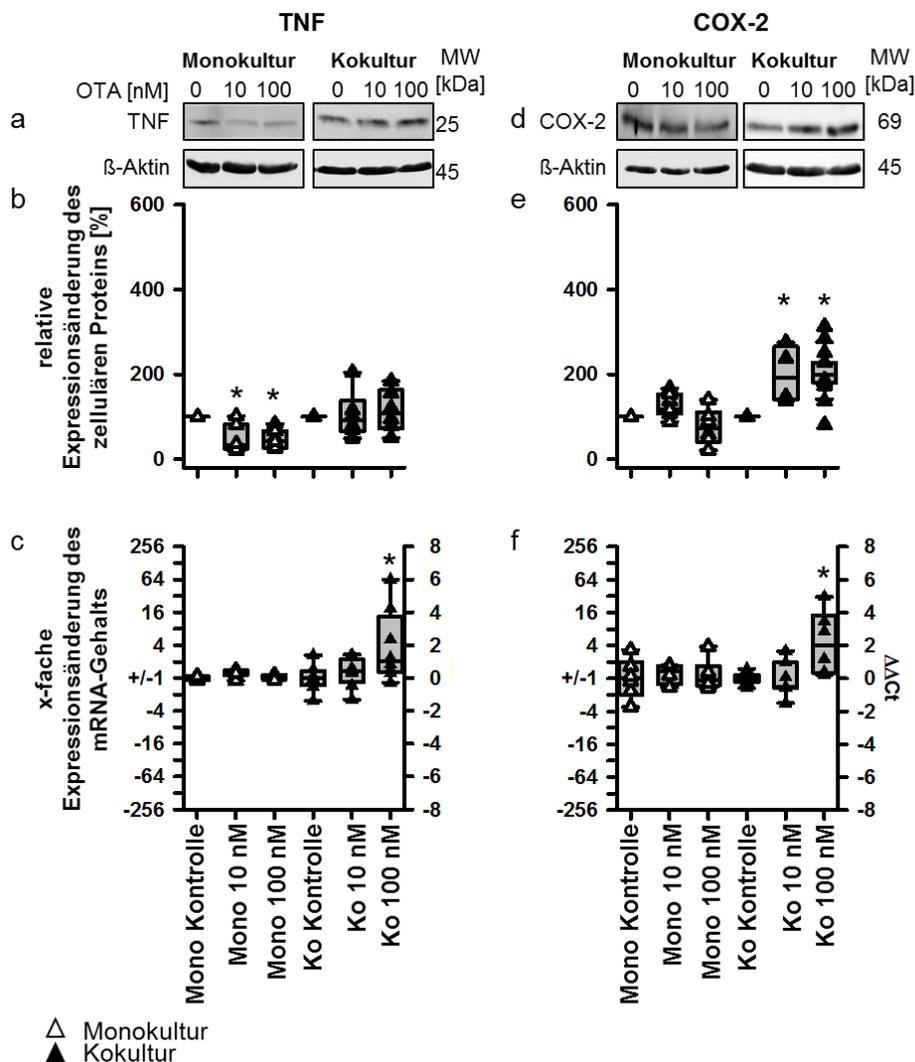


Abbildung 23: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen des inflammatorischen Zytokins TNF und des Enzyms COX-2 in NRK-49F. OTA-Effekt auf TNF und COX-2 Protein (a, b, d, e) und mRNAs (c, f) in Mono und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnen Proteinen nach OTA-Inkubation (a, d). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “**” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-9$.

3.2.4.2. Einfluss von OTA auf die Dedifferenzierung von NRK-49F Zellen

OTA hat keinen Einfluss auf die Protein- oder mRNA-Expression von N-Cadherin oder Vimentin in NRK-49F in Monokultur. Unter Kokulturbedingungen führte die Inkubation mit OTA zu einem Expressionsanstieg von N-Cadherin Protein und zu einer Expressionsverminderung des Vimentin Proteins. Des Weiteren war die Expression der N-Cadherin mRNA nach Inkubation mit 100 nM OTA erhöht.

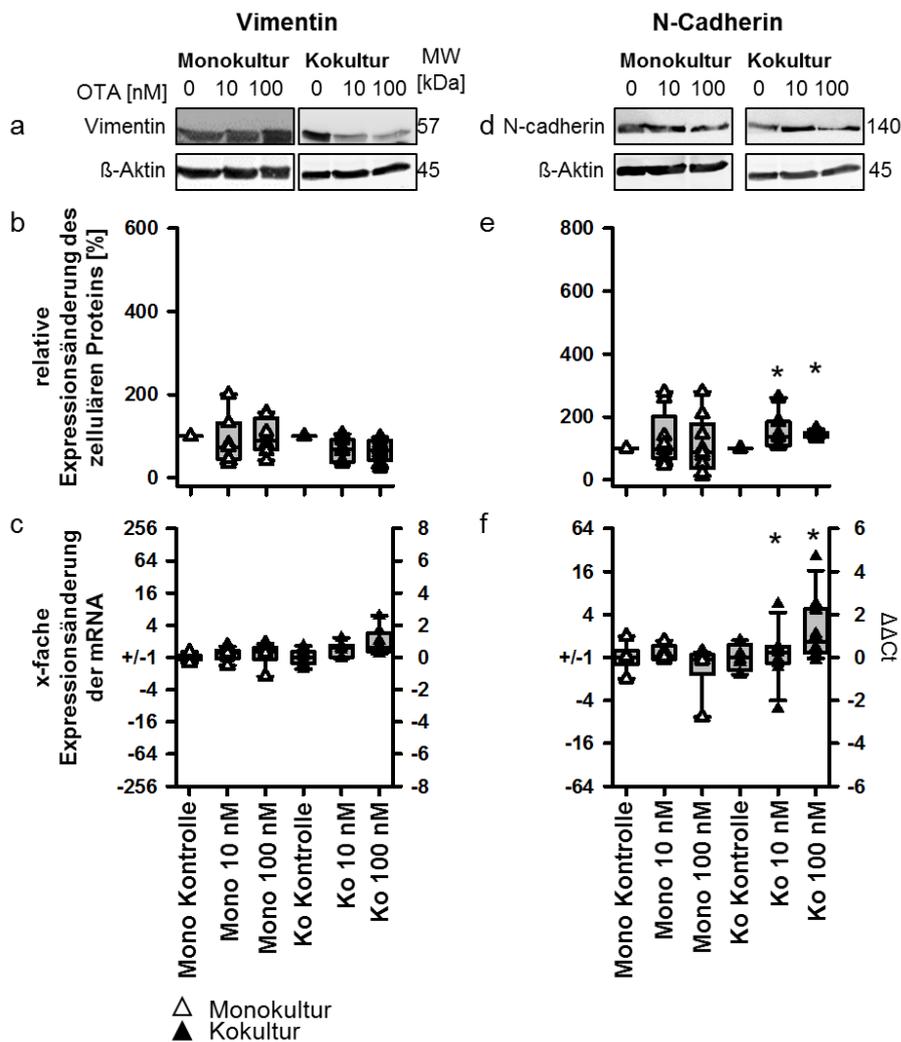


Abbildung 24 Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Proteine und mRNAs in NRK-49F. OTA-Effekt auf N-Cadherin und Vimentin Protein (a, b, d, e) und mRNAs (c, f) in Mono und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnenen Proteine nach OTA-Inkubation (a, d, g). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle werden mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-9$.

3.2.4.3. Einfluss von OTA auf die Expression von Matrixproteinen in NRK-49F Zellen

In NRK-49F in Monokultur führte die Inkubation mit OTA zu einem Expressionsanstieg des Kollagen I und Fibronectin Proteins, während die Expression des WISP1 Proteins nicht verändert war (Abbildung 25 b, e, h). Außerdem war die Expression der für Matrixkomponenten kodierenden mRNAs unverändert (Abbildung 25 c, f, i). In Kokultur hingegen verschwand der OTA-Effekt auf die Proteinexpression von Kollagen I und Fibronectin. Im Gegensatz dazu war die WISP1 Proteinexpression nach Inkubation mit 100 nM OTA erhöht (Abbildung 25 b, e, h). Auch unter Kokulturbedingungen hatte OTA keinen Einfluss auf die mRNA-Expression der betrachteten Proteine (Abbildung 25 c, f, i).

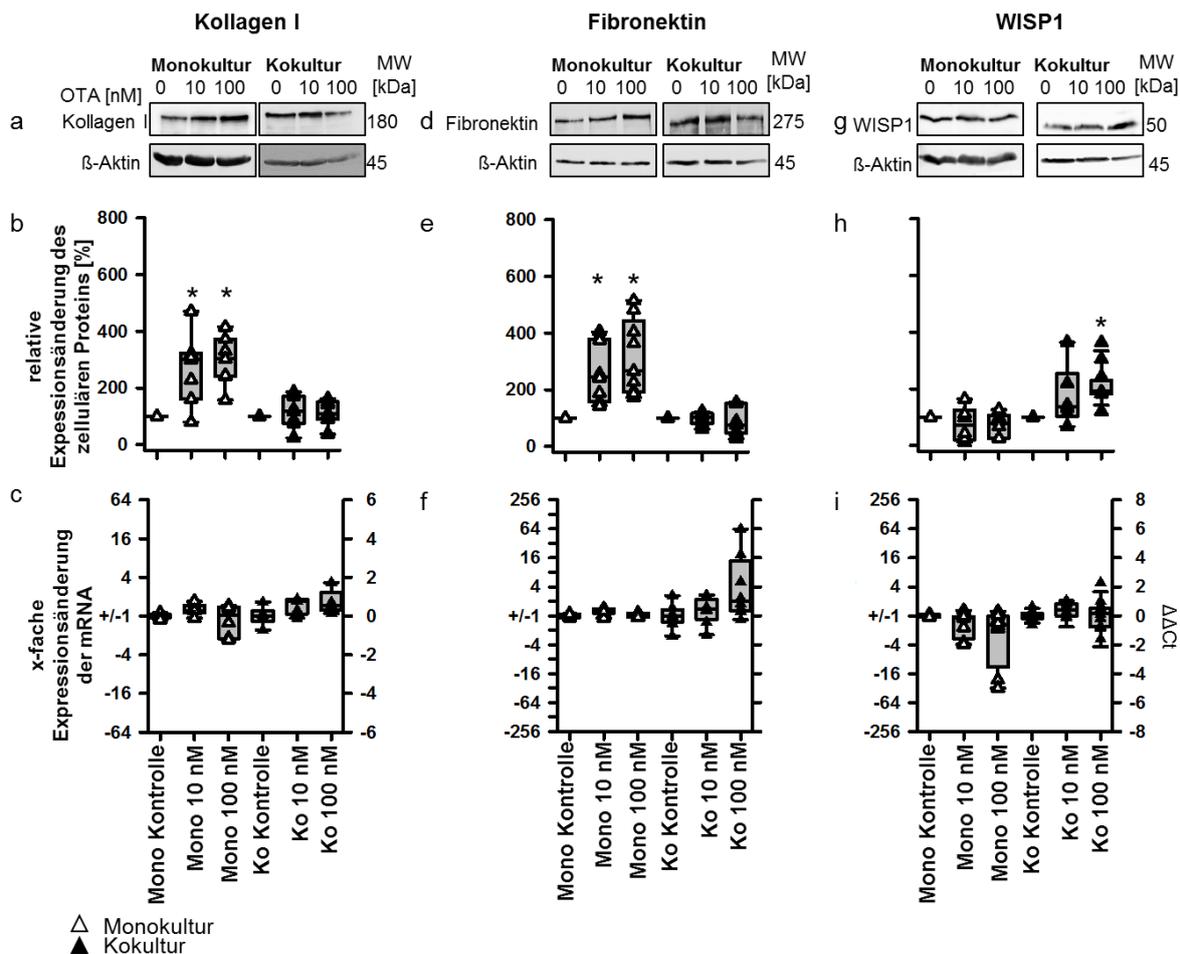


Abbildung 25: Einfluss von OTA auf Expressionsänderungen von Matrixproteinen und mRNAs in NRK-49F. OTA-Effekt auf Kollagen I, Fibronektin und WISP1 Protein (a, b, d, e, g, h) und mRNAs (c, f, i) in Mono- und Kokultur. Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnen Proteinen nach OTA-Inkubation (a, d, g). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5-10$.

3.2.5. Effekt von konditionierten Kokultur-Medium auf Zellen in Monokultur

Es ist möglich, dass in das Zellkulturmedium sezernierte Substanzen an der Vermittlung des OTA-Effekts in Kokultur beteiligt sind. Daher wurde der Effekt von konditioniertem Medium getestet. Hierzu wurde Medium von Zellen, die für 48 h in Kokultur waren, gesammelt (konditioniertes Medium) und für weitere 48 h sowohl auf NRK-52E als auch auf NRK-49F Zellen jeweils in Monokultur transferiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine darin isoliert und analysiert. Konditioniertes Medium von der mit OTA behandelten Gruppe, verglichen mit Medium der unbehandelten Kontrollgruppe, verursachte einen Expressionsanstieg des Fibronektin Proteins in Epithelzellen in Monokultur und eine Expressionserhöhung des COX-2 Proteins in Fibroblasten in Monokultur (Abbildung 26). Dies konnte nicht nach OTA-Inkubation der Zellen in Monokultur ohne konditioniertes Medium gezeigt werden. Die hier gezeigten Effekte entsprechen den oben beschriebenen OTA-Effekten, die exklusiv unter Kokulturbedingungen auftreten.

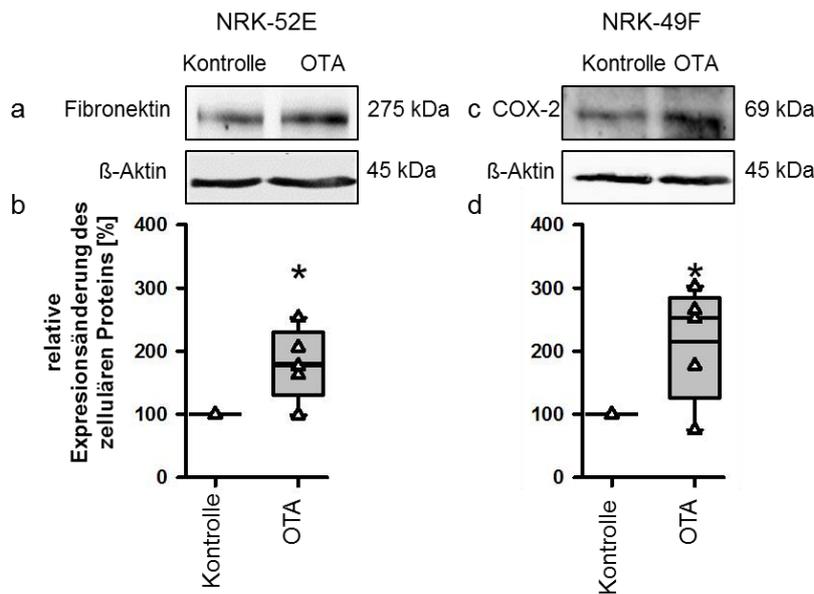


Abbildung 26: Medientransfer. Effekt von konditionierten, OTA enthaltenden Medium aus der Kokultur auf Fibronectin in NRK-52E (a–b) und COX-2 in NRK-49F in Monokultur (c–d). Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnen Proteinen nach OTA-Inkubation (a, c). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=5$.

3.2.6. Effekt der Kokultur auf die Expression der miRs

Nachdem in Abschnitt 3.2.1. ein Kokultur-Effekt auf die Expression verschiedener mRNAs beschrieben wurde, war die weiterführende Frage, ob es Hinweise gibt, dass dies auch für posttranskriptionelle Regulatoren gilt. Vertreter hierfür sind miRs. Für miR-21, -29b und -200a ist bekannt, dass ihre Expression a) während der Entwicklung chronischer Nierenerkrankungen und b) nach OTA-Exposition verändert vorliegen. Darum wurde zunächst getestet, ob die Kokultur per se einen Einfluss auf die Expression dieser miRs hat. In Epithelzellen führten die Kokulturbedingungen zu einem Expressionsanstieg der miR-21 und -200a um annähernd das zwanzigfache, während die Expression der miR-29b unverändert war (Abbildung 27 a-c).

In Fibroblasten führte die Kokultur per se zu einem Expressionsanstieg von miR-21, hatte aber keinen Einfluss auf die miR-29b oder -200a Expression (Abbildung 27 j-l). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass miR-21 und -200a in Epithelzellen sowie miR-200a in Fibroblasten auf die zelluläre Interaktion reagieren und somit möglicherweise zu Veränderungen des zellulären Phänotyps beitragen können.

