Universität Ulm
Institut für Physiologische Chemie
Leiter: Professor Dr. Thomas Wirth

Die Rolle der Cytochrom P450-Isoform 2E1 und deren Inhibierung durch 12-Imidazolyldodecanol im Cisplatin-induzierten Nierenversagen

DISSERTATION

zur Erlangung des
DOKTORGRADES DER MEDIZIN
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von
DOMINIK BUCKERT
geboren in Idar-Oberstein

Ulm, 2011

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Wirth
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Barth

Tag der Promotion: 27.10.2011

Gewidmet den Menschen, die mich auf dem langen Weg bis zur Vollendung dieser Arbeit stets liebe- und verständnisvoll unterstützt haben:

Meiner Familie, meiner Freundin, meinem Mitstreiter

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **VI**

1. Einleitung **1**

1.1. Das akute Nierenversagen 1

1.2. Die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen 4

1.3. Der CYP2E1-Inhibitor 12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol) 9

1.4. Cisplatin 11

1.5. Zielsetzung 14

2. Material und Methoden **15**

2.1. Material 15

2.1.1. Chemikalien und Systeme 15
2.1.2. Puffer und Medien 16
2.1.3. Antikörper 19
2.1.4. Zelllinien 19
2.1.5. Verbrauchsmaterialien 20
2.1.6. Geräte 21

2.2. Methoden 22

2.2.1. Stocklösungen und Lösungsvorschriften 22
2.2.2. Allgemeine Zellkulturtechniken 24
2.2.3. Proteintechniken 26
2.2.4. Zellbasierte Assays im Microplateformat 30
2.2.4.1. Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue 30
2.2.4.2. Zytotoxizitätsmessung mit CytoTox-Glo 32
2.2.4.3. Messung der Caspasenaktivierung mit Caspase-Glo 3/7 33

2.2.5. Messung von freiem Eisen mit dem Bleomycin-Assay 34
2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS) 37
2.2.6.1. Prinzip 37
2.2.6.2. Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) 38
2.2.6.3. Messung des Mitochondrienpotentials mit dem JC-1-Assay 40
2.2.6.4. Messung von intrazellulärem Eisen mit Phen Green SK 43

2.2.7. Tierversuche 45
2.2.7.1. Allgemeine Haltungsanweisungen 45
2.2.7.2. Gewinnung von Probenmaterial 46
2.2.7.3. Etablierung des Modells des Cisplatin-induzierten Nierenschadens 48
2.2.7.4. Evaluierung der Testsubstanz 12-Imidazolyldodecanol 48

2.2.8. Histologische Untersuchungen der Organproben 49
2.2.8.1. Allgemeine Probenvorbereitung 49
2.2.8.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) 49

2.2.9. Datenverarbeitung und Statistik 50

3. Ergebnisse 51
3.1. Immunoblot 51
3.1.1. Immunoblots aus Mikrosomenextrakten 51
3.1.1.1. Cytochrom P450 2E1 51
3.1.1.2. Hämoxygenase 1 (HO-1) 52
3.1.2. Immunoblots aus Nierenextrakten 53
3.2. Zellbasierte Assays im Microplateformat 55
3.2.1. Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue 55
3.2.2. Zytotoxizitätsmessung mit CytoTox-Glo 57
3.2.3. Messung der Caspasenaktivierung mit Caspase-Glo 3/7 59
3.3. Messung von freiem Eisen mit dem Bleomycin-Assay 62
3.4. Durchflusszytometrie (FACS) 64
3.4.1. Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) 64
3.4.2. Messung des Mitochondrienpotentials mit dem JC-1-Assay 71
3.4.3. Messung von intrazellulärem Eisen mit Phen Green SK 76
3.5. Tierversuche 81
3.5.1. Etablierung des Modells des Cisplatin-induzierten Nierenschadens 81
3.5.2. Evaluierung der Testsubstanz 12-Imidazolyldodecanol 84
3.6. Histologische Untersuchungen der Organproben 88
3.6.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen (HE) 88
4. Diskussion 90
4.1. Interaktion von CYP2E1, Cisplatin und 12-Imidazolyldodecanol auf Proteinebene 90
4.2. Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose durch Cisplatin 93
4.3. Ursache und Wirkung des reaktiven Sauerstoffstresses durch Cisplatin 95
4.4. Die Rolle freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität 99
4.5. 12-Imidazolyldodecanol als therapeutische Substanz *in vivo* 102
4.6. Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick 104
5. Zusammenfassung 107
6. Literaturverzeichnis 109
Danksagung 125

Abkürzungsverzeichnis

12-ID-ol	12-Imidozolyldodecanol
AAF-Glo	Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin
Act	β-Aktin
AFS	Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	*Acute renal failure*, akutes Nierenversagen
ATN	*Acute tubular necrosis*, akuter Tubulusschaden
Bip	2,2‘-Bipyridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Hydroxypropyl-β-cyclodextrin, Cyclodextrin
Cp	Cisplatin
CYP450 Isoformen	Isoformen der Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen
CYP2E1	Subtyp 2E1 der CYP-Superfamilie
DCF	Dichlorofluorescein
DCFH	Dichlorofluorescin
DCFH-DA	Dichlorofluorescin-diacetat
DEVD	Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat
DMEM	*Dulbecco’s modified eagle medium*
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	*Fluorescence aktivated cell sorting,* Durchflusszytometrie
FCS	*Fetal calf serum*
FSC	*Forward scatter*, Vorwärtsstreulicht
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HBS	*Hepes buffered saline*
HBSS	*Hank’s buffered salt solution*
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HO-1	Hämoxygenase 1
i.v.	intra-venös

KG	Körpergewicht
LD_{50}	Letale Dosis 50: Dosis, bei der 50 % der Versuchstiere sterben
Men	Menadion
MW	*Molekular weight*, Molmasse
OCT	*Organic cation transporter*, organischer Kationen-transporter
PBS	Physiologische Kochsalzlösung
PCNA	*Proliferating cell nuclear antigen*
ROS	*Reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	*Rounds per minute*, Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylfulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	*Sidwards scatter*, Seitwärtsstreulicht
TBA	Thiobabitursäure

1. Einleitung

1.1. Das akute Nierenversagen

Definition

Das akute Nierenversagen (ARF: *acute renal failure*) stellt eine der größten Herausforderungen der klinischen Medizin dar [4]. Man versteht unter diesem Begriff die akut (innerhalb von Stunden bis Tagen) aufgetretene Unfähigkeit der Niere, ihre physiologischen Funktionen aufrecht zu erhalten [87]. Dazu zählen die Ausscheidung von Stoffwechselendprodukten, die Regulation des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und des Blutdrucks sowie die Beibehaltung der Homöostase, der Elektrolytzusammensetzung und des Säure-Base-Haushalts [4, 87, 167]. Aufgrund dieser Vielzahl an Aufgaben existieren in der Literatur zahlreiche unterschiedliche Definitionen des akuten Nierenversagens, wobei jeweils Kriterien herangezogen werden, die ausschließlich den Verlust einzelner dieser Leistungen widerspiegeln [120]. In der klinischen Routine zeigt dabei die Messung der im Blut akkumulierenden Endprodukte des Stickstoff-Stoffwechsels, zum Beispiel des Harnstoffs und des Kreatinins, die größte Praktikabilität und Reproduzierbarkeit [5, 130]. Eine entsprechende Erhöhung dieser Substanzen im Blut, beziehungsweise die daraus berechnete Abnahme der glomerulären Filtrationsleistung (GFR), bilden dementsprechend die Grundlage der 2004 verabschiedeten Konsensus-Kriterien, die für eine größere Generalisierbarkeit, Konsistenz und Reproduzierbarkeit in der Erforschung des akuten Nierenversagens sorgen sollen [15,87]. Die GFR stellt dabei ein direktes Maß für die exkretorische Leistung der Niere dar; nimmt dieser Parameter akut um 75 % ab, liegt ein akutes Nierenversagen vor [15, 16, 87].

Epidemiologie und Prognose

Abhängig von der jeweils zugrunde liegenden Definition tritt ein ARF bei 5 % bis 8 % aller im Krankenhaus behandelten Patienten auf [70, 114]. Betrachtet man dabei speziell die Patienten, die während ihres Aufenthaltes in einer intensivmedizinischen Einrichtung untergebracht werden mussten, liegt die Quote sogar bei bis zu 25 % [40]. Das Vorliegen eines akuten Nierenversagens spielt darüber hinaus eine bedeutende prognostische Rolle: Die Gesamtwahrscheinlichkeit im Krankenhaus zu versterben, beträgt bei Patienten mit ARF bis zu 20 % [4, 174]. Des Weiteren bestätigen große epidemiologische Studien, dass das Sterblichkeitsrisiko mit dem initialen Kreatinin-Anstieg korreliert ist, also ein

fulminanteres Nierenversagen mit einer höheren Sterblichkeit einhergeht [70, 114]. Interessanterweise blieben diese Zahlen trotz des allgemeinen medizinischen Fortschritts über die letzten Jahrzehnte weitestgehend unverändert [174].

Ursachen und Risikofaktoren

In den vergangenen Jahren wurden einige Untersuchungen mit dem Ziel angestellt, Patienten mit erhöhtem Risiko für ein akutes Nierenversagen zu identifizieren, um so ein tieferes Verständnis der zugrunde liegenden Ätiologie zu erreichen [3, 40, 109]. Zu den gefundenen, nicht veränderbaren Risikofaktoren zählen dabei u.a. höheres Alter, männliches Geschlecht und prä-existente Begleiterkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, Erkrankungen des kardio-vaskulären Systems und chronische Nieren- und Leberschäden [3, 109]. Darüber hinaus konnten allerdings auch einige potentiell beeinflussbare Umstände herausgearbeitet werden, die zum ARF prädisponieren. Zu ihnen gehören der Schock jeglicher Ursache, große Herz- oder Gefäßeingriffe, Hypovolämie, Rhabdomyolyse und im Besonderen die Exposition gegenüber nephrotoxischen Medikamenten [69, 108, 166]. So wird berichtet, dass etwa 20-25 % der Fälle eines akuten Nierenversagens direkt durch die Verwendung nierenschädigender Substanzen ausgelöst werden [115, 129].

Pathogenetische Mechanismen der Nierenschädigung durch Medikamente

Therapeutische Substanzen können auf unterschiedliche Weise die Niere in ihrer Funktion beeinträchtigen [115]. Dabei lassen sich allerdings einige wenige Hauptmechanismen beschreiben, denen einzelne Substanzklassen exemplarisch zugeordnet werden können und die in unterscheidbaren, idealtypischen Nierenschädigungen resultieren. Im Einzelfall können sich die jeweiligen Medikamente jedoch mehrerer dieser Mechanismen bedienen, so dass am Ende ein gemischtes Bild zu beobachten ist [129].

Grundsätzlich können Medikamente durch Veränderung des renalen bzw. glomerulären Blutflusses, durch Induktion einer interstitiellen Inflammation, durch Formation von kristallinen Präzipitaten oder durch direkte Schädigung der Tubuluszellen zum akuten Nierenversagen führen [24, 127, 132, 146, 149]. Im Folgenden soll vor allem auf die bedeutende Subentität des akuten Tubulusschadens (ATN: *acute tubular necrosis*) eingegangen werden.

Pathophysiologie des akuten Tubulusschadens

Die Zellen des proximalen Tubulus zeigen eine besondere Anfälligkeit gegenüber toxischen Schäden, da ihnen die Aufgabe obliegt, durch Reabsorptionsprozesse den Primärharn zu konzentrieren und zuvor filtrierte Elektrolyte und kleine Proteine für den Organismus zu sparen [133]. Zu diesem Zweck sind die Zellen mit verschiedenen Transportproteinen (zum Beispiel aus der Familie der organischen Kationentransporter, OCT: *organic cation transporter*) ausgestattet, die auf der luminalen Seite der Zellmembran exprimiert werden [104]. Nun stellen einige Medikamente, die primär durch freie Filtration eliminiert werden, ebenfalls Substrate für diese Transporter dar, was zu einer Anreicherung dieser Substanzen in den Zellen, vor allem des proximalen Tubulus, führt [115, 132]. Dies gilt zum Beispiel für jodhaltige Röntgenkontrastmittel, Antibiotika (Aminoglykoside) oder für Chemotherapeutika wie Cisplatin, welches Gegenstand dieser Promotionsschrift ist [106, 132]. Einmal in die Zellen aufgenommen, können die Substanzen ihre schädigende Wirkung nun auf unterschiedliche Art und Weise entfalten: Diskutiert wird, dass durch die Anreicherung in Lysosomen zelluläre Funktionen, wie beispielsweise die Proteinbiosynthese, beeinträchtigt wird [123, 129]. Hierdurch kommt es sowohl zur Apoptose als auch zur Nekrose der proximalen Tubuluszellen, was dann klinisch als akutes Nierenversagen imponiert [19]. Des Weiteren scheint eine Akkumulation der entsprechenden Substanzen zu einer Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*, siehe weiter unten) und zur Freisetzung katalytischen Eisens (Fenton Reaktion, siehe weiter unten) zu führen [57, 82, 84, 168]; ein nierenprotektiver Effekt konnte durch die vorherige Verabreichung bestimmter Antioxidantien (zum Beispiel Vitamin E) erzielt werden [77, 129]. Als Quelle sowohl der Sauerstoffspezies, als auch des freien Eisens könnten dabei fremdstoffmetabolisierende Enzyme in Frage kommen. Hier stehen vor allem die Mitglieder der Familie der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP450 Isoformen) im Verdacht, auf die im Folgenden weiter eingegangen werden soll [31, 97, 99].

1.2. Die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen

Biochemie der Cytochrom P450 Superfamilie

Die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen stellen eine große Gruppe verwandter Enzyme dar, die durch eine in nahezu allen pro- und eukaryoten Spezies vorkommende Multigenfamilie kodiert wird [48]. Sie bestehen strukturell aus einem variablen Proteinanteil, nach dem die Zuordnung der einzelnen Enzyme zu Subfamilien erfolgt sowie einem ihnen gemeinsamen Häm-Molekül, welches die prosthetische Gruppe der Enzyme bildet [53]. Sie können unter anderem die Funktion einer mischfunktionellen Hydroxylase ausüben: In ihr jeweiliges Substrat bauen sie ein Atom des molekularen Sauerstoffs als Hydroxylgruppe ein, während das andere Sauerstoffatom in der Regel durch NADPH zu Wasser reduziert wird [57]. Diese Reaktion folgt vereinfacht somit folgender Gleichung:

$$SH + O_2 + NADPH + H^+ \rightarrow SOH + H_2O + NADP^+$$

Auf molekularer Ebene wird folgender Mechanismus als der Katalyse zugrunde liegend angenommen (Abbildung 1) [57]: Das Enzym bindet mit seinem Häm-Eisen in dreiwertiger Form an das entsprechende Substrat, anschließend erfolgt die Reduktion des Eisens zu Fe^{2+} (Abb. 1b und 1c). Das benötigte Elektron stammt dabei vom NADPH, welches über das akzessorische Flavoprotein NADPH-P450-Reduktase reduziert wird [123]. Das zweiwertige Eisen bindet nun Sauerstoff (O_2) (Abb. 1d). Durch ein weiteres Elektron von der NADPH-P450-Reduktase) kommt es zur Reduktion des gebundenen Sauerstoffs zur Peroxy-Form, wobei das Häm-Eisen in seinen dreiwertigen Zustand zurückkehrt (Abb. 1e). Nach Spaltung der O-O-Bindung wird nun Wasser freigesetzt; der noch an der Häm-Gruppe verbleibende Sauerstoff (als sogenannte Oxoferryl-Gruppe) kann nun, vermutlich über einen radikalischen Mechanismus (*Groves-Newcomb* Mechanismus [116]), in C-H-Gruppen des Substrates eingebaut werden (Abb. 1f).

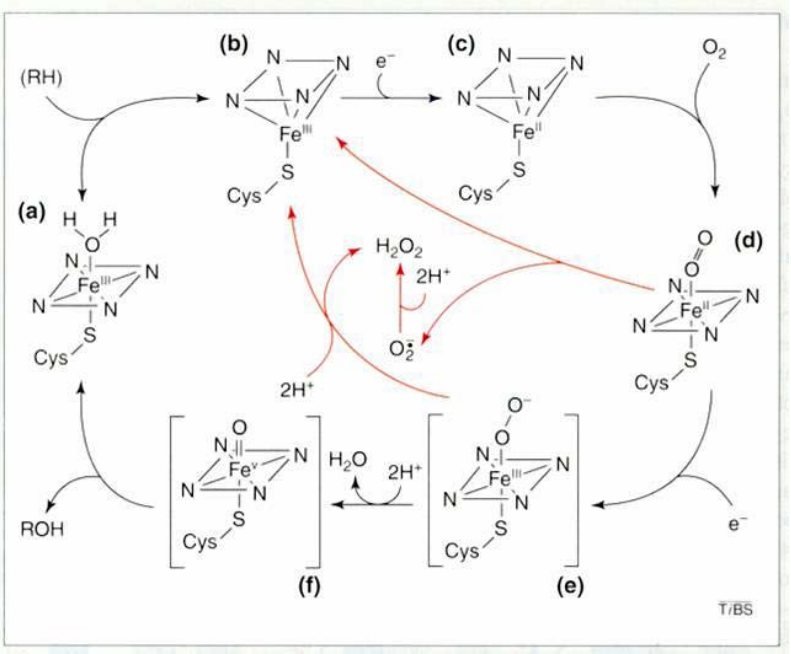


Abbildung 1: Mechanismus der katalytischen Aktivität der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen. Darstellung ist auf den Häm-Anteil reduziert [57].

Bemerkenswert ist, dass an verschiedenen Stellen des Reaktionszyklus instabile Eisen-Sauerstoff-Intermediate entstehen. Dies begünstigt, dass der nicht vollständig an das Substrat gebundene Sauerstoff reduziert und im Sinne von Substratentkopplungsreaktionen an die Umgebung abgegeben werden kann (Abbildung 1 Mitte) [83]. Auf die pathobiochemische Bedeutung dieser Beobachtung soll weiter unten ausführlicher eingegangen werden.

Vorkommen und Funktion der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen

Wie bereits erwähnt, bilden die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen eine der größten bekannten Enzymfamilien mit einer Vielzahl an Aufgaben. Bestimmte Subfamilien sind dabei in der Membran von Mitochondrien lokalisiert; der weitaus größere Teil wird allerdings in den Membranen des rauhen Endoplasmatischen Retikulums gefunden [57, 112].

Des Weiteren unterscheidet man Isoformen mit hoher bzw. niedriger Substratspezifität [53]. Die erste Gruppe spielt vor allem bei der Biosynthese der Steroidhormone, der Gallensäuren, dem Bilirubin- und Aminosäurestoffwechsel sowie in der Hydroxylierung von Fettsäurederivaten und der damit verbundenen Eicosanoidsynthese eine bedeutende Rolle [57].

Die Vertreter der zweiten Gruppe nehmen dagegen eine zentrale Rolle in der Verstoffwechslung verschiedener Fremdstoffe ein. Als sogenannte *Phase-I-Enzyme* sind sie in der Lage, vor allem hydrophobe Xenobiotica zu oxidieren und damit der Ausscheidung aus dem Organismus zugänglich zu machen [57].

Es existieren ebenso Isoformen, die beide Funktionen erfüllen, darunter fällt zum Beispiel das weiter unten genauer beschriebene CYP2E1. Weiterhin findet sich die größte Konzentration an Monooxygenasen in der Leber, allerdings lassen sich viele CYP450 Isoformen auch in extrahepatischen Geweben, wie zum Beispiel dem Gehirn, dem Herzen und der Niere nachweisen [37].

Allgemeine Pathophysiologie der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen

Die Fähigkeit der CYP450 Isoformen, verschiedenartige Xenobiotica zu metabolisieren, dient in erster Linie dazu, diese Fremdstoffe für den Organismus unschädlich zu machen. Allerdings werden bestimmte Fremdstoffe durch die CYP450 Isoformen in weitaus gefährlichere Metabolite überführt, einen Vorgang, den man *Giftung* nennt [57]. Diese durch die CYP450-Metabolisierung hydrophiler gewordenen Reaktionsprodukte können nun Addukte mit intrazellulären Strukturen, wie Proteinen, Lipiden und der DNA bilden, die wiederum als Antigene zu einer Autoimmunreaktion mit einhergehender Inflammation führen können [49, 159]. Dieser Mechanismus wird als Hauptursache Medikamenten-induzierter Lebertoxizität angenommen, wie er zum Beispiel bei Substanzen wie dem Narkosegas Halothan beobachtet wird [121]. Zusätzlich können die DNA-Veränderungen Ausgangspunkte für die Entstehung von Tumoren darstellen [80]. Hier spielen die im Gefolge der chronischen Entzündungsaktivität auftretenden Reparationsprozesse mit Gewebsneubildung und -transformation ebenfalls eine bedeutende Rolle [56].

Zusätzlich wird ein weiterer Mechanismus angenommen, über den die CYP450 Isoformen ihren Beitrag zu bestimmten pathologischen Zuständen leisten: Die Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen produzieren während ihrer enzymatischen Aktivität ständig hochreaktive Sauerstoffmetabolite (ROS), darunter das Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxidanion ($O_2\cdot^-$) und das Hydroxyl-Radikal ($HO\cdot$) [83]. Diese sind wiederum über radikalische Mechanismen in der Lage, nahezu alle Zellbestandteile in ihrer Struktur zu verändern und damit in ihrer Funktion zu beeinträchtigen. In der DNA können sie beispielsweise Mutationen induzieren, die für die Entstehung von Tumoren und für die Zellalterung verantwortlich gemacht werden. Des Weiteren können sie Proteine und Lipide

oxidieren, was in deren Funktionsverlust und schlussendlich in den Zelltod mit einhergehender Entzündungsreaktion münden kann [107, 177].

Darüber hinaus stellen die CYP450 Isoformen nicht nur die Produzenten, sondern auch die Angriffsziele reaktiver Sauerstoffspezies dar: Durch chemische Modifikation des Apoproteins oder des Häm-Moleküls kann es zur Zerstörung des Cytochroms mit nachfolgender Freisetzung der Häm-Gruppe kommen. Dieser Umstand, nämlich die Beeinträchtigung und sogar die Zerstörung der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen durch die direkten Nebenprodukte ihrer enzymatischen Aktivität, wird dabei als *mechanism based (suicide) inactivation* bezeichnet, was annähernd mit „Wirkmechanismus-assoziierte Inaktivierung“ zu übersetzen wäre [57, 82].

Die Zerstörung der Cytochrome während der enzymatischen Arbeit durch ROS kann weitreichende Folgen haben: Die veränderten Proteinanteile können als Neoantigene wirken und eine Autoimmunreaktion nach sich ziehen, was vor allem bei bestimmten Formen der akuten (Medikamenten-induzierten) Hepatitis beobachtet wird [13, 18]. Das freiwerdende, zweiwertige Häm-Eisen hingegen kann als Katalysator für gefährliche, zellschädigende Reaktionen dienen, darunter die sogenannte *Fenton-Reaktion* (Abbildung 2), bei der unter anderem das hochreaktive Hydroxyl-Radikal (HO·) entsteht [84, 168].

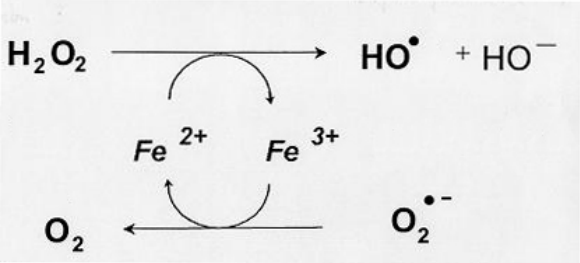


Abbildung 2: Fenton-Reaktion [42].

Dieser Vertreter der ROS besitzt die kürzeste Halbwertszeit (ca. 10^{-9} s) und das höchste Standardreduktionspotential (E_0 = +2,31 V) aller reaktiver Sauerstoffverbindungen, was seine besondere Gefährlichkeit für die Integrität der Zellstrukturen ausmacht [62]. Somit kann die ROS-bedingte Schädigung der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen letztlich zu einem weiteren Anstieg der ROS-Konzentration und damit zu einem fortschreitenden Untergang von Zellen und Geweben führen sowie Tumorwachstum befördern [169].

Unter physiologischen Umständen steht der Zelle wiederum ein Arsenal an anti-oxidativen Mechanismen zur Verfügung, um den natürlicherweise entstehenden ROS-Stress in gewissem Umfang zu kompensieren. Dazu zählen einmal die enzymatische Entfernung der Sauerstoffspezies, etwa durch die Superoxid-Dismutase, die Katalase oder die Glutathionperoxidase sowie andererseits die nicht-enzymatische „Bindung“ der Radikale durch Antioxidantien wie die Vitamine C und E [154]. Allerdings unterliegen die CYP450 Isoformen einer – je nach betrachtetem Isoenzym unterschiedlich stark ausgeprägter – Induzierbarkeit durch Xenobiotica, was in bestimmten Situationen zu einer deutlichen Zunahme der ROS-Produktion mit den erwähnten Konsequenzen führen kann [58, 139].

Besondere Bedeutung der Cytochrome der Genfamilien 2 und 4, insbesondere des Isoenzyms CYP2E1

Die Vertreter der Genfamilien 2 und 4 spielen eine sehr wichtige Rolle in der Metabolisierung verschiedener Fettsäuren sowie in der Verstoffwechslung bestimmter Xenobiotica [53]. Für diese Isoformen werden die oben beschriebenen Pathomechanismen im besonderen Maße als zutreffend erachtet [75, 84, 99]. Insbesondere das Isoenzym CYP2E1 ist hier zu nennen: Als Isoform mit der geringsten Stabilität und kürzesten Halbwertszeit weist es den höchsten Grad an Substratentkopplung auf und stellt damit als bedeutender ROS-Produzent eine besondere Gefahr für die Zelle dar [143, 178]. Daher wird eine zentrale Stellung dieses Enzyms in einer Vielzahl an pathologischen Zuständen angenommen, so in der Entstehung der alkoholischen und nicht-alkoholischen Steatohepatitis und weiterer Lebererkankungen, in der akuten Medikamenten-induzierten Hepatotoxizität (zum Beispiel bei der Acetaminophen-Intoxikation), bei der Entstehung bösartiger Tumoren und auch bei der Entwicklung eines akuten Nierenschadens [2, 26, 80, 81, 96, 97, 101, 103, 105, 134].

Interessanterweise scheint gerade das Cytochrom 2E1 nur eine geringe physiologische Funktion auszuüben, da entsprechende *Knockout*-Mäuse keine physiologische Beeinträchtigungen zeigten [54, 100].

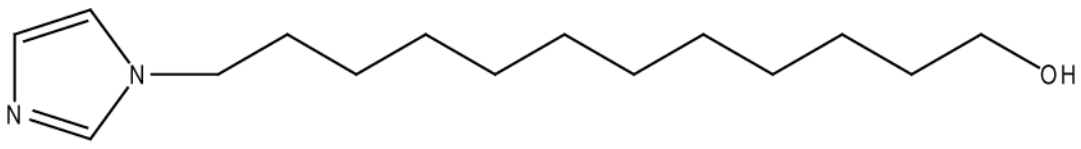
1.3. Der CYP2E1-Inhibitor 12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol)

Rationale Inhibitor-Entwicklung

Den oben ausgeführten Überlegungen folgend, scheint die spezifische Hemmung einzelner Cytochrome, allen voran der Isoform 2E1, eine therapeutische Option in einer großen Zahl von krankhaften Zuständen zu sein. Dabei konnten durch die Aufklärung der Proteinstruktur des Enzyms sowie durch die Kenntnis der Geometrie seiner natürlichen Liganden die Bindungsverhältnisse im aktiven Zentrum des Enzyms computergestützt simuliert werden [42, 136]. Dies führte zur Entwicklung des Inhibitors 12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol), der in optimaler Weise an das CYP2E1 angepasst und somit in der Lage ist, das Enzym in seiner Aktivität zu hemmen [140]. Dies geschieht in erster Linie durch die Stabilisierung des Proteins und die Blockierung seines Substratzugangskanals. Weiterhin ist erwähnenswert, dass die Aminosäuresequenzen der funktionell bedeutenden Proteinsegmente in verschiedenen Säugern (z.B. bei Mensch, Schwein, Ratte, Maus) in hohem Maße konserviert erscheinen (Übereinstimmung der Aminosäuresequenz des aktiven Zentrums bis zu 100 %), wodurch eine Übertragung von Forschungsergebnissen vom Menschen auf Versuchstiere und umgekehrt als durchaus gerechtfertigt erscheint [42].

Eigenschaften von 12-Imidazolyldodecanol

Bei dem Inhibitor 12-ID-ol handelt es sich um eine niedermolekulare, lipophile Substanz, deren systematische Bezeichnung 12 - (1*H* - Imidazol - 1 - yl) - dodecan - 1 - ol lautet. Die Strukturformel gibt Abbildung 3 wieder; die Molmasse beträgt 252,4 g/mol.



12 – (1*H* – Imidazol – 1 – yl) – dodecan – 1 – ol

$C_{14}H_{27}N_2O$

MW: 252,4 g/mol

Abbildung 3: Strukturformel, Summenformel und Molmasse von 12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol).

Löslichkeitsvermittlung durch die Trägersubstanz Hydroxypropyl-β-cyclodextrin

Aufgrund der Lipophilie von 12-ID-ol, ist die Anwendung im wässrigen Milieu organischer Systeme ohne entsprechendes Lösungsmittel stark eingeschränkt. Die Verwendung gängiger Chemikalien, wie DMSO oder Acetonitril, schied dabei aufgrund ihrer hohen Toxizität oder ihrer intrinsischen Wirkung auf das CYP2E1 aus [139].

Schließlich konnte in computergestützten Simulationsversuchen eine Substanz identifiziert werden, die als Löslichkeitsvermittler geeignet schien: Das Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (Cyclodextrin, CD) stellt ein räumlich konfiguriertes Molekül mit einem lipohilen Innenraum und einer hydrophilen Außenseite dar (Abbildung 4).