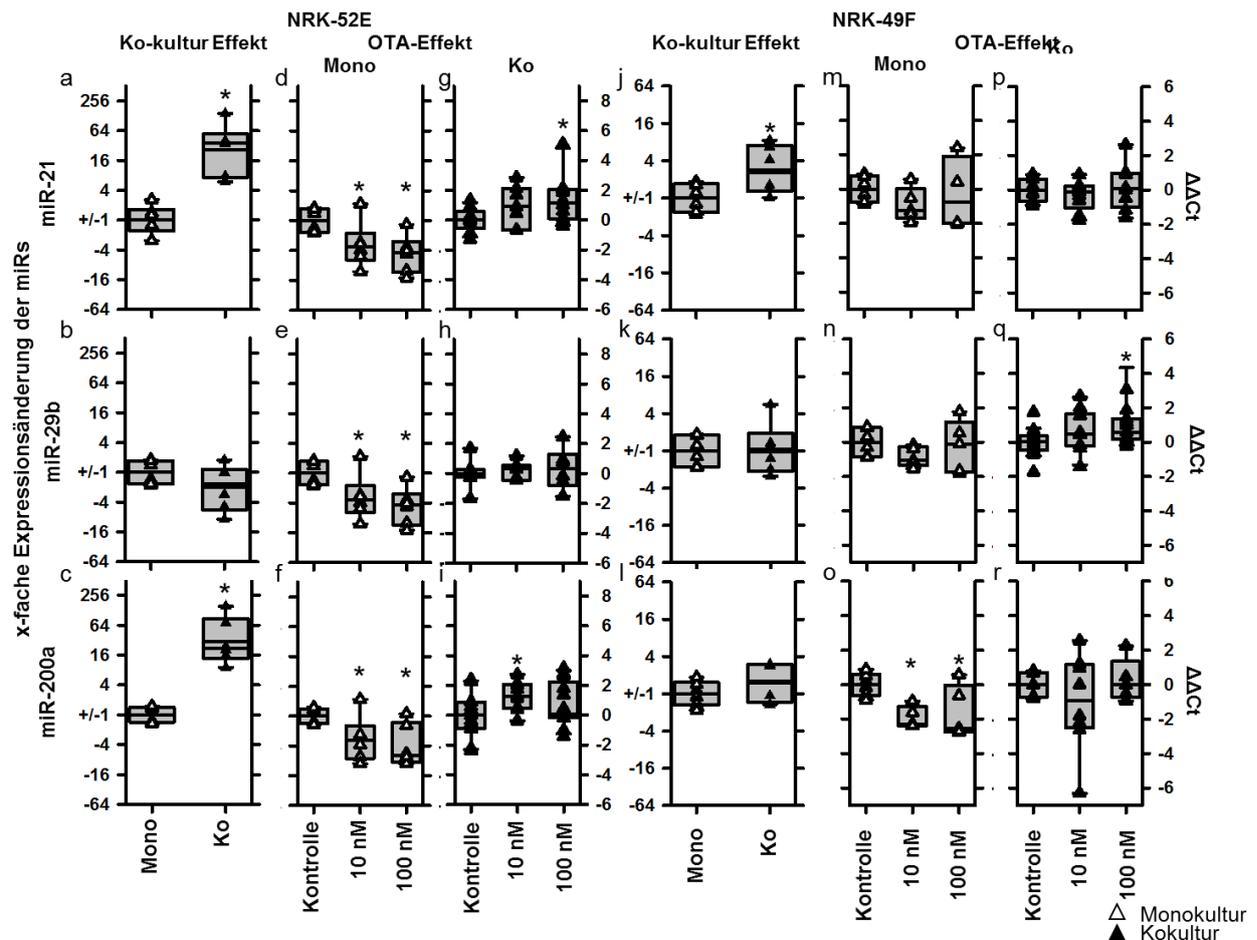


Abbildung 27: Expressionsänderungen von miRs. Effekt der Kokultur auf die Expressionsänderung von miR-21, -29b, -200a in NRK-52E (a-c) und NRK-49F (j-l). Effekt von OTA auf die Expression von miR-21, -29b und -200a in NRK-52E unter Mono- (d-f) und Kokulturbedingungen (g-i) sowie in NRK-49F unter Mono (m-o) und Kokulturbedingungen (p-r). Repräsentative Western Blots von aus Zellen gewonnen Proteinen nach OTA-Inkubation (a, c). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-13$.

3.2.7. Effekt von OTA auf die Expression von miRs

In den Kapiteln 3.2.3. und 3.2.4. wurde beschrieben, dass OTA eine Expressionsänderung von Proteinen verursachte, die sich nicht durch Änderungen der mRNA-Expression erklären lässt. Eine Möglichkeit, dies zu erklären, ist, dass posttranskriptionelle Prozesse an der Vermittlung dieser OTA-Effekte beteiligt sind. Also wurde der Einfluss von OTA auf die in 3.2.6.1. beschriebenen miRs bestimmt. In Monokultur war in den Epithelzellen die Expression der miR-21 -29b und -200a, nach Inkubation mit OTA verringert. Im Gegensatz dazu war die Expression der miR-21 nach Inkubation mit 100 nM OTA leicht erhöht und die von miR-200a nach Inkubation mit 10 nM OTA ebenfalls leicht erhöht. Ansonsten war die Expression der miRs unter Kokulturbedingungen nach OTA-Exposition unverändert (Abbildung 27 d-i). Dies deutet auf eine Stabilisierung der miRs in Kokultur hin. In den Fibroblasten in Monokultur führte die Behandlung mit OTA zu einer Expressionsverminderung der miR-200a,

während die Expression von miR-21 und -29b unverändert war. Unter Kokulturbedingungen führte die Inkubation der Fibroblasten mit OTA zu einer Erhöhung der Expression von miR-29b, während die Expression der anderen beiden unverändert blieb (Abbildung 27 m-r).

3.2.8. Abhängigkeit der OTA-induzierten Effekte von miRs

Die bisher beschriebenen phänomenologischen Effekte waren Anknüpfungspunkt für weiterführende Untersuchungen der funktionellen Rolle der miR-21, -29b und -200a. Hierzu wurden die miRs mit Hilfe spezifischer Inhibitoren (AntagomiRs) gebunden und anschließend beispielhaft Proteine, deren Expression nach OTA-Inkubation nur in Kokultur verändert war, gemessen. Für NRK-52E wurde hier und in nachfolgenden Kapiteln die Expressionsänderung des Fibronectin Proteins, als repräsentative OTA-induzierte Änderung betrachtet und die des COX-2 Proteins in NRK-49F. Als erstes wurden die drei miRs simultan gehemmt. Dabei zeigte sich, dass bereits die alleinige Inhibition der drei miRs zu einer starken Beeinträchtigung der Expression Fibronectin Proteins in Epithelzellen führte. Darum kann für diese experimentellen Bedingungen keine Aussage bezüglich der Fibronectinexpression getroffen werden. Für die Fibroblasten hingegen hat sich gezeigt, dass die gleichzeitige Inhibition der drei miRs, den OTA-Effekt auf die Expression des COX-2 Proteins verhindern konnte.

Weiterführend gab es zwei Inhibitionsgruppen: 1) Inhibition der miR-21 und der -200a gleichzeitig 2) Inhibition der miR-29b allein. In Epithelzellen in Kokultur verhinderten sowohl die simultane Inhibition der miR-21 und -200a als auch die Inhibition der miR-29b den OTA-induzierten Expressionsanstieg des Fibronectin Proteins. In Fibroblasten unter Kokulturbedingung unterband die Inhibition von miR-21 und -200a den durch OTA verursachten Expressionsanstieg des COX-2 Proteins, wohingegen die Hemmung von miR-29b den OTA-Effekt auf die COX-2 Expression nicht schmälerte. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die OTA-Effekte zumindest teilweise durch die miRs-21, -29b und -200a vermittelt werden.

3.2.7. Rolle der COX-2 Aktivität bei der Vermittlung der OTA-Effekte

In Kapitel 3.2.4.1. wurde beschrieben, dass OTA einen Expressionsanstieg des COX-2 Proteins in Fibroblasten in Kokultur verursacht. COX-2 ist ein induzierbares Enzym, das Prostaglandine herstellen kann, die als lösliche Mediatoren wirken und zur zellulären Kommunikation beitragen können. Also wurde mit Hilfe zweier spezifischer COX-2-Inhibitoren die Rolle der COX-2-Aktivität für OTA-Effekte in NRK-52E überprüft. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition der COX-2-Aktivität in Kokultur die OTA-induzierten Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in Epithelzellen verhinderte.

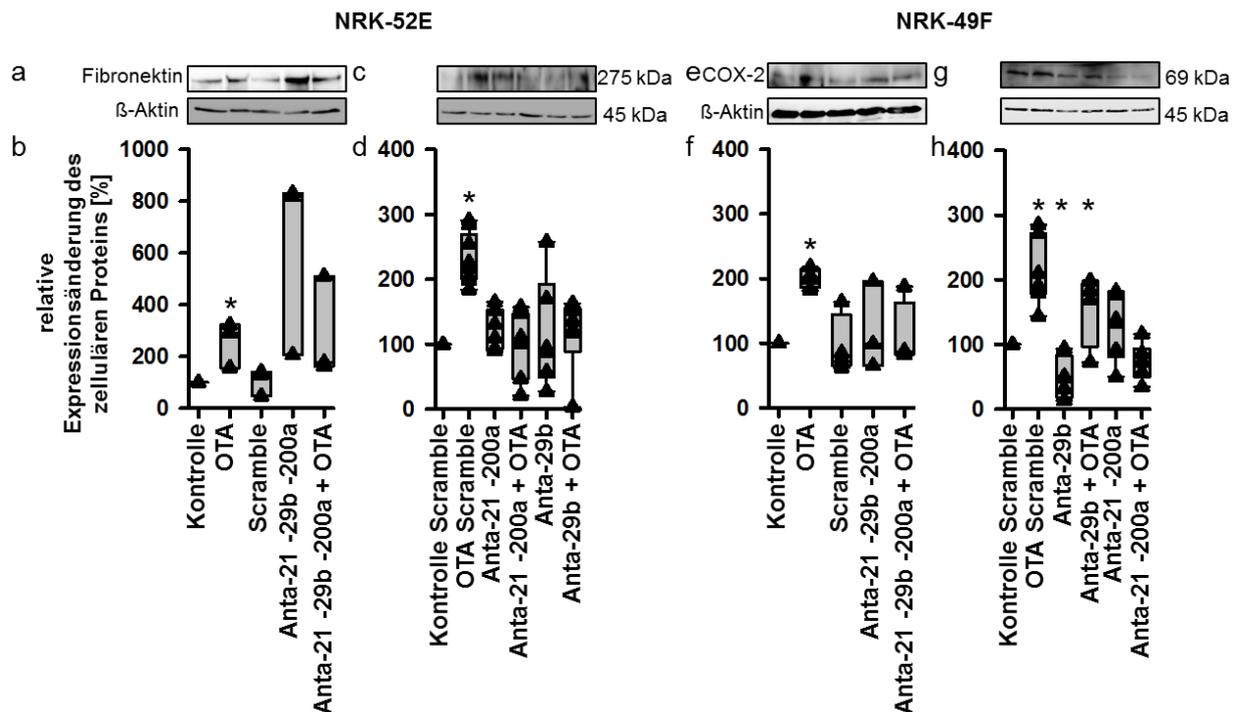


Abbildung 28: Rolle von miRs bei der Vermittlung von OTA-induzierten Effekten. Rolle von miR-21, -29b und -200a beim OTA-induzierten Expressionsanstieg des Fibronectin Proteins in NRK-52E (a-d) und des COX-2 Proteins in NRK-49F. Repräsentative Western Blots (a, c, e, g). Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-12$.

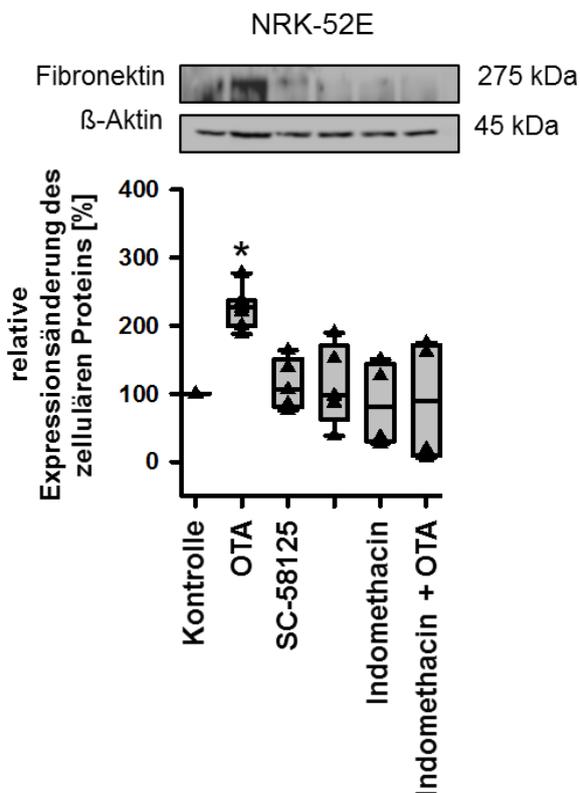


Abbildung 29: Rolle von COX-2 an der OTA-induzierten Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in NRK-52E. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit “*” gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-12$.

3.2.10. Abhängigkeit der OTA-vermittelten Effekte von MAP-Kinasen

MAP-Kinasen können an der Zelle ankommende extrazelluläre Signale in zelluläre Antworten übersetzen, daher wurden sie hier als Mediatoren der zellulären Kommunikation in Betracht gezogen. Zunächst wurde die Aktivität von zwei Vertretern der MAP-Kinasen, nämlich ERK1/2 mit einem spezifischen Inhibitor in Kokultur gehemmt. Sowohl in Epithelzellen als auch in Fibroblasten schützte die Inhibition der Kinasen ERK1/2 vor dem OTA-induzierten Expressionsanstieg des Fibronectin Proteins bzw. COX-2 Proteins (Abbildung 30 a-d)

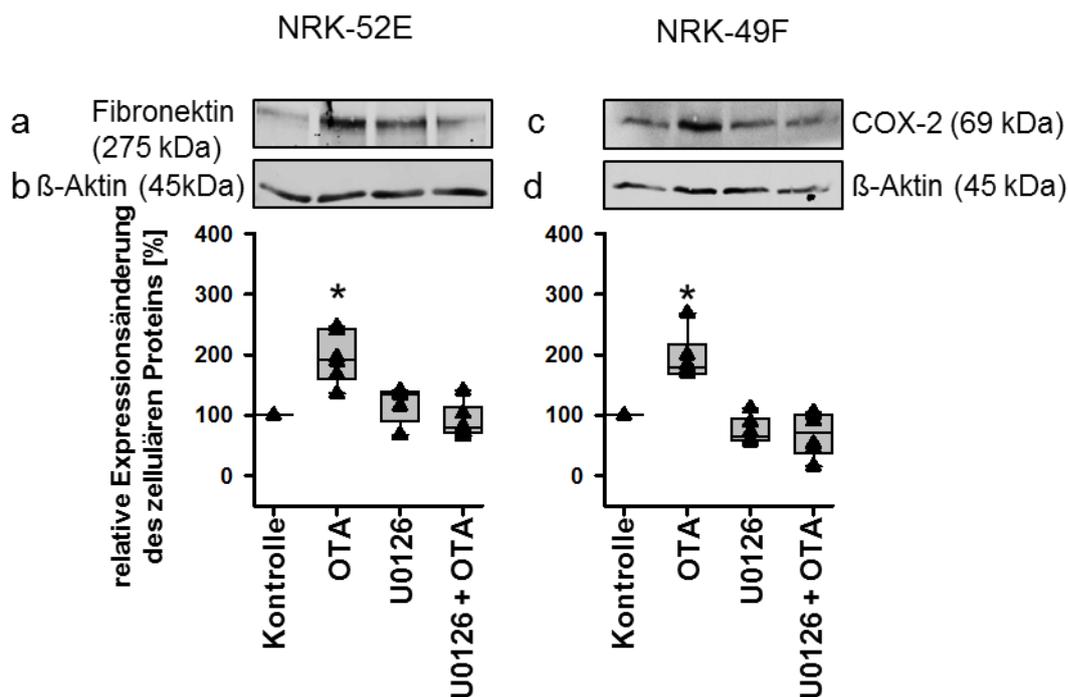


Abbildung 30: Rolle von ERK1/2 für OTA-induzierte Änderungen. Effekt von ERK1/2-Inhibition auf die OTA-induzierte Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in NRK-52E (b) und des COX-2 Proteins in NRK-49F (d). (a und c) Repräsentative Western Blots. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet ($p < 0,05$), $n=4-12$.