In *in silico*-Studien konnte des Weiteren gezeigt werden, dass 12-ID-ol in das Innere des CDs aufgenommen und so ein stabiler, wasserlöslicher Komlex aus beiden Substanzen gebildet wird [42]. Dieser bildete die Grundlage der folgenden *in vivo*- und *in vitro*-Studien mit dem CYP2E1-Inhibitor. Für entsprechende Lösungsvorschriften sei auf Kapitel **2.2.1.** verwiesen.

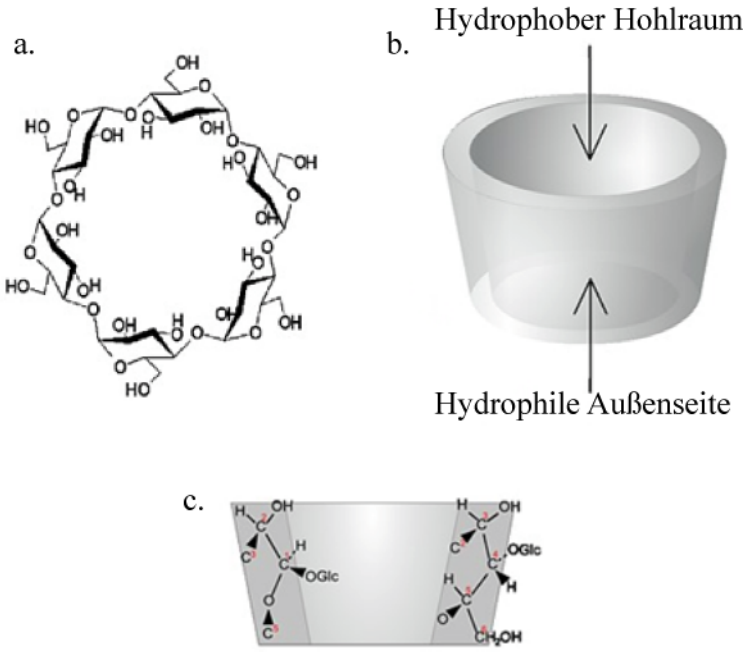
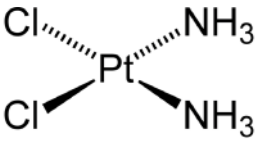


Abbildung 4: Hydroxypropyl-β-cyclodextrin. **a.:** Strukturformel in der Aufsicht. **b.:** Schematische dreidimensionale Darstellung. **c.:** Anordnung der hydrophilen Molekülgruppen nach außen [42].

1.4. Cisplatin

Eigenschaften und Anwendung

Cisplatin (Cp) ist eine antineoplastische Substanz, die in der klinischen Anwendung weite Verbreitung findet [30]. Vor etwa 40 Jahren zufällig entdeckt, bildet sie heute einen festen Bestandteil in der Behandlung von Hoden-, Eierstock-, Blasen-, Gesichts-, Hals-, Lungen- und verschiedenen anderen Tumoren [30, 144]. Dabei handelt es sich bei diesem Wirkstoff, im Gegensatz zu den meisten anderen Chemotherapeutika, die normalerweise komplexe organische Verbindungen darstellen, um ein simples anorganisches Molekül. Abbildung 5 zeigt die Strukturformel von Cisplatin und gibt Auskunft über die wichtigsten chemischen Eigenschaften.



Freiname: Cisplatin
Nomenklatur: *cis*-Diammindichloridoplatin (II)
Summenformel: $Cl_2H_6N_2Pt$
Molmasse: 300,1 g/mol

Abbildung 5: Strukturformel und Eigenschaften von Cisplatin.

Wirkmechanismus

Letztlich ist der genaue Hintergrund der antineoplastischen Aktivität von Cisplatin noch nicht vollständig aufgeklärt, dennoch gibt es einen gesicherten Konsens über den wahrscheinlichsten Wirkmechanismus [125]: In wässriger Lösung werden die Chlorid-Ionen im Komplex spontan durch Wasser-Moleküle ersetzt, dabei entsteht der zweifach positiv geladene Diaquo-Komplex [23]. Diese Ligandensubstitution lässt sich formal mit folgender Gleichung beschreiben:

$$[Pt(NH_3)_2Cl_2] + 2H_2O \leftrightarrow [Pt(NH_3)_2(H_2O)_2]^{2+} + 2Cl^-$$

Diese hoch reaktive Form von Cisplatin ist nun in der Lage, an verschiedene Strukturen der DNA zu binden, hier vor allem an die Nukleinbasen Guanin und Adenin [44]. Da es sich weiterhin um ein bifunktionales Molekül handelt und somit zwei nucleophile DNA-Reste angegriffen werden können, resultiert die Anwesenheit von Cisplatin in der Ausbildung von Brücken zwischen und innerhalb der DNA-Stränge [86]. Diese DNA-Veränderungen wiederum können nun von verschiedenen Wächterproteinen (zum Beispiel

hMSH2, HMG 1 und 2, hUBF, TBP) erkannt werden: Liegt das Ausmaß der DNA-Schädigung unter einer bestimmten Schwelle, verhindern sie die Zellteilung und initiieren die Reparaturmechanismen der betroffenen Zelle. Ist der Schaden hingegen zu groß, leiten sie den programmierten Zelltod ein [25, 47, 153]. Dabei zeigen sich schnell teilende Zellen, also insbesondere auch Krebszellen, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber solchen Veränderungen als sich langsam teilende Gewebe [125]. Hierdurch konnte Cisplatin zu einer der wichtigsten Substanzen in der modernen Krebstherapie werden.

Nebenwirkungen und Dosis-limitierende Effekte

Neben der bereits erwähnten großen Wirksamkeit gegenüber zahlreichen menschlichen Krebsarten besitzt Cisplatin eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen, die eine große Belastung für die Patienten darstellen und im Einzelfall zu einem Therapieabbruch zwingen können. Zu diesen Effekten gehören unter anderem Übelkeit und Erbrechen, Diarrhöe, Haarausfall, Myelosuppression, Neuro-, Oto- und Nephrotoxizität [32]. Die im klinischen Alltag bedeutendste Dosis-limitierende Nebenwirkung stellt dabei die – zum Teil irreversible – Schädigung der Nieren dar [125, 173]. Sie tritt bei bis zu 20 % der Patienten auf, die Cisplatin erhalten [173]. Zwar finden Applikationsregime Anwendung, die speziell diesen Effekt abmildern sollen, allerdings konnte bislang noch keine überzeugende Strategie entwickelt werden, die einen suffizienten Nierenschutz bei gleichzeitig möglichst hoher verabreichter Cisplatin-Dosis gewährleistet [1]. Hier besteht durchaus die Notwendigkeit weiterer Forschung in der Zukunft.

Mögliche Mechanismen der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität

Cisplatin wird einerseits per Diffusion, andererseits über verschiedene Transporter in das Innere der Zelle aufgenommen [72]. Insbesondere kommt es in den Zellen des proximalen Nierentubulus über die Interaktion mit dem organischen Kationentransporter 2 (*organic cation transporter*, OCT) zur Anreicherung [28]. Anschließend führt die Verabreichung von Cisplatin sowohl zum nekrotischen als auch zum apoptotischen Untergang der betroffenen Zellen [138]. So konnte gezeigt werden, dass nach Cisplatin-Inkubation die proapoptotischen Mitglieder der Bcl-2-Familie Bax und Bak induziert werden [94, 131]. Ihre Aktivierung führt zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien; hier sind unter anderem Proteine wie Cytochrom c, AIF oder Smac zu nennen. Diese wiederum können zur Aktivierung der ausführenden Proteine der Apoptose führen, den Caspasen, [158]. Weiterhin wurde berichtet, dass die Gabe von Cisplatin eine Aktivierung der Zellzyklusproteine Cdk2 und p53 und der MAP-Kinasen zur Folge hat. Dieser Zustand

begünstigt über die konsekutive Aktivierung weiterer Zielproteine ebenfalls die Apoptose [76, 90, 175].

Allerdings ist bislang noch unklar, wie genau die Aktivierung dieser intrazellulären Signalwege in der Cisplatin-Nephrotoxizität vonstatten geht. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf den ROS Stress gelegt, der nach Cisplatin-Exposition in den Nierenzellen gemessen werden kann [9]. Hier existieren wiederum Hinweise, die auf die Interaktion von Cisplatin mit den intrazellulären Cytochromen als mögliche Quelle dieser ROS hindeuten (siehe auch Kapitel **1.2.**) [7, 8]. Die intrazellulären Veränderungen, die als Folge des ROS-Stresses beobachtet werden können, könnten damit den Ausgangspunkt für die Aktivierung der verschiedenen apoptotischen Signalwege darstellen und darüber hinaus direkte zytotoxische Effekte bis hin zur Nekrose mit einhergehender Inflammation ausüben [125, 176].

Der genaue Mechanismus, über den Cisplatin seine Nephrotoxizität entfaltet, ist damit folglich noch immer nicht vollständig aufgeklärt, auch fehlt es an wirksamen Mitteln, diesen Nierenschaden zu verhindern oder zumindest weitestgehend abzumildern; aufgrund der hohen antineoplastischen Wirksamkeit Cisplatins scheint weitere Forschung auf diesem Gebiet allerdings indiziert [125].

1.5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die nierenschädigende Wirkung des Chemotherapeutikums Cisplatin untersucht werden. Folgende Fragestellungen fanden dabei besondere Beachtung:

- Kann eine Interaktion von Cisplatin mit der Cytochrom-Isoform 2E1 nachgewiesen werden?
- Können durch zellbasierte Assays im Microplateformat die Effekte von Cisplatin auf Nierenzellen bezüglich Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose *in vitro* näher beleuchtet werden?
- Können die Hypothesen der ROS-Produktion und der schädigenden Eisenfreisetzung durch Cisplatin untermauert werden?
- Kann ein Mausmodell des Cisplatin-induzierten Nierenschadens etabliert werden?
- Stellt in diesem Zusammenhang die Messung bestimmter klinischer Parameter ein geeignetes Mittel zur Überwachung der Nierenfunktion dar?
- Ist der neuartige CYP-Inhibitor 12-ID-ol geeignet, um die schädigende Wirkung von Cisplatin *in vitro* und *in vivo* aufzuheben oder zumindest abzumildern?
- Können Effekte von Cisplatin oder 12-ID-ol auf die Organe der Versuchstiere in der histologischen Begutachtung nachgewiesen werden?
- Steht damit letztendlich mit der Substanz 12-ID-ol ein neuer Wirkstoffkandidat für die Behandlung bzw. Prävention des akuten Nierenschadens zur Verfügung, der möglicherweise auch bei anderen nierenschädigenden Substanzen zum Einsatz kommen könnte?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Systeme

Chemikalien

Die im nachfolgenden alphabetisch aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Amersham Biosciences, AppliChem Darmstadt, Calbiochem, La Jolla, USA, Carl Roth, Karlsruhe, Fresenius Cabi, Bad Homburg, Invitrogen, Karlsruhe, Merck, Darmstadt, PAN Biotech Aidenach, Roche, Mannheim, Serva, Heidelberg, sowie Sigma-Aldrich, Steinheim, bezogen.

1-Butanol
12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol)
2,2‘-Bipyridin (Bip)
Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat (AFS)
Ammoniumeisensulfat
Ammoniumpersulfat (APS)
Ascorbinsäure
Bleomycin-sulfat
Bovines Serum-Albumin (BSA)
Bromphenolblau
Chelex resin
Chlorwasserstoff (HCl)
Cisplatin
Clexane
Coomassie brilliant blue
Dichlorofluorescin-diacetat (DCFH-DA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)
DNA (Kalbsthymus, Typ I)
Dulbecco’s modified eagle medium (DMEM)
Eosin
Ethanol (EtOH)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Fetal calf serum (FCS)
Formaldehyd
Glycerol
Glycin
Hämatoxylin
Hepes
Isofluran
Kaliumchlorid (KCl)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)
Kalziumchlorid ($CaCl_2$)
Magermilchpulver
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)
Mannitol
Melatonin
Menadion
Methanol
Natriumchlorid (NaCl)
Natriumdodecylfulfat (SDS)
Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$)
Natriumhydroxid (NaOH)

Neo-Mount	Thiobabitursäure (TBA)
Ortho-Phosphorsäure	Tris-HCl
Paraffin	Triton-X-100
Penicillin/Streptomycin	Trypsin/EDTA
2Phen Green SK-diacetat	Tween 20
ProLong Gold Antifade	Xylol
Polyacrylamid	β-Cyclodextrin (CD)
Saccharose	β-Mercaptoethanol
TEMED	

Systeme

Caspase-Glo 3/7 Assay Kit	Fa. Promega, Madison, USA
CellTiter-Blue Assay Kit	Fa. Promega, Madison, USA
CytoTox-Glo Assay Kit	Fa. Promega, Madison, USA
Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED Rabbit/Mouse	Fa. DAKO, Glostrup, Dänemark
MitoProbe JC-1 Assay Kit	Fa. Invitrogen, Karlsruhe
SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate	Fa. Thermo Fisher Scientific, Wilmington

2.1.2. Puffer und Medien

Medium für LLC-Pk_1 (Standard):	DMEM	
	10 % FCS	
	1 % Penicillin/Streptomycin	
Gefriermedium:	FCS	0,9 ml
	Medium	0,72 ml
	DMSO	0,18 ml
PBS für Zellkultur (pH 7,4):	NaCl	137 mM
	Na_2HPO_4	10 mM
	KCl	2,6 mM
	KH_2PO_4	1,8 mM
HBSS (*Hank's buffered salt solution*):	NaCl	137 mM

	KCl	5,4 mM
	Na_2HPO_4	0,25 mM
	KH_2PO_4	0,44 mM
	$CaCl_2$	1,3 mM
	$MgSO_4$	1,0 mM
	$NaHCO_3$	4,2 mM
HBS (*Hepes buffered saline*, pH 6,5):	Hepes	5 g
	NaCl	8 g
	KCl	0,37 g
	Na_2HPO_4	0,27 g
FACS-Puffer (pH 7,4):	Hepes	10 mM
	NaCl	140 mM
	$CaCl_2$	2,5 mM
Puffer A für Mikrosomenextraktion:	Tris-HCl (pH 7,4)	33,3 mM
	KCl	33,3 mM
	EDTA	1 mM
	Saccharose	250 mM
	Vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugeben	
Puffer B für Mikrosomenextraktion:	Tris (1M)	10 ml
	EDTA (10 mM)	100 ml
	Glycerol (100 %)	500 ml
	Aqua dest.	ad 1 l
	Vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugeben	
TNT-Puffer:	NaCl	1,17 g
	Tris-HCl (5 M, pH 8,8)	4 ml
	Triton-X-100	1 ml
	Aqua dest.	ad 100 ml
	Vor Gebrauch Proteaseinhibitoren zugeben	
Bradford-Reagenz:	*Coomassie brilliant blue*	100 mg
	Ethanol, reinst	50 ml
	Ortho-Phosphorsäure (85 %)	100 ml

	Aqua dest.	850 ml
Ladepuffer (Lämmli):	Tris-HCl (2 M, pH 6,8)	5 ml
	SDS (20 %)	10 ml
	Glycerol	13 ml
	Eine Spatelspitze Bromphenolblau	
	Aqua dest.	ad 50 ml
	Vor Gebrauch β-Mercaptoethanol (5 %) zugeben	
Trenngel für SDS-PAGE (12,5 %):	Polyacrylamid (40 %)	3,159 ml
	Aqua dest.	4,657 ml
	Tris (2 M, pH 8,8)	1,885 ml
	APS (10 %)	200 µl
	SDS (20 %)	100 µl
	TEMED	18 µl
Sammelgel für SDS-PAGE (5 %):	Polyacrylamid (40 %)	564 µl
	Aqua dest.	3,976 ml
	Tris (2 M, pH 6,8)	312 µl
	APS (10 %)	126 µl
	SDS (20 %)	25 µl
	TEMED	10 µl
Laufpuffer für SDS-PAGE:	Tris-HCl	3,025 g
	Glycin	14,4 g
	SDS (20 %)	5 ml
	Aqua dest.	ad 1 l
Transferpuffer:	Tris-HCl	5,8 g
	Glycin	2,9 g
	SDS (20 %)	1,85 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	ad 1 l
TBS/Tween:	Tris-HCl	2,24 g
	NaCl	8 g
	Aqua dest.	900 ml
	HCl (konz.)	bis pH 7,5
	Aqua dest.	ad 1 ml

	Tween 20	1 ml
Block-Milch:	Magermilchpulver	2,5 g
	TBS/Tween	50 ml
Formalin-Lösung 4 % (pH 7)	NaH_2PO_4	40 g
	Na_2HPO_4	65 g
	Aqua dest.	9 l
	Formaldehyd (37 %)	1 l

2.1.3. Antikörper

Primärantikörper

Cytochrome P450 polyklonaler Antikörper (MFO-100)	Fa. Assay Designs, Michigan, USA
HO-1 (Hsp32) polyklonaler Antikörper (SPA-895)	Fa. Assay Designs, Michigan, USA
HO-1 (Hsp32) monoklonaler Antikörper (OSA-111)	Fa. Assay Designs, Michigan, USA
β-Aktin Antikörper (8432)	Fa. Santa Cruz Biotechnology

Sekundärantikörper

Ziege anti Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (1858415)	Fa. Pierce
Ziege anti Maus, Perxidase gekoppelt (sc-2005)	Fa. Santa Cruz Biotechnology

2.1.4. Zelllinien

Für die im nachfolgenden beschrieben Experimente wurde die Zelllinie LLC-Pk_1 verwendet, eine Zelllinie, die aus immortalisierten, proximalen Nierentubuluszellen des Schweins gewonnen wurde [71]. Aufgrund ihrer funktionellen Ähnlichkeit zu menschlichen Nierenzellen und ihrer stabilen intrinsischen Expression von CYP2E1 dienten sie in zahlreichen Arbeiten als adäquates Modell des akuten Nierenschadens [7,

117, 125, 131]. Die Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Toxikologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

Als Negativkontrolle für einzelne Experimente diente des Weiteren die Zelllinie HEK 293 [55].

2.1.5. Verbrauchsmaterialien

96-well-Platten	Fa. Greiner
Cell scraper	Fa. Greiner
Deckgläser	Fa. Menzel
EDTA-Blutröhrchen	Fa. Beckton & Dickinson
Einbettkasetten	Fa. Simport
Einmalhandschuhe (latex)	Fa. Semperit Technische Produkte
Einmalskalpelle	Fa. Feather
Eppendorfgefäße, 1,5 ml, 2 ml	Fa. Eppendorf
FACS-Röhrchen	Fa. Sarstedt
Filmfolie	Fa. Ecopla
Klebeband (Leukosilk, Fixierpflaster)	Fa. BFN Medical
Kryoröhrchen	Fa. Nunc
Nitrozellulosemembrane	Fa. Whatmann
Pasteurpipetten	Fa. Brand
Pipettenspitzen	Fa. Gilson
Proteinmarker	Fa. Sigma-Aldrich
Punktionskanülen, verschiedene Kaliber	Fa. Terumo
Reaktionsgefäße (*Falcons*), 12 ml, 50 ml	Fa. Beckton & Dickinson
Röntgenfilme	Fa. Fuji
Silikonmatte	Fa. Gummi Welz
Spektrometerküvetten, 1,5 ml	Fa. Plastibrand
Spritzen, verschiedene Volumina	Fa. Beckton & Dickinson
Ultrazentrifugationsgefäße	Fa. Eppendorf
Whatmann-Papier	Fa. Whatmann
Zellkulturschalen, verschiedene Größen	Fa. Greiner

Zellstoff	Fa. Kimberly-Clark

2.1.6. Geräte

Analysenwaage	Fa. Sartorius
Automatischer Zellzähler (*Cell-Counter*, Vi-Cell)	Fa. Beckman Coulter
Brutschrank Zellkultur	Fa. Heraeus
Computer	Fa. MSI
Durchflusszytometer (FACSCalibur)	Fa. Beckton & Dickenson
Eismaschine	Fa. Scotsman
Entwässerungsautomat	Fa. Miles Scientific
Färbeautomat	Fa. DAKO
Feinwaage	Fa. Scaltec
Filmbox	Fa. Agfa
Filmentwickler	Fa. Agfa
Fluorometer/Luminometer (*GloMax 96*)	Fa. Promega
Heizblock	Fa. Keison
Immunoblot-System (Elektrophoresesystem)	Fa. C.B.S. Scientific
Kühl- und Gefrierschränke:	
-196 °C Stickstofftank	Fa. Forma Scientific
-20 °C Gefrierschrank	Fa. Liebherr
-80 °C Gefrierschrank	Fa. Thermo Fische Scientific
+4 °C Kühschrank	Fa. Liebherr
Magnetrührer	Fa. IKA Labortechnik
Mechanische Pipetten, verschiedenen Größen	Fa. VWR
Metabolische Käfige	Fa. Indulab
Mikroskope	Fa. Zeiss
pH-Meter	Fa. Knick
Präparationsbesteck	Fa. Aesculap
Scanner	Fa. Agfa
Schüttler	Fa. Heidolph
Schwingmühle (*TissueLyser II*)	Fa. Quiagen
Sicherheitswerkbank Zellkultur	Fa. Heraeus

Spannungsquelle	Fa. LKB
Spektrophotometer	Fa. Pharmacia Biotech
Transfersystem (Immunoblot)	Fa. C.B.S. Scientific
Vortexer	Fa. Scientific Industries
Wasserbad	Fa. B. Braun
Zellkulturmikroskop	Fa. Leica
Zentrifugen:	
Biofuge pico	Fa Heraeus
Megafuge	Fa Heraeus
Ultrazentrifuge XL-90	Fa. Beckman Instruments

2.2. Methoden

2.2.1. Stocklösungen und Lösungsvorschriften

Die im Folgenden beschriebenen Lösungsvorschriften und Berechnungen beziehen sich auf Substanzen und Stocklösungen, die in dieser Art für verschiedene Experimente verwendet wurden. Waren für bestimmte Methoden weitere Chemikalien notwendig, so werden deren Verwendungsvorschriften mit der Besprechung der Methode abgehandelt. Alle Chemikalien wurden gemäß den Herstellerangaben behandelt und gelagert.

12-Imidazolyldodecanol (12-ID-ol, MW: 252,4 g/mol) ist eine lipophile Substanz, die zur besseren Lösungsvermittlung in den hochmolekularen Zuckerkomplex Cyclodextrin (CD, MW: 1380 g/mol) eingebracht wurde. Da die Substanzen im Komplex in einem molaren Verhältnis von 1 (12-ID-ol): 1,7 (CD) stehen, ergibt sich ein Massenverhältnis von 1 (Imidoc): 5,46*1,7 = 9,3 ≈ 10 (CD). Das bedeutet, dass man um 1 g 12-ID-ol zu komplexieren, 10 g CD einsetzen muss. Dabei beträgt folglich das Massenverhältnis von 12-ID-ol im Komplex zur Gesamtmasse des Komplexes 1:11; die Molmasse des 12-ID-ols im CD-Komplex beträgt folglich 2776,4 g/mol. Ferner ist zu beachten, dass die Effizienz, mit der die Komplexierung gelingt, je nach Charge bei etwa 75 % liegt, was einen Mehransatz des 12-ID-ol-CD-Komplexes von etwa 25 % notwendig machte [42, 140].

Wenn nicht anders beschrieben, wurde eine 1 mM Stocklösung des 12-ID-ol-CD-Komlexes hergestellt (34,7 mg 12-ID-ol-CD-Komplex gelöst in 10 ml HBSS), üblicherweise verwendete Endkonzentrationen im Inkubationsmedium waren 0,1 µM (Zugabe von 1 µl Stocklösung zu 10 ml Inkubationsmedium) und 1 µM (Zugabe von 10 µl zu 10 ml Inkubationsmedium). Da bislang keine Daten über die Stabilität des 12-ID-ol-CD-Komplexes vorliegen, wurden Trockensubstanz und Stocklösungen lichtgeschützt bei +4 °C gelagert und die Stocklösungen alle 7 Tage erneuert.

Um einen etwaigen Einfluss des CD auf die Experimente nachweisen oder ausschließen zu können, wurde außerdem eine reine CD-Stocklösung verwendet, die eine Konzentration wie der 12-ID-ol-CD-Komplex aufwies. Dazu wurden 32,1 g des reinen CD in 10 ml HBSS gelöst. Zu den Versuchsansätzen (10 ml) wurden 10 µl hinzugegeben, was einer Endkonzentration des Imidoc-CD-Komplexes von 1 µM entspricht.

Von Cisplatin (MW: 300 g/mol) wurden 5 mM Stocklösungen hergestellt (15 mg in 10 ml HBSS). Dazu war eine dezente Erwärmung erforderlich. Die übliche angestrebte Endkonzentration lag bei 1 mM, was bei einem Inkubationsendvolumen von 10 ml eine Zugabe von 2 ml der Stocklösung bedeutete. Um hier keinen Verdünnungsfehler zu begehen, wurde der Inkubationsansatz zuerst mit 8 ml hergestellt und dann mit 2 ml der Cisplatin-Stocklösung aufgefüllt. Als Inkubationspuffer wurde ebenfalls HBSS gewählt.

Von Mannitol (MW: 182,17 g/mol) wurde eine 10 mM Stocklösung in HBSS hergestellt (18,2 g gelöst in 10 ml). Angestrebte Endkonzentration war 1 mM, damit ergab sich bei einem Inkubationsvolumen von 10 ml eine Zugabe der Stocklösung von 1 ml. Um keinen relevanten Verdünnungsfehler zu begehen, wurde verfahren wie bei der Herstellung der Cisplatin-Lösungen beschrieben.

Von Melatonin (MW: 232,28 g/mol) wurde eine 100 mM Stocklösung in reinem Ethanol hergestellt (23,23 mg gelöst in 1 ml). Mit einer Zugabe von 100 µl der Stocklösung zu dem Inkubationsansatz von 10 ml ergab sich eine Endkonzentration von 1 mM.

2,2‘-Bipyridin (MW: 156,19 g/mol) wurde in Endkonzentrationen von 10 µM bis 1 mM eingesetzt. Dazu wurde eine 100 mM Stocklösung hergestellt (15,6 mg gelöst in 1 ml reinem Ethanol). Zugabe von 100 µl des Stocks zu einem Inkubationsvolumen von 10 ml entspricht dabei einer Endkonzentration von 1 mM.

Vom Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat (MW: 392,14 g/mol) wurde ein 50 mM Stock hergestellt (19,6 mg gelöst in 1 ml HBS). Im Gegensatz zu den anderen Experimentalsubstanzen wurde AFS ausschließlich in HBS mit einem pH-Wert von 6,5 inkubiert, um das Gleichgewicht auf der Seite des zweiwertigen Eisen zu halten (siehe auch Abschnitt **2.2.6.4.** unter „Versuchsprotokoll“) [172]. Es wurden Endkonzentrationen zwischen 10 µM und 1 mM angestrebt, eine Zugabe von 200 µl der Stocklösung zu 10 ml Inkubationsvolumen entsprach dabei einer Konzentration von 1 mM.

2.2.2. Allgemeine Zellkulturtechniken

Kultivierung von Zellen

Bei der Zelllinie LLC-Pk_1 handelt es sich um adhärent wachsende Zellen [71, 117]. Diese wurden, wenn nichts anders beschrieben, in oben genanntem Medium in Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO_2 im Brutschrank kultiviert. Sobald sie eine Konfluenz von etwa 80-90 % erreicht hatten, wurde wie folgt eine Subkultivierung vorgenommen: Das alte Medium wurde vorsichtig abgesaugt, anschließend der *Monolayer* mit warmen PBS-Puffer überschichtet, der dann ebenfalls verworfen wurde. Es folgte die Überschichtung mit Trypsin/EDTA (bei 37 °C) und die anschließende Inkubation im Brutschrank für 5 min. Die entstandene Zellsuspension wurde in einem *Falcon* entsprechender Größe im Verhältnis 1:2 mit warmem Medium gemischt, um eine Neutralisierung des Trypsins zu erreichen. Danach erfolgte die Abzentrifugation der Zellen in einer Tischzentrifuge (standartmäßig 900 rpm für 5 min bei Raumtemperatur). Der Überstand wurde wiederum vorsichtig abgesaugt. Je nach benötigter Zellmenge bzw. nach geplantem Versuchszeitpunkt wurde das Pellet nun in einem unterschiedlich großen Volumen von Medium aufgenommen, resuspendiert und dann in eine neuen Kulturschale ausgebracht. Üblicherweise wurden nach diesem Protokoll Subkultivierungen in einem Verhältnis zwischen 1:10 bis 1:25 durchgeführt [10].

Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und dann in ein *Falcon* überführt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit warmem Medium verdünnt (Verhältnis 1:3) und in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (900 rpm, für 5 min bei

Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wiederum in warmen Medium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension wurden die Zellen auf Zellkulturschalen ausgebracht. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, anschließend wurden die Zellen wie oben beschrieben subkultiviert. Es wurde dabei darauf geachtet, dass die Zellen nur zwischen den Passagen 3 und 10 für Experimente verwendet wurden.

Zum Einfrieren wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 90 % kultiviert. Es folgte – wie bereits beschrieben – die Ernte der Zellen mittels Trypsin/EDTA und die anschließende Zentrifugation. Zum Waschen des Pellets wurde es in warmem Medium aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Es erfolgten die Resuspension der Zellen im vorbereiteten Gefriermedium und der Transfer in entsprechende Kryoröhrchen (Konzentration der Zellen: $20*10^6$/Kryoröhrchen). Diese wurden mit Zellstoff umwickelt und für etwa 4 Wochen bei -80 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Nach dieser Zeit wurde der Zellstoff entfernt und die Röhrchen dauerhaft bei -196 °C im Flüssigstickstofftank aufbewahrt [11].

Zählen von Zellen

Um die Konzentration von Zellen in einer Suspension zu bestimmen, wurden 200 µl der Suspension in bestimmte Zählgefäße pipettiert, die zum *Cell-Counter*-System von Beckman Coulter gehörten. Das Gerät wiederum aspirierte das angebotene Flüssigkeitsvolumen, versetzte es im Verhältnis 1:1 mit Trypsin und analysierte anschließend, basierend auf Faktoren wie Färbeintensität, Größe, Granularität und Dichte der beobachteten Events, die Gesamtkonzentration der Zellen pro ml sowie den Anteil lebender Zellen in Prozent. Da somit direkt die Konzentration lebender Zellen pro ml in der Ausganssuspension bekannt war, konnten je nach Bedarf entsprechende Verdünnungen angesetzt werden [14].