3.2.11. Effekt von OTA auf die Expression von ERK1/2 und pERK1/2

Weil die Hemmung von ERK1/2 sowohl in den Epithelzellen als auch in den Fibroblasten die OTA-induzierten Effekte verhinderte, wurde diese MAP-Kinase detaillierter betrachtet. Die Messungen mittels Western Blot ergaben, dass die Inkubation mit OTA in Kokultur sowohl in NRK-52E, als auch in NRK-49F zu einer Expressionserhöhung von phosphorylierten ERK1/2, nicht aber des gesamten ERK1/2 führte (Abbildung 31 a-d) Diese Daten zeigen, dass OTA zumindest teilweise über die Aktivierung von ERK1/2 seine Effekte auf beide Zelllinien vermittelt.

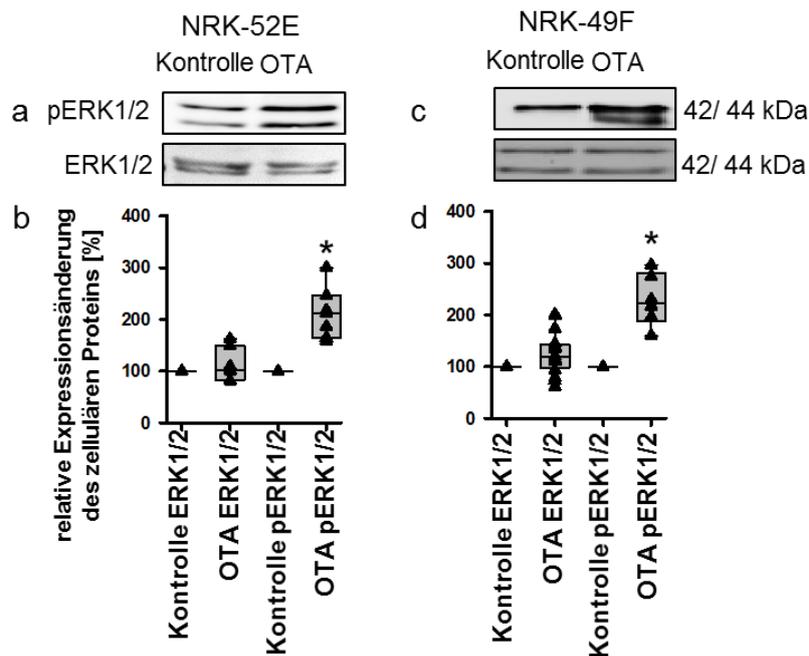


Abbildung 31: Einfluss von OTA auf die Expression von ERK1/2 und phosphorylierten ERK1/2. Effekt von OTA auf die Expression von ERK1/2 und phosphorylierten ERK1/2 in NRK-52E (b) und NRK-49F (d) unter Kokulturbedingungen. (a, c) Repräsentative Western Blots. Statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle sind mit "*" gekennzeichnet (p < 0,05), n=4-12

4. Diskussion

4.1. Teil I Effekt der simultanen Inkubation humaner Zellen aus dem proximalen Tubulus mit OTA und CIT

4.1.1. HK-2 Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von Mykotoxinen

Ein Ziel dieser Arbeit war zu überprüfen, ob die gleichzeitige Inkubation proximaler Tubuluszellen des Menschen mit zwei nephrotoxischen Mykotoxinen die Entstehung der Prozesse Inflammation, EMT und Fibrose begünstigt. Vorab soll diskutiert werden, inwiefern HK-2 Zellen sich eignen, um diese Fragestellung zu beantworten. HK-2 Zellen stammen aus dem proximalen Tubulus eines erwachsenen Mannes und wurden in anderen Arbeiten genutzt, um Nephrotoxizität und EMT zu untersuchen [138-141]. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels SI gezeigt werden, dass HK-2 Zellen eine für Epithelzellen typische kubische Form haben. In einer Arbeit von Slussler et. al. werden die epithelialen Eigenschaften der HK-2 Zellen überprüft, um zu beurteilen ob HK-2 Zellen geeignet sind die Entstehung einer EMT zu erforschen [142]. Es wird unter anderen darauf verwiesen, dass HK-2 Zellen mehr N- als E-Cadherin exprimieren, was die Daten der vorliegenden Arbeit bestätigen. Einige Arbeiten liefern Hinweise darauf, dass dieses Cadherinmuster speziell in Epithelzellen des proximalen Tubulus typisch ist [143-145]. Das heißt N-Cadherin kann hier als Protein dienen, das den epithelialen Charakter der Zellen anzeigt. Occludin ist ein wesentlicher Bestandteil der *tight junctions* und in der vorliegenden Arbeit konnte zwar die für Occludin kodierende mRNA detektiert werden, aber das Protein selbst nicht. Dieser Umstand wurde auch in der Literatur beschrieben [146]. Eine durchlässige Epithelschicht ist charakteristisch für Zellen des proximalen Tubulus und Voraussetzung, damit sie ihre Aufgabe der Resorption erfüllen können und dies konnte in der vorliegenden Arbeit mittels FITC-Dextran Diffusion bestätigt werden. Ein weiteres Charakteristikum für Zellen des proximalen Tubulus ist die Ausstattung mit Transportproteinen wie z.B. die Na⁺/K⁺-ATPase, MCT, NHE und SGLT-2, die auch von HK-2 Zellen exprimiert werden [147-150]. Allerdings gibt es keine Hinweise auf basolateral lokalisierte organische Aniontransporter (OAT) 1 und 3 [151]. Diese Transporter sind an der Aufnahme von OTA in die Zellen beteiligt [152]. Es ist denkbar, dass durch ihr Fehlen weniger OTA in die Zelle gelangt und so der OTA-Effekt in HK-2 Zellen im Vergleich zur Situation im Menschen unterschätzt wird. Weil HK-2 Zellen über viele für proximale Tubuluszellen charakteristische Eigenschaften verfügen (kubische Form, durchlässige Epithelschicht, Verhältnis von E- und N-Cadherin), sind sie ein geeignetes Modell, um die Wirkung von Mykotoxinen in Bezug auf nephropathische Veränderungen zu betrachten.

4.1.2. Wirkung von OTA und CIT auf den Zelltod von HK-2 Zellen

In mikromolaren Konzentrationen führen die Mykotoxine OTA und CIT separat sowie in Kombination zum Absterben epithelialer Zellen des proximalen Tubulus, was sich in einer

vermehrten LDH-Freisetzung, einer erhöhten Caspase-3 Aktivität und einer verminderten Zellzahl zeigt [153-155]. Allerdings liegen für beide Toxine die Spitzenwerte im Blutplasma gesunder Menschen eher im nanomolaren Bereich [19, 67, 156-159]. Der OTA-induzierte Zelltod hängt auch von der Inkubationsdauer ab und bei entsprechend langer Exposition führt OTA sogar in pikomolaren Konzentrationen zum Absterben der Zellen. Schwerdt et al. haben für RPTEC Zellen (humanen Primärzellen aus dem proximalen Tubulus) gezeigt, dass die Caspase-3 Aktivität nach 48 h bei einer Inkubation mit 1000 nM OTA ansteigt, während die Caspase-3 Aktivität nach 14 Tagen, schon nach Inkubation mit 0,3 nM OTA ansteigt [56]. In der vorliegenden Arbeit war die Caspase-3 Aktivität und LDH- oder Caspase-3 Freisetzung nach Inkubation mit 10 nM OTA unverändert. Dabei ist nicht auszuschließen, dass bei einer längeren Inkubationsdauer 10 nM OTA ausreichen, um die Viabilität zu beeinträchtigen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass 100 µM CIT zu einem Anstieg der Caspase-3 Aktivität führte. Dies entspricht der aktuellen Datenlage, wonach 50-75 µM CIT als proapoptotisch beschrieben werden [155, 160]. Es ist anzumerken, dass die Durchschnittskonzentration von CIT in humanem Blutplasma bei 1 nM liegt und somit 100000-fach niedriger, als die Konzentration die in Zellkulturversuchen den Zelltod herbeiführt. Mit Hinsicht auf CIT finden sich keine Arbeiten, die sich mit dem Einfluss nanomolarer Konzentrationen auf nephropathische Prozesse beschäftigen. Des Weiteren ist anzumerken, dass es bisher bezüglich nephropathischer Prozesse keine Arbeit mit Fokus auf der Interaktion von OTA und CIT in nanomolaren Konzentrationen gibt.

4.1.3. Einfluss von OTA und CIT auf inflammatorische Prozesse in HK-2 Zellen

Epithelzellen des proximalen Tubulus können unter physiologischen Bedingungen Zytokine sezernieren. Diese dienen dann als lösliche Mediatoren und sind ein Bestandteil des physiologischen Mikromilieus. Unter Einwirkung schädlicher Stimuli können Tubuluszellen die Sekretion der Zytokine erhöhen und damit zur Entstehung eines inflammatorischen Milieus beitragen [161]. Es gibt Arbeiten, die darauf hinweisen, dass OTA in verschiedenen Nierenzelllinien inflammatorische Prozesse auslöst, beispielsweise eine Erhöhung der TNF-Synthese sowie dessen Sekretion [162]. Des Weiteren konnte im Blutserum von Schweinen, die mit OTA gefüttert wurden, ebenfalls ein Anstieg der TNF-Konzentration gemessen werden [163]. Wu et. al. zeigten, dass auch CIT in mikromolaren Konzentrationen zu einem Anstieg von TNF in Zebrafischen führt. Die TNF-Sekretion kann also durch beide Mykotoxine beeinflusst werden [164]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in nanomolaren Konzentrationen erst die simultane Inkubation mit OTA und CIT zu einem Expressionsanstieg des TNF Proteins und der für TNF kodierenden mRNA führte. Angesichts der Bedeutung von TNF bei der Entstehung pathologischer Prozesse ist es wahrscheinlich, dass der hier gezeigte Anstieg von TNF zur Entstehung eines inflammatorischen Milieus beiträgt [165, 166]. Darüber hinaus gibt es Hinweise dafür, dass

TNF im Rahmen einer CKD die Entstehung einer EMT begünstigt [167]. Außerdem zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass sich die Expressionserhöhung des TNF Proteins in einer Expressionserhöhung seiner mRNA widerspiegelt. Dies lässt die Vermutung einer transkriptionellen Regulation der TNF-Expression zu.

Ein bekannter Regulationsmechanismus der TNF-Expression ist der NF- κ B-Signalweg. Die Arbeit von Sauvant et. al. zeigt, dass OTA zu einer Erhöhung der NF- κ B-Aktivität führt, weshalb eine Beteiligung dieses Signalwegs an der OTA-induzierten Erhöhung der TNF-Expression denkbar ist [168]. Neben TNF wurde in der vorliegenden Arbeit auch die COX-2 Protein- und mRNA-Expression gemessen, da COX-2 ein potentieller Mediator entzündlicher Prozesse ist. Allerdings führte die simultane Inkubation der Zellen mit OTA und CIT zu einer Expressionsverminderung des COX-2 Proteins. COX-2 ist ein Enzym, das im Rahmen einer Entzündungsreaktion aktiviert wird. In der Niere hat COX-2 unter physiologischen Bedingungen zahlreiche weitere Funktionen wie z.B. die Regulation der Reninfreisetzung oder der NaCl-Ausscheidung [127]. Darum steht die hier beobachtete verminderte Synthese von COX-2 nicht im Kontrast zu der Annahme, dass die Mykotoxine die Entstehung eines inflammatorischen Milieus begünstigen, sondern deutet viel mehr darauf hin, dass die Mykotoxine die Elektrolytregulation beeinflussen. Auch im Falle von COX-2 spiegelt sich die Expressionsveränderung des Proteins in Expressionsänderungen der für COX-2 kodierenden mRNA wieder, was eine direkte transkriptionelle Regulation vermuten lässt.

4.1.4. Einfluss von OTA und CIT auf EMT in HK-2 Zellen

Bisher gibt es keine Hinweise darauf, dass OTA in nanomolaren Konzentrationen einen Einfluss auf während einer EMT veränderter Proteine wie z.B. β -Catenin, TGF- β , α -SMA, E- oder N-Cadherin hat [162, 168, 169]. Die vorliegenden Daten bestätigen dies, mit Ausnahme einer schwachen Expressionsabnahme des E-Cadherin Proteins sowie einer schwachen Änderung der Zellform, die mittels des Strukturindex gezeigt werden konnte. Darüber hinaus hatte CIT keinen Einfluss auf die Expression der betrachteten epithelialen und mesenchymalen Proteine. Nach Inkubation mit der Mykotoxinkombination allerdings war die Expression der epithelialen Proteine E- und N-Cadherin vermindert, während die Expression der mesenchymalen Proteine Vimentin und α -SMA erhöht war. Diese Veränderungen sind auch im Laufe einer EMT zu erwarten. Außerdem war die Expression der für E-Cadherin kodierenden mRNA vermindert und die für α -SMA kodierende mRNA war erhöht. Dies lässt vermuten, dass die Expressionsänderungen des E-Cadherin und α -SMA Proteins die Folge einer direkten transkriptionellen Regulation ist. Im Gegensatz dazu lässt sich die Expressionsänderung des Vimentin Proteins nicht auf Veränderungen der für Vimentin kodierenden mRNA zurückführen. Daher ist es wahrscheinlicher, dass der beobachtete Expressionsanstieg des Vimentin Proteins durch posttranskriptionelle Mechanismen verursacht wurde. Die Stabilität des Vimentin Proteins wird durch Phosphorylierungen

beeinflusst, die durch Kinasen und Phosphatasen reguliert werden. Daher wäre eine mögliche Erklärung für die Expressionserhöhung des Vimentin Proteins, veränderte Aktivitäten der Kinasen und Phosphatasen, damit seines Phosphorylierungsgrades und letztendlich seiner Stabilität. Eine andere mögliche Erklärung ist die Erhöhung der Translationsrate durch posttranskriptionelle Mechanismen wie beispielsweise veränderte miR-Konzentrationen oder Aktivitäten. Ein weiteres epitheliales Protein, das oftmals zur Abschätzung einer EMT herangezogen wird, ist Occludin. Mittels Western Blot konnte dieses Protein zwar nicht nachgewiesen werden, aber die Expression der Occludin-mRNA war detektierbar. Die Inkubation mit der Mykotoxinkombination führte zu einer Expressionsverminderung der für Occludin kodierenden mRNA. Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, dass die Mykotoxine eine EMT in HK-2 Zellen induzieren. Kollagen IV ist der Hauptbestandteil der Basalmembran, die im Laufe einer EMT abgebaut wird. Die hier erhobenen Daten zeigen, dass die Menge des sezernierten Kollagen IV nicht durch OTA, aber sowohl durch Inkubation mit CIT, als auch der Mykotoxinkombination leicht vermindert wurde. Hierbei handelte es sich zwar nicht um einen synergistischen Effekt, aber diese Änderungen unterstützen die Annahme, dass sich die HK-2 Zellen in einer EMT befanden.

Die Änderungen der Proteinexpression während einer EMT haben oftmals morphologische Änderungen zur Folge, daher wurde die Zellform anhand des Struktur-Index (SI) ermittelt. HK-2 Zellen haben unter Kontrollbedingungen einen SI von 0,87, was auf eine für Epithelzellen typische kubische Form hindeutet. Nach Inkubation mit CIT war der SI unverändert, während die Inkubation mit OTA zu einer leichten aber signifikanten Verminderung führte. Die Kombination beider Mykotoxine verstärkte diesen Effekt über eine additive Interaktion hinaus. Ein verminderter SI deutet auf eine morphologische Änderung von einer kubischen, zu einer eher spindelähnlichen Form hin. Diese Spindelform ist typisch für mesenchymale Zellen und stellt einen weiteren Hinweis auf eine EMT dar. Weiterhin kann die Veränderung von *tight junctions* zu einer Abnahme der epithelialen Barrierefunktion führen. Allerdings konnte dies in der vorliegenden Arbeit nicht durch die Ermittlung der transepithelialen FITC-Dextran Diffusionsrate bestätigt werden. HK-2 Zellen bilden eine für proximalen Tubuluszellen typische durchlässige Epithelschicht [170]. Das macht es schwierig, moderate Änderungen der Barrierefunktion zu messen. Proximale Tubuluszellen zeichnen sich durch die Expression verschiedener Transporter wie zum Beispiel des Na⁺-Glukose-Kotransporters 1 (SGLT1) aus. Im Rahmen einer Dedifferenzierung kommt es zu einer verminderten Expression von Transportern [171, 172]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression der für den SGLT-1 kodierenden mRNA nach Inkubation mit der Mykotoxinkombination im Vergleich zur Kontrolle und den Einzelinkubationen vermindert war. Dabei handelte es sich um einen additiven Effekt. Bezüglich der EMT kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Mykotoxinkombination

zu Änderungen führt, die auf eine EMT hinweisen. Die meisten dieser Effekte sind durch eine synergistische Interaktion von OTA und CIT zu erklären, während vereinzelt auch additive Effekte zu beobachten waren.