Versuchsvorbereitung

Die Zellen wurden so kultiviert, dass am geplanten Versuchstag eine Konfluenz von 100 % erreicht wurde. Am Vortag der Experimente wurde außerdem ein Mediumwechsel durchgeführt, so dass sich die Zellen zum Versuchszeitpunkt immer unter vergleichbaren Bedingungen befunden hatten.

2.2.3. Proteintechniken

2.2.3.1. Mikrosomenpräparation

Vorbereitung der Zellen

Insgesamt wurden pro Gruppe 5 große Zellkulturschalen (Durchmesser 25 cm) verwendet. Die Zellen wurden bis zu voller Konfluenz wachsen gelassen, dann am Versuchstag mit 37 °C warmem PBS gewaschen und anschließend mit HBSS überschichtet. Es erfolgte die Inkubation mit den verschiedenen Experimentalsubstanzen für 2,5 h unter Standardzellkulturbedingungen.

Ernten der Zellen

Nach der Inkubationszeit wurde der Inkubationspuffer verworfen, die Zellen mit eiskaltem HBSS überschichtet und anschließend mit einem *Cell scraper* von der Kulturschale gelöst. Danach erfolgte der Transfer der suspendierten Zellen in ein großes *Falcon*. Zum möglichst vollständigen Entfernen des Inkubationspuffers wurden die Zellen nun zentrifugiert (900 rpm für 5 min bei +4 °C) und danach in eiskaltem Puffer resuspendiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt, nach dem das Pellet allerdings in 1,5 ml eiskaltem Puffer A aufgenommen und anschließend in einen gekühlten Glas-*Dauncer* überführt wurde [10].

Homogenisierung und Auftrennung der subzellulären Kompartimente

Im *Dauncer* wurden die Zellen nun manuell für 5 min homogenisiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine übermäßige Blasenbildung vermieden wurde. Weiterhin wurden die Glasgeräte ständig mit Eis gekühlt und zwischen den einzelnen Gruppen mit Alkohol gereinigt.

Das Homogenisat wurde nun einer Zentrifugation unterworfen (1900 rpm ≅ 600 g für 10 min bei +4 °C). Das so gewonnene Pellet mit den Nuklei, ganzen Zellen und Debris wurde verworfen, der Überstand (entspricht der postnukleären Fraktion) in ein neues *Falcon* überführt und anschließend erneut zentrifugiert (6000 rpm ≅ 6500 g für 10 min bei +4 °C). Das entstandene Pellet entsprach nun der mitochondrialen Fraktion mit Mitochondrien, Lysosomen und Endosomen. Es wurde in einem möglichst geringen Volumen von Puffer B resuspendiert und anschließend bei -80 °C gelagert.

Der Überstand der vorangegangenen Zentrifugation (postmitochondriale Fraktion) wurde in ein spezielles Ultrazentrifugationsgefäß überführt und eine erneute Zentrifugation durchgeführt (45.000 rpm ≅ 105.000 g für 60 min bei +4 °C). Die hierfür notwendige Ultrazentrifuge wurde freundlicherweise von der Abteilung für Toxikologie und Pharmakologie der Universität Ulm zur Verfügung gestellt. Das entstandene Pellet enthielt nun die mikrosomale Fraktion mit dem Endoplasmatischen Retikulum, dem Golgi-Apparat und der Plasmamembran. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet anschließend in einem geringen Volumen von Puffer B resuspendiert und ebenfalls bei -80 °C gelagert [38].

2.2.3.2. Proteinextraktion aus Mäusenieren

Wie im Kapitel **2.2.7.2.** beschrieben, wurde den Versuchstieren ein Nierenstück zur Proteinextraktion und nachfolgender Analyse mittels Immunoblot entnommen. Da eine komplette Solubilisierung sowohl zytosolischer, als auch membrangebundener Proteine stattfinden sollte, wurde ein Puffer auf Basis der hochmolekularen Seife Triton-X-100 hergestellt (TNT-Puffer) [20, 67]. Die schockgefrorenen Organe wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Anschließend wurde das Nierenstück mit 500 µl TNT-Puffer überschichtet und bei +4 °C auftauen gelassen. Um einen Abbau der gewünschten Proteine durch freiwerdende Proteinasen zu verhindern, wurden dem Puffer kurz vor seinem Einsatz verschiedene Proteaseinhibitoren zugesetzt. Sobald das Gewebe aufgetaut war, wurde dem Gefäß ein *Metallbead* hinzugefügt und das Nierenstück in der hierfür geeigneten Schwingmühle homogenisiert (3 x für 30 sec bei 30 Hz). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei +4 °C in einer Mikrozentrifuge. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert, der gebrauchte *Metallbead* mit Alkohol gereinigt und wiederverwendet [39].

2.2.3.3. Proteingehaltbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen sowohl der Mikrosomen- als auch der Nierenextrakte erfolgte mittels der Methode nach Bradford [21]. Der im entsprechenden Reagenz enthaltene Farbstoff *Coomassie brilliant blue* G-250 ändert sein

Absorptionsmaximum von 465 nm ohne Proteinbindung zu 595 nm mit Protein. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm im Vergleich zu einem Leerwert entspricht dabei der Proteinkonzentration in der Probe. Der Test wurde mittels einer Verdünnungsreihe von BSA im jeweiligen Proteinextraktionspuffer geeicht. Zur Durchführung des Tests wurden 1 µl der zu untersuchenden Probe mit 999 µl Bradford-Reagenz in einer 1 ml Küvette gemischt. Als Leerwert wurde 1 µl des entsprechenden Extraktionspuffers zum Reagenz zugegeben. Die Messung der Absorption erfolgte nach 2 min im Spektrometer.

2.2.3.4. Immunoblot

Um die relative Expression der jeweiligen Zielproteine in den Mikrosomen- und Nierenextrakten zu analysieren, wurde eine Auftrennung des Proteingemisches mittels Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*Blotten*) und dann durch spezifische Antikörperbindung nachgewiesen [92, 122, 163].

Vorbereitung der Proben

Nachdem der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben bestimmt worden ist, wurde das Volumen der Probe in ein Reaktionsgefäß pipettiert, welches einer bestimmten absoluten Proteinmenge entsprach. Im Falle der Mikrosomen war das üblicherweise 45 µg reines Protein, bei den Nierenextrakten 60 µg. Danach wurde durch Hinzugeben des jeweils verwendeten Proteinextraktionspuffers das Volumen jeder Probe auf 30 µl eingestellt. Nach der Zugabe von 10 µl Ladepuffer wurden die Proben für 10 min auf 100 °C erhitzt und nach kurzer Zentrifugation in der Mikrozentrifuge bis zu ihrer Verwendung bei +4 °C gelagert.

Gel-Elektrophorese

Am Vortag wurden die Elektrophoresekammern gründlich mit Ethanol gereinigt und entsprechend den Herstellervorgaben zusammengebaut. 12,5 %-iges Polyacrylamid-Gel (Trenngel) wurde hergestellt und die Kammern damit bis etwa 2 cm vom oberen Rand entfernt gefüllt. Um eine möglichst vollständige Polymerisierung zu erreichen, wurden die Kammern in feuchte Tücher eingewickelt und über Nacht im Kühlschrank bei +4 °C gelagert.

Am Versuchstag wurden die Trenngele mit 5 %-igem Sammelgelen überschichtet. Bevor diese polymerisieren konnten, wurden sie mittels entsprechender Kämme mit Taschen für die Proben versehen. Nachdem auch die Sammelgele vollständig auspolymerisiert waren, wurden die Kämme entfernt und die Elektrophoresesysteme mit dem Laufpuffer gefüllt. Anschließend erfolgte das vorsichtige Auftragen der Proben und des Proteinmarkers. Nun wurden die Systeme geschlossen und die Elektrophorese mit Spannungen zwischen 50 und 150 V durchgeführt. Anhand der Auftrennung des Proteinmarkers wurde dabei der Fortschritt der Läufe kontrolliert [92].

Blotten

Nachdem die Auftrennung der Proteingemische vollständig war, wurde die Elektrophorese gestoppt und die Kammern geöffnet. Mit einem Lineal wurden die an den Seiten überstehenden Teile des Trenngels und das Sammelgel entfernt. Nachdem die Fläche des weiter zu verwendenden Trenngels bestimmt wurde, konnte es anschließend zwischen einer Nitrozellulosemembran und einem Stück Whatman-Papier in die Halterung der speziellen Transferkammer geklemmt werden. Nachfolgend wurde die Kammer mit dem Transferpuffer gefüllt und die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Nitrozellulose gestartet. Die für die Übertragung notwendige Stromstärke entsprach dabei 2,5 x Fläche des Gels cm^2, die Zeit betrug 90 min [163].

Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Blotten wurden die Nitrozellulosemembranen aus den Halterungen genommen und mit einem Kugelschreiber die Banden des Proteinmarkers markiert. Danach erfolgte der erste Waschschritt, bestehend aus dreimaligem Baden der Membranen in TBS/Tween für jeweils 10 min. Um unspezifische Antikörperbindungsstellen auf den Membranen zu blockieren, erfolgte nun die Inkubation in Block-Milch für eine Stunde, danach wurde erneut ein Waschschritt durchgeführt. Nun wurden die Membranen mit den entsprechenden Primärantikörpern (je nach zu detektierendem Zielprotein) überschichtet und über Nacht bei +4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden nach Entfernung der Antikörper und einem weiteren Waschschritt die entsprechenden Meerrettichperoxidase-gekoppelten Zweitantikörper aufgebracht und diese ein bis zwei Stunden inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt erfolgte dann die Sichtbarmachung der Proteinbanden mittels der Meerrettichperoxidase-Reaktion: Auf einer gereinigten Glasplatte wurden pro Membran jeweils 100 µl des Luminolreagenz und des Reaktionspuffers miteinander

vermischt, die entsprechende Membran darin gebadet und anschließend mit Filmfolie auf der Platte fixiert. In der Dunkelkammer wurde nun ein in der Größe der Membran angepasster Röntgenfilm in einer Filmbox belichtet und dann entwickelt [122].

2.2.4. Zellbasierte Assays im Microplateformat

2.2.4.1. Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue

Prinzip

Mit dem CellTiter-Blue-System lassen sich die Anzahl lebender Zellen in 96-well-Platten fluorometrisch messen. Zugrunde liegt dabei die Verwendung des Indikatorfarbstoffes Resazurin, der von metabolisch aktiven Zellen aufgenommen und zu Resofurin reduziert werden kann (Abbildung 6). Dieses Resofurin wiederum produziert ein starkes Fluoreszenzsignal (Exzitationsmaximum 579 nm, Emissionsmaximum 584 nm), das von einem Fluorometer detektiert werden kann. Nicht viable Zellen verlieren rasch die für die Reduktion von Resazurin notwendige metabolische Kapazität und produzieren damit kein Signal [50].

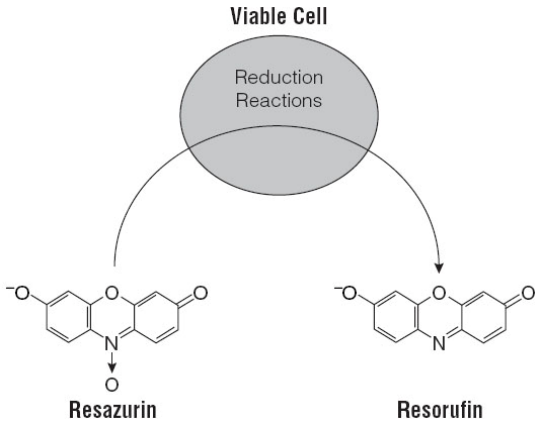


Abbildung 6: Schematische Darstellung des dem CellTiter-Blue zugrunde liegenden Mechanismus [50].

Versuchsprotokoll

Ein Tag vor dem eigentlichen Experiment wurden unter Standardzellkulturbedingungen kultivierte Zellen mit Trypsin geerntet und dann in Medium aufgenommen. Nach einem Waschschritt erfolgte die Aufnahme des Zellpellets in serumfreies Medium und die

Bestimmung der Zellkonzentration. Anschließend wurde die Zellsuspension in geeignetem Maße verdünnt und ein bestimmtes Volumen davon in die einzelnen Näpfe der 96-well-Platten transferiert. Danach erfolgte die Anpassung des Inkubationsansatzes auf 100 µl mit serumfreiem Medium. Um später die Hintergrundfluoreszenz subtrahieren zu können, wurden außerdem zellfreie Inkubationsansätze vorbereitet.

Den Zellen wurde über Nacht die Möglichkeit gegeben, in den Platten anzuwachsen; am Versuchstag wurden sie dann mit den Experimentalsubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der gewählten Zeitperioden folgten schließlich die Zugabe von 20 µl des nach Herstellerangaben vorbereiteten Reaktionspuffers und die weitere Inkubation im Brutschrank für 1 Stunde. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl einer 3 %-igen SDS-Lösung gestoppt und die Platten im Fluorometer (Exzitation 560 nm/Emission 590 nm) analysiert. Dazu wurde die Hintergrundfluoreszenz der zellfreien Proben bestimmt und von den anderen subtrahiert.

Da verschiedene Zelllinien in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl in unterschiedlicher Weise in der Lage sind, ein lineares Signalverhalten zu produzieren, wurde vor den eigentlichen Versuchen eine Verdünnungsreihe mit den LLC-Pk_1-Zellen angefertigt, um eine geeignete Ausgangszellzahl bestimmen zu können (Abbildung 7). In den anschließenden Experimenten wurden 20 000 Zellen pro well ausgesät.

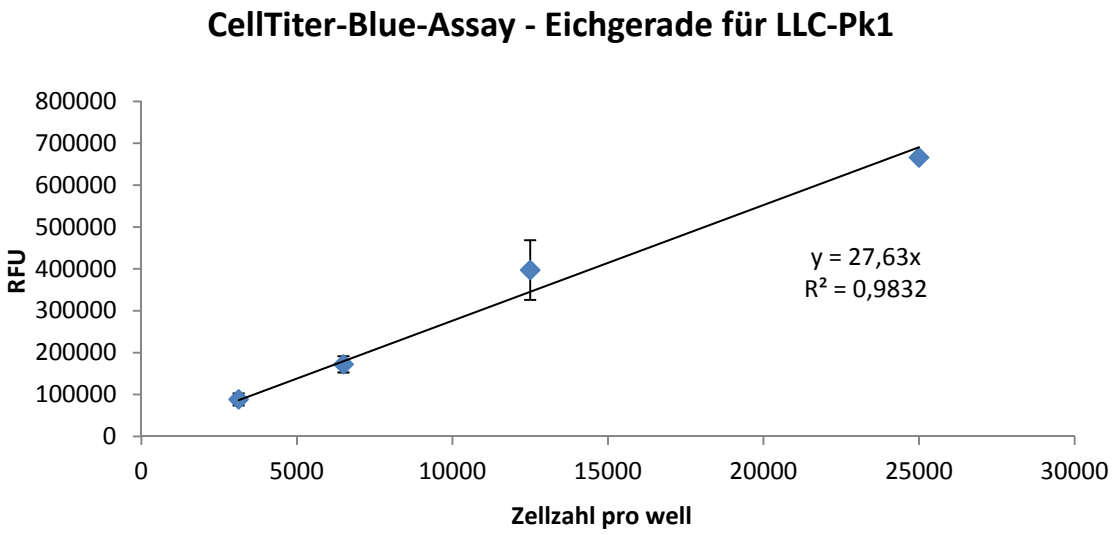


Abbildung 7: CellTiter-Blue-Assay: Aufnahme einer Eichgeraden abhängig von der eingesetzten Zellzahl.

2.2.4.2. Zytotoxizitätsmessung mit CytoTox-Glo

Prinzip

Die Nachweissubstanz dieses Assays ist das enzymatische Produkt AAF-Glo (Alanyl-alanyl-phenylalanyl-aminoluciferin). Nachdem der Peptid-Rest abgespalten ist, stellt das frei werdende Aminoluciferin ein Substrat für das Enzym Luciferase dar, was zu der Produktion eines Lumineszenzsignals führt. Diese kann in einem Luminometer detektiert werden (Abbildung 8). Dabei gibt der Hersteller an, dass diese Spaltung nur durch eine Protease geschehen kann, die sich im Zellinneren befindet. Da das Substrat selbst nicht zellmembrangängig ist, kann es also nur zur Signalproduktion kommen, wenn die Integrität der Zellmembran zerstört ist. Somit ergibt sich ein Signalniveau in Abhängigkeit der Menge an toten Zellen innerhalb einer Population. Lysiert man im nächsten Schritt die Zellmembranen auch der zuvor lebendigen Zellen und misst erneut die Lumineszenz, kann man rechnerisch den prozentualen Anteil der toten Zellen an der Ausgangsmenge bestimmen [119].

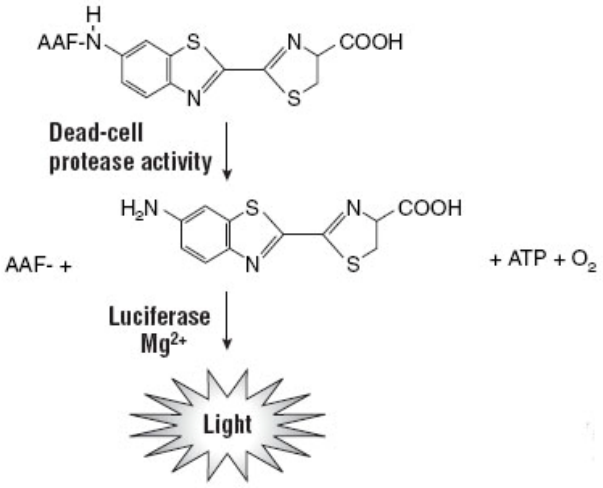


Abbildung 8: CytoTox-Glo-Assay: Schematische Darstellung der Versuchprinzips. Als "Dead-cell protease" wird das durch Verlust der Zellmembran freiwerdende Enzym bezeichntet [119].

Versuchsprotokoll

Wie in Kapitel **2.2.2.** unter „Versuchsvorbereitung“ beschrieben, wurden ein Tag vor dem eigentlichen Versuch Zellen geerntet und in einer bestimmten Menge (in der Regel 20 000 Zellen pro Napf) in eine 96-well-Platte transferiert. Auch für diese Versuchsreihen wurden die Zellen weiterhin in 100 µl serumfreiem Medium kultiviert und Reaktionsansätze ohne Zellen vorbereitet, um mittels dieser Leerwerte später die Hintergrundlumineszenz subtrahieren zu können.

Am Versuchstag wurden dann die verschiedenen Testreagenzien nach Herstellerprotokoll vorbereitet, danach die verschiedenen Experimentalsubstanzen zu den Zellen gegeben und die Ansätze für die gewünschten Zeiträume im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten die Zugabe von 50 µl des Zytotoxizitätsreagents und eine weitere Inkubation für 15 min. Danach wurde die Lumineszenz (entsprach dem Signal der toten Zellen innerhalb der Population) gemessen. Anschließend wurde 50 µl des Lyse-Puffers zu den Ansätzen gegeben und nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 min erneut die Lumineszenz gemessen. Wie oben beschrieben, wurde nun der prozentuale Anteil der toten Zellen an der Gesamtzellmenge bestimmt.

2.2.4.3. Messung der Caspasenaktivierung mit Caspase-Glo 3/7

Prinzip

Das Testprinzip ähnelt dem des Zytotoxizitätsassays CytoTox-Glo (Kapitel **2.2.4.2.**): Auch hier wird ein modifiziertes Substrat für das Enzym Luciferase als Detektionsreagenz eingesetzt. Dabei handelt es sich wiederum um das Aminoluciferin, an das diesmal die Tetrapeptidsequenz Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat (DEVD) angehängt wurde. Diese Sequenz stellt einen spezifischen Angriffspunkt für die intrazellulär vorkommenden Caspasen 3 und 7 dar, deren Aktivierung entscheidend mit dem apoptotischen Zelltod verknüpft ist. Nach Abspaltung der Peptide wird das Aminoluciferin für das Enzym Luciferase freigegeben, was zur Produktion eines Lumineszenzsignals führt (Abbildung 9). Da die Ausgangssubstanz nicht zellmembrangängig ist, muss vorher eine Zelllyse durchgeführt werden [85].

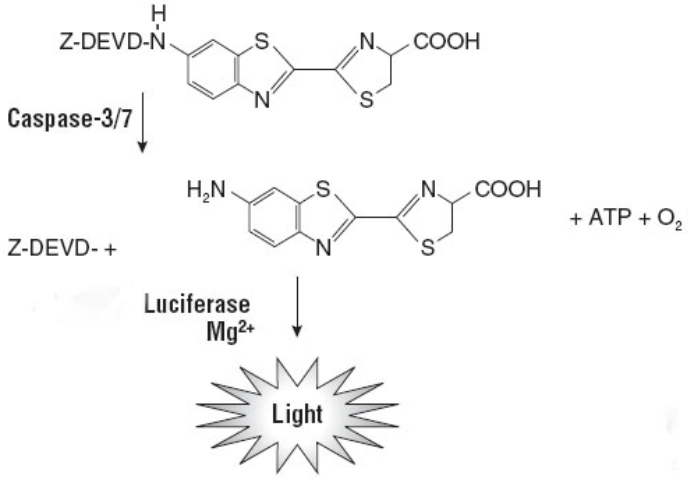


Abbildung 9: Caspase-Glo 3/7-Assay: Schematische Darstellung des Testprinzips [85].

Versuchsprotokoll

Wie bereits im Kapitel **2.2.2.** beschrieben, wurden einen Tag vor Versuchsdurchführung Zellen geerntet und in 100 µl serumfreien Medium in 96-well-Platten ausgesät. Auch hier wurden Leerproben angelegt, um die Hintergrundfluoreszenz subtrahieren zu können.

Am Versuchstag wurden dann die Testreagenzien vorbereitet und die Zellen mit den verschiedenen Experimentalsubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der entsprechenden Zeitperioden erfolgten die Zugabe von 100 µl des Caspase-Glo-Reagenz und eine weitere Inkubation für ein halbe Stunde im Brutschrank. Anschließend wurde die Lumineszenz der Proben im Luminometer gemessen.

2.2.5. Messung von freiem Eisen mit dem Bleomycin-Assay

Hintergrund

Die Detektion von intrazellulärem freiem Eisen in ionisierter Form ist aufgrund der geringen vorkommenden Menge und der kurzen Halbwertszeit äußerst schwierig. Letztlich besitzt die Zelle selbst Mechanismen, um diese hochreaktiven Ionen unschädlich zu machen [35]. Dennoch besteht ein besonderes Interesse daran, die Größe des Pools an intrazellulärem ionisiertem Eisen (*intracellular labile iron pool*) nachweisen und quantifizieren zu können, um eventuelle Änderungen in besonderen Stoffwechselsituationen festzustellen [60, 65].

Prinzip

Das Antibiotikum Bleomycin ist – sofern es zwei-wertiges Eisen gebunden hat – in der Lage, GC-reiche DNA zu degradieren. Dabei entsteht unter anderem Malondialdehyd, welches mit Thiobabitursäure (TBA) einen farbigen Komplex bildet. Dessen Absorption wiederum kann im Photospektrometer bestimmt werden. Sind alle Testreagenzien im Ansatz im Überschuss vorhanden, besteht ein lineares Verhältnis zwischen der Eisenkonzentration in der Probe und der Menge des gebildeten Malondialdehyd-TBA-Komplexes [46, 170].

Vorbereitung

Aufgrund der hohen Sensitivität des *Assays* und der zur erwartenden geringen Eisenkonzentration in den untersuchten Zellen und Medien, besteht die besondere Notwendigkeit, Eisenkontaminationen in den eingesetzten Testreagenzien möglichst gering zu halten. Zu diesem Zweck wurde der Eisenchelator Chelex resin, ein metallionenbindendes Harz, eingesetzt. Zu allen im nachfolgenden beschriebenen Lösungen (außer dem Bleomycin) wurde vor dem eigentlichen Versuchstag pro 10 ml Volumen 0,3 g dieser Substanz gegeben. Mit einem Magnetrührer wurde dann das Chelex über Nacht bei +4 °C in Suspension gehalten und am nächsten Morgen bei 1500 rpm abzentrifugiert.

Des Weiteren wurden folgende Lösungen vorbereitet:

- DNA (Kalbsthymus, Typ I) 1 mg/ml
- Bleomycin-sulfat 15 units in 10 ml Aqua dest.
- Ascorbinsäure 8 mM Aqua dest.
- NaOH 50 mM in Aqua dest.
- HCl 50 mM in Aqua dest.
- HCl 25 %
- $MgCl_2$ 50 mM in Aqua dest.
- EDTA 100 mM in Aqua dest.
- TBA 1 % (w/v) in NaOH (50 mM)
- 1-Butanol 25 %

Außerdem war es vor der Durchführung des *Assays* notwendig, einen Ansatz in größerem Maßstab (siehe unten) herzustellen und eine möglichst genaue pH-Wert-Einstellung auf 7,4 vorzunehmen. Die hierfür notwendige Menge an HCl bzw. NaOH muss dann wieder auf das Volumen im eigentlichen Ansatz herunter gerechnet werden.

Versuchsprotokoll

In einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 250 µl der DNA-Lösung, 25 µl Bleomycin-Lösung, 50 µl $MgCl_2$-Lösung, 50 µl Ascorbinsäure-Lösung (soll die Oxidation von zwei- zu drei-wertigem Eisen verhindern) und 25 µl der zu untersuchenden Probe (siehe unten) gemischt. Zusätzlich wurde mit dem entsprechenden Volumen an HCl bzw. NaOH die Einstellung des korrekten pH-Wertes vorgenommen (siehe oben). Außerdem wurden Negativkontrollen vorbereitet, die statt einer biologischen Probe 25 µl Aqua dest. enthielten. Diese waren nötig, um eine eventuelle Kontamination mit Eisen zu erkennen.

Da prinzipiell auch Reaktionsprodukte aus anderen Quellen mit dem TBA reagieren könnten, wurden weiterhin Ansätze ohne Bleomycin in den Versuch mit eingeschlossen.

Die so vorbereiteten Proben wurden nun für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, danach erfolgte die Zugabe von 50 µl EDTA-Lösung, 250 µl HCl-Lösung (25%) und 250 µl TBA-Lösung. Mit dem EDTA wurde die Reaktion des Bleomycins gestoppt, mit der HCl-Lösung die überschüssige DNA ausgefällt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 20 min bei 80 °C erfolgte die Überschichtung der Reaktionsansätze mit 1 ml 1-Butanol, anschließend wurden die Proben *gevortext*. Nach einer Zentrifugation (2500 g für 20 min) wurde der Überstand vorsichtig in entsprechende Spektrometerküvetten überführt. Dieser Schritt bewirkte, dass das reine Chromogen aus dem Ansatz extrahiert werden konnte und keine Verfälschung der Messergebnisse durch DNA- oder Proteinpräzipitate stattfand. Schließlich wurde die Absorption der Proben bei 535 nm Wellenlänge gemessen.

Untersuchungsmaterial

Zellen wurden bis zu vollständiger Konfluenz kultiviert, anschließend das Medium verworfen und die Zellen mit HBSS überschichtet. Es erfolgte darin die Inkubation der Testsubstanzen über verschiedene Zeiträume. Zum einen wurde das Inkubationsmedium auf freies Eisen hin untersucht, zum anderen wurden die Zellen mit Hilfe eines *Cell scrapers* geerntet und in ein 10 ml Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zentrifugation und Entfernung des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Zellen in 1 ml Extraktionspuffer. Anschließend fand der schonende Zellaufschluss im Ultraschallbad (3-mal für 30 sec) statt. Mit den so entstandenen Zellhomogenisaten wurde ebenfalls der Bleomycin-*Assay* durchgeführt [20, 67, 79].

Zusätzlich wurde zur Evaluierung und Eichung des Assays eine Verdünnungsreihe einer Ammoniumeisensulfat-Lösung verwendet; den linearen Testbereich gibt Abbildung 10 wieder.

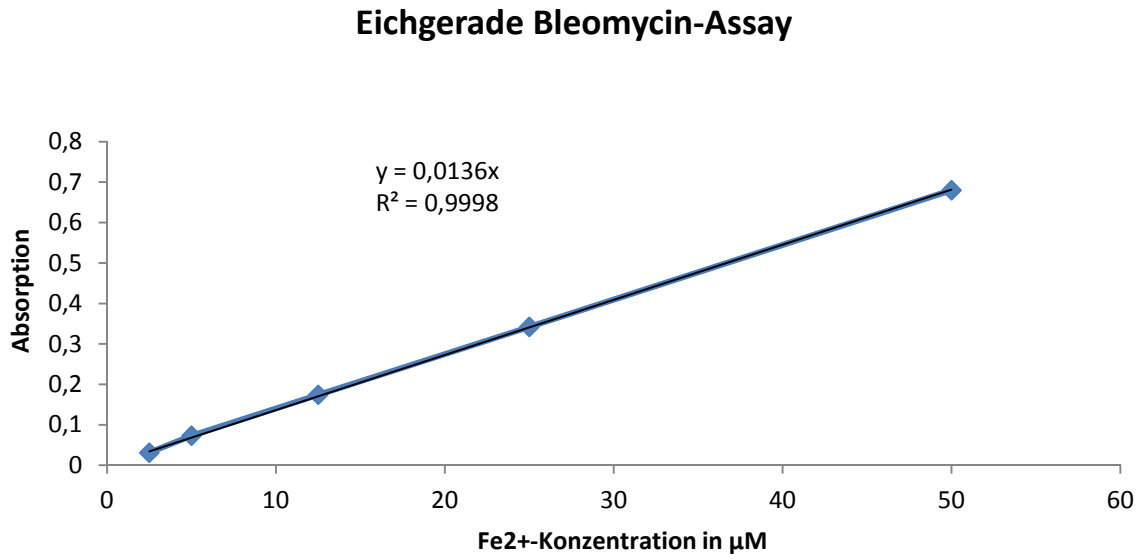


Abbildung 10: Bleomycin-Assay. Linearer Bereich des Tests.