4.1.5. Einfluss von OTA und CIT auf die Expression von Kollagen III in HK-2 Zellen

Interstitielle Fibrose gilt als Endpunkt einer chronischen Nierenerkrankung und zeichnet sich durch die Akkumulation extrazellulärer Matrixproteine aus. Epithelzellen können Matrixproteine in die Umgebung sezernieren. Üblicherweise ist Kollagen I hierbei mengenmäßig am stärksten vertreten. Allerdings gibt es Arbeiten, die zeigen, dass im Fall der proximalen Tubuluszellen die Sekretion von Kollagen III überwiegt. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Kollagen III stärker an der Entstehung einer Nierenfibrose beteiligt ist als Kollagen I [56, 119, 168, 173, 174]. Deshalb ist die Sekretion von Kollagen III geeignet, um den Effekt eines fibrotischen Stimulus auf die Niere zu untersuchen. Krogh et. al. haben gezeigt, dass in Schweinen, die über 90 Tage mit OTA-haltigem Futter gefüttert wurden, eine progressive Nephropathie mit fibrösen Bereichen entstanden ist [175]. Der profibrotische Effekt konnte auch in Zellkulturmodellen mit Zellen aus dem proximalen Tubulus gezeigt werden [56]. In der vorliegenden Arbeit hatten 10 nM OTA allein keinen Einfluss auf die Kollagen III Sekretion der HK-2 Zellen. Dieses widersprüchliche Ergebnis zu den genannten Beobachtungen an Schweinen oder den Ergebnissen von Hennemeier et. al. ist dadurch zu erklären, dass die Zellen in den meisten Arbeiten erst nach längerer Inkubationszeit oder nach Inkubation mit höheren OTA-Konzentrationen mit einer erhöhten Kollagensekretion reagierten [56] [168]. Wenn man bedenkt, dass interstitielle Fibrose den Endpunkt chronischer Nierenerkrankungen darstellt, wird klar, dass es sich um einen langfristigen Prozess handelt, der eine längere Inkubationszeit erfordert. Hald beschreibt, dass nicht OTA allein, sondern auch andere Mykotoxine wie CIT für die Entstehung der renalen Fibrose in Schweinen verantwortlich sein könnten [176]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass CIT allein zu keiner Änderung der sezernierten Kollagen III Menge führte, während die Kombination aus CIT und OTA eine erhöhte Sekretion zur Folge hatte. Dies kann zur Entstehung einer interstitiellen Fibrose beitragen. Außerdem wurde eine OTA-induzierte Expressionserhöhung des intrazellulären Kollagen III gemessen aber nicht der für Kollagen III kodierenden mRNA. Daher erscheint eine posttranskriptionelle Regulation der Kollagen III Sekretion wahrscheinlich.

4.1.6. Rolle von MAP-Kinasen bei der Vermittlung Mykotoxin-induzierter Expressionserhöhung der TNF mRNA

OTA-induzierte Effekte wie Erhöhung der Caspase-3 Aktivität, der TNF mRNA-Expression oder der epithelialen Durchlässigkeit, in verschiedenen Zelllinien sind von der Aktivität verschiedener MAPK abhängig [162, 177, 178]. Darüber hinaus beeinflusst auch CIT die Aktivität der MAP-Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 p38 [160]. Damit übereinstimmend zeigen

die vorliegenden Daten, dass die MAPK ERK1/2 und JNK1/2 den Mykotoxin-induzierten Einfluss auf die TNF mRNA Expression vermitteln, allerdings war p38 nicht involviert. Dabei ist zu bemerken, dass ERK1/2 und JNK1/2 auf unterschiedliche Weisen wirken, denn die Mykotoxinkombination führte zu einer vermehrten Phosphorylierung von ERK1/2, aber nicht von JNK1/2. Das deutet darauf hin, dass die Mykotoxine in Kombination die Aktivität von ERK1/2 erhöhen und darüber einen Teil ihrer Effekte vermitteln. Im Fall von JNK1/2 nutzen die Mykotoxine die basale Aktivität, um die Expressionserhöhung von TNF mRNA zu vermitteln.

4.1.7. Relevanz der eingesetzten Mykotoxinkonzentrationen

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass OTA und CIT in nanomolaren Konzentrationen synergistisch auf die Entstehung nephropathischer Prozesse wirken. Es bleibt anzumerken, dass die hier eingesetzten Konzentrationen (OTA 10 nM, CIT 1 nM) in etwa den Konzentrationen entsprechen, die auch im Blutplasma von Menschen zu finden sein können. Jedoch sind die Mykotoxine zu einem hohen Anteil an Plasmaproteine gebunden, was dazu führt, dass nur ein Bruchteil des vorhandenen OTA frei zur Verfügung steht. OTA und CIT werden unter anderem aus dem Blut über basolaterale Transportproteine in die Tubuluszellen aufgenommen. Über apikale Transportproteine kann OTA in den Urin geschleust werden. Dieses freie OTA kann über H⁺-Dipeptid-Kotransporter resorbiert werden, und OTA kann auch pH-abhängig intrazellulär akkumuliert werden [55]. Es ist wahrscheinlich, dass die beschriebenen Prozesse zu einer Anreicherung der Mykotoxine in den Epithelzellen des proximalen Tubulus führen und damit im Vergleich zum Blut höhere Konzentrationen der frei verfügbaren Mykotoxine in der Zelle erreicht werden. In einer Arbeit von Schwerdt et. al. hat sich für primäre humane Nierenzellen gezeigt, dass Effekte nach Exposition mit OTA in pikomolaren Konzentrationen auf beispielsweise die Kollagensekretion, die LDH-Freisetzung oder die Caspase-3 Aktivität erst nach 14 Tagen auftreten. Daher ist es denkbar, dass nach einer längeren Expositionszeit pikomolare Mykotoxinkonzentrationen ausreichen, um ähnliche Effekte wie eine Kurzzeitinkubation mit höheren Konzentrationen auszulösen [56].

4.2. Teil II Modulation der nephrotoxische OTA-Wirkung durch die Kommunikation von Epithelzellen und Fibroblasten

4.2.1. Kokultur als Modell für zelluläre Kommunikation

Die Kommunikation zwischen Epithelzellen des proximalen Tubulus und Gewebsfibroblasten über lösliche Mediatoren wie Zytokine und Wachstumsfaktoren ist entscheidend für physiologische Funktionen des proximalen Tubulus [179]. Darüber hinaus unterstützt eine Störung dieser Kommunikation die Entwicklung tubulo-interstitieller Krankheiten [179, 180]. Bisher wurde der nierenschädigende Effekt von OTA lediglich in proximalen Tubuluszellen in Monokultur untersucht.

Daher wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit überprüft, ob die zelluläre Kommunikation zwischen proximalen Tubuluszellen und Fibroblasten die nephropathische Wirkung von OTA verändert. Um dieser Frage nachzugehen, wurde ein Kokulturmodell bestehend aus proximalen Tubuluszellen aus der Ratte (NRK-52E) und normalen renalen Fibroblasten aus der Ratte (NRK-49F) verwendet. Um die Zelltypen voneinander getrennt, aber dennoch in gemeinsamer Kultur (Kokultur) inkubieren zu können, wurden Filtereinsätze verwendet. Unter diesen Umständen hatten die Zellen keinen direkten Kontakt und konnten ausschließlich über sezernierte Substanzen kommunizieren. Dies kommt der *in vivo* Situation näher als eine Zellkultur, in der nur ein Zelltyp untersucht wird.

4.2.2. NRK-52E Zellen als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von OTA

NRK-52E Zellen stellen einen epithelialen Klon einer normalen Nierenzelllinie aus der Ratte dar [181]. Sie zeichnen sich durch ihre flache polyedrische Form aus [181]. Im Gegensatz zu HK-2 Zellen haben NRK-52E mehr *tight junction* Proteine und mit einem elektrischen transepithelialen Widerstand (TEER) von $12 \Omega/\text{cm}^2$ einen höheren TEER als HK-2 Zellen [170]. Sie exprimieren für Zellen des proximalen Tubulus charakteristische Transporterproteine wie OAT1 und 3, sowie SGLT-2 [146, 182]. Darüber hinaus konnte in mehreren Arbeiten gezeigt werden, dass NRK-52E Zellen nach Inkubation mit nierenschädigenden Substanzen wie TGF- β oder hohen Konzentrationen von Prorenin und Angiotensin II eine EMT aufweisen. Die EMT zeigt sich in einer Umorganisation des Aktin-Zytoskeletts, morphologischen Veränderungen, Expressionsabnahme des E-Cadherin Proteins sowie einem Anstieg der Proteinexpression von Fibronectin-, Vimentin-, Kollagen III- und α -SMA [183-188]. Zusammenfassend zeigen diese Arbeiten, dass NRK-52E Zellen ein geeignetes Modell zur Untersuchung von EMT sind.

4.2.3. NRK-49F als Modellsystem zur Untersuchung der nephrotoxischen Wirkung von OTA

Bei NRK-49F Zellen handelt es sich um einen fibroblastischen Klon der NRK-Zelllinie. Diese Zellen zeichnen sich durch eine für Fibroblasten charakteristische Spindelform aus [181]. NRK-49F Zellen exprimieren typische mesenchymale Proteine wie α -SMA und Vimentin [189]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass NRK-49F Zellen durch TGF- β aktiviert werden können, was zu einer Fibroblasten–Myofibroblasten-Transdifferenzierung führt, die sich durch einen Anstieg der Proliferationsrate sowie der mesenchymalen Proteine Fibronectin, Vimentin, Kollagen I, III und α -SMA zeigt [190-192]. Ein bedeutender Vorteil zur Untersuchung der OTA-Wirkung auf Zellen des proximalen Tubulus ist der renale Ursprung dieser Zelllinie, da renale Fibroblasten sich von z.B. dermalen Fibroblasten durch ihre

Wachstumseigenschaften, Homöostase von Matrixproteinen und das Ansprechen auf sezernierte Mediatoren wie TGF- β und Interleukine unterscheiden [179]. Da zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit keine stabile humane Fibroblasten-Zelllinie aus der Niere zur Verfügung stand, musste auf Rattenzellen ausgewichen werden.

Wie in der Einleitung beschrieben, ist die Wirkung von OTA stark speziesabhängig. Diese Unterschiede haben sich zum Beispiel in Zellkulturexperimenten gezeigt, in denen für verschiedene Zelllinien ermittelt wurde, welche OTA-Konzentration zu einer Verminderung der Zellzahl führt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellzahl humaner Zellen ab einer OTA-Konzentration von 10 nM sinkt, bei NRK-52E war dies ab 500 nM der Fall und für NRK-49F waren 10 μ M notwendig, um die Zellzahl zu mindern [193]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für die verwendeten Zelllinien höhere OTA-Konzentrationen eingesetzt werden müssen, um Effekte zu erzielen, die mit denen in humanen Zellen vergleichbar sind. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit OTA-Konzentrationen zwischen 10-1000 nM eingesetzt.

4.2.4. Effekt der Kokultur auf die Expression von mRNAs die an der Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose beteiligt sind

Die Kokultur per se beeinflusste bereits den Phänotyp der Epithelzellen und Fibroblasten. Das zeigt, dass bereits die geänderte experimentelle Ausgangssituation in Form des Kokulturmodells zu Änderungen führen kann. Beispielsweise war die Expression der für Kollagen I und WISP1 kodierenden mRNA in NRK-52E vermindert. Dies könnte bedeuten, dass die Kokultivierung die Synthese von fibrotisch wirkenden Strukturen in NRK-52E hemmt und somit zur Entstehung eines Mikromilieus beiträgt, welches einer physiologischen Situation näherkommt. Granato et. al. beschreiben in ihrer Arbeit, dass aktivierte Fibroblasten sich beispielsweise durch eine gesteigerte Synthese von α -SMA oder COX-2 von normalen Fibroblasten unterscheiden. Des Weiteren ist die Hauptaufgabe aktivierter Fibroblasten nicht mehr die Homöostase von Matrixproteinen [194]. Es gibt weitere Arbeiten, die beschreiben, dass aktivierte Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten vermehrt Zytokine wie MCP-1, IL-6 und TNF sezernieren [195-197]. In NRK-49F Zellen unter Kokulturbedingungen war die Expression der für IL-6, MCP-1, TNF, COX-2 und α -SMA kodierenden mRNAs vermindert. Das deutet darauf hin, dass der Phänotyp der Fibroblasten in Kokultur im Vergleich zur Monokultur mehr dem normaler Gewebsfibroblasten entspricht. Außerdem war die Expression der für Kollagen I und Fibronectin kodierenden mRNA erhöht. Dies bedeutet, dass die Fibroblasten in Kokultur ihre physiologische Funktion in der Homöostase der Matrixproteine besser ausüben können und wurde auch von Hakelius et. al. beschrieben [198].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Mehrheit der Änderungen darauf hindeutet, dass die Zellen in Kokultur die Situation in der Niere besser widerspiegeln als Zellen in Monokultur.

4.2.5. Einfluss von OTA auf den Zelltod von Epithelzellen und Fibroblasten

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass OTA erst ab 1000 nM einen Einfluss auf den Zelltod der betrachteten Zelllinien hatte. Für die Epithelzellen in Monokultur konnte gezeigt werden, dass die LDH-Freisetzung anstieg, was auf die Entstehung einer Nekrose deutet. In Fibroblasten hingegen stieg die Caspase-3 Aktivität an. Dies deutet auf die Entwicklung einer Apoptose hin. In Kokultur hingegen waren die Caspase-3 Aktivität sowie die LDH-Freisetzung der beiden Zelllinien nach OTA-Inkubation unverändert. Dies zeigt, dass in Kokultur beide Zelllinien vor dem OTA-induzierten Zelltod bei einer Konzentration von 1000 nM geschützt sind. Ein solcher protektiver Einfluss der Kokultur konnte auch schon für die Wirkung des in der onkologischen Systemtherapie häufig verwendeten Zytostatikums Cisplatin gezeigt werden und unterstreicht die Überlegenheit einer Kokultur gegenüber der Monokultur [199].

4.2.6. Einfluss von OTA die Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose in Epithelzellen in Mono- und Kokultur

Nach Einwirkung eines nephrotoxischen Stimulus können vor allem in Epithelzellen des proximalen Tubulus Expressionsänderungen von Proteinen beobachtet werden, die charakteristisch für eine EMT sind. Oftmals beeinflussen diese geschädigten Epithelzellen das tubulo-interstitielle Milieu durch Sekretion proinflammatorisch wirkender Zytokine und beeinflussen damit umliegende Zellen [92, 94]. Wie im ersten Diskussionsteil erläutert, gibt es bisher keine Daten, die den Zusammenhang zwischen einer Exposition mit OTA im nanomolaren Bereich und der Entstehung einer EMT beschreiben. Dies wurde noch nicht in einem Kokultursystem überprüft. Die vorliegenden Daten zeigen, dass OTA in Epithelzellen nur in Kokultur mit Fibroblasten zu Expressionsänderungen von Proteinen führt, die typisch für die Entstehung einer EMT sind (Verminderung der E-Cadherin- sowie Erhöhung der Fibronectin- und Vimentin Proteinexpression). Darüber hinaus konnte eine Änderung der Zellmorphologie von einer kubischen zu einer spindel-ähnlichen Form demonstriert werden. Diese morphologische Änderung unterstützt die Annahme, dass die Zellen in eine EMT übergegangen sind. Die Proteinexpression von TNF, COX-2 und Kollagen III war vermindert. Die vorliegenden Daten liefern keinen Hinweis dafür, dass die NRK-52E Zellen zur Entstehung eines inflammatorischen oder fibrotischen Milieus beitragen.