2.2.6. Durchflusszytometrie (FACS)

2.2.6.1. Prinzip

In der Durchflusszytometrie können bestimmte chemische und physikalische Eigenschaften von Zellen in Echtzeit untersucht werden. Die vereinzelten, in Suspension befindlichen Zellen werden dabei nacheinander an verschiedenen Lichtquellen und optischen Sensoren vorbeigeführt. Bei den Lichtquellen handelt es sich heute meistens um Laser, die kohärentes Licht verschiedener Wellenlängen emittieren können. Als Sensoren werden in der Regel Photomultiplier eingesetzt, die in der Lage sind, schwache Lichtsignale zu verstärken und in elektrische Signale umzuwandeln. Diese Detektoren sind in bestimmten Anordnungen im Messmodul des Durchflusszytometers angebracht. Damit ist die Messung von Lichtbeugung und –brechung jeder einzelnen Zelle möglich, was Rückschlüsse auf Größe und Beschaffenheit (z.B. Granularität) der untersuchten Zelle zulässt. Weiterhin kann man eine Reihe von Fluoreszenzfarbstoffen einsetzen, die auf unterschiedliche Weisen intra- oder extrazelluläre Bestandteile binden können. Diese Fluorochrome können durch die Laser angeregt und die wiederum emittierte Fluoreszenz gemessen werden. So eingesetzt, entspricht ein Durchflusszytometer prinzipiell einem Fluoreszenzmikroskop, nur dass Zellen in wesentlich größerem Maßstab untersucht werden können [145].

2.2.6.2. Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Prinzip

Bei dem eingesetzten Dichlorofluorescin-diacetat (DCFH-DA) handelt es sich um eine nicht fluoreszierende, zellmembrangängige Substanz (Abbildung 11) [63, 93].

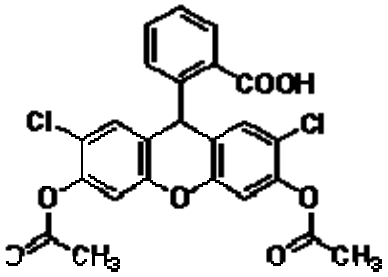


Abbildung 11: Strukturformel Dichlorofluorescin-diacetat, MW: 487,29 g/mol.

Intrazellulär können die Acetatreste von unspezifischen Esterasen abgespalten werden, was zur Folge hat, dass das DCFH in der Zelle gefangen wird. Abhängig von der Anwesenheit starker Oxidationsmittel, wie zum Beispiel ROS, kann nun das Dichlorofluorescin (DCFH) zu Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert werden (Abbildung 12). Das fluoreszierende DCF (Exzitationsmaximum 504 nm, Emissionsmaximum 529 nm) kann wiederum im Durchflusszytometer detektiert werden.

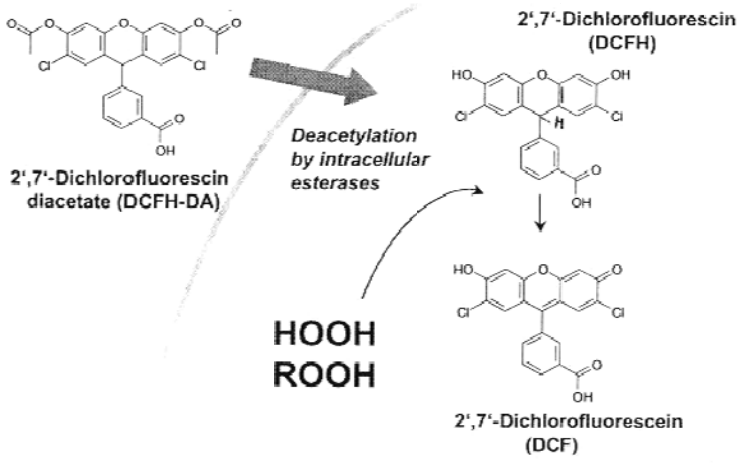


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Dichlorofluorescin-Methode.

Versuchsprotokoll

Vor Beginn der Experimente wurde eine 5 mM DCFH-DA-Stocklösung hergestellt (12,2 mg gelöst in 5 ml EtOH). Mit einer Zugabe von 10 µl der Stocklösung zum Inkubationsvolumen von 1 ml ergab sich damit eine Endkonzentration von 50 µM.

Des Weiteren wurde eine 8 mM Stocklösung von Menadion (MW: 172,18 g/mol, entspricht 1,34 mg gelöst in 1 ml DMSO) vorbereitet. Menadion diente als anerkannter Induktor von oxidativem Stress als Positivkontrolle zur Etablierung und Evaluation des Versuchprotokolls. Dabei wurde eine Endkonzentration von 80 µM angestrebt, was einer Zugabe von 10 µl des Stocks zum Inkubationsvolumen von 1 ml entsprach [128].

Die nach Standardbedingungen (siehe oben) kultivierten Zellen wurden am Versuchstag geerntet und dann im Medium aufgenommen, um das zur Ernte notwendige Trypsin zu neutralisieren. Es folgte ein Waschschritt (Zentrifugation und Resuspension) in HBSS bzw. HBS und die Bestimmung der Zellkonzentration mittels *Cell-Counter*. Danach wurden jeweils 1*10^6 Zellen in je ein FACS-*Tube* transferiert, gefolgt von einem weiteren Waschschritt. Anschließend erfolgte die Aufnahme der Zellpellets in 1 ml HBSS/HBS und die Zugabe der verschiedenen Experimentalsubstanzen. Zum Schluss wurde das DCFH-DA hinzugegeben, der Inkubationsansatz einmal durchgemischt und die Zellen dann zur Inkubation in den Brutschrank gestellt. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Proben dann im Durchflusszytometer untersucht.

Analyse im Durchflusszytometer

Wie im Kapitel **2.2.6.3.** ausführlicher beschrieben, wurde für jede Probe anhand der physikalischen Parameter die intakte Zellpopulation dargestellt, da nur sie in die weitere Analyse eingeschlossen werden sollte (Abbildung 13-a.). Von dieser Population wurde die Verteilung der Fluoreszenzintensitäten (*FL1* = grüne Fluoreszenz) in einem Histogramm aufgenommen (Abbildung 13-c./d.). Zur Auswertung wurde dann der X_{mean} einer Probe bestimmt, der dem Median der Verteilung dieser Fluoreszenzintensitäten innerhalb der Zellpopulation entsprach. Anschließend wurde dieser für jede Probe auf den mittleren X_{mean} der Kontrollproben bezogen, so dass am Ende der Analyse ein Quotient stand, der die relative Fluoreszenzintensität einer Probe gegenüber der Kontrolle angab (Abbildung 13-b.).

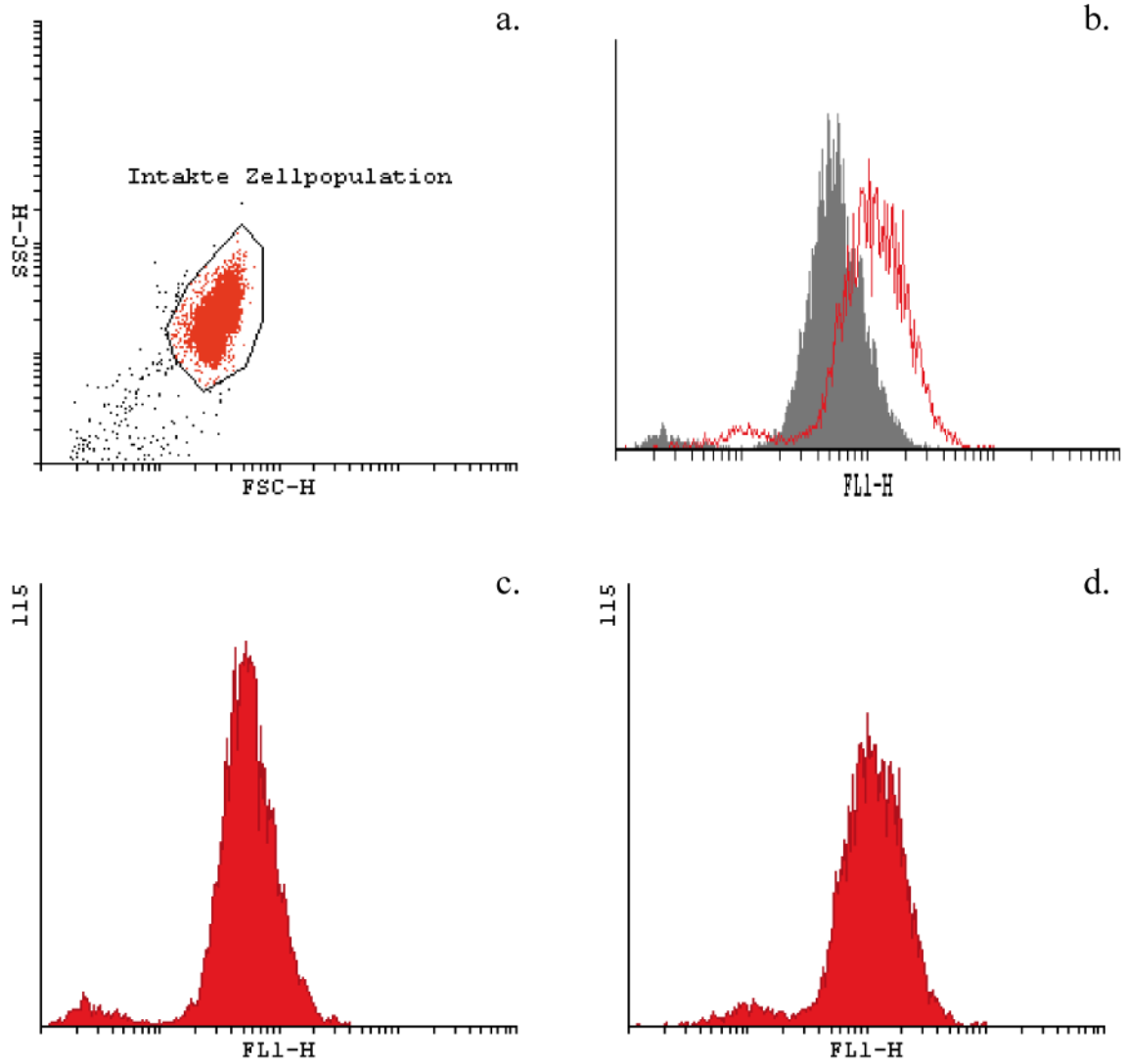


Abbildung 13: a.: Darstellung und *gating* der intakten Population. **c.** und **d.:** Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von Kontrolle (**c.**) und Menadion (**d.**). **b.:** Überlagerte Darstellung der Proben aus **c.** und **d.** SSC-H, FSC-H, FL1-H in logarithmischer Darstellung.

2.2.6.3. Messung des Mitochondrienpotentials mit dem JC-1-Assay

Prinzip

JC-1 ist ein kationischer Fluoreszenzfarbstoff (Abbildung 14), der sich in Abhängigkeit des vorherrschenden Potentials in Mitochondrien anreichert. Dabei kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Bildung von J-Aggregaten, deren Emissionsmaximum bei 590 nm (rot) liegt. Da der nicht aggregierte Farbstoff bei 529 nm (grün) Licht emittiert, ist die Messung des Mitochondrienpotentials einer Zelle auf diese Weise möglich. Dabei ist das Rot- zu Grünverhältnis nicht von anderen Parametern (wie zum Beispiel der Größe oder der Dichte der Mitochondrien) abhängig, was den Test weniger störanfällig machen soll.

Die häufigste Anwendung besteht in der Messung der mitochondrialen Depolarisation, die zum Beispiel im Rahmen der Apoptose auftritt [91, 155].

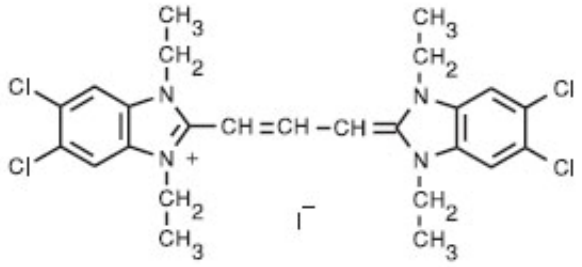


Abbildung 14: Strukturformel JC-1, MW: 652,23 g/mol.

Versuchsprotokoll

Entsprechend den Herstellervorgaben wurden gebrauchsfertige Lösungen des JC-1-Farbstoffes sowie des Mitochondrienpotentialdisrupters CCCP (Positivkontrolle) in reinem DMSO hergestellt.

Die nach Standardzellkulturbedingungen (Kapitel **2.2.2.)** kultivierten Zellen wurden mit warmem HBSS/HBS gewaschen und anschließend mit den verschiedenen Experimentalsubstanzen im Brutschrank inkubiert (für Anmerkungen zu Konzentrationen und Lösungsvorschriften, siehe Kapitel **2.2.1.**). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Puffer verworfen, die Zellen mit HBSS/HBS gewaschen und geerntet. Nachdem das zur Ernte benötigte Trypsin/EDTA abzentrifugiert worden ist, wurde das Zellpellet in 3 ml HBSS/HBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (Kapitel **2.2.2.**). Anschließend erfolgte der Transfer von 1*10^6 Zellen in ein spezielles FACS-Röhrchen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen nun in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert und die Inkubation mit JC-1 und CCCP gemäß dem Herstellerprotokoll vorgenommen. Verwendete Endkonzentrationen im Ansatz waren dabei 2 µM für JC-1 und 50 µM für CCCP (Endkonzentration DMSO 0,2 % beziehungsweise 0,1 %), die Inkubationszeit betrug 15 min.

Analyse im Durchflusszytometer

Im ersten Schritt wurden die physikalischen Parameter, also die Größe und Granularität, der zu untersuchenden Zellen im *FSC* und *SSC* analysiert, um die eigentliche Zellpopulation zu detektieren und Zelltrümmer für die weitere Auswertung auszuschließen (Abbildung 15). Danach wurde eine *Gate* auf diese Population gesetzt und im nächsten

Schritt die Fluoreszenzintensitäten in den Kanälen *FL1* = grüne Fluoreszenz und *FL2* = rote Fluoreszenz gemessen (Abbildung 16). Dabei wurde eine manuelle Kompensation durchgeführt, um den Effekt des Überstrahlens des emittierten Wellenlängenbereiches in den jeweils anderen Kanal zu minimieren.

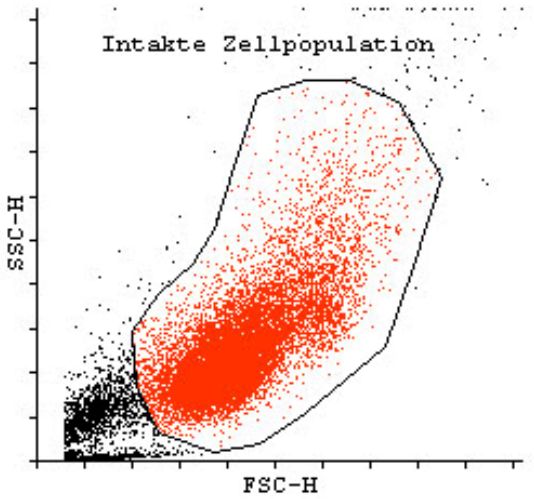


Abbildung 15: Analyse von Zellen mit dem JC-1-Assay, Schritt 1: Darstellung und *gating* der eigentlichen Zellpopulation. FSC-H und SSC-H im linearen Maßstab.

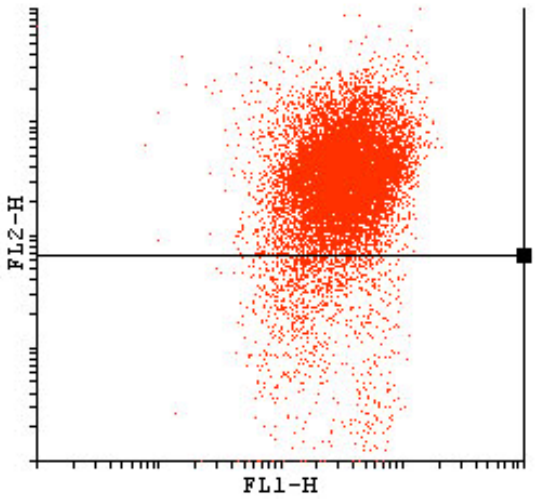


Abbildung 16: Analyse von Zellen mit dem JC-1-Assay, Schritt 2: Darstellung der Fluoreszenzintensitäten. FL1-H und FL2-H im logarithmischen Maßstab.

Anhand der Positivkontrolle CCCP war nun im dritten Schritt die Abgrenzung zwischen intaktem und zerstörtem Mitochondrienpotentials möglich (Abbildung 17).

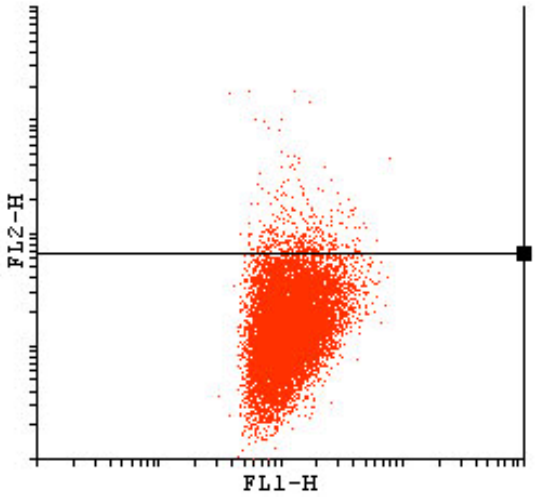


Abbildung 17: Analyse von Zellen mit dem JC-1-Assay, Schritt 3: Analyse der Positivkontrolle CCCP und Festlegung der Abgrenzung zwischen intaktem und zerstörtem Mitochondrienpotentials. FL1-H und FL2-H im logarithmischen Maßstab.

Für die im Folgenden analysierten Proben wurde der Anteil der Zellen mit jeweiligem Potential in Prozent bestimmt und angegeben.

2.2.6.4. Messung von intrazellulärem Eisen mit Phen Green SK

Prinizp

Um mit größerer Sensitivität sowie Spezifität als mit dem oben beschriebenen Bleomycin-Assay (Kapitel **2.2.5.**) Änderungen im freien Eisenpool einer Zelle untersuchen zu können, wurde versucht, ein neuartiges Nachweissystem in die Durchflusszytometrie einzuführen, basierend auf dem fluoreszierenden Eisenchelator Phen Green SK-diacetat. Bindet diese Substanz ionisiertes, vor allem zwei-wertiges Eisen, nimmt ihre Fluoreszenz ab. Gibt man nun einen stärkeren Eisenchelator hinzu, entfernt man das gebundene Eisen aus dem Phen Green-Komplex und die Fluoreszenz nimmt wieder zu. Dieser Fluoreszenzzuwachs soll dabei der Menge an gebundenem Eisen proportional sein [43, 45, 73, 134, 137, 152, 161].

Ähnlich wie bei dem oben beschriebenen DCFH-DA handelt es sich bei der Diacetat-Form des Phen Green um die zellmembrangängige Variante. Nach Abspaltung der Acetat-Reste wird eine Entfernung der Substanz per Diffusion aus dem Zellinneren verhindert.

Versuchsprotokoll

Vor Versuchsbeginn wurde eine 5 mM Stocklösung von Phen Green SK-diacetat in DMSO hergestellt (MW: 706,49 g/mol, entspricht 1 mg gelöst in 283,2 µl DMSO). Zur Etablierung des Protokolls wurden verschiedene Endkonzentrationen verwendet, dabei ergab sich mit der Zugabe von 20 µl der Stocklösung zum Inkubationsvolumen von 1 ml eine Endkonzentration von 100 µM.

Weiterhin wurde eine 1 M Lösung von Bip vorbereitet (15,6 mg in 100 µl EtOH). Die angestrebte Endkonzentration lag bei 5 mM und damit 50-mal höher als die des ersten Chelators. Dies machte eine Zugabe von 5 µl zum Versuchsansatz von 1 ml notwendig.

Als Positivkontrolle wurde AFS verwendet. Um Zielkonzentrationen zwischen 10 µM und 1 mM zu erreichen, wurde eine Stocklösung von 5 mM in HBS hergestellt (19,6 mg in 10 ml HBS). Durch eine Zugabe von 2 µl zum Ansatz erhielt man hiermit eine Endkonzentration von 10 µM.

Es sei nochmals erwähnt, dass das Gleichgewicht zwischen zwei- und drei-wertigem Eisen unter anderem vom verwendeten Puffer und dem eingestellten pH-Wert abhängig ist [172]. Daher wurde für die folgenden Versuche ausschließlich HBS (pH von 6,5) verwendet, da hier von einer ausreichenden Stabilisierung des zwei-wertigen Eisens auszugehen war.

Es wurden unter Standardkulturbedingungen Zellen wie oben beschrieben mit Trypsin geerntet und anschließend in Medium aufgenommen. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen dann in HBS resuspendiert und im *Cell-Counter* die Zellkonzentration bestimmt. Danach wurden jeweils 1*10^6 Zellen in je ein FACS-Tube überführt und nach einem weiteren Waschschritt in 1 ml HBS resuspendiert. Es folgte die Inkubation der Experimentalsubstanzen für verschiedene Zeitperioden. Nach einem Waschschritt wurden die Zellen dann mit Phen Green SK für 20 min im Brutschrank inkubiert und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Danach fanden ein weiterer Waschschritt und die Inkubation von Bip für weitere 20 min statt sowie eine erneute Analyse im Durchflusszytometer.

Analyse im Durchflusszytometer

Wie schon im Kapitel **2.2.6.3.** beschrieben, wurde zuerst die intakte Zellpopulation anhand ihrer physikalischen Parameter ermittelt. Anschließend erfolgte die Darstellung der Fluoreszenzintensitäten (*FL1* = grüne Fluoreszenz) in einem Histogramm. Wie aus dem

Versuchsprotokoll zu entnehmen ist, wurde diese Analyse für jede Probe nach der Inkubation des Phen Green sowie des Bip durchgeführt.

2.2.7. Tierversuche

2.2.7.1. Allgemeine Haltungsanweisungen

Für die im nachfolgenden beschriebenen Versuche wurden männliche NMRI-Mäuse verwendet [128]. Die Tiere waren zum Zeitpunkt, in dem sie in den hiesigen Tierversuchsabteilungen ankamen, zwischen 6 und 8 Wochen alt; vor den eigentlichen Versuchen wurde ihnen mindestens eine Woche Zeit zur Akklimatisierung gelassen. Um möglichst homogene Versuchsbedingungen zu erreichen, wurde anhand des Körpergewichts der Tiere der Versuchsbeginn definiert, sowie die Zuteilung zu den verschiedenen Gruppen getätigt. Dabei sollten alle Tiere zwischen 30 und 35 g wiegen, der Gruppendurchschnitt wurde mit 33 g zu Beginn festgelegt. Die Haltung erfolgte nach der gängigen Nutzerordnung des Tierforschungszentrums der Universität Ulm. Dabei wurde den Tieren freier Zugang zu fester Nahrung und Wasser gewährt, eine besondere Diät im Rahmen der Versuche war nicht notwendig.

Um eine größtmögliche Sicherheit in der Applikation der Testsubstanzen zu erreichen, wurden diese den Versuchstieren intra-venös (i.v.) verabreicht. Dazu war es nötig, eine kurze Narkose mit Isofluran durchzuführen [135]. Es wurde dabei eine definierte Menge von 2 bis 3 ml des Narkotikums auf ein Stück Zellstoff gegeben, welches wiederum in ein großes, oben abgeschlossenes Becherglas gelegt wurde. Die Mäuse wurden dann einzeln in das Glas gesetzt und unter sorgfältiger Beobachtung betäubt. Anschließend erfolgte die langsame i.v.-Injektion der jeweiligen Testsubstanzen in eine Schwanzvene. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 500 µl.

2.2.7.2. Gewinnung von Probenmaterial

Ein Tag vor Versuchsende wurden die Mäuse in sogenannte metabolische Käfige verbracht (Abbildung 18), die freundlicherweise von der Universität Hohenheim zur Verfügung gestellt wurden. Damit war es sowohl möglich, die Einfuhr von Wasser zu kontrollieren als auch die Ausscheidungen der Versuchstiere aufzufangen. Insbesondere der Urin wurde gesammelt und darin vom Labor der Klinischen Chemie der Universität die Konzentrationen einiger Parameter der Nierenfunktion analysiert.



Abbildung 18: Metabolischer Käfig. Im oberen Teil befindet sich die Nutzfläche für die Versuchstiere, darunter die Apparatur, mit der die Ausscheidungen gesammelt werden.

Zur weiteren Probengewinnung wurden die Tiere mit Isofluran getötet. Das Vorgehen war ähnlich wie im Kapitel **2.2.7.1.** beschrieben, allerdings betrug die Menge des verwendeten Narkotikums etwa 10 ml. Anschließend wurde der Bauch der Tiere mit EtOH (70 %) abgewaschen und das Abdomen mit einem Schnitt entlang der Rippenbögen eröffnet. Nachdem die Leber vorsichtig präpariert und nach kaudal geschlagen worden war, erfolgte die Durchtrennung des Zwerchfells, was das Kollabieren der Lungen zur Folge hatte. Nun wurden die großen Venen unmittelbar unterhalb ihrer Einmündung ins Herz eröffnet, wodurch sich ein maximales Volumen an Vollblut im Thorax der Tiere sammelte. Dieses konnte dann mit einer Pipette, die zuvor mit Heparin *(Clexane)* behandelt worden war, aufgenommen und in ein spezielles EDTA-Blutröhrchen überführt werden. Nach einer Zentrifugation (3000 rpm bei +4 °C für 10 min in einer Tischzentrifuge) wurde der

gewonnene Überstand (also das Blutplasma) in Probenröhrchen der Klinischen Chemie überführt und dort anschließend in Bezug auf einige Nierenparameter hin analysiert.

Außerdem wurden den Tieren das Herz, die Leber und beide Nieren für weitere Untersuchungen entnommen. Eine der Nieren wurde dabei in flüssigem Stickstoff schockgefroren; mit diesem Material wurde die im Kapitel **2.2.3.2.** beschriebene Proteinextraktion durchgeführt. Die anderen Organe wurden in geeigneten Reaktionsgefäßen mit 4 %-iger Formaldehyd-Lösung überschichtet und für ein Woche fixiert. Die Fixier-Lösung wurde dabei alle 24 Stunden gewechselt. Die weitere Aufarbeitung der Proben für die histologische Beurteilung wird in Kapitel **2.2.8.** beschrieben.

Berechnung der *Kreatinin-Clearance*

Als *Clearance* bezeichnet man die Fähigkeit der Niere, ein bestimmtes Plasmavolumen innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit von einer harnpflichtigen Substanz zu befreien. Bei einer Beeinträchtigung der Nierenfunktion treten Veränderungen der *Clearance* schon dann auf, wenn die Messung der harnpflichtigen Substanzen im Blut noch normale Werte ergibt, weshalb insbesondere gering-gradige Schäden sensitiver erkannt werden können [5, 126].

Um die *Kreatinin-Clearance* bestimmen zu können, wurden der 24 h-Urin und das Blutplasma der Versuchstiere gewonnen und anschließend die Kreatininkonzentrationen in beiden Medien gemessen. Unter der Voraussetzung, dass im untersuchten Zeitraum die Kreatininproduktion konstant erfolgte, ließ sich damit die *Clearance* nach folgender Formel berechnen:

$$C = \frac{U \times V}{S \times t}$$

Dabei stehen: C für *Clearance* in ml/min, U für Kreatininkonzentration im Urin in µmol/l, V für Urinvolumen in ml, S für Kreatininkonzentration im Serum in µmol/l, t für Sammelzeit in Minuten.

2.2.7.3. Etablierung des Modells des Cisplatin-induzierten Nierenschadens

Basierend auf Daten aus der Literatur bezüglich der LD_{50} von Cisplatin bei Mäusen wurden einige Vorversuche durchgeführt, um die optimale Dosis für die weiteren Versuche zu finden. Dabei sollte eine relevante Beeinträchtigung der Nierenfunktion erreicht werden, ohne dass die Tiere an unspezifischen Wirkungen des Cisplatins verstarben. Außerdem sollte evaluiert werden, ob es möglich sei, die Nierenfunktion der Mäuse – ähnlich wie aus der Humanmedizin bekannt – anhand einiger Parameter der Nierenfunktion zu verfolgen, um so einen zeitlichen Verlauf der potentiellen Nierenschädigung genauer eingrenzen zu können. Hierzu wurden den Versuchstieren 12 mg Cisplatin pro kg Körpergewicht (gelöst in PBS) injiziert und anschließend an verschiedenen Zeitpunkten Blut und Urin entnommen (siehe Kapitel **2.2.7.2.**). Einer Kontrollgruppe wurde lediglich 500 µl PBS verabreicht.

In Zusammenschau der verschiedenen Parameter ergab sich für den eigentlichen Therapieversuch, dass dieser 9 Tage nach der Applikation von Cisplatin beendet wurde, da sich hier der Nierenschaden am deutlichsten offenbarte.

2.2.7.4. Evaluierung der Testsubstanz 12-Imidazolyldodecanol

Die Mäuse wurden in Gruppen zu je vier Individuen zusammengefasst. Am Tag eins startete die Injektion der jeweiligen „therapeutischen Substanz“: Die Tiere erhielten entweder 12-ID-ol in verschiedenen Konzentrationen, die Vehikelkontrolle CD oder nur PBS. Damit sollte der nierenprotektive Effekt, den eine Volumentherapie hat, erfasst werden, um eine eventuelle zusätzliche Wirkung des 12-ID-ol herausarbeiten zu können [32, 125]. Insgesamt erfolgte die tägliche Injektion über einen Zeitraum von 10 Tagen. Am Tag drei wurde den Tieren zusätzlich eine Cisplatin-Injektion in der oben genannten Dosierung verabreicht.

Nach Ablauf der acht Tage nach Cisplatin-Injektion wurden die Tiere in metabolische Käfige verbracht und nach einem weiteren Tag das Probenmaterial (wie im Kapitel **2.2.7.2.** beschrieben) gewonnen.