4.2.7. Einfluss von OTA die Entstehung von Inflammation, EMT und Fibrose in Fibroblasten in Mono- und Kokultur

Die OTA-Inkubation führte in Fibroblasten in Monokultur zu einem Expressionsanstieg der Kollagen I- und Fibronectin Proteine. Dieser Effekt verschwand unter Kokulturbedingungen. Im Kapitel 4.2.4. wurde beschrieben, dass die Fibroblasten in Kokultur, im Vergleich zur Monokultur einen Phänotyp bilden, der dem Phänotyp unter physiologischen Bedingungen näherkommt. Hierzu gehört auch, dass die Fibroblasten ihre physiologische Funktion der Matrixproteinsynthese gezielter ausüben. Möglicherweise ist in NRK-49F die Syntheserate der Matrixproteine in Kokultur höher als in Monokultur, sodass die OTA-Inkubation in Kokultur keine weitere Erhöhung der Matrixproteinsynthese nach sich zieht. Für diese Vermutung spricht die gestiegene Expression der für Kollagen I und Fibronectin kodierenden mRNA in Fibroblasten unter Kokulturbedingungen. In Bezug auf das inflammatorische Zytokin TNF zeigen die vorliegenden Daten, dass die OTA-Inkubation zu einer Expressionsverminderung von TNF in Monokultur führt. Dieser Effekt verschwindet allerdings in Kokultur. Diese Daten deuten darauf hin, dass den Fibroblasten nach OTA-Inkubation in Kokultur mehr TNF Protein zur Verfügung steht, als in Monokultur. Wenn diese Proteine auch vermehrt sezerniert werden, kann dies die zelluläre Kommunikation modulieren, beispielsweise indem TNF in NRK-49F Zellen die Synthese von COX-2 Metaboliten erhöht und somit das tubulo-interstitielle Milieu verändert [200]. In der vorliegenden Arbeit wurde nach OTA-Inkubation eine Expressionserhöhung von COX-2 Protein nur unter Kokulturbedingung gemessen. Dies deutet einerseits auf eine inflammatorische Reaktion der Fibroblasten hin, andererseits kann dies auch zu einer Erhöhung der COX-2-Aktivität führen. Dies hätte zur Folge, dass mehr COX-2-Metabolite sezerniert und somit die zelluläre Kommunikation verändert würde. Darüber hinaus hat die OTA-Inkubation zu einer Expressionserhöhung von WISP-1 nur unter Kokulturbedingung geführt. WISP-1 ist ein Protein, das sezerniert wird und an der Entstehung von Fibrose beteiligt ist. So kann diese Veränderung die Entstehung einer tubulo-interstitiellen Fibrose unterstützen.

4.2.8. Rolle von miRs an der Vermittlung OTA-induzierter Effekte

Die beobachteten Expressionsänderungen der Proteine waren meistens nicht durch Expressionsänderungen der für sie kodierenden mRNAs erklärbar. Dies deutet auf eine posttranskriptionelle Regulation hin. In den letzten Jahren haben sich miRs zunehmend als posttranskriptionelle Regulatoren der Genexpression erwiesen. Darüber hinaus unterstützt ihre Dysregulation die Pathogenese diverser Krankheiten wie Malignome, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Nephropathien. Speziell für Nephropathien gibt es Daten, die zeigen, dass die Expression von miR-21, -29b und -200a verändert ist [201, 202]. Darüber hinaus führt eine OTA-Inkubation zu einer Expressionsänderung der genannten miRs [203, 204]. Dies macht sie zu möglichen Kandidaten als Mediatoren der beobachteten OTA-induzierten

Effekte auf die Proteinexpression. Die Kokultur per se führte zu einer Expressionserhöhung von miR-21 und -200a in Epithelzellen und der von miR-200a in Fibroblasten. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass OTA in der Monokultur der Epithelzellen zu einer Verminderung der Menge der drei miRs führte. Dieser Effekt verschwand unter Kokulturbedingungen und vereinzelt konnte sogar eine leichte Expressionserhöhung dieser miRs gezeigt werden. Dies könnte bedeuten, dass die miRs in Kokultur vermehrt exprimiert oder stabilisiert werden und sie somit ihre Zielstruktur effektiver hemmen können. Durch Inhibition der miRs wurde überprüft, ob sie an der Vermittlung der OTA-induzierten Expressionsänderungen der Proteine beteiligt sind. Sowohl simultane Inhibition von miR-21 und -200a als auch die Hemmung von miR-29b durch AntagomiRs verhinderte die OTA-induzierte Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in Epithelzellen. Dies liefert einen Hinweis darauf, dass eine basale Aktivität dieser miRs notwendig ist, um die beobachteten OTA-induzierten Veränderungen zu ermöglichen. Des Weiteren verhinderte die simultane Inhibition von miR-21 und -200a auch die OTA-vermittelte Expressionserhöhung des COX-2 Proteins in Fibroblasten. Es muss angemerkt werden, dass die Inhibitionsexperimente in der Kokultur stattfanden und somit beide Zellentypen gleichzeitig betrafen. Eine mögliche Erklärung dieses protektiven Effekts ist, dass die miRs eine eher permissive Rolle in den Zellen haben, die sie im Rahmen der Inhibition nicht mehr ausüben können. Eine alternative Erklärung wäre ein Transfer der miRs von den Epithelzellen zu den Fibroblasten vermittelt durch Exosomen oder an Proteine gebunden welche an der Vermittlung der OTA-Effekte beteiligt sind.

4.2.9. Rolle von COX-2 an der Vermittlung OTA-induzierter Effekte

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die OTA-induzierten Effekte in Kokultur auf die Monokultur transferierbar sind. Hierzu wurde konditioniertes Medium aus der Kokultur auf die Monokultur übertragen und es konnten OTA-Effekte gemessen werden, die zuvor ausschließlich unter Kokulturbedingungen zu beobachten waren. Diese Daten weisen darauf hin, dass eine Interaktion zwischen den untersuchten Zelltypen vorherrscht, die unabhängig von einem direkten Zellkontakt ist. Bekannte lösliche Mediatoren, die in der Niere die zelluläre Kommunikation vermitteln, sind COX-2-Metabolite. Im Abschnitt 4.2.7. wurde auch beschrieben, dass eine OTA-Inkubation zu einer Expressionserhöhung von COX-2 in Fibroblasten, exklusiv in Kokultur, führt. Außerdem wurde in der Literatur beschrieben, dass Fibroblasten über COX-2 Metabolite mit benachbarten Zellen kommunizieren können [205]. Darüber hinaus ist bekannt, dass COX-2 in der Niere sowohl an der Ausübung physiologischer Funktionen, als auch an der Entstehung verschiedenster tubulo-interstitieller Schädigungen beteiligt ist [206-208]. Daher ist denkbar, dass der OTA-induzierte Expressionsanstieg des COX-2 Proteins in Fibroblasten auch zu einer veränderten Sekretion von COX-2-Metaboliten führt, die wiederum auf umliegende Epithelzellen

einwirken. Tatsächlich haben Experimente, in denen die COX-2-Aktivität gehemmt wurde, gezeigt, dass dies die OTA-induzierte Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in Epithelzellen verhindert. Dies stimmt mit Aussagen aus der Literatur überein, laut denen eine COX-2-Inhibition in Nierenzellen die Synthese extrazellulärer Matrixproteine hemmt [209]. Die COX-2-Metabolite Prostaglandin E2 und F2 sind denkbare Kandidaten für die Vermittlung der gemessenen Effekte, denn beide können an der Entstehung pathologischer Prozesse in der Niere beteiligt sein. Während PGE2 an der Entstehung diabetischer Nephropathien und des Nierenzellkarzinoms beteiligt ist, fördert PGF2 die Entstehung von Glomerulosklerose und tubulo-interstitieller Fibrose [210-212]. Es bleibt noch anzumerken, dass NRK-49F tatsächlich in der Lage sind, diese Prostaglandine zu synthetisieren [213]. Im nächsten Schritt stand die Frage im Fokus, wie die löslichen Mediatoren (z.B. COX-2 Metabolite) in intrazelluläre Signale übersetzt werden. Hierfür wurde die Beteiligung von MAP-Kinasen in Betracht gezogen, da ihre Hauptfunktion die Translation extrazellulärer Signale in zelluläre Antworten darstellt.

4.2.10. Rolle von MAPK bei der Vermittlung OTA-induzierter Effekte

Es wurde vielfach beschrieben, dass die MAPK ERK1/2 an der Vermittlung diverser OTA-Effekte involviert und an der zellulären Kommunikation zwischen Tubuluszellen und Fibroblasten beteiligt sind sowie beispielsweise nach Einwirkung eines fibrotischen Stimulus die Expression von Fibronectin erhöhen [162, 178, 214-217]. Daher wurden sie auch für die in Kokultur gemessenen OTA-Effekte in Betracht gezogen. In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der ERK1/2 nach OTA-Inkubation in beiden Zelllinien erhöht war, was für eine höhere Aktivität dieser Kinasen spricht. Zum anderen wirkte sich eine Hemmung der ERK1/2 protektiv gegenüber der OTA-vermittelten Expressionserhöhung von Fibronectin in den Epithelzellen und der Expressionserhöhung von COX-2 in Fibroblasten aus. Ein denkbarer Zusammenhang der im Kapitel 4.2. aufgezeigten Effekte ist, dass OTA in den Fibroblasten zu einer Expressionserhöhung des COX-2 Proteins und folglich zu seiner erhöhten Aktivität führt. Dies könnte zu einer erhöhten Sekretion von COX-2-Metaboliten wie z.B. PGE2 oder PGF2 in den Extrazellularraum führen, die als lösliche Mediatoren an der zellulären Kommunikation beteiligt sind und so die Epithelzellen beeinflussen können. Dies könnte sich unter anderem den gemessenen Expressionsanstieg von Fibronectin hervorrufen.

5. Zusammenfassung

Teil I) In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob sich die Wirkung zweier Mykotoxine (OTA und CIT) auf Nierenepithelzellen verändert, wenn sie gleichzeitig vorhanden sind. Dazu wurde eine humane Epithelzelllinie aus dem proximalen Tubulus (HK-2) gewählt. Die Toxine wurden in Konzentrationen verwendet, die im Blut gesunder Probanden zu finden sind. Es zeigte sich, dass die simultane Inkubation mit diesen Mykotoxinen stärkere Effekte hervorrief, als der Einsatz nur eines Toxins. So konnte eine synergistische Interaktion von CIT und OTA bezüglich ihrer Wirkung auf die proximalen Tubuluszellen gezeigt werden, was sich u.a. in einer erhöhten Expression Inflammations- und Fibrose-assoziiierter Proteine zeigte. Darüber hinaus induzierte die simultane Inkubation mit OTA und CIT Expressionsänderungen epithelialer und mesenchymaler Proteine sowie morphologische Änderungen. Diese Veränderungen können in der Niere die Entstehung von Nephropathien begünstigen. Die Mykotoxin-induzierte Expressionserhöhung der für TNF kodierenden mRNA wurde zumindest teilweise durch die ERK1/2 und JNK1/2 Signalwege vermittelt.

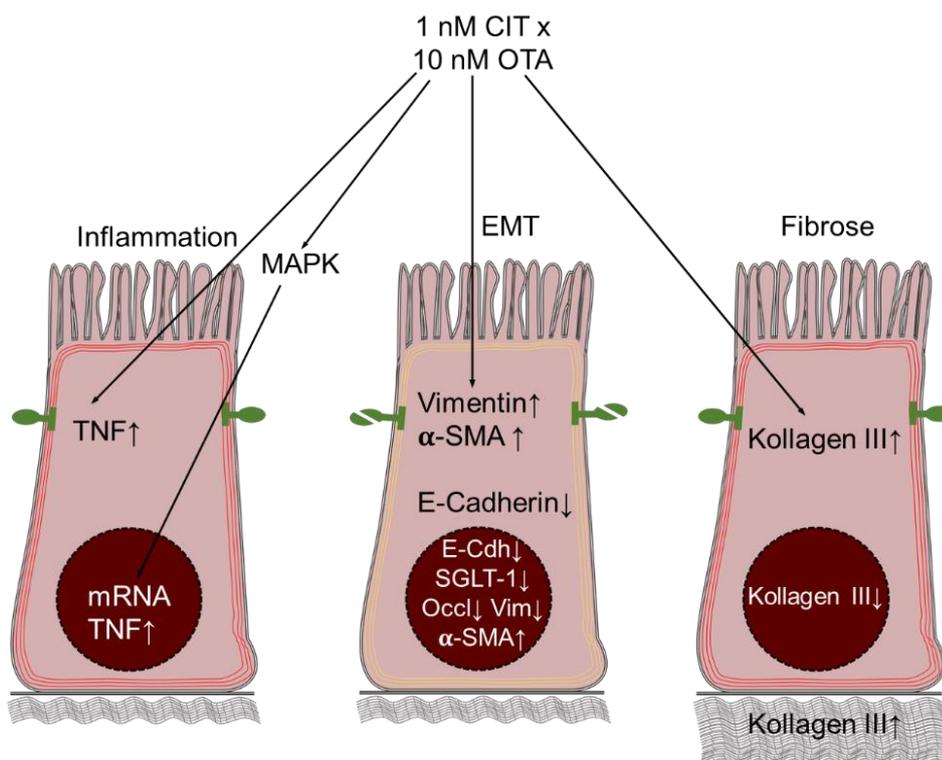


Abbildung 32: Zusammenfassung der Effekte der simultanen Inkubation von HK-2 mit OTA und CIT.

Die simultane Inkubation von HK-2 Zellen mit 1 nM CIT und 10 nM OTA führte zur Expressionsverminderung der Proteine des epithelialen E-Cadherins sowie zur verringerten Expression der für E-Cadherin, Occludin, SGLT-1, Vimentin und Kollagen III kodierenden mRNAs und zu einer Expressionserhöhung des TNF- Vimentin- α-SMA- und Kollagen III Proteins und der für TNF kodierenden mRNA. Die Expressionserhöhung der TNF mRNA wurde über die MAPK ERK1/2 und JNK1/2 vermittelt.

CIT-Citrinin, OTA-Ochratoxin A, E-Cdh E-Cadherin, SGLT-1-Natrium-Glukose-Kotransporter-1, Occl – Occludin, Vim – Vimentin, α-SMA – α-Aktin der glatten Muskulatur

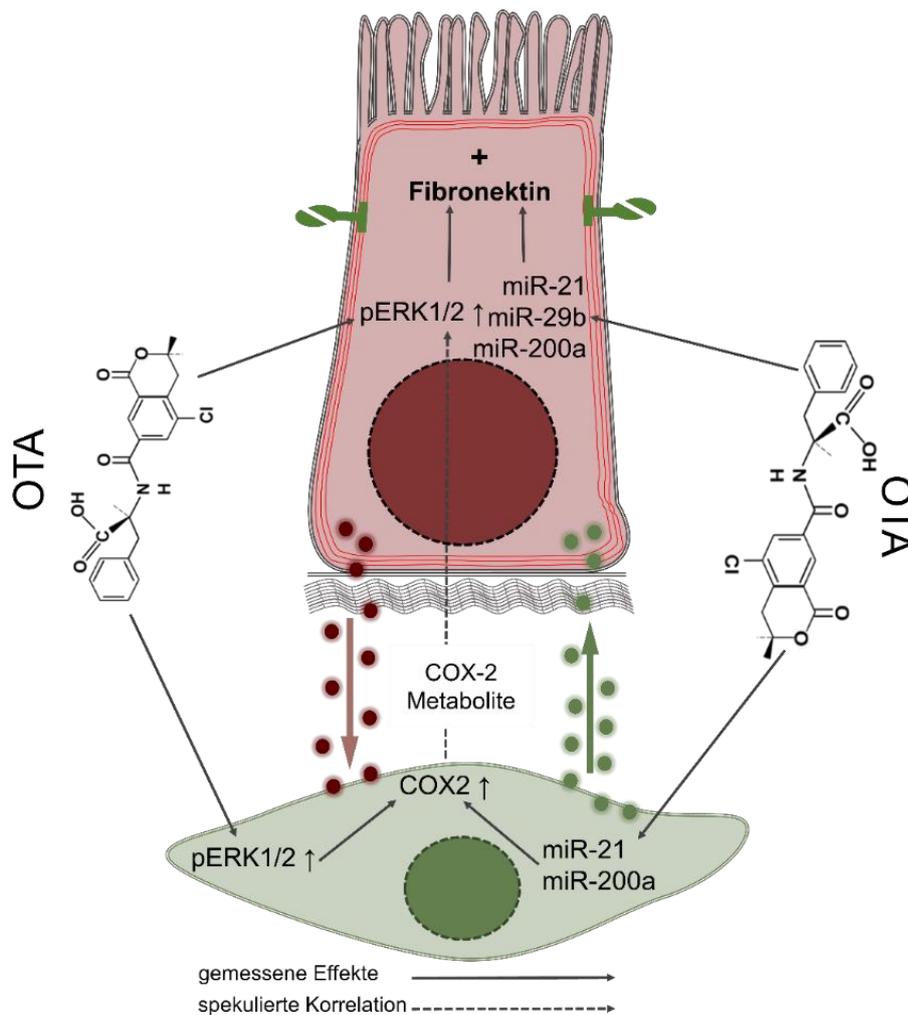


Abbildung 33: Signalwege OTA-induzierter Effekte in der Kokultur.

Nach 48 h Inkubation mit OTA zeigte sich exklusiv in Kokultur in Epithelzellen eine Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins und in Fibroblasten des COX-2 Proteins. OTA-Inkubation in beiden Zelllinien führte zu einer Erhöhung der ERK1/2 Phosphorylierung. Eine Hemmung von ERK1/2 verhinderte die OTA-induzierte Expressionserhöhung des Fibronectins in Epithelzellen und des COX-2 in Fibroblasten. Eine Inhibition von COX-2 verhinderte die OTA-induzierte Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in Epithelzellen. Als weitere Mediatoren der OTA-induzierten Effekte wurden miR-21 -29b und 200a in Betracht gezogen werden. Die simultane Inhibition von miR-21 und -200a wirkte sich protektiv gegenüber der OTA-induzierten Expressionserhöhung des Fibronectin Proteins in Epithelzellen und des COX-2 Proteins in Fibroblasten aus. Des Weiteren verhinderte die Hemmung von miR-29b die vermehrte Expression des Fibronectin Proteins in Epithelzellen. ERK1/2 - Extrazelluläre-Signale regulierte Kinasen 1/2, miR – mikroRNAs, COX-2 Cyclooxygenase-2, OTA – Ochratoxin A

Teil II) Im zweiten Teil der Arbeit konnte mittels eines Kokulturmodells gezeigt werden, dass die nephropathische Wirkung von OTA durch zelluläre Kommunikation zwischen Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus und renalen Fibroblasten verstärkt wird. Das hat sich in einer Expressionserhöhung proinflammatorischer und profibrotischer Proteine in Fibroblasten sowie der Entstehung einer EMT in Epithelzellen gezeigt, die jeweils exklusiv nur in Kokultur zu beobachten waren.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Beteiligung der mikroRNAs21, -29b, -200a sowie die Beteiligung der COX-2 und der ERK1/2 für die Vermittlung der OTA-Effekte notwendig ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass es lohnenswert ist, OTA in komplexeren experimentellen Szenarien zu untersuchen, die der *in vivo*-Situation ähnlicher sind. Das nierentoxische Potential von OTA kann sich sowohl durch Interaktion mit anderen Mykotoxinen als auch durch zelluläre Kommunikation zu erhöhen.

1. Wang, Y., et al., *Ochratoxin A Producing Fungi, Biosynthetic Pathway and Regulatory Mechanisms*. Toxins (Basel), 2016. **8**(3).
2. Searcy, J.W., N.D. Davis, and U.L. Diener, *Biosynthesis of ochratoxin A*. Appl Microbiol, 1969. **18**(4): p. 622-7.
3. Huff, W.E. and P.B. Hamilton, *Mycotoxins - Their Biosynthesis in Fungi: Ochratoxins - Metabolites of Combined Pathways*. J Food Prot, 1979. **42**(10): p. 815-820.
4. Schmidt-Heydt, M., et al., *The biosynthesis of ochratoxin A by Penicillium as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods*. Food Microbiol, 2012. **29**(2): p. 233-41.
5. Stoll, D., M. Schmidt-Heydt, and R. Geisen, *Differences in the regulation of ochratoxin A by the HOG pathway in Penicillium and Aspergillus in response to high osmolar environments*. Toxins (Basel), 2013. **5**(7): p. 1282-98.
6. Josefsson, B.G. and T.E. Moller, *Heat stability of ochratoxin A in pig products*. J Sci Food Agric, 1980. **31**(12): p. 1313-5.
7. Torrey, G.S. and E.H. Marth, *Isolation and Toxicity of Molds from Foods Stored in Homes*. J Food Prot, 1977. **40**(3): p. 187-190.
8. Krogh, P., et al., *Fate of ochratoxin A and citrinin during malting and brewing experiments*. Appl Microbiol, 1974. **28**(1): p. 31-4.
9. Nip, W.K., et al., *Fate of ochratoxin A in brewing*. Appl Microbiol, 1975. **30**(6): p. 1048-9.
10. Shotwell, O.L., M.L. Goulden, and C.W. Hesseltine, *Survey of U.S. wheat for ochratoxin and aflatoxin*. J Assoc Off Anal Chem, 1976. **59**(1): p. 122-4.
11. Kabak, B., *Aflatoxins and ochratoxin A in chocolate products in Turkey*. Food Addit Contam Part B Surveill, 2019: p. 1-6.
12. Silva, L.J.G., et al., *Ochratoxin A in the Portuguese Wine Market, Occurrence and Risk Assessment*. Food Addit Contam Part B Surveill, 2019. **12**(2): p. 145-149.
13. Walker, R., *Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants*. Adv Exp Med Biol, 2002. **504**: p. 249-55.
14. Authority, E.F.S. *Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to ochratoxin A in food*. 2006 9 June 2006 [cited 2006 09-06].
15. Hagelberg, S., K. Hult, and R. Fuchs, *Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties*. J Appl Toxicol, 1989. **9**(2): p. 91-6.
16. Kumagai, S., *Effects of plasma ochratoxin A and luminal pH on the jejunal absorption of ochratoxin A in rats*. Food Chem Toxicol, 1988. **26**(9): p. 753-8.
17. Chu, F.S., *Interaction of ochratoxin A with bovine serum albumin*. Arch Biochem Biophys, 1971. **147**(2): p. 359-66.
18. Bow, D.A., et al., *The impact of plasma protein binding on the renal transport of organic anions*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(1): p. 349-55.
19. Hald, B., *Ochratoxin A in human blood in European countries*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 159-64.
20. Wu, Q., et al., *Metabolic pathways of ochratoxin A*. Curr Drug Metab, 2011. **12**(1): p. 1-10.
21. Ringot, D., et al., *Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update*. Chem Biol Interact, 2006. **159**(1): p. 18-46.
22. Galtier, P., et al., *The pharmacokinetic profile of ochratoxin A in the rat after oral and intravenous administration*. Drug Metab Dispos, 1979. **7**(6): p. 429-34.
23. Studer-Rohr, I., J. Schlatter, and D.R. Dietrich, *Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans*. Arch Toxicol, 2000. **74**(9): p. 499-510.
24. Ostry, V., et al., *Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification*. Mycotoxin Res, 2017. **33**(1): p. 65-73.
25. Frank, H.K., *Risk estimation for ochratoxin A in European countries*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 321-5.
26. Dirheimer, G. and E.E. Creppy, *Mechanism of action of ochratoxin A*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 171-86.

27. Schaaf, G.J., et al., *The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in proximal tubular cells*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1588**(2): p. 149-58.
28. Szczech, G.M., et al., *Ochratoxin A toxicosis in swine*. Vet Pathol, 1973. **10**(4): p. 347-64.
29. Zhu, L., et al., *miR-122 plays an important role in ochratoxin A-induced hepatocyte apoptosis in vitro and in vivo*. Toxicol Res (Camb), 2016. **5**(1): p. 160-167.
30. Zhu, L., et al., *A Review: Epigenetic Mechanism in Ochratoxin A Toxicity Studies*. Toxins (Basel), 2017. **9**(4).
31. Aleo, M.D., R.D. Wyatt, and R.G. Schnellmann, *Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules*. Toxicol Appl Pharmacol, 1991. **107**(1): p. 73-80.
32. Lambert, D., et al., *Ochratoxin A displaces claudins from detergent resistant membrane microdomains*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(2): p. 632-6.
33. Wang, H., et al., *OTA induces intestinal epithelial barrier dysfunction and tight junction disruption in IPEC-J2 cells through ROS/Ca(2+)-mediated MLCK activation*. Environ Pollut, 2018. **242**(Pt A): p. 106-112.
34. Ferrante, M.C., et al., *Expression of COX-2 and hsp72 in peritoneal macrophages after an acute ochratoxin A treatment in mice*. Life Sci, 2006. **79**(13): p. 1242-7.
35. Darif, Y., et al., *Ochratoxin A mediates MAPK activation, modulates IL-2 and TNF-alpha mRNA expression and induces apoptosis by mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways in human H9 T cells*. J Toxicol Sci, 2016. **41**(3): p. 403-16.
36. Gekle, M., C. Sauvant, and G. Schwerdt, *Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells*. Mol Nutr Food Res, 2005. **49**(2): p. 118-30.
37. Stoev, S.D., B. Hald, and P.G. Mantle, *Porcine nephropathy in Bulgaria: a progressive syndrome of complex or uncertain (mycotoxin) aetiology*. Vet Rec, 1998. **142**(8): p. 190-4.
38. Elling, F. and T. Moller, *Mycotoxic nephropathy in pigs*. Bull World Health Organ, 1973. **49**(4): p. 411-8.
39. Krogh, P., *Ochratoxin A residues in tissues of slaughter pigs with nephropathy*. Nord Vet Med, 1977. **29**(9): p. 402-5.
40. Elling, F., *Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: alterations in enzyme activity in tubular cells*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1979. **87A**(4): p. 237-43.
41. Stoev, S.D., et al., *Complex etiology and pathology of mycotoxic nephropathy in South African pigs*. Mycotoxin Res, 2010. **26**(1): p. 31-46.
42. Meucci, V., et al., *Serum levels of ochratoxin A in dogs with chronic kidney disease (CKD): a retrospective study*. J Vet Med Sci, 2017. **79**(2): p. 440-447.
43. Elling, F., et al., *Spontaneous toxic nephropathy in poultry associated with ochratoxin A*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1975. **83**(6): p. 739-41.
44. Elling, F., *Demonstration of ochratoxin A in kidneys of pigs and rats by immunofluorescence microscopy*. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1977. **85A**(2): p. 151-6.
45. Filali, A., et al., *Ochratoxin A in human plasma in Morocco: a preliminary survey*. Hum Exp Toxicol, 2002. **21**(5): p. 241-5.
46. Hassan, A.M., et al., *Study of ochratoxin A as an environmental risk that causes renal injury in breast-fed Egyptian infants*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(1): p. 102-5.
47. El-Sayed, A.A., E.A. Soher, and A. Neamat-Allah, *Human exposure to mycotoxins in Egypt*. Mycotoxin Res, 2002. **18**(1): p. 23-30.
48. Hmaissia Khelifa, K., et al., *Ochratoxin A levels in human serum and foods from nephropathy patients in Tunisia: where are you now?* Exp Toxicol Pathol, 2012. **64**(5): p. 509-12.
49. Zaied, C., et al., *Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA*. Exp Toxicol Pathol, 2011. **63**(7-8): p. 613-8.
50. Welborn, J.R., C.E. Groves, and S.H. Wright, *Peritubular transport of ochratoxin A by single rabbit renal proximal tubules*. J Am Soc Nephrol, 1998. **9**(11): p. 1973-82.

51. Jung, K.Y., et al., *Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters*. Life Sci, 2001. **69**(18): p. 2123-35.
52. Anzai, N., et al., *Functional characterization of rat organic anion transporter 5 (Slc22a19) at the apical membrane of renal proximal tubules*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(2): p. 534-44.
53. Babu, E., et al., *Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1590**(1-3): p. 64-75.
54. Anzai, N., P. Jutabha, and H. Endou, *Molecular mechanism of ochratoxin a transport in the kidney*. Toxins (Basel), 2010. **2**(6): p. 1381-98.
55. Schwerdt, G., et al., *Apical-to-basolateral transepithelial transport of Ochratoxin A by two subtypes of Madin-Darby canine kidney cells*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1324**(2): p. 191-9.
56. Schwerdt, G., et al., *Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture*. Toxicology, 2007. **232**(1-2): p. 57-67.
57. Mapari, S.A., U. Thrane, and A.S. Meyer, *Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants?* Trends Biotechnol, 2010. **28**(6): p. 300-7.
58. Ostry, V., F. Malir, and J. Ruprich, *Producers and important dietary sources of ochratoxin A and citrinin*. Toxins (Basel), 2013. **5**(9): p. 1574-86.
59. Subramani, R., et al., *Cytotoxic and antibacterial substances against multi-drug resistant pathogens from marine sponge symbiont: Citrinin, a secondary metabolite of Penicillium sp.* Asian Pac J Trop Biomed, 2013. **3**(4): p. 291-6.
60. Wang, L., et al., *Effects of Light Intensity and Color on the Biomass, Extracellular Red Pigment, and Citrinin Production of Monascus ruber*. J Agric Food Chem, 2016. **64**(50): p. 9506-9514.
61. Stormer, F.C., et al., *Does the mycotoxin citrinin function as a sun protectant in conidia from Penicillium verrucosum*. Mycopathologia, 1998. **142**(1): p. 43-7.
62. Pleadin, J., et al., *Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in unprocessed cereals established during a three-year investigation period*. Food Addit Contam Part B Surveill, 2018. **11**(1): p. 20-25.
63. Larsen, T.O., A. Svendsen, and J. Smedsgaard, *Biochemical characterization of ochratoxin A-producing strains of the genus Penicillium*. Appl Environ Microbiol, 2001. **67**(8): p. 3630-5.
64. Culig, B., et al., *Presence of Citrinin in Grains and Its Possible Health Effects*. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017. **14**(3): p. 22-30.
65. Faisal, Z., et al., *Interaction of the mycotoxin metabolite dihydrocitrinone with serum albumin*. Mycotoxin Res, 2019. **35**(2): p. 129-139.
66. Poor, M., et al., *Interaction of Citrinin with Human Serum Albumin*. Toxins (Basel), 2015. **7**(12): p. 5155-66.
67. Blaszkewicz, M., K. Munoz, and G.H. Degen, *Methods for analysis of citrinin in human blood and urine*. Arch Toxicol, 2013. **87**(6): p. 1087-94.
68. Follmann, W., C. Behm, and G.H. Degen, *Toxicity of the mycotoxin citrinin and its metabolite dihydrocitrinone and of mixtures of citrinin and ochratoxin A in vitro*. Arch Toxicol, 2014. **88**(5): p. 1097-107.
69. Phillips, R.D., W.O. Berndt, and A.W. Hayes, *Distribution and excretion of [¹⁴C]citrinin in rats*. Toxicology, 1979. **12**(3): p. 285-98.
70. Berndt, W.O., *The role of transport in chemical nephrotoxicity*. Toxicol Pathol, 1998. **26**(1): p. 52-7.
71. Sugiyama, K., et al., *Inhibitory effect of citrinin on lipopolisaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells*. Mycotoxin Res, 2013. **29**(4): p. 229-34.
72. Flajs, D. and M. Peraica, *Toxicological properties of citrinin*. Arh Hig Rada Toksikol, 2009. **60**(4): p. 457-64.
73. Vrabcheva, T., et al., *Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy*. J Agric Food Chem, 2000. **48**(6): p. 2483-8.

74. van Egmond, H.P., *Methods for determining ochratoxin A and other nephrotoxic mycotoxins*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 57-70.
75. Krejci, M.E., N.S. Bretz, and D.A. Koechel, *Citrinin produces acute adverse changes in renal function and ultrastructure in pentobarbital-anesthetized dogs without concomitant reductions in [potassium]plasma*. Toxicology, 1996. **106**(1-3): p. 167-77.
76. Chagas, G.M., et al., *Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells*. Cell Struct Funct, 1994. **19**(2): p. 103-8.
77. Berndt, W.O. and A.W. Hayes, *Effects of citrinin on renal tubular transport functions in the rat*. J Environ Pathol Toxicol, 1978. **1**(1): p. 93-103.
78. Kitchen, D.N., W.W. Carlton, and J. Tuite, *Ochratoxin A and citrinin induced nephrosis in Beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features*. Vet Pathol, 1977. **14**(2): p. 154-72.
79. Rasic, D., et al., *Oxidative stress as a mechanism of combined OTA and CTN toxicity in rat plasma, liver and kidney*. Hum Exp Toxicol, 2019. **38**(4): p. 434-445.
80. Heung, M. and L.S. Chawla, *Acute kidney injury: gateway to chronic kidney disease*. Nephron Clin Pract, 2014. **127**(1-4): p. 30-4.
81. Makris, K. and L. Spanou, *Acute Kidney Injury: Definition, Pathophysiology and Clinical Phenotypes*. Clin Biochem Rev, 2016. **37**(2): p. 85-98.
82. Garcia-Ortuno, L.E. and N.A. Bobadilla, *Integrative View of the Mechanisms that Induce Acute Kidney Injury and its Transition to Chronic Kidney Disease*. Rev Invest Clin, 2018. **70**(6): p. 261-268.
83. *Chapter 1: Definition and classification of CKD*. Kidney Int Suppl (2011), 2013. **3**(1): p. 19-62.
84. Rivara, M.B., et al., *Indication for Dialysis Initiation and Mortality in Patients With Chronic Kidney Failure: A Retrospective Cohort Study*. Am J Kidney Dis, 2017. **69**(1): p. 41-50.
85. Barnett, L.M.A. and B.S. Cummings, *Nephrotoxicity and Renal Pathophysiology: A Contemporary Perspective*. Toxicol Sci, 2018. **164**(2): p. 379-390.
86. Elledge, M.F., et al., *Chronic Kidney Disease of Unknown Etiology in Sri Lanka: Quest for Understanding and Global Implications*, in *RTI Press Research Brief*. 2014: Research Triangle Park (NC).
87. Lunyera, J., et al., *CKD of Uncertain Etiology: A Systematic Review*. Clin J Am Soc Nephrol, 2016. **11**(3): p. 379-85.
88. Chevalier, R.L., *The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(1): p. F145-61.
89. Schelling, J.R., *Tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression*. Pediatr Nephrol, 2016. **31**(5): p. 693-706.
90. Moll, S., et al., *Epithelial cells as active player in fibrosis: findings from an in vitro model*. PLoS One, 2013. **8**(2): p. e56575.
91. Morgado-Pascual, J.L., et al., *Epigenetic Modification Mechanisms Involved in Inflammation and Fibrosis in Renal Pathology*. Mediators Inflamm, 2018. **2018**: p. 2931049.
92. Magno, A.L., et al., *Current Knowledge of IL-6 Cytokine Family Members in Acute and Chronic Kidney Disease*. Biomedicines, 2019. **7**(1).
93. Zhang, W., et al., *Extracellular vesicles in diagnosis and therapy of kidney diseases*. Am J Physiol Renal Physiol, 2016. **311**(5): p. F844-F851.
94. Ferenbach, D.A. and J.V. Bonventre, *Kidney tubules: intertubular, vascular, and glomerular cross-talk*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016. **25**(3): p. 194-202.
95. El-Achkar, T.M. and P.C. Dagher, *Tubular cross talk in acute kidney injury: a story of sense and sensibility*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(12): p. F1317-23.
96. Colombo, M., G. Raposo, and C. Thery, *Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2014. **30**: p. 255-89.
97. Lyu, L.L., Y. Feng, and B.C. Liu, *Urinary Biomarkers for Chronic Kidney Disease with a Focus on Gene Transcript*. Chin Med J (Engl), 2017. **130**(18): p. 2251-2256.