Dieser Versuchsansatz wurde für ausgewählte Gruppen unabhängig voneinander zwei Mal wiederholt.

2.2.8. Histologische Untersuchungen der Organproben

2.2.8.1. Allgemeine Probenvorbereitung

Die aus den Tierversuchen gewonnenen Organproben (Kapitel **2.2.7.2.**) wurden zunächst entwässert und anschließend in Paraffinblöcke eingebettet. Diese wurden dann am Mikrotom in etwa 1 µm dicke Scheiben geschnitten, die wiederum auf Objektträger gegeben wurden. Danach folgte die Entparaffinierung der Schnitte durch Inkubation in Xylol für fünf Minuten. Dieser Schritt wurde drei Mal wiederholt. Anschließend wurden die Proben für jeweils fünf Minuten einer absteigenden Alkoholkonzentration (beginnend bei 100 %, dann 90 % und schließlich 70 %) ausgesetzt und im letzten Schritt mit Aqua dest. gereinigt. Die so vorbereiteten Proben konnten dann verschiedenen Färbungen unterzogen werden [12].

2.2.8.2. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung stellt eine der wichtigsten Verfahren in der pathologischen Beurteilung von Organveränderungen dar. Sie dient der morphologischen Untersuchung von Organproben und Biopsien im konventionellen Lichtmikroskop.

Nach der Vorbereitung der Proben (Kapitel **2.2.8.1.**) wurden die Schnitte bei Raumtemperatur für fünf Minuten in einer Hämatoxylin-Lösung inkubiert und anschließend mit lauwarmem Wasser abgespült. Danach wurden die Proben mit einer mit Eisessig angesäuerten Eosin-Lösung (Konzentration 1 %) für 15 Minuten behandelt und danach wiederum mit Aqua dest. gereinigt. Nach Beurteilung der Färbeintensität am Mikroskop wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (von 70 % bis 96 %) entfärbt und anschließend für eine Stunde mit Xylol inkubiert. Dann erfolgte die Konservierung der getrockneten Objektträger mit der kommerziellen Lösung *Neo-Mount*

und abschließend die pathologische Beurteilung am Lichtmikroskop [12, 110]. Diese wurde freundlicherweise durch die Nephropathologische Abteilung des Pathologischen Instituts der Uniklinik Erlangen durchgeführt. Dort war darüber hinaus die Gruppenzuteilung der einzelnen Tiere nicht bekannt, so dass der pathologische Befund verblindet erhoben wurde. Die Beurteilung erfolgte dabei semiquantitativ nach den typischen pathologischen Veränderungen, die in der Cisplatin-Nephropathie beobachtet werden können: dem Vorhandensein von vakuolisiertem Tubulusephitel, sowie von Tubulusepithel mit vergrößerten Zellkernen [148, 171].

2.2.9. Datenverarbeitung und Statistik

Zur Gewinnung, Aufarbeitung und Darstellung der hier gezeigten Daten wurden folgende Programme genutzt: Microsoft Office Home and Student, Adobe CreativeSuite 2, davon insbesondere Photoshop CS2 und Illustrator CS2, ImageJ 1.40 und Cyflogic 1.1.0.

Die statistische Auswertung der Daten wurde mit dem Datenanalysemodul von Microsoft Office Excel 2007 durchgeführt. Um innerhalb der Experimente Signifikanzen zu berechnen, kam der t-Test für unabhängige Variablen zum Einsatz. Dieser setzte voraus, dass eine Normalverteilung der Messwerte um den wahren Gruppenmittelwert vorlag und dass sich die Varianzen der einzelnen Gruppen ähnlich verhielten. Um dies zu gewährleisten, erfolgte zuvor eine Varianzanalyse mit dem gleichen Programm [41].

3. Ergebnisse

3.1. Immunoblot

3.1.1. Immunoblots aus Mikrosomenextrakten

3.1.1.1. Cytochrom P450 2E1

Zur Validierung des verwendeten Cytochrom P450 2E1 Antikörpers (CYP2E1), sowie des angewendeten Protokolls zur Herstellung und Extraktion von Mikrosomenextrakten wurde die Zelllinie LLC-Pk_1 auf den entsprechenden Proteingehalt hin untersucht. Das Ergebnis ist in Abbildung 19 wiedergegeben. Als Negativ- bzw. Positivkontrolle wurden Extrakte aus der Zelllinie HEK 293 und Mäuselebern eingesetzt. Daneben wurden drei unabhängig voneinander hergestellte Proteinextrakte aus den zu untersuchenden LLC-Pk_1-Zellen aufgetragen. Die Höhenlokalisation der beobachteten Bande entspricht den Herstellerangaben des Antikörpers.

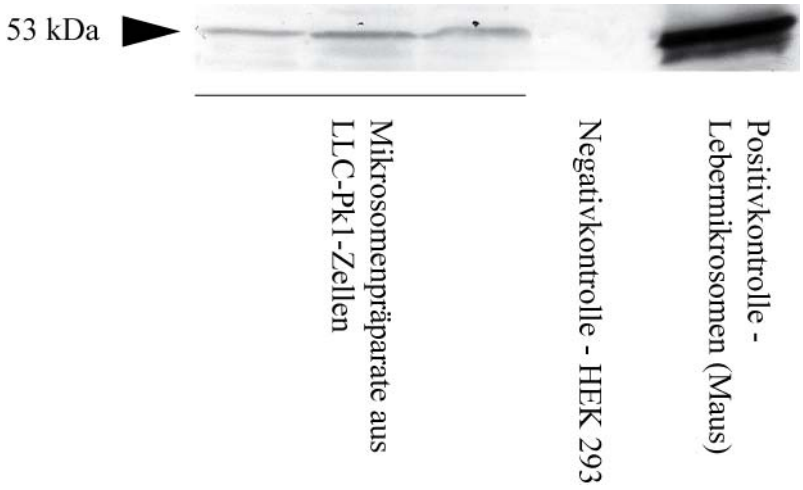


Abbildung 19: Nachweis von CYP2E1 aus Mikrosomenextrakten: Extrakte aus LLC-Pk_1-Zellen wurden gegenüber einer Negativkontrolle (aus HEK 293), sowie einer Positivkontrolle (aus Mäuselebern) aufgetragen.

Weiterhin wurde der CYP2E1-Gehalt der Zellen in Abhängigkeit von der Inkubation mit verschiedenen Kombinationen der Testsubstanzen untersucht (Abbildung 20). Dabei zeigte sich, dass der Proteingehalt durch die Zugabe von Cisplatin (1 mM für 2,5 h) deutlich gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen abnimmt. Diese Abnahme wird durch die Koinkubation von Cisplatin mit den anderen Experimentalsubstanzen scheinbar nicht beeinflusst.

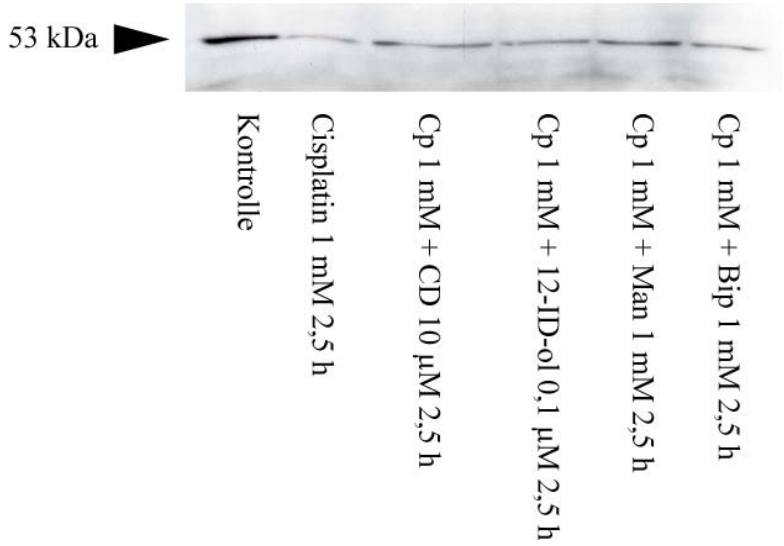


Abbildung 20: CYP2E1 Gehalt in LLC-Pk_1-Zellen abhängig von der Inkubation mit verschiedenen Experimentalsubstanzen. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, Man: Mannitol, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

3.1.1.2. Hämoxygenase 1 (HO-1)

Weiterhin wurden die LLC-Pk_1-Zellen auf den Gehalt von Hämoxygenase 1 (HO-1) nach Inkubation mit den verschiedenen Experimentalsubstanzen hin untersucht (Abbildung 21). Die Inkubation mit Cisplatin für die angegebene Zeit scheint dabei keine Veränderung des HO-1 Gehaltes zu bewirken. Die gleichzeitige Inkubation mit Imidoc resultierte hingegen in einer Abnahme des entsprechenden Proteingehaltes, während dies für die Koinkubation von Cisplatin mit CD nicht der Fall war. Als Positivkontrolle wurden erneut die Extrakte aus den Mäuselebern verwendet.

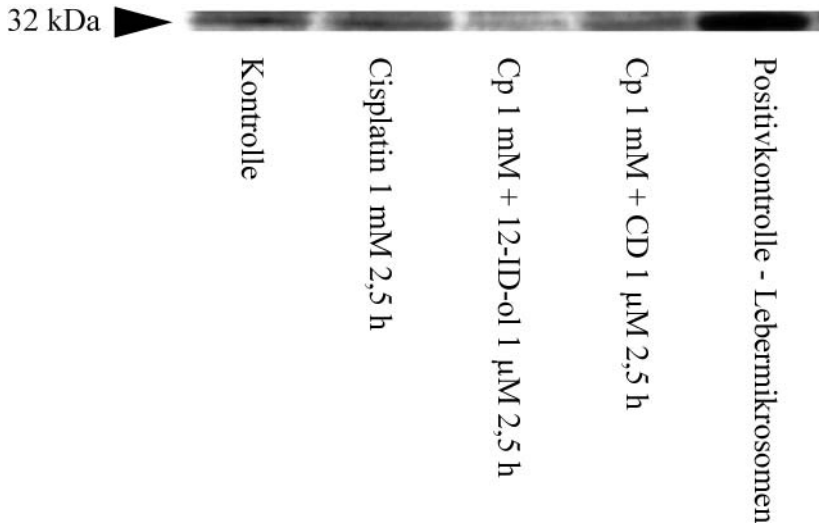


Abbildung 21: Hämoxygenase 1 Gehalt in LLC-Pk_1-Zellen abhängig von der Inkubation mit verschiedenen Experimentalsubstanzen. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

3.1.2. Immunoblots aus Nierenextrakten

Auch aus den aus den Tierversuchen gewonnenen Nieren wurden Proteinextrakte hergestellt, die wiederum auf ihren Gehalt an CYP2E1 und HO-1 untersucht wurden. Im ersten Schritt wurden die Extrakte der Gruppe „Absolutkontrolle“ der „Krankheitskontrolle“ gegenübergestellt. In der „Absolutkontrolle“ erhielten die Versuchstiere lediglich eine einmalige Injektion des Lösungsmittels (500 µl PBS); den Tieren in der „Krankheitskontrolle“ wurde in einer Einzeldosis Cisplatin verabreicht (vergleiche auch Kapitel **2.2.7.3.** und **2.2.7.4.**) Das Ergebnis ist in Abbildung 22 wiedergegeben, wobei jede Bahn einem Versuchstier entspricht. Es lässt sich hier kein Unterschied in der Expression von CYP2E1 erkennen. HO-1 scheint in der „Krankheitskontrolle“ stärker exprimiert zu sein, allerdings lässt die Qualität des eingesetzten Antikörpers keinen endgültigen Schluss zu. Als Ladekontrolle wurde β-Aktin (Act) verwendet.

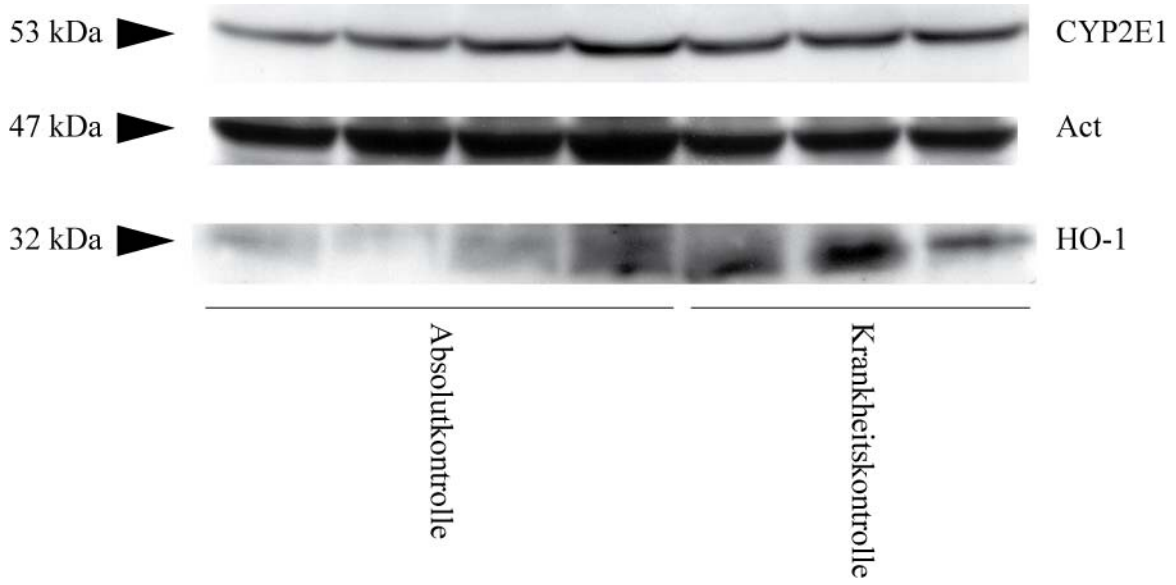


Abbildung 22: Vergleich der Nierenextrakte aus den Gruppen „Absolutkontrolle" und „Krankheitskontrolle" bezüglich des Gehaltes an CYP2E1 und Hämoxygenase 1. Act: Actin.

Weiterhin erfolgte der Vergleich der „Krankheitskontrolle“ mit den Lösungsmittelkontroll-gruppen „PBS Kontrolle“ und „CD-Kontrolle“ (CD einer Konzentration von 10 µM), in denen den Versuchstiere neben der Cisplatin-Injektion wiederholt 500 µl des entsprechenden Lösungsmittels verabreicht wurden. Auch hier lässt sich keine Unterschied in der Expression der untersuchten Proteine nachweisen (Abbildung 23).

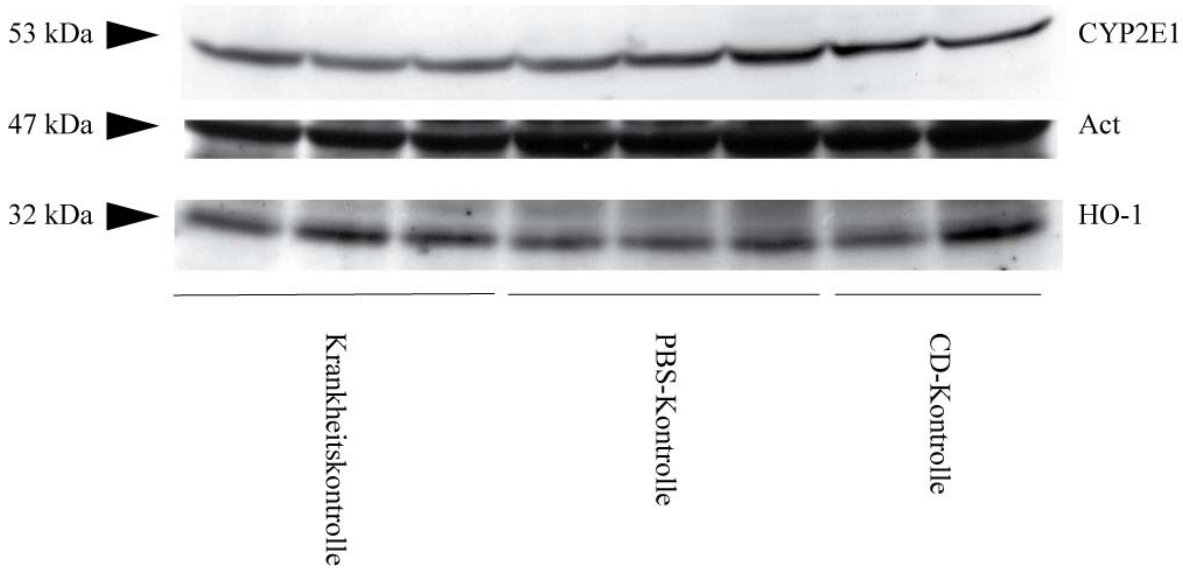


Abbildung 23: Vergleich der Nierenextrakte aus den Gruppen „Krankheitskontrolle", „PBS-Kontrolle" und „CD-Kontrolle" bezüglich des Gehaltes an CYP 2e1 und Hämoxygenase 1. Act: Actin

Schließlich wurden die „Absolutkontrolle“, die „Krankheitskontrolle“ und eine „Therapiegruppe“ (12-ID-ol 0,1 mg/kg KG) gegenübergestellt (Abbildung 24). In der CYP2E1 Expression lässt sich auch hier kein Unterschied feststellen; der HO-1 Gehalt schein in der Absolutkontrolle geringer zu sein als in den beiden anderen Gruppen. Bezüglich der Beurteilbarkeit ergeben sich allerdings dieselben Einschränkungen wie oben beschrieben.

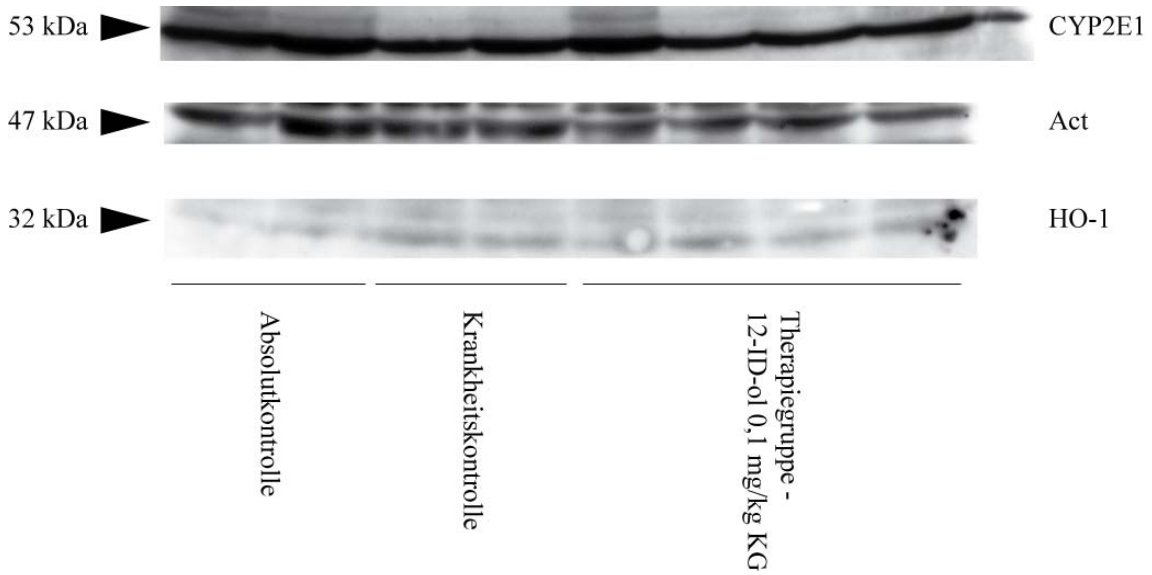


Abbildung 24: Vergleich der Nierenextrakte aus den Gruppen „Absolutkontrolle", „Krankheitskontrolle" und „Therapiegruppe 12-ID-ol 0,1 mg/kg KG" bezüglich des Gehaltes an CYP2E1 und Hämoxygenase 1. Act: Actin.

3.2. Zellbasierte Assays im Microplateformat

3.2.1. Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue

Mittels des CellTiter-Blue-Systems wurde der Einfluss einer Cisplatin-Inkubation auf die Viabilität von LLC-Pk_1-Zellen untersucht. In einem Zeitraum von 24 h wurden dabei verschiedene Cisplatin-Konzentrationen betrachtet und unbehandelten Zellen gegenübergestellt (Abbildung 25).

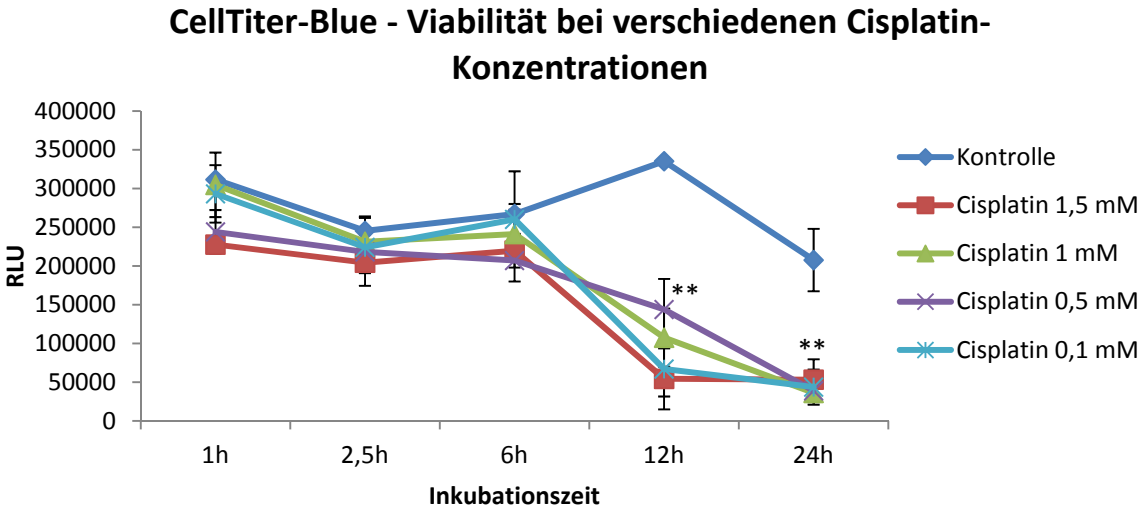


Abbildung 25: CellTiter-Blue-Assay: Zeitlicher Verlauf der Viabilität in Abhängigkeit verschiedener Cisplatin-Konzentrationen. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. RLU: *relative light units*.

Man sieht, dass bis zu einer Inkubationszeit von 6 h kein nennenswerter Unterschied zwischen den Gruppen besteht. Danach kommt es unter Cisplatin-Inkubation zu einem starken Verlust an viablen Zellen. Dabei ist eine Dosis-Wirkungs-Beziehung in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration zu erkennen. Die Abnahme der Viabilität der Kontrollzellen nach 24 h kann damit erklärt werden, dass serumfreies Inkubationsmedium verwendet wurde; in Abbildung 26 wurde die Viabilität der Kontrollzellen daher *per definitionem* als „1“ gesetzt und die anderen Gruppen darauf bezogen.

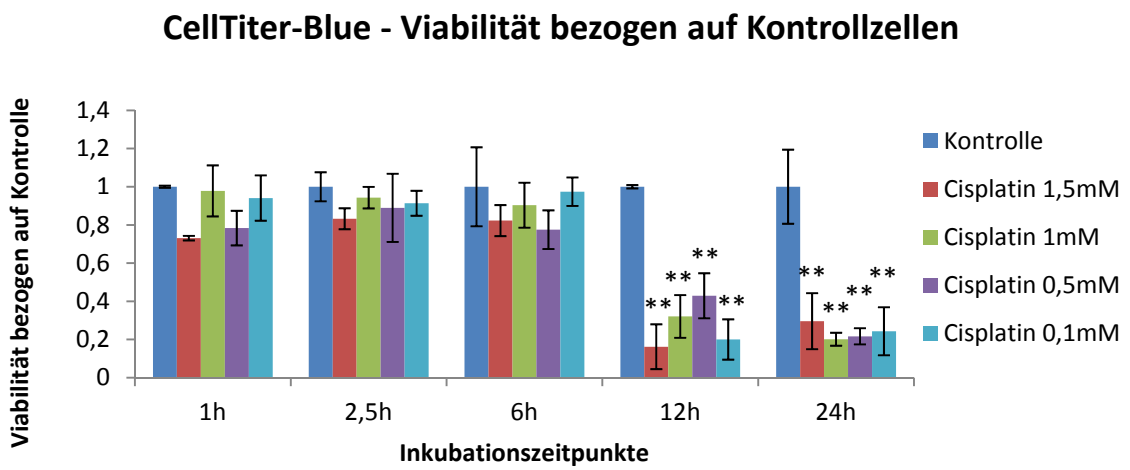


Abbildung 26: CellTiter-Blue-Assay: Zeitlicher Verlauf der Viabilität in Abhängigkeit verschiedener Cisplatin-Konzentration, bezogen auf Kontrolle. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

Im nächsten Schritt wurde eine Koinkubation von Cisplatin mit verschiedenen Experimentalsubstanzen durchgeführt und erneut die Entwicklung der Viabilität über einen Zeitraum von 24 Stunden analysiert (Abbildung 27).

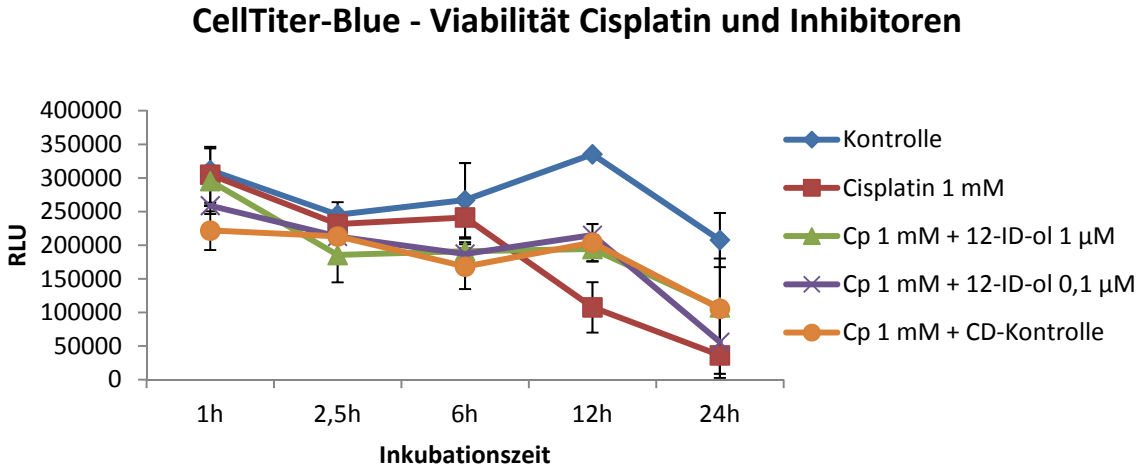


Abbildung 27: CellTiter-Blue-Assay: Zeitlicher Verlauf der Viabilität bei verschiedenen Koinkubationen von Cisplatin mit den angegebenen Experimentalsubstanzen. Cp: Cispatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, RLU: *relative light units*.

Zur verbesserten Anschaulichkeit zeigt Abbildung 28 wiederum die relative Viabilität der einzelnen untersuchten Gruppen gegenüber der Kontrolle.

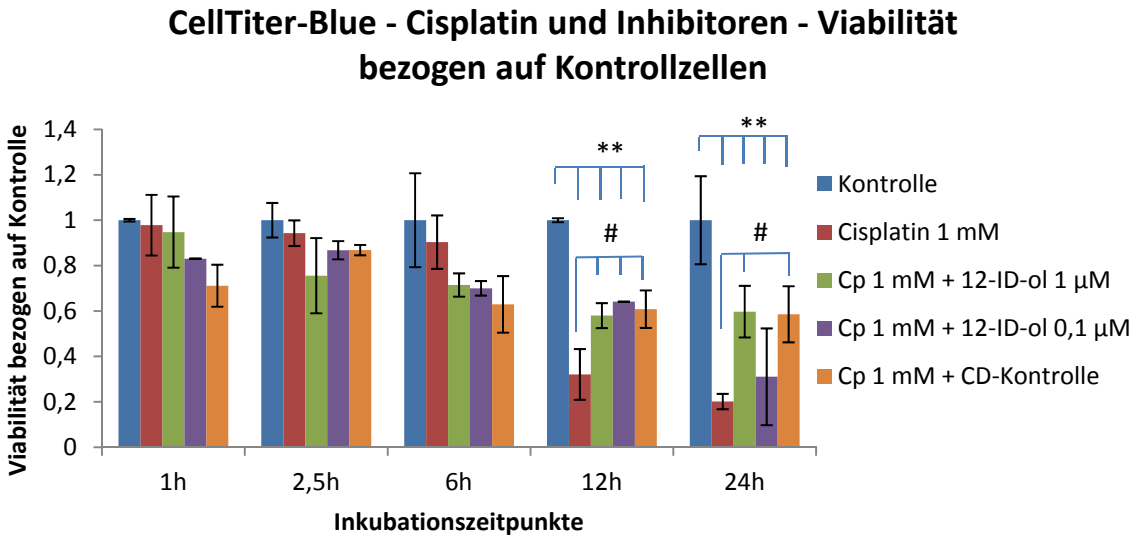


Abbildung 28: CellTiter-Blue-Assay: Zeitlicher Verlauf der Viabilität bei verschiedenen Koinkubationen von Cisplatin mit den angegebenen Experimentalsubstanzen, bezogen auf Kontrolle. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle, # bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Cisplatingruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

Die Abnahme der Viabilität durch Cisplatin nach 12 bzw. 24 Stunden konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit den Experimentalsubstanzen signifikant abgemildert werden. Dabei war allerdings kein Unterschied in der Wirkung zwischen 12-ID-ol 1 µM und der Lösungsmittelkontrolle CD 1 µM zu verzeichnen, lediglich eine Inkubation von 12-ID-ol 0,1 µM zeigte nach 24 Stunden geringere Effekte.

3.2.2. Zytotoxizitätsmessung mit CytoTox-Glo

Mittels des CytoTox-Glo-Assays wurde weiterhin der Anteil an toten Zellen innerhalb einer definierten Ausgangspopulation bestimmt, der durch verschiedene Cisplatin-Konzentrationen über die Zeit hervorgerufen wird. Dabei steht als Aussage am Ende des Tests der Anteil toter Zellen in Prozent der eingesetzten Gesamtzellmenge (vgl. auch Kapitel **2.2.4.2.**).

Im ersten Schritt wurden die Auswirkungen verschiedener Cisplatin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden untersucht (Abbildung 29).

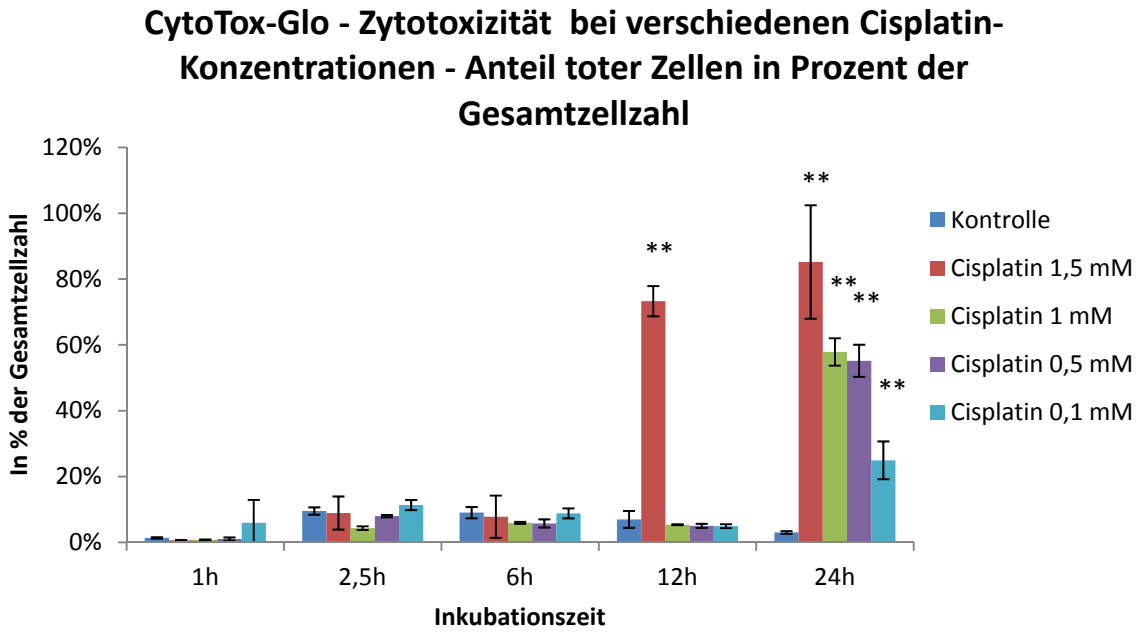


Abbildung 29: CytoTox-Glo-Assay: Zeitlicher Verlauf der Zytotoxizität in Abhängigkeit verschiedener Cisplatin-Konzentrationen. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

Eine deutliche Zunahme der Zytotoxizität trat dabei erst nach 12 Stunden bei einer eingesetzten Cisplatin-Konzentration von 1,5 mM auf. Bei diesem Inkubationszeitpunkt zeigten die niedrigeren Konzentrationen noch keinen Effekt. Nach 24 Stunden war praktisch die gesamte Population bei einer eingesetzten Konzentration von 1,5 mM abgestorben. Hier zeigte sich des Weiteren, dass auch bei den geringeren Konzentrationen ein beachtlicher Anteil der ursprünglichen Zellmasse untergegangen war. Auch ließ sich eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen eingesetzter Cisplatin-Konzentration und Menge der toten Zellen innerhalb einer Population herausarbeiten.

Anschließend sollte wiederum der Effekt einer Koinkubation von Cisplatin mit den Inhibitoren auf die Entwicklung der Zytotoxizität untersucht werden. Dem gleichen Versuchsschema folgend, ergaben sich die Resultate, die Abbildung 30 zeigt.

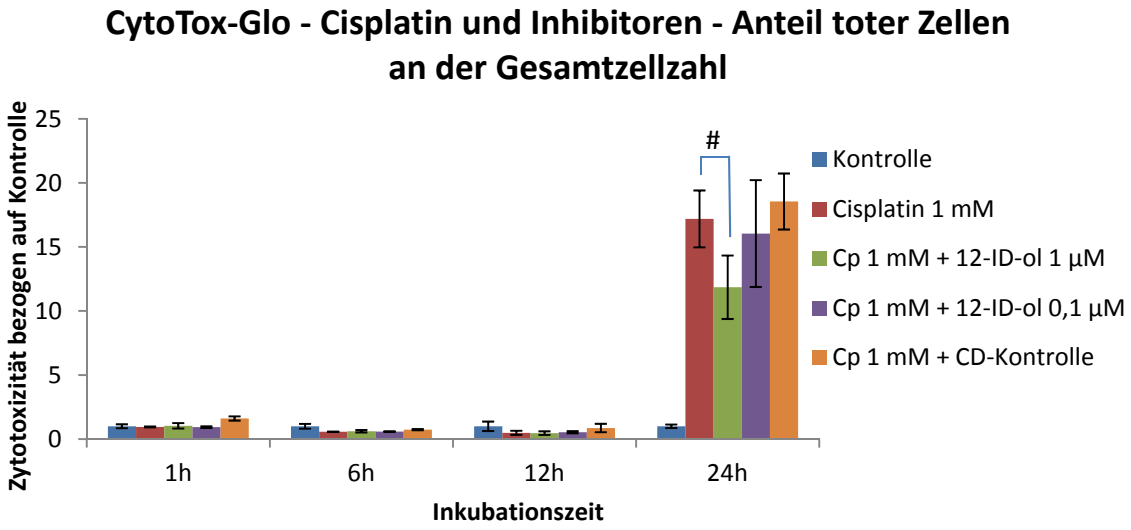


Abbildung 30: CytoTox-Glo-Assay: Zeitlicher Verlauf der Zytotoxizität bei verschiedenen Koinkubationen von Cisplatin und den angegebenen Experimentalsubstanzen. # bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cispatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

Man sieht, dass durch die Koinkubation von Cisplatin 1 mM mit 12-ID-ol 1 µM eine signifikante Abmilderung des zytotoxischen Effekts erzielt werden konnte, der von Cisplatin in der entsprechenden Konzentration alleine hervorgerufen wurde. Allerdings war diese Wirkung nicht stark genug, um das Niveau der Kontrollzellen zu erreichen. Mit 12-ID-ol in einer zehnfach niedrigeren Konzentration bzw. mit der Vehikelkontrolle CD 1 µM ließ sich ein solcher Effekt nicht nachweisen.

3.2.3. Messung der Caspasenaktivierung mit Caspase-Glo 3/7

Um den Zelltodmechanismus, mit dem die Cisplatin-Inkubation zu einer Abnahme der Viabilität in der Zellkultur führt, weiter untersuchen zu können, wurde die Caspasenaktivierung mittels des Caspase-Glo 3/7-Assays gemessen. Abbildung 31 zeigt, wie sich die Inkubation verschiedener Cisplatin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 12 Stunden auf die Aktivierung der Endstrecke des apoptotischen Zelltods auswirkte.

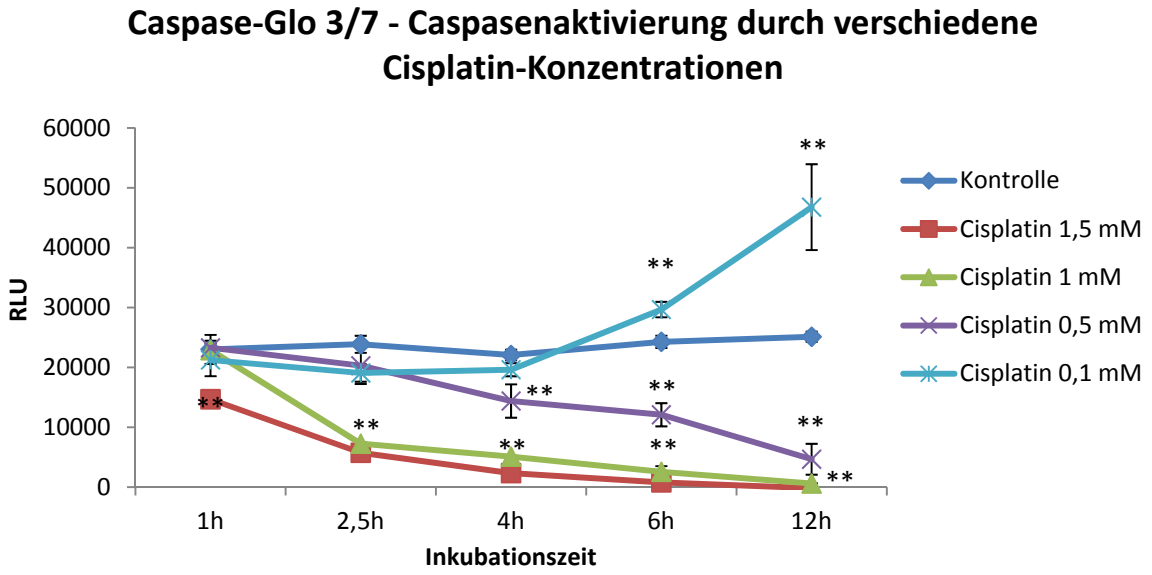


Abbildung 31: Caspase-Glo 3/7: Zeitlicher Verlauf der Caspasen-Aktivierung durch verschiedene Cisplatin-Konzentrationen. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle, RLU: *relative light units*.

Merkwürdigerweise kam es bei der Verwendung von Cisplatin-Konzentrationen ab 0,5 mM zu einem raschen Abfall des Lumineszenz-Signals unter den Wert der Kontrolle. Dabei ließ sich eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennen. Lediglich in bei der geringsten untersuchten Cisplatin-Konzentration von 0,1 mM ließ sich eine stetige Zunahme des Caspasen-Aktivierung nach einem Zeitpunkt von 4 h beobachten.

In Kombination mit den Ergebnissen der Viabilitätsmessungen mittels CellTiter-Blue-Assay (Kapitel **3.2.1.**), ließ sich nun die Caspasen-Aktivierung auf den viablen Anteil der eingesetzten Zellpopulationen beziehen. Abbildung 32 zeigt die Resultate dieser Berechnungen; des Weiteren wurden hier die einzelnen Gruppen auf die Kontrolle bezogen, deren Wert als „1“ definiert wurde. Wie man sieht, ergab sich – die beschriebenen theoretischen Überlegungen zugrunde gelegt – eine wesentlich ausgeprägtere Aktivierung in der Gruppe Cisplatin 0,1 mM als in der Betrachtung des Caspase-Glo 3/7 Assays alleine.

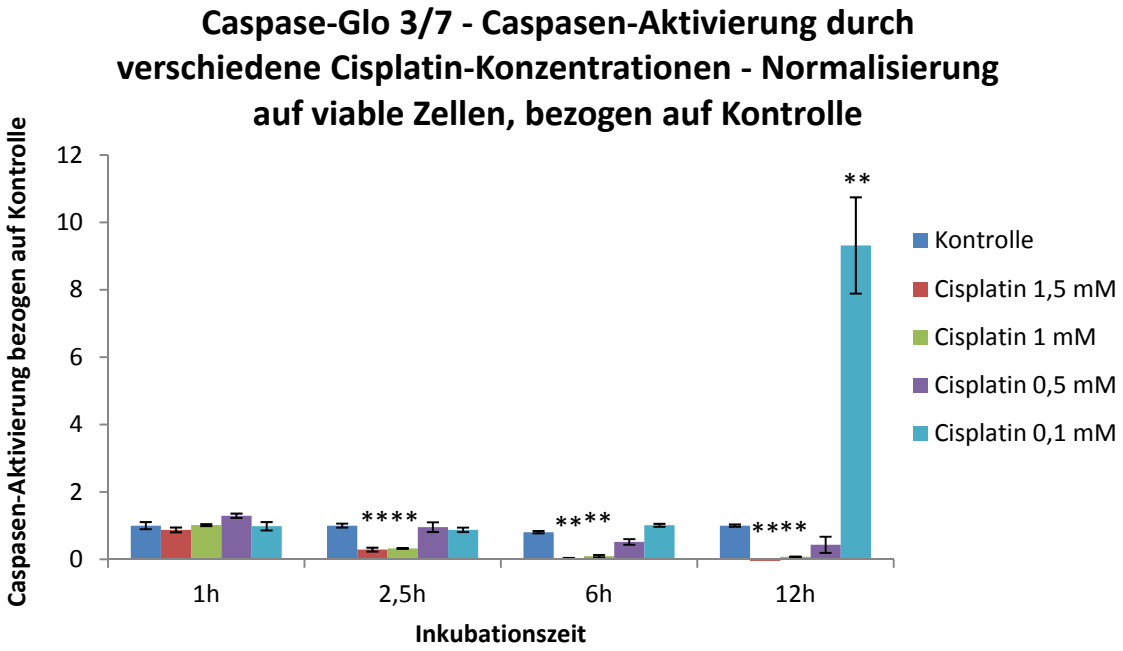


Abbildung 32: Caspase-Glo 3/7: Caspasen-Aktivierung durch verschiedene Cisplatin-Konzentrationen, normalisiert auf viable Zellen, bezogen auf Kontrolle. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

Weiterhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Koinkubation der Experimental-substanzen mit Cisplatin-Konzentrationen von 0,1 mM beziehungsweise 1 mM aufweist. Bei einer Cisplatin-Konzentration von 1 mM (Abbildung 33) konnte dabei kein Effekt beobachtet werden.

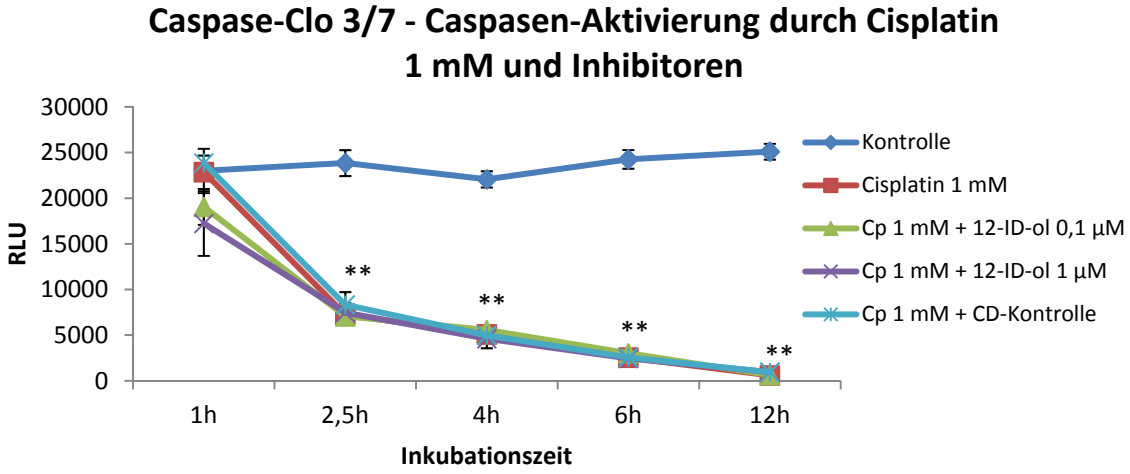


Abbildung 33: Caspase-Glo 3/7: Caspasen-Aktivierung durch Cisplatin 1 mM und Inhibitoren. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. Cp: Cispatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol,, CD: Cyclodextrin, RLU: *relative light units*.

Auch bei einer Cisplatin-Konzentration von 0,1 mM blieb die Wirkung der verwendeten Inhibitoren gering (Abbildung 34). In Kombination mit der Vehikelkontrolle CD (Konzentration 1 µM) zeigte sich nach 12 Stunden ein schwach signifikanter Anstieg in der gemessenen Caspasen-Aktivierung; 12-ID-ol in einer niedrigen Konzentration (was einer niedrigen CD-Konzentration entsprach), unterschied sich in diesem Test nicht von der alleinigen Inkubation mit Cisplatin 0,1 mM.

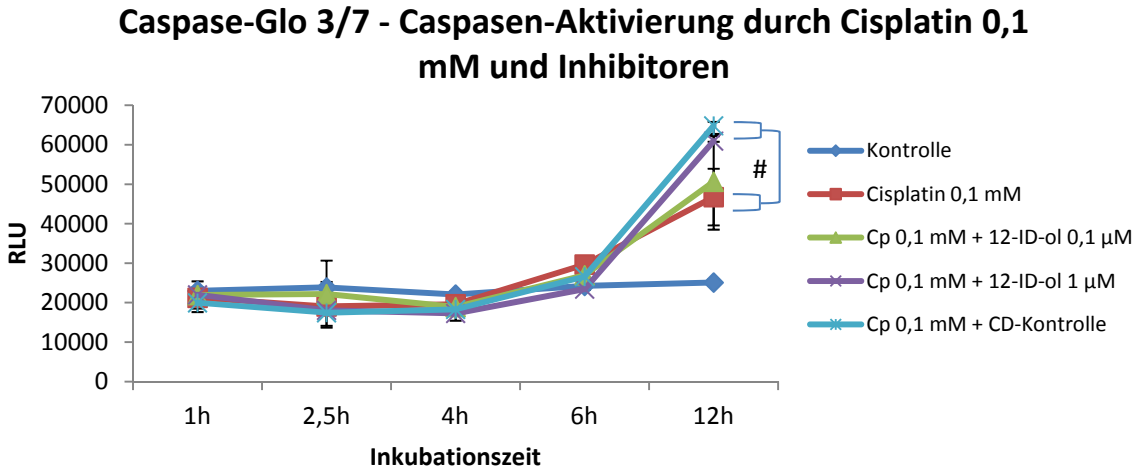


Abbildung 34: Caspase-Glo 3/7: Caspasen-Aktivierung durch Cisplatin 0,1 mM und Inhibitoren. # bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cispatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, RLU: *relative light units*.

3.3. Messung von freiem Eisen mit dem Bleomycin-Assay

Der Bleomycin-Assay stellt eine der verwendeten Methoden dar, mit der eine mögliche Änderung des intrazellulären Eisenpools durch Cisplatin-Exposition untersucht werden sollte. Hierzu wurden LLC-Pk_1-Zellen mit Cisplatin in einer Konzentration von 1 mM inkubiert und anschließend verschiedene Untersuchungsmaterialien dem Test unterworfen (siehe auch Kapitel **2.2.5.**) Dabei kamen unterschiedliche Zellaufschlussverfahren zur Anwendung, um methodenabhängige Unterschiede in den Testresultaten herausarbeiten zu können. Bei der Aufschlussmethode 1 wurden die – entsprechend des Versuchsprotokolls vorbereiteten – Zellproben mittels des vorbeschriebenen Extraktionspuffers aufgeschlossen. Bei Methode 2 wurden die Proben zusätzlich im Ultraschallbad schonend homogenisiert [20, 67, 79]. Abbildung 35 stellt die beiden Verfahren einander gegenüber.

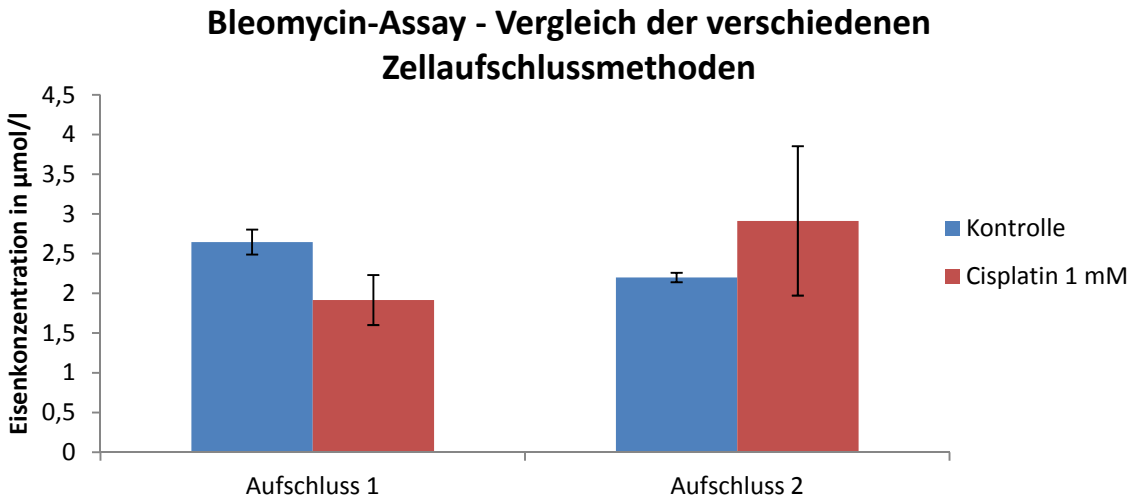


Abbildung 35: Bleomycin-Assay: Vergleich der verschiedenen Verfahren für den Zellaufschluss. Aufschlussmethode 1: Aufschluss durch Extraktionspuffer. Aufschlussmethode 2: Physikalischer Zellaufschluss im Ultraschallbad.

Wie man sieht, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den angewendeten Methoden. Insbesondere konnte auch keine Änderung der gemessenen Eisenkonzentration durch die Inkubation mit Cisplatin nachgewiesen werden.

Im nächsten Schritt wurden die in der Zellkultur gewonnenen Überstände auf ihren Eisengehalt hin untersucht (Abbildung 36).

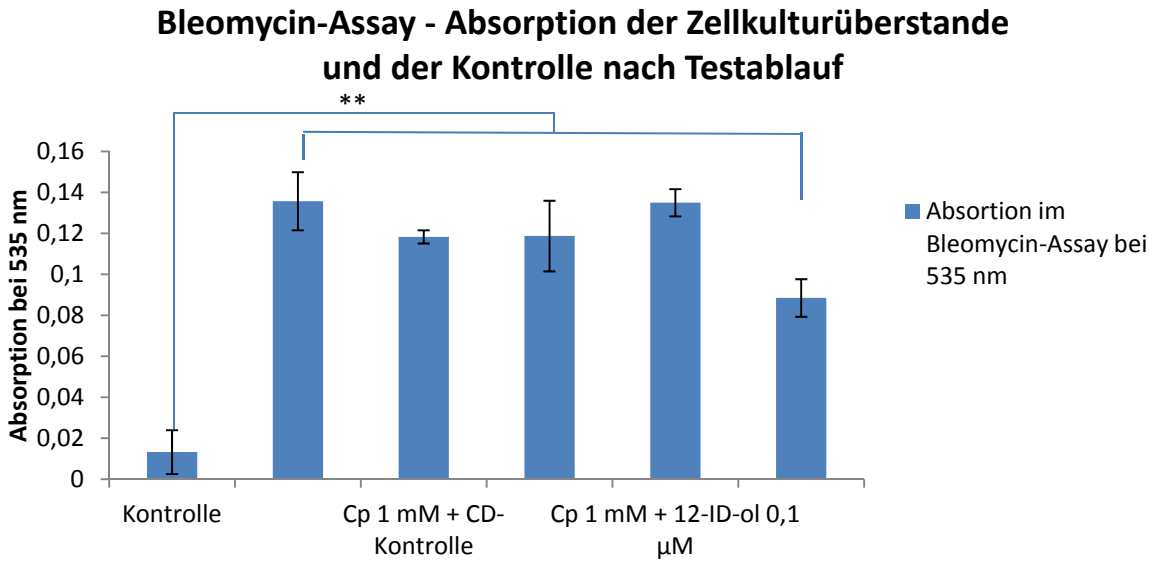


Abbildung 36: Bleomycin-Assay: Messung der Absorption der Zellkulturüberstände bei 535 nm nach Ablauf des Tests. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. Cp: Cispatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

Man erkennt, dass die Anwesenheit von Cisplatin im Inkubationsmedium in einer Zunahme des Absorptionssignals bei 535 nm resultierte. Im Sinne des Tests wäre dies mit einer höheren Eisenkonzentration im untersuchten Medium gleichzusetzen. Jedoch zeigte sich in einer durchgeführten Kontrolle, die ausschließlich Cisplatin und keine Zellen beinhaltete, ein vergleichbarer Anstieg der gemessenen Absorption. Damit ließ sich mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine direkte Interaktion von Cisplatin mit den Testchemikalien schließen, was die Aussagekraft des Tests in der vorliegenden Fragestellung stark in Frage stellte. Im Übrigen beeinflusste die Koinkubation mit den Inhibitoren den Testausgang nicht.

3.4. Durchflusszytometrie (FACS)

3.4.1. Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Der DCFH-DA-Assay (vgl. Kapitel **2.2.6.2.**) diente zur Messung des intrazellulären Sauerstoffstresses, der nach einer Cisplatin-Inkubation auftritt. Es sollte weiterhin untersucht werden, inwiefern sich dieser Stress durch die Verwendung der bereits beschriebenen Experimentalsubstanzen verhindern ließe.

Die Substanz Menadion wurde zur Evaluation des Tests verwendet (Abbildung 37). Sie gilt als anerkannter Induktor von Sauerstoffradikalen und stellte damit eine brauchbare Positivkontrolle dar.

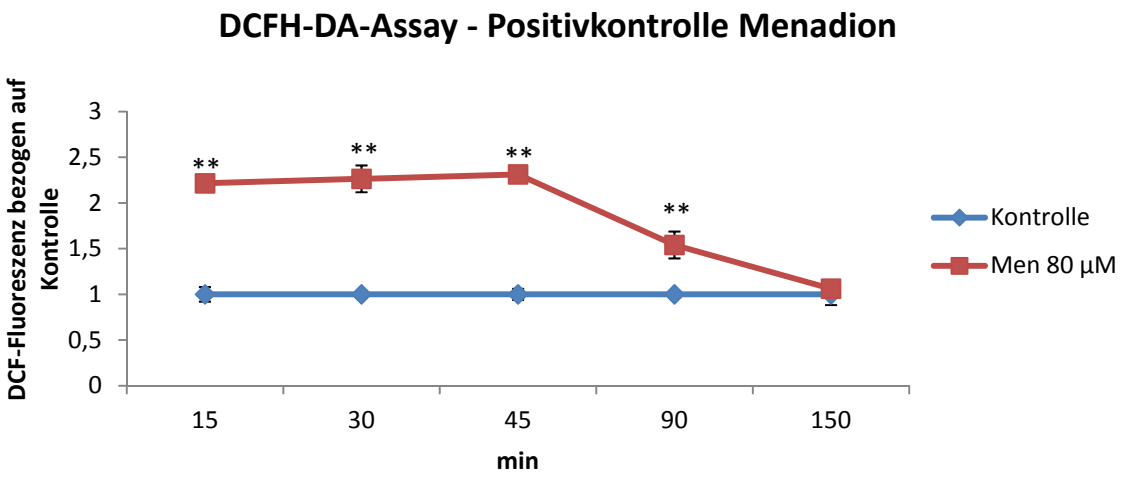


Abbildung 37: DCFH-DA-Assay: Evaluation der Positivkontrolle Menadion. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. Men: Menadion.

Der Abfall des gemessenen DCF-Fluoreszenz-Signals nach etwa 45 Minuten lässt sich damit erklären, dass Menadion in der eingesetzten Konzentration auch starke Apoptose-auslösende Eigenschaften besitzt [36]. Dies führte am Ende der beobachteten Inkubationszeit zu einem Verlust an viablen Zellen und – damit einhergehend – an gemessener Fluoreszenz.

Um eine möglicherweise vorhandene Dosis-Wirkungs-Beziehung herausarbeiten zu können, erfolgte die Inkubation der LLC-Pk_1-Zellen mit verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen über den angegebenen Zeitraum. Abbildung 38 stellt die Ergebnisse dieses Experiments dar.

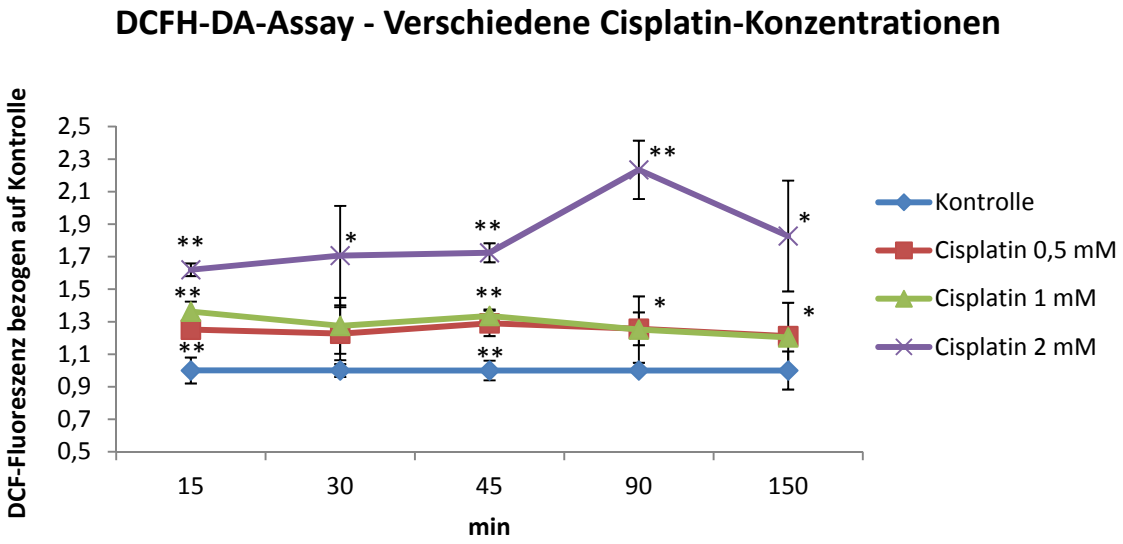


Abbildung 38: DCFH-DA-Assay: Auswirkung verschiedener Cisplatin-Konzentrationen auf den intrazellulären ROS-Gehalt über die Zeit. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

Man sieht, dass eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der eingesetzten Cisplatin-Konzentration und dem gemessen DCF-Fluoreszenz-Signal beobachtet werden konnte. Dabei bestand die größte Differenz zur Kontrolle bei einer Konzentration von 2 mM nach einer 1,5-stündigen Inkubationszeit.