98. Dong, H., et al., *MicroRNA: function, detection, and bioanalysis*. Chem Rev, 2013. **113**(8): p. 6207-33.
99. Nara, K., et al., *Anti-inflammatory roles of microRNA 21 in lipopolysaccharide-stimulated human dental pulp cells*. J Cell Physiol, 2019. **234**(11): p. 21331-21341.
100. Mohr, A.M. and J.L. Mott, *Overview of microRNA biology*. Semin Liver Dis, 2015. **35**(1): p. 3-11.
101. Li, Y.F., et al., *MicroRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury*. Protein Cell, 2013. **4**(11): p. 813-9.
102. Huang, Y., Y. He, and J. Li, *MicroRNA-21: a central regulator of fibrotic diseases via various targets*. Curr Pharm Des, 2015. **21**(17): p. 2236-42.
103. Lin, Q., et al., *MiR-21 Regulates TNF-alpha-Induced CD40 Expression via the SIRT1-NF-kappaB Pathway in Renal Inner Medullary Collecting Duct Cells*. Cell Physiol Biochem, 2017. **41**(1): p. 124-136.
104. Song, N., et al., *miR-21 Protects Against Ischemia/Reperfusion-Induced Acute Kidney Injury by Preventing Epithelial Cell Apoptosis and Inhibiting Dendritic Cell Maturation*. Front Physiol, 2018. **9**: p. 790.
105. Liu, X., et al., *Transforming growth factor-beta-sphingosine kinase 1/S1P signaling upregulates microRNA-21 to promote fibrosis in renal tubular epithelial cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2016. **241**(3): p. 265-72.
106. Kang, Z., et al., *Remote ischemic preconditioning upregulates microRNA-21 to protect the kidney in children with congenital heart disease undergoing cardiopulmonary bypass*. Pediatr Nephrol, 2018. **33**(5): p. 911-919.
107. Zheng, S.B., et al., *Microvesicles containing microRNA-21 secreted by proximal tubular epithelial cells are involved in renal interstitial fibrosis by activating AKT pathway*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(3): p. 707-714.
108. Wang, F., et al., *Antagonist of microRNA-21 improves balloon injury-induced rat iliac artery remodeling by regulating proliferation and apoptosis of adventitial fibroblasts and myofibroblasts*. J Cell Biochem, 2012. **113**(9): p. 2989-3001.
109. Li, G., et al., *Fibroproliferative effect of microRNA-21 in hypertrophic scar derived fibroblasts*. Exp Cell Res, 2016. **345**(1): p. 93-9.
110. Thum, T., et al., *MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 980-4.
111. Zhao, C., et al., *MicroRNA-29b regulates hypertrophy of murine mesenchymal stem cells induced toward chondrogenesis*. J Cell Biochem, 2019.
112. Pandey, M., S. Sultana, and K.P. Gupta, *Involvement of epigenetics and microRNA-29b in the urethane induced inception and establishment of mouse lung tumors*. Exp Mol Pathol, 2014. **96**(1): p. 61-70.
113. Liu, H., et al., *microRNA-29b: an emerging player in human cancer*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(21): p. 9059-64.
114. Cha, M.J., et al., *The microRNA-dependent cell fate of multipotent stromal cells differentiating to endothelial cells*. Exp Cell Res, 2016. **341**(2): p. 139-46.
115. Abonnenc, M., et al., *Extracellular matrix secretion by cardiac fibroblasts: role of microRNA-29b and microRNA-30c*. Circ Res, 2013. **113**(10): p. 1138-47.
116. Drummond, C.A., et al., *Na/K-ATPase signaling regulates collagen synthesis through microRNA-29b-3p in cardiac fibroblasts*. Physiol Genomics, 2016. **48**(3): p. 220-9.
117. Maegdefessel, L., J. Azuma, and P.S. Tsao, *MicroRNA-29b regulation of abdominal aortic aneurysm development*. Trends Cardiovasc Med, 2014. **24**(1): p. 1-6.
118. Pan, J., et al., *Role of microRNA-29b in angiotensin II-induced epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells*. Int J Mol Med, 2014. **34**(5): p. 1381-7.
119. Hennemeier, I., et al., *Role of microRNA-29b in the ochratoxin A-induced enhanced collagen formation in human kidney cells*. Toxicology, 2014. **324**: p. 116-22.
120. Nagaoka, K., et al., *Epithelial cell differentiation regulated by MicroRNA-200a in mammary glands*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65127.

121. Sene Lde, B., et al., *Involvement of renal corpuscle microRNA expression on epithelial-to-mesenchymal transition in maternal low protein diet in adult programmed rats*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e71310.
122. Kito, N., et al., *miRNA Profiles of Tubular Cells: Diagnosis of Kidney Injury*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 465479.
123. Wang, G., et al., *Intrarenal expression of miRNAs in patients with hypertensive nephrosclerosis*. Am J Hypertens, 2010. **23**(1): p. 78-84.
124. Nasrallah, R. and R.L. Hebert, *Prostacyclin signaling in the kidney: implications for health and disease*. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. **289**(2): p. F235-46.
125. Norregaard, R., T.H. Kwon, and J. Frokiaer, *Physiology and pathophysiology of cyclooxygenase-2 and prostaglandin E2 in the kidney*. Kidney Res Clin Pract, 2015. **34**(4): p. 194-200.
126. Rios, A., et al., *Cyclooxygenase-2 and kidney failure*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2012. **98**(3-4): p. 86-90.
127. Harris, R.C., *COX-2 and the kidney*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **47 Suppl 1**: p. S37-42.
128. Yang, T. and M. Liu, *Regulation and function of renal medullary cyclooxygenase-2 during high salt loading*. Front Biosci (Landmark Ed), 2017. **22**: p. 128-136.
129. Kramer, B.K., M.C. Kammerl, and M. Komhoff, *Renal cyclooxygenase-2 (COX-2). Physiological, pathophysiological, and clinical implications*. Kidney Blood Press Res, 2004. **27**(1): p. 43-62.
130. Jia, Z., et al., *Role of COX-2/mPGES-1/prostaglandin E2 cascade in kidney injury*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 147894.
131. Saba-EI-Leil, M.K., C. Fremin, and S. Meloche, *Redundancy in the World of MAP Kinases: All for One*. Front Cell Dev Biol, 2016. **4**: p. 67.
132. Lake, D., S.A. Correa, and J. Muller, *Negative feedback regulation of the ERK1/2 MAPK pathway*. Cell Mol Life Sci, 2016. **73**(23): p. 4397-4413.
133. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3100-12.
134. Yoon, S. and R. Seger, *The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions*. Growth Factors, 2006. **24**(1): p. 21-44.
135. Sun, Y., et al., *Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis*. J Recept Signal Transduct Res, 2015. **35**(6): p. 600-4.
136. Shi, Y. and M. Gaestel, *In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance*. Biol Chem, 2002. **383**(10): p. 1519-36.
137. Stock, C., et al., *Migration of human melanoma cells depends on extracellular pH and Na⁺/H⁺ exchange*. J Physiol, 2005. **567**(Pt 1): p. 225-38.
138. Shi, S., et al., *Toxicity study of oxalicumone A, derived from a marine-derived fungus Penicillium oxalicum, in cultured renal epithelial cells*. Mol Med Rep, 2017. **15**(5): p. 2611-2619.
139. Gunness, P., et al., *Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity*. Can J Physiol Pharmacol, 2010. **88**(4): p. 448-55.
140. Guo, Y., et al., *Parathyroid hormone induces epithelial-to-mesenchymal transition via the Wnt/beta-catenin signaling pathway in human renal proximal tubular cells*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 5978-87.
141. Sayarlioglu, H., et al., *Is there any role of epithelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of contrast nephropathy?* Ren Fail, 2016. **38**(8): p. 1249-55.
142. Slusser, A., et al., *Cadherin expression, vectorial active transport, and metallothionein isoform 3 mediated EMT/MET responses in cultured primary and immortalized human proximal tubule cells*. PLoS One, 2015. **10**(3): p. e0120132.
143. Prozialeck, W.C., P.C. Lamar, and D.M. Appelt, *Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron*. BMC Physiol, 2004. **4**: p. 10.

144. Prozialeck, W.C., P.C. Lamar, and S.M. Lynch, *Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and beta-catenin in the proximal tubule epithelium*. Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **189**(3): p. 180-95.
145. Nouwen, E.J., et al., *Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney*. Kidney Int, 1993. **44**(1): p. 147-58.
146. Prozialeck, W.C., et al., *Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(6): p. 942-53.
147. Chang, C.Y., et al., *FXVD2c plays a potential role in modulating Na(+)/K (+)-ATPase activity in HK-2 cells upon hypertonic challenge*. J Membr Biol, 2014. **247**(1): p. 93-105.
148. Wang, Q., Y. Lu, and M.E. Morris, *Monocarboxylate transporter (MCT) mediates the transport of gamma-hydroxybutyrate in human kidney HK-2 cells*. Pharm Res, 2007. **24**(6): p. 1067-78.
149. Wu, Y., et al., *Oxidative Stress-Activated NHE1 Is Involved in High Glucose-Induced Apoptosis in Renal Tubular Epithelial Cells*. Yonsei Med J, 2016. **57**(5): p. 1252-9.
150. Chonlaket, P., T. Wongwan, and S. Soodvilai, *Liver X receptor activation inhibits SGLT2-mediated glucose transport in human renal proximal tubular cells*. Exp Physiol, 2018. **103**(2): p. 250-260.
151. Jenkinson, S.E., et al., *The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule*. Pflugers Arch, 2012. **464**(6): p. 601-11.
152. Tsuda, M., et al., *Transport of ochratoxin A by renal multispecific organic anion transporter 1*. J Pharmacol Exp Ther, 1999. **289**(3): p. 1301-5.
153. Knecht, A., et al., *Combinatory effects of citrinin and ochratoxin A in immortalized human proximal tubule cells*. Mycotoxin Res, 2005. **21**(3): p. 176-81.
154. Bouslimi, A., et al., *Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxin a and citrinin: individual and combined effects*. Toxicol Mech Methods, 2008. **18**(4): p. 341-9.
155. Klaric, M.S., et al., *A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin*. Arch Toxicol, 2012. **86**(1): p. 97-107.
156. Petkova-Bocharova, T. and M. Castegnaro, *Ochratoxin A in human blood in relation to Balkan endemic nephropathy and urinary tract tumours in Bulgaria*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 135-7.
157. Maaroufi, K., et al., *Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia*. Arch Toxicol, 1995. **69**(8): p. 552-8.
158. Ali, N., K. Hossain, and G.H. Degen, *Blood plasma biomarkers of citrinin and ochratoxin A exposure in young adults in Bangladesh*. Mycotoxin Res, 2018. **34**(1): p. 59-67.
159. Degen, G.H., N. Ali, and U. Gundert-Remy, *Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers*. Toxicol Lett, 2018. **282**: p. 43-48.
160. Chang, C.H., et al., *Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells*. Toxicol Appl Pharmacol, 2009. **237**(3): p. 281-7.
161. van Kooten, C. and M.R. Daha, *Cytokine cross-talk between tubular epithelial cells and interstitial immunocompetent cells*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2001. **10**(1): p. 55-9.
162. Hennemeier, I., et al., *The food contaminant and nephrotoxin ochratoxin A enhances Wnt1 inducible signaling protein 1 and tumor necrosis factor-alpha expression in human primary proximal tubule cells*. Mol Nutr Food Res, 2012. **56**(9): p. 1375-84.
163. Bernardini, C., et al., *Cellular stress marker alteration and inflammatory response in pigs fed with an ochratoxin contaminated diet*. Res Vet Sci, 2014. **97**(2): p. 244-50.

164. Wu, T.S., et al., *Evaluation of nephrotoxic effects of mycotoxins, citrinin and patulin, on zebrafish (Danio rerio) embryos*. Food Chem Toxicol, 2012. **50**(12): p. 4398-404.
165. Schulz, S., et al., *Relation between the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene and protein expression, and clinical, biochemical, and genetic markers: age, body mass index and uric acid are independent predictors for an elevated TNF-alpha plasma level in a complex risk model*. Eur Cytokine Netw, 2004. **15**(2): p. 105-11.
166. Malaviya, R., J.D. Laskin, and D.L. Laskin, *Anti-TNFalpha therapy in inflammatory lung diseases*. Pharmacol Ther, 2017. **180**: p. 90-98.
167. Zhao, C., et al., *Role of tumor necrosis factor-alpha in epithelial-to-mesenchymal transition in transplanted kidney cells in recipients with chronic allograft dysfunction*. Gene, 2018. **642**: p. 483-490.
168. Sauvant, C., H. Holzinger, and M. Gekle, *The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells*. Cell Physiol Biochem, 2005. **15**(1-4): p. 125-34.
169. Gagliano, N., et al., *Ochratoxin A-induced renal cortex fibrosis and epithelial-to-mesenchymal transition: molecular mechanisms of ochratoxin A-injury and potential effects of red wine*. Mol Med, 2005. **11**(1-12): p. 30-8.
170. Lash, L.H., et al., *Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications*. Biochem Pharmacol, 2002. **64**(10): p. 1533-46.
171. Rajasekaran, S.A., et al., *Na,K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis*. Mol Cancer Ther, 2010. **9**(6): p. 1515-24.
172. Lee, Y.J. and H.J. Han, *Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3beta, Snail1, and beta-catenin in renal proximal tubule cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(5): p. F1263-75.
173. Ekblom, P. and A. Weller, *Ontogeny of tubulointerstitial cells*. Kidney Int, 1991. **39**(3): p. 394-400.
174. Lewis, M.P., L.G. Fine, and J.T. Norman, *Pexicrine effects of basement membrane components on paracrine signaling by renal tubular cells*. Kidney Int, 1996. **49**(1): p. 48-58.
175. Krogh, P., et al., *Porcine nephropathy induced by long-term ingestion of ochratoxin A*. Vet Pathol, 1979. **16**(4): p. 466-75.
176. Hald, B., *Porcine nephropathy in Europe*. IARC Sci Publ, 1991(115): p. 49-56.
177. Ozcan, Z., G. Gul, and I. Yaman, *Ochratoxin A activates opposing c-MET/PI3K/Akt and MAPK/ERK 1-2 pathways in human proximal tubule HK-2 cells*. Arch Toxicol, 2015. **89**(8): p. 1313-27.
178. Sauvant, C., H. Holzinger, and M. Gekle, *Proximal tubular toxicity of ochratoxin A is amplified by simultaneous inhibition of the extracellular signal-regulated kinases 1/2*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(1): p. 234-41.
179. Prunotto, M., et al., *Epithelial-mesenchymal crosstalk alteration in kidney fibrosis*. J Pathol, 2012. **228**(2): p. 131-47.
180. Tan, R.J., D. Zhou, and Y. Liu, *Signaling Crosstalk between Tubular Epithelial Cells and Interstitial Fibroblasts after Kidney Injury*. Kidney Dis (Basel), 2016. **2**(3): p. 136-144.
181. de Larco, J.E. and G.J. Todaro, *Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation*. J Cell Physiol, 1978. **94**(3): p. 335-42.
182. Sauvant, C., H. Holzinger, and M. Gekle, *Prostaglandin E2 inhibits its own renal transport by downregulation of organic anion transporters rOAT1 and rOAT3*. J Am Soc Nephrol, 2006. **17**(1): p. 46-53.
183. Alzayadneh, E.M. and M.C. Chappell, *Nuclear expression of renin-angiotensin system components in NRK-52E renal epithelial cells*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(4): p. 1135-48.
184. Wang, Y., et al., *Let-7d miRNA prevents TGF-beta1-induced EMT and renal fibrogenesis through regulation of HMGA2 expression*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **479**(4): p. 676-682.