Bevor nun Koinkubationen von Cisplatin und den verschiedenen Testsubstanzen untersucht wurden, sollte der intrinsische Effekt von 12-ID-ol und der Vehikelkontrolle CD beleuchtet werden (Abbildung 39).

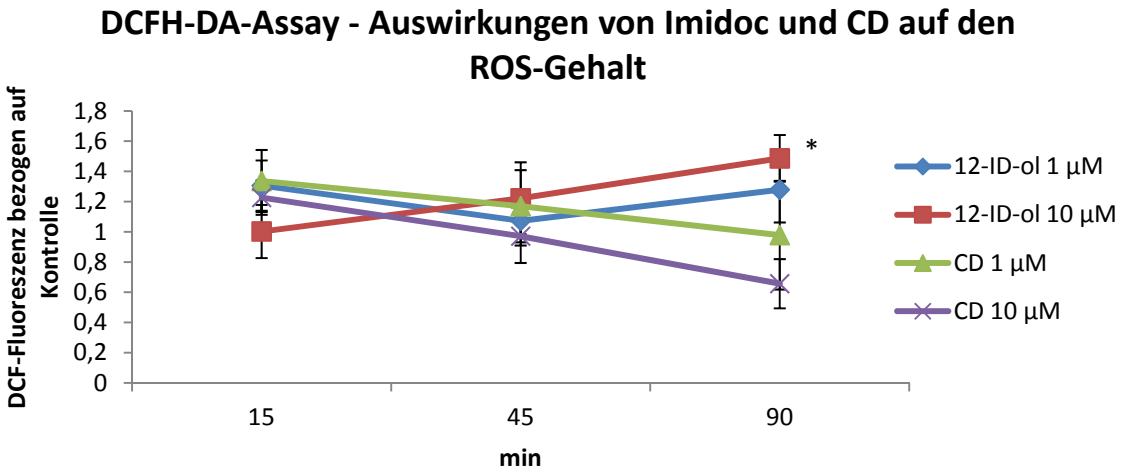


Abbildung 39: DCFH-DA-Assay: Auswirkungen von verschiedenen Konzentrationen von 12-ID-ol und CD auf den ROS-Gehalt über die Zeit. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

Man erkennt, dass die Verwendung des Inhibitors 12-ID-ol Dosis-abhängig zu einem geringen Anstieg des intrazellulären ROS-Gehaltes führte (die als „1“ gesetzte Kontrolle wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen). Weiterhin konnte man bei der Vehikelsubstanz CD eine gewisse ROS-neutralisierende Eigenschaft erkennen. Mit steigender Konzentration kam es hier zum Absinken des ROS-Gehalts unter das Niveau der Kontrolle.

Im nächsten Schritt wurden Koinkubationen von Cisplatin (in Konzentrationen von 1 mM und 2 mM) und Imidoc bzw. CD durchgeführt (Abbildungen 40 und 41).

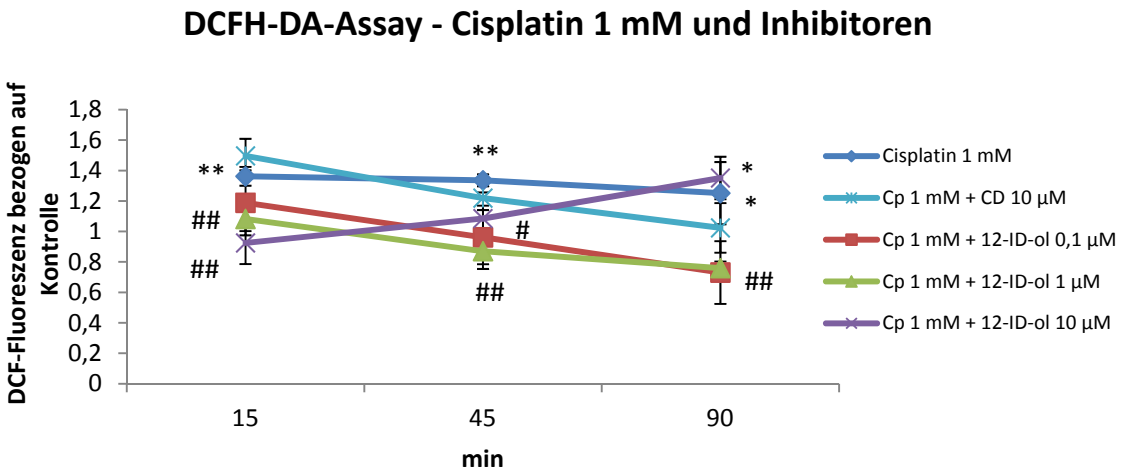


Abbildung 40: DCFH-DA-Assay: Auswirkungen der Koinkubationen von Cisplatin (1 mM) und der entsprechenden Inhibitoren auf den ROS-Gehalt über die Zeit. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. ## bzw. # bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

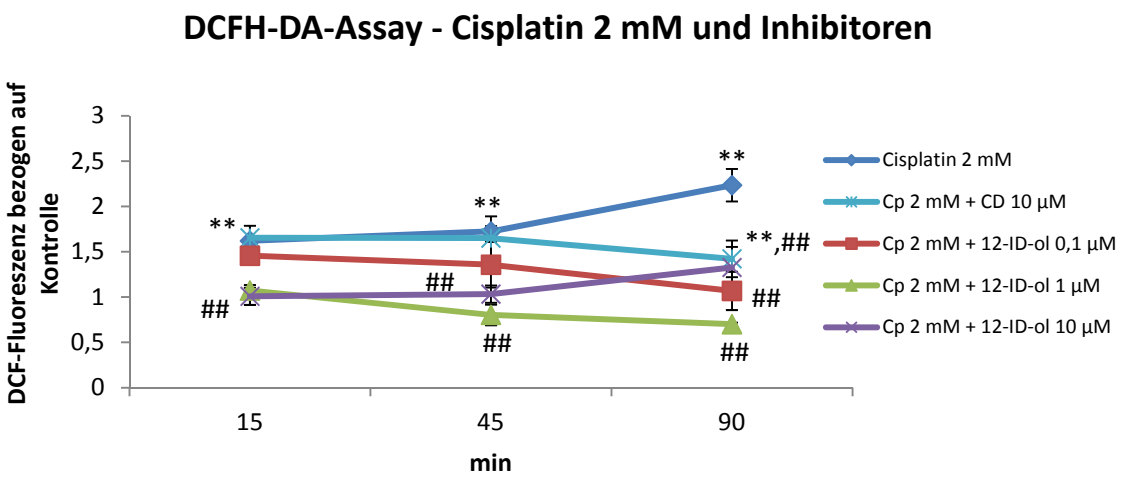


Abbildung 41: DCFH-DA-Assay: Auswirkungen der Koinkubationen von Cisplatin (2 mM) und der entsprechenden Inhibitoren auf den ROS-Gehalt über die Zeit. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. ## bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin.

Unabhängig von der eingesetzten Cisplatin-Konzentration erkennt man, dass die Koinkubation mit dem Vehikel CD 10 µM zu einer gewissen Reduktion des Fluoreszenzsignals führte (vgl. Abbildung 39 und die korrespondierenden Ausführungen). Allerdings konnte durch die Verwendung des CDs insbesondere im Fall von Cisplatin in einer Konzentration von 2 mM keine Normalisierung auf Werte der Kontrolle erreicht werden.

Bei der Verwendung von 12-ID-ol-Konzentrationen bis 1 µM ließ sich beobachten, dass die gemessenen Fluoreszenzsignale das Niveau der Kontrolle annahmen. Damit war ein die Cisplatin-Wirkung abmildernder Effekt zu beobachten, der über die Wirkung des Vehikels hinausging. Ab einer Konzentration von 10 µM zeigte sich dann ein Anstieg des intrazellulären ROS-Signals, der auch in der alleinigen Verwendung von 12-ID-ol zu erkennen war (Abbildung 39).

Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit sich der Cisplatin-Effekt durch die Verwendung des ROS-*Scavenges* Mannitol und des Eisenchelators 2,2‘-Bipyridin aufheben ließe und ob ein Unterschied in dem Ausmaß der Abmilderung zwischen diesen Substanzen und dem Inhibitor 12-ID-ol bestehen würde. Zu diesem Zweck wurden Koinkubationen von Cisplatin in den oben erwähnten Konzentrationen und den verschiedenen Experimentalsubstanzen durchgeführt und analysiert. In den Abbildungen 42 und 43 werden die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

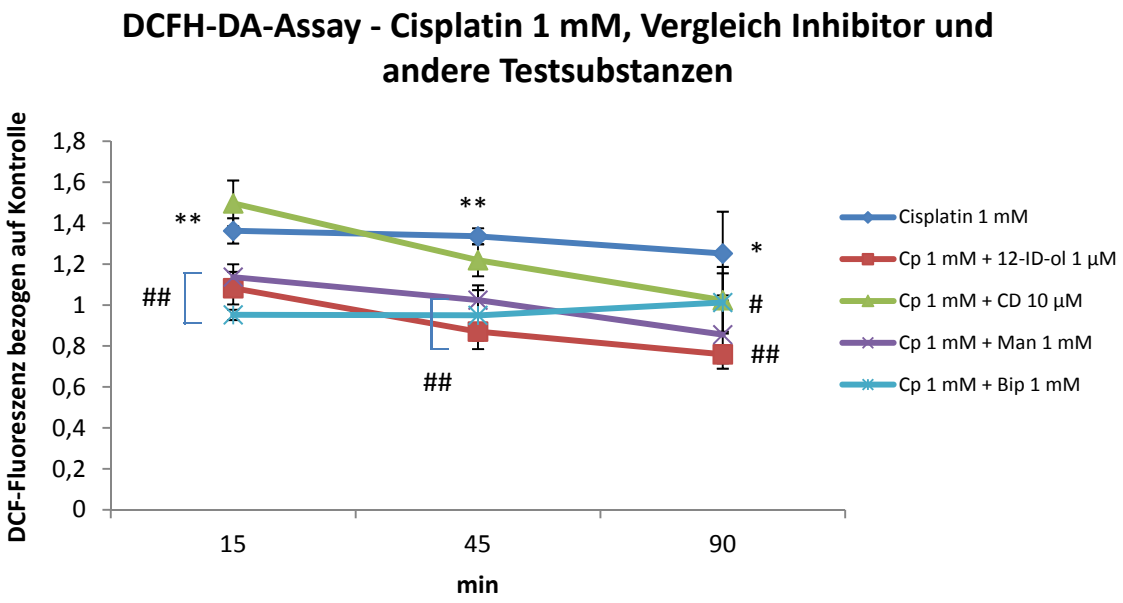


Abbildung 42: DCFH-DA-Assay: Auswirkungen der Koinkubationen von Cisplatin (1 mM) und der entsprechenden Experimentalsubstanzen auf den ROS-Gehalt über die Zeit. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. ## bzw. # bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, Man: Mannitol, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

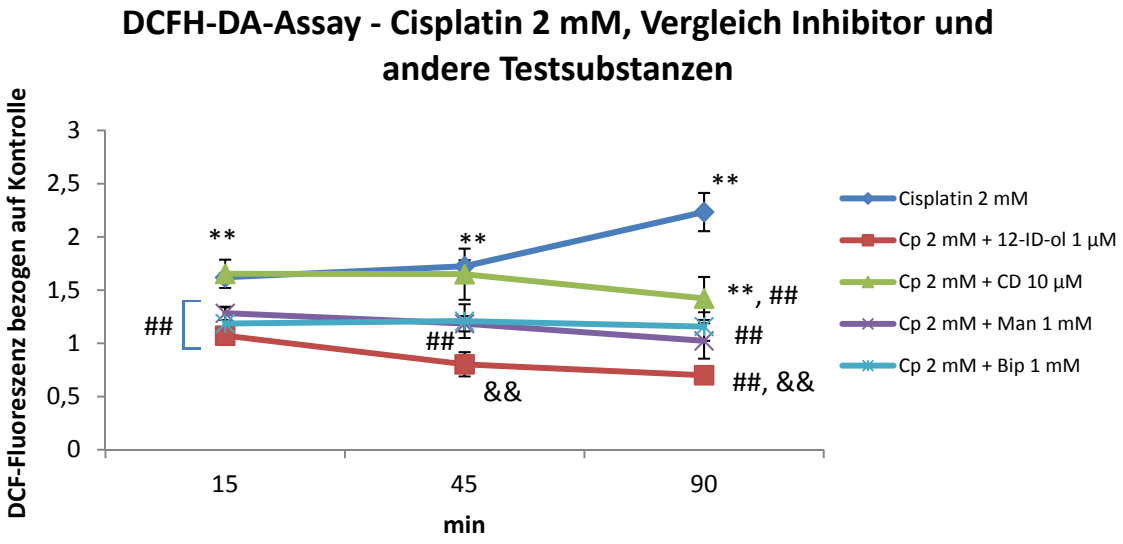


Abbildung 43: DCFH-DA-Assay: Auswirkungen der Koinkubationen von Cisplatin (2 mM) und der entsprechenden Experimentalsubstanzen auf den ROS-Gehalt über die Zeit. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. ## bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. && bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Mannitol-Gruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, Man: Mannitol, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

Man erkennt, dass die erwähnten Experimentalsubstanzen zu einer Abschwächung des Cisplatin-Effekts führten. Insbesondere bei einer Cisplatin-Konzentration von 2 mM zeigte

sich jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen ihnen und 12-ID-ol, wobei der Inhibitor eine deutlichere Abnahme des Fluoreszenzsignals im Vergleich zu den anderen eingesetzten Substanzen in Verbindung mit Cisplatin bewirkte.

Schließlich sollte untersucht werden, ob die Anwesenheit von freiem, ionisiertem Eisen mit einem erhöhten ROS-Gehalt einhergehen und dies mit dem DCFH-DA-Assay nachgewiesen werden kann. Hierfür wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des Eisendonators AFS inkubiert und anschließend analysiert (Abbildung 44).

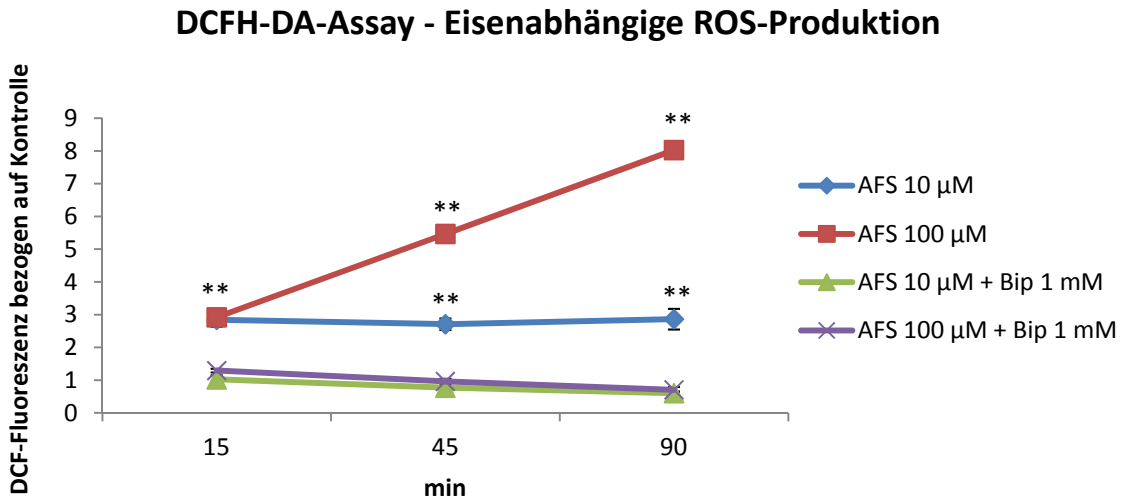


Abbildung 44: DCFH-DA-Assay: Eisenabhängie ROS-Produktion, Eisendonator AFS. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. AFS: Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

Durch die Inkubation mit AFS 10 µM kam es zu einer zeitstabilen Induktion des ROS-Gehaltes auf dreifach höhere Werte gegenüber der Kontrolle. Eine Konzentration von 100 µM führte sogar zu einer stetigen Steigerung des gemessenen Fluoreszenzsignals. Wurde der Eisenchelator 2,2‘-Bipyridin im Überschuss zum Inkubationsmedium gegeben, ergaben sich Werte, die denen der Kontrolle exakt entsprachen, so dass davon auszugehen war, dass durch das Bip eine eisenabhängige ROS-Produktion verhindert werden konnte.

3.4.2. Messung des Mitochondrienpotentials mit dem JC-1-Assay

Mit dem JC-1-Assay sollte die Auswirkung einer Cisplatin-Inkubation auf das Mitochondrienpotential von LLC-Pk_1-Zellen untersucht werden (vergleiche Kapitel **2.2.6.3.**).

Abbildung 45 zeigt die Testergebnisse einer einstündigen Inkubation verschiedener Cisplatin-Konzentrationen, sowie der Positivkontrolle CCCP. Gegenüber der Kontrolle führte die Verwendung des CCCP bereits nach einer Stunde zu einem völligen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials; durch die Cisplatin-Inkubation ließ sich hier ein geringer, allerdings nicht signifikanter Effekt nachweisen. Abbildung 46 zeigt der besseren Übersichtlichkeit wegen nur den Anteil des zerstörten Membranpotentials, relativ zur Kontrolle.

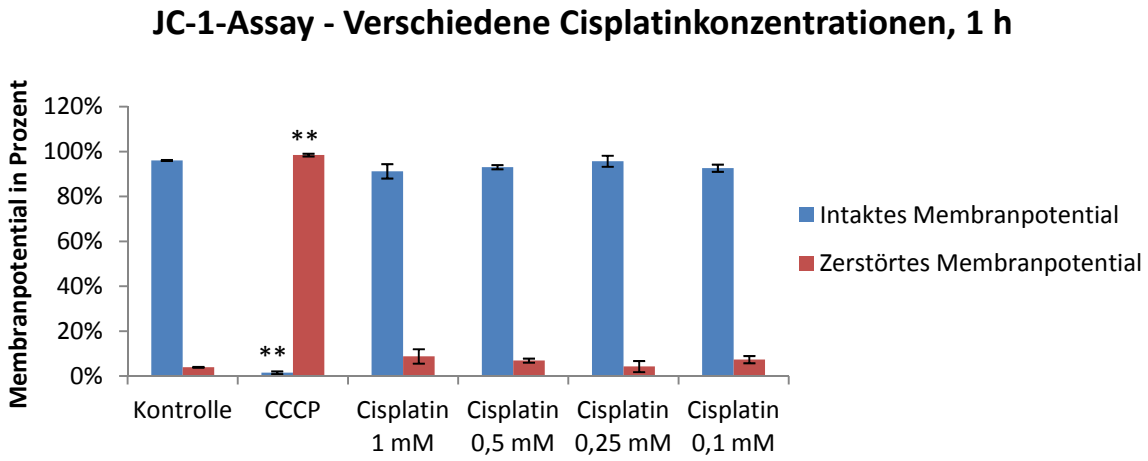


Abbildung 45: JC-1-Assay: Auswirkungen von verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen auf das Membranpotential nach einstündiger Inkubation. CCCP als Positikontrolle. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

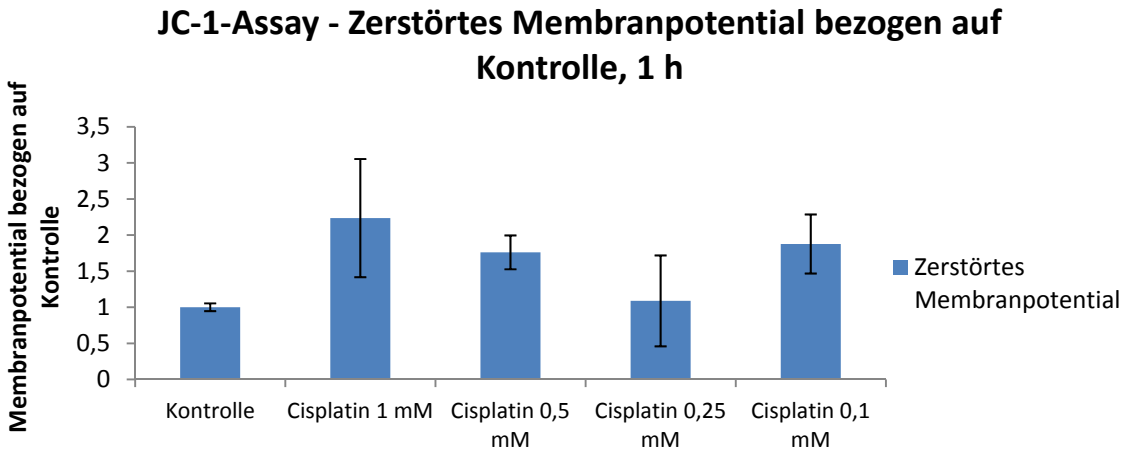


Abbildung 46: JC-1-Assay: Auswirkungen von verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen auf das Membranpotential nach einstündiger Inkubation, Darstellung nur des zerstörten Membranpotentials.

Im nächsten Schritt wurde die Inkubation für 2,5 Stunden durchgeführt, ansonsten blieben die oben genannten Bedingungen unverändert. Abbildungen 47 und 48 zeigen die entsprechenden Ergebnisse, im zweiten Fall wiederum auf die Kontrolle bezogen.

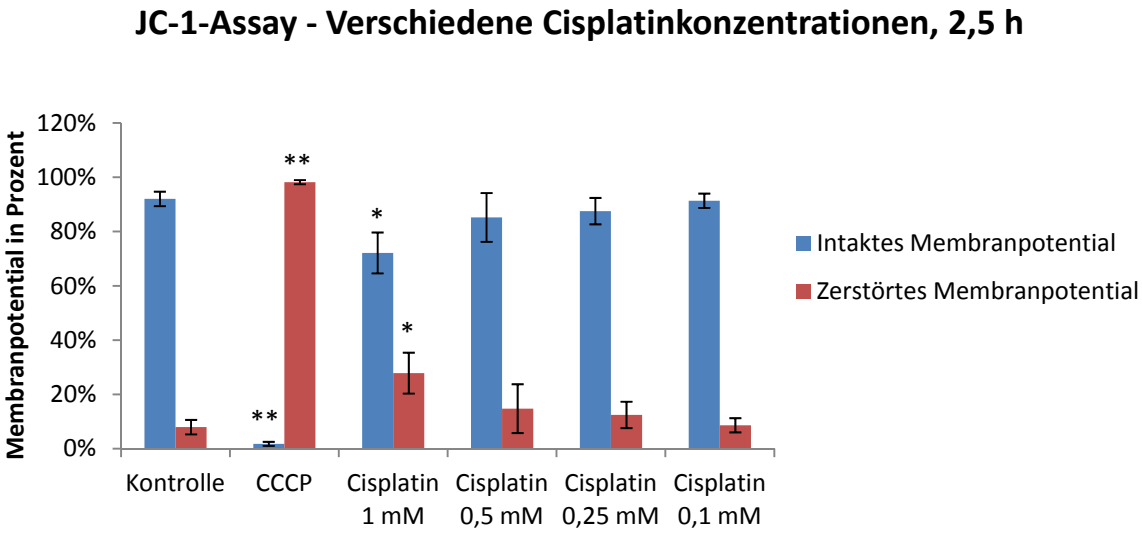


Abbildung 47: JC-1-Assay: Auswirkungen von verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen auf das Membranpotential nach 2,5-stündiger Inkubation. CCCP als Positikontrolle. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

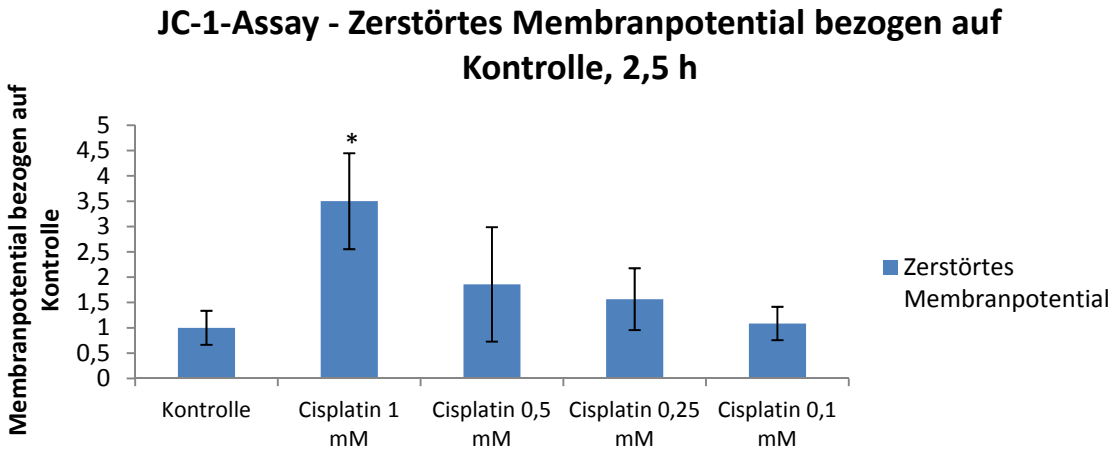


Abbildung 48: JC-1-Assay: Auswirkungen von verschiedenen Cisplatin-Konzentrationen auf das Membranpotential nach 2,5-stündiger Inkubation, Darstellung nur des zerstörten Membranpotentials. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

Hier zeigte sich nun eine signifikante Erhöhung des zerstörten Membranpotentials durch die Cisplatin-Inkubation, so dass diese Testbedingungen (Cisplatin-Konzentration 1 mM für 2,5 Stunden) für die weiteren Untersuchungen beibehalten wurden.

Um herauszuarbeiten, ob sich der Effekt von Cisplatin auf das mitochondriale Potential durch die gleichzeitige Inkubation mit verschiedenen Testsubstanzen abmildern oder sogar aufheben lassen könnte, wurden nun weitere Experimente durchgeführt, deren Ergebnisse in Abbildung 49 zu sehen sind. Wie bereits oben beschrieben, erfolgte ausschließlich die Darstellung des zerstörten Membranpotentials relativ zur Kontrolle, um insgesamt die Anschaulichkeit zu erhöhen.

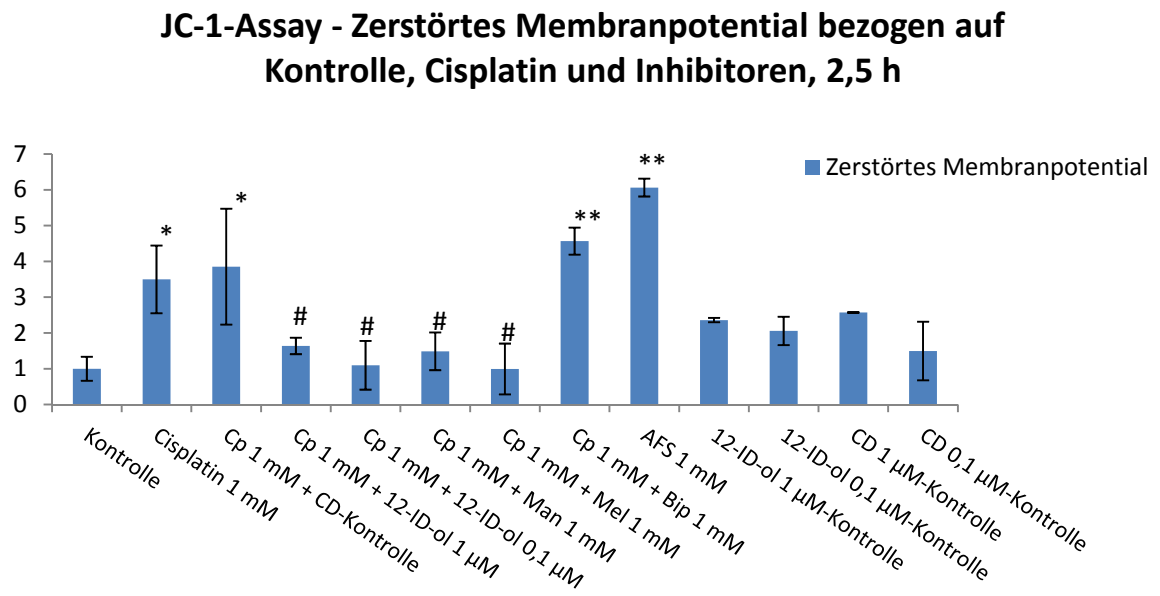


Abbildung 49: JC-1-Assay: Auswirkungen verschiedener Koinkubationen der Experimentalsubstanzen mit Cisplatin 1 mM auf das Membranpotential nach 2,5-stündiger Inkubation, Darstellung nur des zerstörten Membranpotentials. ** bzw * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle, # bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. Cp: Cisplatin, 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, Man: Mannitol, Mel: Melatonin, AFS: Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

Zusammenfassend ließen sich folgende Beobachtungen machen: Wie bereits beschrieben, führte die Inkubation von Cisplatin 1 mM über 2,5 Stunden zu einem signifikanten Anstieg des zerstörten Mitochondrienpotentials. Die Koinkubation mit der Vehikelkontrolle CD zeigte keinen Effekt. Durch die Verwendung des Inhibitors 12-ID-ol ließ sich jedoch eine signifikante Aufhebung des Cisplatin-Effekts erzielen und zwar in Konzentrationen von 1 und 0,1 µM. Diese Wirkung konnte auch bei der Verwendung der ROS-*Scavenger* Mannitol (Man) und Melatonin (Mel) beobachtet werden (jeweils in einer Konzentration von 1 mM). Das 2,2‘-Bipyridin (Bip), welches sich durch seine Fähigkeit auszeichnet, Eisen in seiner zweiwertigen Form zu komplexieren, zeigte keine positiven Effekte auf den Erhalt des Membranpotentials. Weitere Untersuchungen zu dieser Substanz werden weiter unten beschrieben. Die Inkubation der LLC-Pk_1-Zellen mit dem Eisendonator Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat (AFS) resultierte wiederum in einem signifikanten Anstieg des Anteils an zerstörtem Membranpotential. Die zur Kontrolle durchgeführten Inkubationen des Inhibitors bzw. des Vehikels CD, jeweils in verschiedenen Konzentrationen, zeigten schließlich keinem signifikanten Effekt gegenüber den unbehandelten Zellen.