185. Li, S.S., et al., *Tranilast attenuates TGF-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition in the NRK-52E cells*. Pak J Pharm Sci, 2014. **27**(1): p. 51-5.
186. Jiang, L., et al., *A microRNA-30e/mitochondrial uncoupling protein 2 axis mediates TGF-beta1-induced tubular epithelial cell extracellular matrix production and kidney fibrosis*. Kidney Int, 2013. **84**(2): p. 285-96.
187. Bai, Y., et al., *Resveratrol inhibits epithelial-mesenchymal transition and renal fibrosis by antagonizing the hedgehog signaling pathway*. Biochem Pharmacol, 2014. **92**(3): p. 484-93.
188. Saenz-Morales, D., et al., *Requirements for proximal tubule epithelial cell detachment in response to ischemia: role of oxidative stress*. Exp Cell Res, 2006. **312**(19): p. 3711-27.
189. Lewis, M.P. and J.T. Norman, *Differential response of activated versus non-activated renal fibroblasts to tubular epithelial cells: a model of initiation and progression of fibrosis?* Exp Nephrol, 1998. **6**(2): p. 132-43.
190. Wei, C.C., et al., *Interleukin-20 targets renal cells and is associated with chronic kidney disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(3): p. 448-53.
191. Wang, H., et al., *beta-Aminoisobutyric acid ameliorates the renal fibrosis in mouse obstructed kidneys via inhibition of renal fibroblast activation and fibrosis*. J Pharmacol Sci, 2017. **133**(4): p. 203-213.
192. Xue, X., et al., *Protein kinase Calpha drives fibroblast activation and kidney fibrosis by stimulating autophagic flux*. J Biol Chem, 2018. **293**(28): p. 11119-11130.
193. O'Brien, E., A.H. Heussner, and D.R. Dietrich, *Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B*. Toxicol Sci, 2001. **63**(2): p. 256-64.
194. Granato, G., et al., *Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: an experimental system to study myofibroblasts deactivation*. Cell Death Discov, 2017. **3**: p. 17038.
195. Komohara, Y. and M. Takeya, *CAFs and TAMs: maestros of the tumour microenvironment*. J Pathol, 2017. **241**(3): p. 313-315.
196. Comito, G., et al., *Cancer-associated fibroblasts and M2-polarized macrophages synergize during prostate carcinoma progression*. Oncogene, 2014. **33**(19): p. 2423-31.
197. De Monte, L., et al., *Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer*. J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 469-78.
198. Hakelius, M., et al., *Differential Gene Regulation in Fibroblasts in Co-culture with Keratinocytes and Head and Neck SCC Cells*. Anticancer Res, 2015. **35**(6): p. 3253-65.
199. Halabian, R., et al., *Co-culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells overexpressing lipocalin 2 with HK-2 and HEK293 cells protects the kidney cells against cisplatin-induced injury*. Cell Biol Int, 2015. **39**(2): p. 152-63.
200. Levine, L., et al., *The stimulation of prostaglandin production by transforming growth factor-alpha and 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate or 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol is synergistic*. Biochem Biophys Res Commun, 1985. **130**(1): p. 110-7.
201. Cao, J., et al., *MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells*. Mol Med Rep, 2016. **13**(1): p. 75-82.
202. Chau, B.N., et al., *MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways*. Sci Transl Med, 2012. **4**(121): p. 121ra18.
203. Loboda, A., et al., *Nrf2 deficiency exacerbates ochratoxin A-induced toxicity in vitro and in vivo*. Toxicology, 2017. **389**: p. 42-52.
204. Stachurska, A., et al., *Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells*. Mol Nutr Food Res, 2013. **57**(3): p. 504-15.
205. Alcolea, S., et al., *Interaction between head and neck squamous cell carcinoma cells and fibroblasts in the biosynthesis of PGE2*. J Lipid Res, 2012. **53**(4): p. 630-42.

206. Qiu, J., et al., *TNF α up-regulates COX-2 in chronic progressive nephropathy through nuclear accumulation of RelB and NF-kappaB2*. Arch Physiol Biochem, 2016. **122**(2): p. 88-93.
207. Nasrallah, R., R. Hassouneh, and R.L. Hebert, *PGE2, Kidney Disease, and Cardiovascular Risk: Beyond Hypertension and Diabetes*. J Am Soc Nephrol, 2016. **27**(3): p. 666-76.
208. Yang, Y., et al., *Salt restriction leads to activation of adult renal mesenchymal stromal cell-like cells via prostaglandin E2 and E-prostanoid receptor 4*. Hypertension, 2015. **65**(5): p. 1047-54.
209. El Chaar, M., et al., *Cyclooxygenase-2 inhibitor decreases extracellular matrix synthesis in stretched renal fibroblasts*. Nephron Exp Nephrol, 2005. **100**(4): p. e150-5.
210. Maraqa, A.D., *Effect of atorvastatin on interleukins and prostaglandin E2 in the kidney of type 1 diabetic rats*. Eur Cytokine Netw, 2016. **27**(4): p. 97-101.
211. Kaminska, K., et al., *The role of prostaglandin E2 in renal cell cancer development: future implications for prognosis and therapy*. Future Oncol, 2014. **10**(14): p. 2177-87.
212. Dey, A., et al., *Rofecoxib decreases renal injury in obese Zucker rats*. Clin Sci (Lond), 2004. **107**(6): p. 561-70.
213. Lahoua, Z., et al., *Mechanism of the activation of arachidonic acid release by oxysterols in NRK 49F cells: role of calcium*. Cell Signal, 1989. **1**(6): p. 569-76.
214. Ponnusamy, M., et al., *ERK pathway mediates P2X7 expression and cell death in renal interstitial fibroblasts exposed to necrotic renal epithelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2011. **301**(3): p. F650-9.
215. Sekine, S., et al., *Possible involvement of mitogen-activated protein kinase in the angiotensin II-induced fibronectin synthesis in renal interstitial fibroblasts*. Arch Biochem Biophys, 2003. **415**(1): p. 63-8.
216. Zhu, B., et al., *Emodin inhibits extracellular matrix synthesis by suppressing p38 and ERK1/2 pathways in TGF-beta1-stimulated NRK-49F cells*. Mol Med Rep, 2011. **4**(3): p. 505-9.
217. Chen, Z., et al., *Inorganic phosphate stimulates fibronectin expression in renal fibroblasts*. Cell Physiol Biochem, 2012. **30**(1): p. 151-9.

Eidesstattliche Erklärung / Declaration under Oath

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

I declare under penalty of perjury that this thesis is my own work entirely and has been written without any help from other people. I used only the sources mentioned and included all the citations correctly both in word or content.

Halle (Saale), 05.12.2019

Marie-Christin Schulz

Danksagung

Der Erfolg einer wissenschaftlichen Arbeit ist in der Regel nicht dem Bemühen einer einzigen Person geschuldet, daher möchte ich mich an dieser Stelle bei all denen bedanken, die mich auf diesem langen, schwierigen Weg unterstützt haben.

Ich bedanke mich herzlich ...

... bei Herrn PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt für die Betreuung dieser Arbeit und dafür, dass er sich stets meiner Sorgen und Problemen angenommen hat und mir half konstruktive Lösungen zu finden.

... bei Herrn Prof. Dr. med. Micheal Gekle, dass er mich im Julius-Bernstein-Institut aufgenommen und ausgebildet hat und mir letztendlich die Bearbeitung dieses spannenden Dissertationsthemas ermöglicht hat. Darüber hinaus möchte ich ihm dafür danken, dass er mich stets motiviert hat, für seine Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er mich in meinem Bestreben mit allen Möglichkeiten unterstützt hat.

... bei der DFG für die finanzielle Unterstützung.

... bei Prof. Dr. rer. nat. Hans-Ulrich Humpf und seinem Team für die Kooperation und den regen Austausch insbesondere beim jährlichen Mykotoxin Workshop.

... bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Wim Wätjen, für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät III und für sein stetiges Interesse an diesem Projekt, seine konstruktive Kritik und hilfreichen Hinweise.

... bei den technischen Assistentinnen/ Assistenten des Julius-Bernstein-Instituts für die Einarbeitung in die Laborarbeit und die stetige Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente sowie die gelegentliche Pflege meiner Zellen.

... bei Frau Kerstin Quarch, für ihre Hilfe bei formellen und administrativen Problemen.

... bei allen wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen/ Mitarbeitern, für die Unterstützung bei fachlichen Fragen und Problemen, für das angenehme Arbeitsumfeld und die regenerativen Pausen in denen in neue Kraft schöpfen konnte.

... bei meiner Familie und meinen Freunden, für die erholsame und kraftschöpfende Ablenkung von der Arbeit und stet offene Ohren für meine Sorgen.

...bei meinem Partner Simon Trommer mit dem ich wissenschaftliche Probleme auch nach der Arbeit wälzen konnte, der mit mir Erfolge gefeiert hat und mir bei Misserfolgen halt gegeben hat. Der auch in stressigen Zeiten sein Lächeln und seinen Frohmut nicht verloren hat und mir immer wieder geholfen hat Probleme lösungsorientiert zu betrachten.

„Wenn's einfach wäre würd's jeder machen“ Michael Gekle

22.01.2020

Marie-Christin Schulz

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Marie-Christin Schulz
Geburtsdatum: 20.05.1989
Geburtsort: Neuruppin
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Anschrift: Steiler Berg 1, 06114, Halle (Saale)
Mobiltelefon: 01578 7956632

Ausbildung

10/2015 – 10/2020 Promotion am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie in der AG Gekle zum Thema „Modulation der nierenschädigenden Wirkung von Ochratoxin A durch simultane Exposition mit Citrinin und durch tubulo-interstitielle Kommunikation“ (bewertet mit magna cum laude (1,4))

10/2013 - 09/2015 Studium des Masterstudiengangs Ernährungswissenschaften an der Martin-Luther-Universität; Abschluss Master of Science (2,0)

10/2010 - 10/2013 Studium an der Martin-Luther-Universität: Studiengang Ernährungswissenschaften; Abschluss Bachelor of Science (2,4)

09/2006 - 06/2010 Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife am Karl-Friedrich-Schinkel-Gymnasium, Neuruppin, Abschlussnote 2,2

Praktische Erfahrungen

10/2015 – 10/2020 Promotion am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie

08/2014 - 09/2015 Bearbeitung des Projekts „Einfluss von extrazellulärer Azidose auf die Homöostase der Kollagene 1, 3, 4 und Fibronectin von 3 Zelltypen der Ratte.“ im Rahmen der Masterarbeit (abgeschlossen mit 1,5). (AG Gekle)

02 - 09/2013 Laborarbeit in der AG Gekle im Rahmen der Bachelorarbeit zum Thema „Einfluss von extrazellulärer Azidose auf die Extrazellulärkomponenten in Tumorzellen und Fibroblasten“ (abgeschlossen mit 1,3)

02 - 04/2012 Praktikum in der Gemeinschaftspraxis und Tagesklinik Innere Medizin

08 - 09/2010 Praktikum beim Moorgut Kartzfehn in der Qualitätssicherung

Publikationen

Schulz, M.-C., Gekle M., Schwerdt G.: Epithelial-fibroblast cross talk aggravates the impact of the nephrotoxin ochratoxin A. BBA - Molecular Cell Research, 2019

Schulz, M.-C., Rottkord, U., Humpf, H.-U., Gekle M., Schwerdt G.: Synergistic action of the nephrotoxic mycotoxins ochratoxin A and citrinin at nanomolar concentrations in human proximal tubule-derived cells. Toxicol Lett. 2018

Schulz, M.-C.; Wagenbrett, L.; Schwerdt, G., Gekle, M.: Influence of extracellular acidosis on matrix protein homeostasis in tumour cells and fibroblasts. Adv Exp Med Biol. 2018

Rottkord, U., Röh, C., Ferse, I, Schulz, M.-C., Rückenschloss, U., Gekle, M., Schwerdt, G. and Humpf, HU.: Structure-activity relationship of ochratoxin A and synthesized derivatives: importance of amino acid and halogen moiety for cytotoxicity. Arch. Toxicol. 2016

Kongressbeiträge

Vorträge

Schulz, M.-C., Gekle, M., Schwerdt, G. (2019), Epithelial-fibroblast cross talk enhances the toxicity of ochratoxin A (OTA) in nanomolar concentrations, 41. Mycotoxin Workshop, Lissabon

Schulz, M.-C., Gekle, M., Schwerdt, G. (2019), Epithelial-fibroblast crosstalk – necessary requirement for the nephrotoxicity of ochratoxin A (OTA)?, 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Stuttgart

Schulz, M.-C., Humpf, H.-U., Gekle, M., Schwerdt, G. (2018) Epithelial-fibroblast cross-talk modulates the nephrotoxicity of ochratoxin A (OTA), 40. Mycotoxin Workshop, München

Schulz, M.-C., Humpf, H.-U., Gekle, M., Schwerdt, G. (2018) Tubule-interstitial cross talk modulates the impact of ochratoxin A (OTA) on renal epithelial cells?, 84. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Göttingen

Schulz, M.-C., Humpf, H.-U., Gekle, M., Schwerdt, G. (2017) Interaktion der nephropathischen Mykotoxine Ochratoxin A und Citrinin in humanen proximalen Tubuluszellen (HK-2), Doktorandenkongress der medizinischen Fakultät, Halle (Saale)

Schulz, M.-C., Gekle, M., Schwerdt, G. (2017) Co-occurrence of the nephrotoxic mycotoxins ochratoxin A and citrinin – mates or competitors? 39. Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz

Posterpräsentationen

Schulz, M.C.,Gekle, M.,Schwerdt, G. (2018) Tubulo-interstitial cross-talk enhances the nephropathic effect of ochratoxin A (OTA). 5. Forschungstag der medizinischen Fakultät Halle (Saale)

Schulz, M.C.,Gekle, M.,Schwerdt, G. (2018) Epithelial-fibroblast cross-talk modulates the nephrotoxicity of ochratoxin A (OTA) 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. Berlin

Schulz, M.C.,Gekle, M.,Schwerdt, G. (2017) Tubulo-interstitial cross talk modulates the impact of and ochratoxin A (OTA) on renal epithelial cells, 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie. Mannheim

Schulz, M.-C., Wagenbrett, L., Schwerdt, G., Gekle, M. (2017) Influence of extracellular acidosis on matrix proteins of tumor cells and fibroblasts. 45. Jahrestagung der internationalen Fachgesellschaft für Sauerstofftransport zum Gewebe in Halle (Saale)

Schulz, M.-C., Gekle, M., Schwerdt, G. (2017) The pathological effect of the mycotoxin Ochratoxin A (OTA) on renal tubule epithelial cells and renal fibroblasts is modulated by cellular crosstalk 83. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Heidelberg, Germany.

Schulz, M.-C., Gekle, M., Schwerdt, G. (2016) The impact of the mycotoxin Ochratoxin A (OTA) on renal tubule epithelial cells and renal fibroblasts is modulated by the cellular crosstalk., Forschungstag der medizinischen Fakultät Halle (Saale)

Schwerdt G., Rottkord, U., Schulz, M.-C., Humpf, H.-U.,Gekle, M. (2016) Necessity of different moieties of the ochratoxin A molecule to influence collagen formation or gene expression: structure-activity-studies with synthesized derivatives in comparison to natural OTA 38. Mycotoxin Workshop, Berlin, Germany.

Schulz, M.-C., Gekle, M. (2016) Influence of extracellular acidosis on matrix proteins 95. Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Physiologie, Lübeck, Germany.

Schulz M.-C., Gekle M. (2015) Influence of extracellular acidosis on matrix proteins. 26. Bilateralen Symposium Poznan-Halle.

Auszeichnungen

Posterpreis bei der 10. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Nephrologie, Berlin (2018)

Posterpreis beim 5. Forschungstag der medizinischen Fakultät, Halle (Saale) (2018)

besten Vortrag der Sitzung beim Doktorandenkongress der medizinischen Fakultät, Halle (Saale) (2017)

Vortragspreis beim 39th Mycotoxin Workshop, Bydgoszcz, Poland (2017)