Um herauszuarbeiten, inwiefern die Testsubstanz 2,2‘-Bipyridin intrinsische Effekte auf das mitochondriale Membranpotential besitzt, wurden Messungen mit verschiedenen Konzentrationen der Substanz alleine bzw. in Kombination mit Cisplatin (1 mM) durchgeführt, über deren Ergebnisse Abbildung 50 Aufschluss gibt.

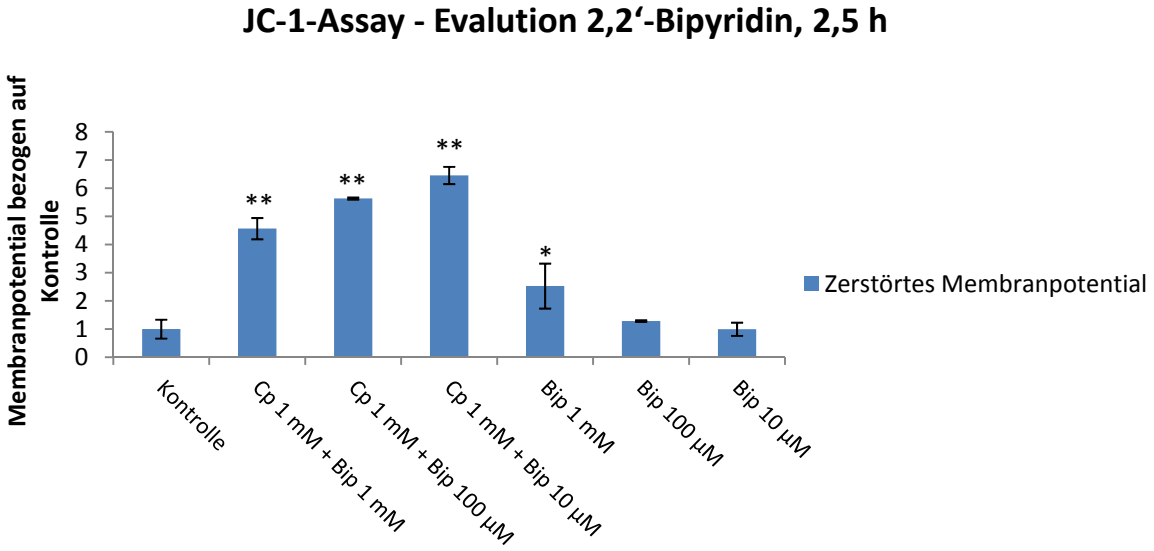


Abbildung 50: JC-1-Assay: Evaluation der Testsubstanz 2,2'-Bipyridin, 2,5-stündige Inkubation, Darstellung nur des zerstörten Membranpotentials. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. Cp: Cisplatin, Bip: 2,2‘-Bipyridin.

Dabei lässt sich beobachten, dass die Inkubation mit Bip alleine in ansteigenden Konzentrationen zu einem größeren Anteil an zerstörtem Membranpotential führte. In Kombination mit Cisplatin hingegen führte eine Erhöhung der Bip-Konzentration zu einem schwächeren Effekt. Interessanterweise waren die beobachteten Auswirkungen der Koinkubationen von Bip und Cisplatin durchweg größer, als der jeweiligen Einzelsubstanzen (siehe oben). Dies wiederum lässt einen komplexen Wirkmechanismus, eventuell auch auf Ebene der Testsubstanzen des JC-1-Assays, vermuten.

3.4.3. Messung von intrazellulärem Eisen mit Phen Green SK

Nachdem sich durch die Verwendung des Bleomycin-Assays keine brauchbaren Aussagen bezüglich der Rolle freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität treffen ließen, sollte mit dem Phen Green-Assay ein neuartiges Nachweissystem für freies intrazelluläres Eisen in die Durchflusszytometrie eingeführt werden. Im Idealfall wäre es hierbei möglich, das freie Eisen auf Ebene der einzelnen Zelle zu messen. Das im Abschnitt **2.2.6.4.** beschriebene Protokoll stellte dabei die am besten funktionierende Version dar; die im Folgenden ausgeführten Ergebnisse und Überlegungen beziehen sich darauf.

Abbildung 51 zeigt die Auswertung einer repräsentativen Kontrollprobe, jeweils vor (51-a./b.) und nach (51-c./d.) dem Zugeben des 2,2‘-Bipyridins, welches dem Phen Green das gebundene Eisen entziehen und damit die Fluoreszenz dieser Substanz wieder erhöhen sollte.

Man erkennt in Abbildung 51-b., dass sich nach der Inkubation des Phen Green diskrete *Peaks* messen ließen. Unter der Annahme, dass die Substanz in zwei idealtypischen Zuständen vorkommt, also als Komplex und als „freies“ Phen Green, wurde davon ausgegangen, dass der rechte *Peak* der Menge an überschüssigem („freiem“) Phen Green in den Zellen entsprach. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass nach der Zugabe des zweiten Chelators 2,2‘-Bipyridin eine Verschiebung der Fluoreszenz in Richtung höhere Werte stattgefunden hatte; dieser *Shift* zugunsten des freien Phen Green sollte wiederum der Menge an zuvor komplexierten Eisen entsprechen [43, 45, 73, 134, 137, 152, 161]. Da es sich um eine Kontrollprobe handelte, fiel die Menge des „frei“ gewordenen Phen Green allerdings gering aus.

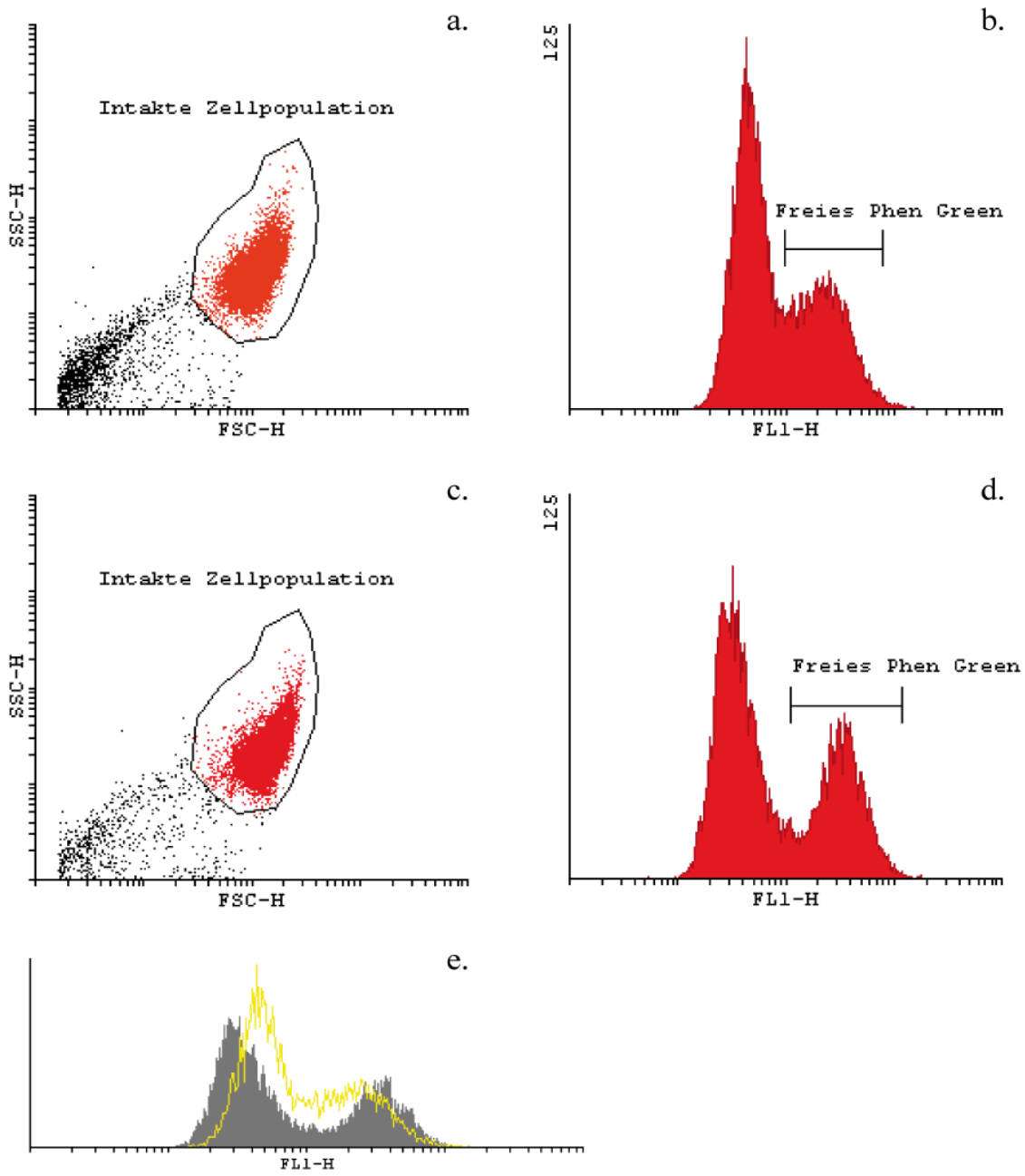


Abbildung 51: Phen Green-Assay: Auswertung einer Kontrollprobe. **a.** und **c.:** Darstellung und *gating* der intakten Zellpopulation, **b.** und **d.:** Verteilung der Fluoreszenzintensitäten jeweils vor (**a.** und **b.**) und nach (**c.** und **d.**) der Zugabe des 2,2‘-Bipyridin. **e.:** Überlagerte Darstellung der Messungen aus **b.** (gelb) und **d.** (grau). SSC-H, FSC-H, FL1-H in logarithmischer Darstellung.

Im nächsten Schritt wurden daher Proben vor dem eigentlichen Versuch mit dem Eisendonator AFS inkubiert. Abbildung 52 zeigt die Analyse einer repräsentativen Probe, wobei nur die entsprechenden Histogramme (vor 52-a. und nach 52-b. der Zugabe des 2,2‘-Bipyridins) dargestellt werden.

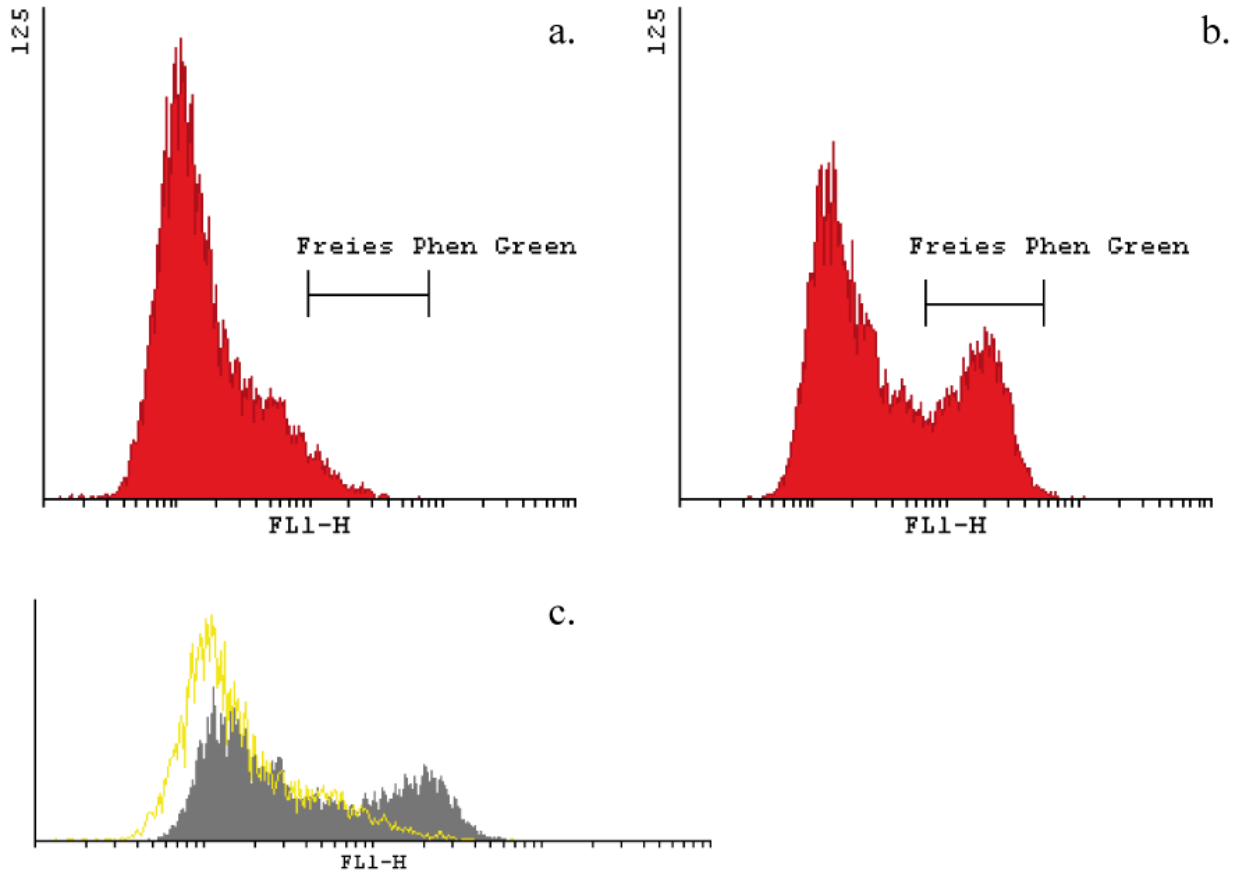


Abbildung 52: Phen Green-Assay: Auswertung der Positivkontrolle AFS 100 µM. Verteilung der Fluoreszenzintensitäten vor (**a.**) und nach (**b.**) der Zugabe des 2,2‘-Bipyridins. **c.:** Überlagerte Darstellung der Messungen aus **a.** (gelb) und **b.** (grau). FL1-H in logarithmischer Darstellung.

Vor der Inkubation des 2,2‘-Bipyridins lag nun die Verteilung der Fluoreszenz ganz auf der Seite des als Komplex vorkommenden Phen Greens (Abbildung 52-a). Nach dessen Zugabe bildete sich wiederum ein zweiter *Peak* aus, der dem „frei“ gewordenen Phen Green entsprach. Wie zu erwarten, konnte hier eine wesentlich größere Änderung des Fluoreszenzsignals gegenüber der Kontrolle verzeichnet werden.

In Abbildung 53 ist nun die Menge des „frei“ gewordenen Phen Greens bei der Negativ- sowie Positivkontrolle in Prozent dargestellt. Es ergab sich dabei ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Kontrollgruppen.

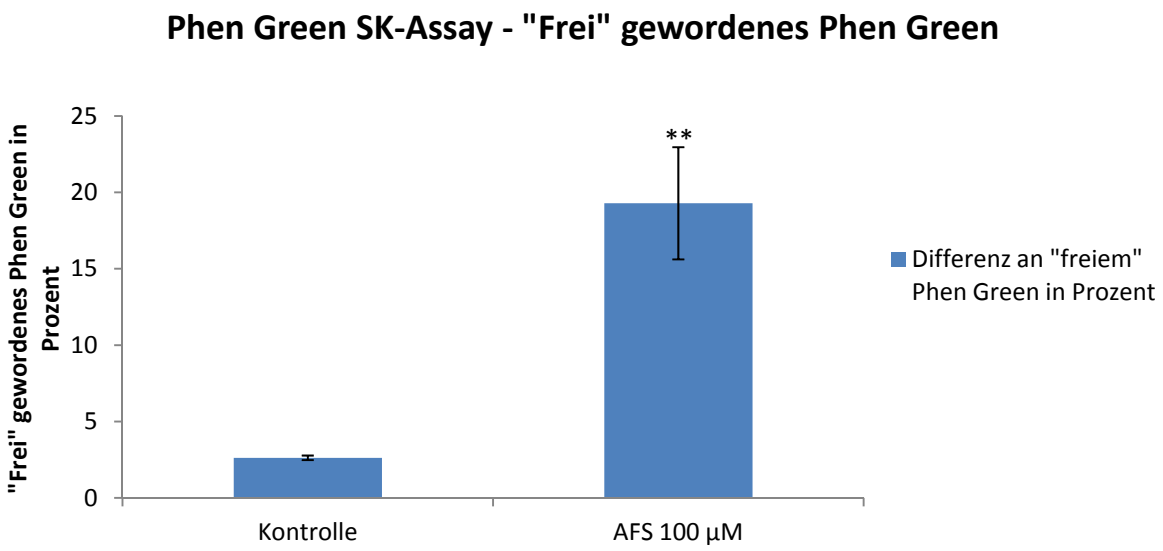


Abbildung 53: Phen Green-Assay: Gegenüberstellung der Menge des „frei“ gewordenen Phen Greens in der Negativ- sowie Positivkontrolle (AFS 100 µM). ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle. AFS: Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat.

Nun sollte untersucht werden, ob nach Inkubation der LLC-Pk_1-Zellen mit Cisplatin eine Änderung der Menge des „frei“ werdenden Phen Green gegenüber der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen werden könnte. Dabei zeigte sich allerdings, dass es bereits durch die alleinige Anwesenheit des Cisplatin zu einer Verschiebung der gemessenen Fluoreszenz in Richtung des freien Phen Greens kam, also noch vor der Zugabe des 2,2‘-Bipyridins (Abbildung 54).

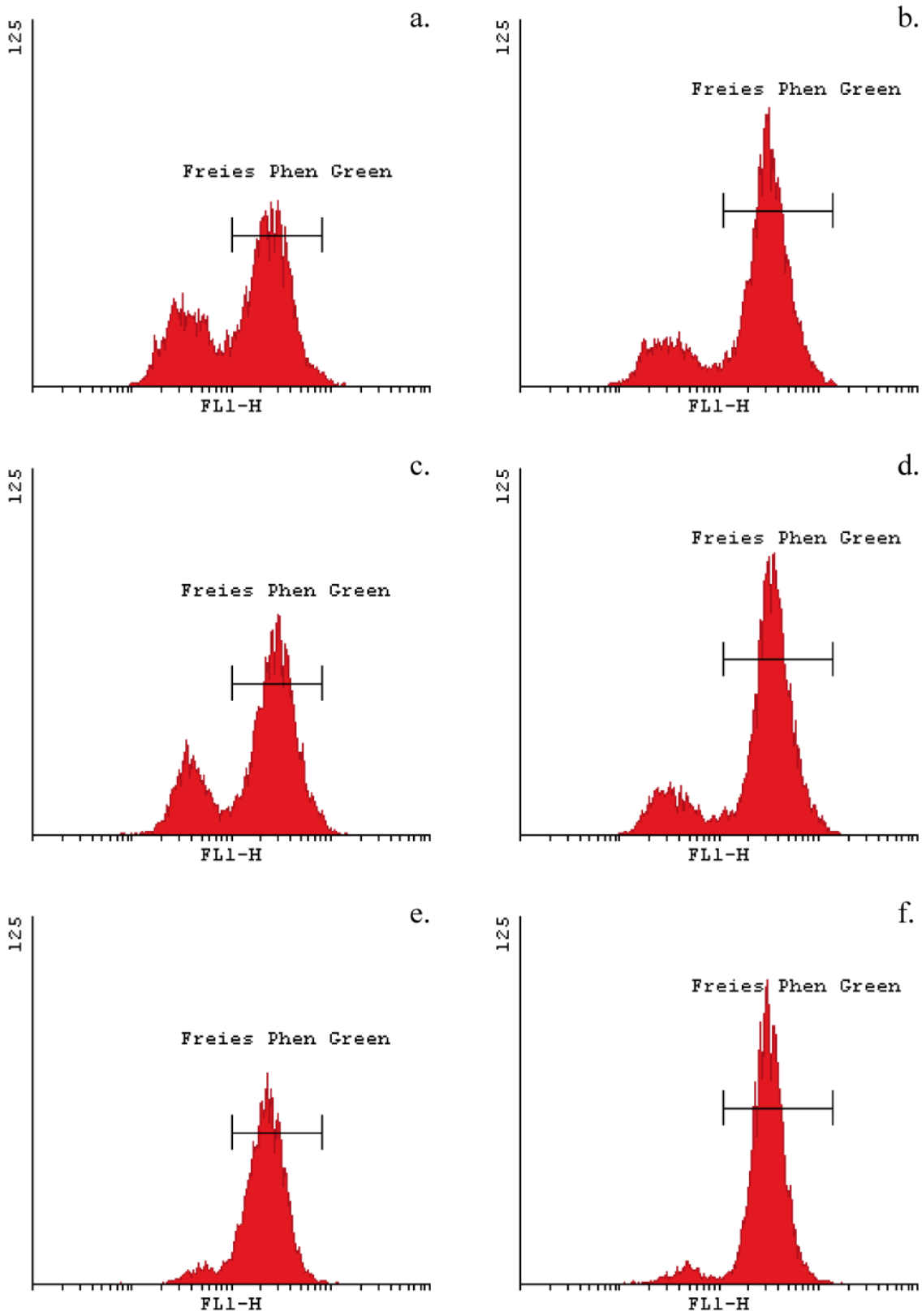


Abbildung 54: Phen Green-Assay: Verschiedene Cisplatin-Konzentrationen vor (**a., c., e.**) und nach (**b., d., f.**) der Zugabe des 2,2'-Bipyridins. **a.** und **b.:** Cisplatin 10 µM, **c.** und **d.:** Cisplatin 100 µM, **e.** und **f.:** Cisplatin 1000 µM. FL1-H in logarithmischer Darstellung.

Weiterhin konnte in dieser Hinsicht eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet werden: Je höher die eingesetzte Cisplatin-Konzentration, desto größer der Prozentsatz des „freien“ Phen Green vor der 2,2‘-Bipyridin-Inkubation (Abbildungen 54 und 55).

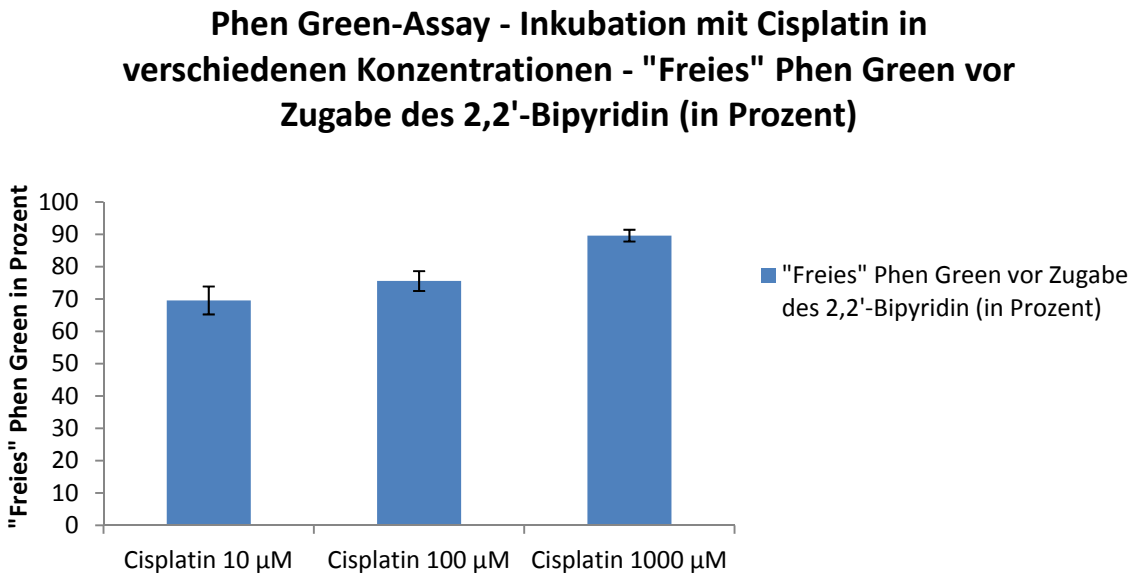


Abbildung 55: Phen Green-Assay: Anteil des „freien“ Phen Green vor der Zugabe des 2,2‘-Bipyridin in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration.

Daher ließ sich vermuten, dass eine direkte Interaktion des Cisplatins mit dem Phen Green auf molekularer Ebene stattfand, die möglicherweise in einer Stabilisierung des Phen Green in seiner „freien“ Form resultierte. Dadurch war eine Analyse der intrazellulären Auswirkungen des Cisplatins nach oben vorgestelltem Schema kaum möglich.

3.5. Tierversuche

3.5.1. Etablierung des Modells des Cisplatin-induzierten Nierenschadens

Wie in Kapitel **2.2.7.3.** beschrieben, sollte in einem Vorversuch analysiert werden, ob ein durch Cisplatin induzierter Nierenschaden anhand klinischer Parameter verfolgt werden könnte. Zusätzlich sollte durch dieses Vorgehen der optimale Zeitraum für eine solche

Schädigung herausgearbeitet werden. Wie ebenfalls erwähnt, wurden zu diesem Zweck Tiere in Gruppen zusammengefasst und anschließend deren Blut zu bestimmten Zeitpunkten nach Cisplatin-Injektion gewonnen.

Abbildung 56 gibt Aufschluss über den zeitlichen Verlauf des gemeinhin wichtigsten Parameters zur Beurteilung der Nierenfunktion, des Plasma-Kreatinins. In der Darstellung entspricht dabei jeder Meßpunkt dem Wert eines individuellen Tiers.

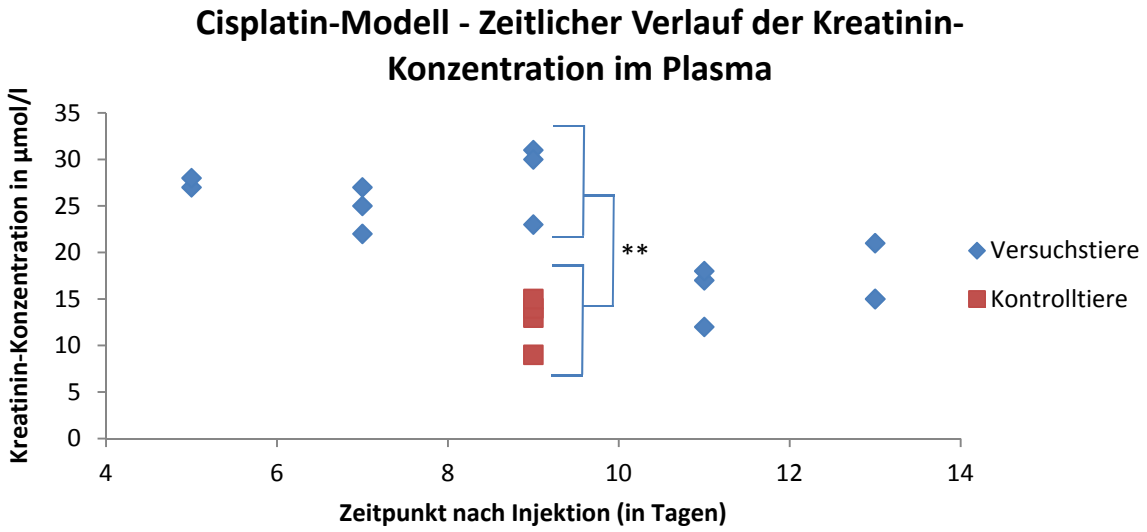


Abbildung 56: Cisplatin-Modell: Zeitlicher Verlauf der Plasma-Kreatinin-Konzentration. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

Man sieht, dass am Tag 9 nach Cisplatin-Injektion der Unterschied zwischen den Versuchs- und Kontrolltieren am deutlichsten zutage trat. Des Weiteren wurde ein weiterer Nierenparameter, der Plasma-Harnstoff, im Blut der Tiere untersucht (Abbildung 57).

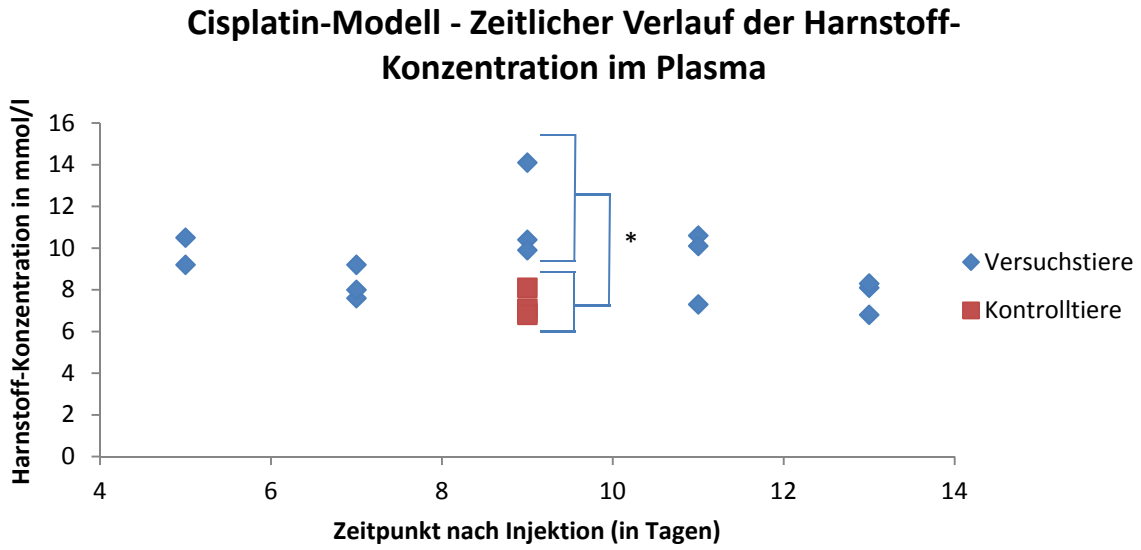


Abbildung 57: Cisplatin-Modell: Zeitlicher Verlauf der Plasma-Harnstoff-Konzentration. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle.

Hier zeigte sich ebenfalls der größte Unterschied zwischen der Experimental- und der Kontrollgruppe am 9. Tag, auch wenn nur ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ beobachtet werden konnte.

Gemäß der in Kapitel **2.2.7.2.** beschriebenen und erklärten Formel wurde außerdem die *Kreatinin-Clearance* als empfindlichstes Maß der Nierenfunktion für alle Tiere berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 wiedergegeben.

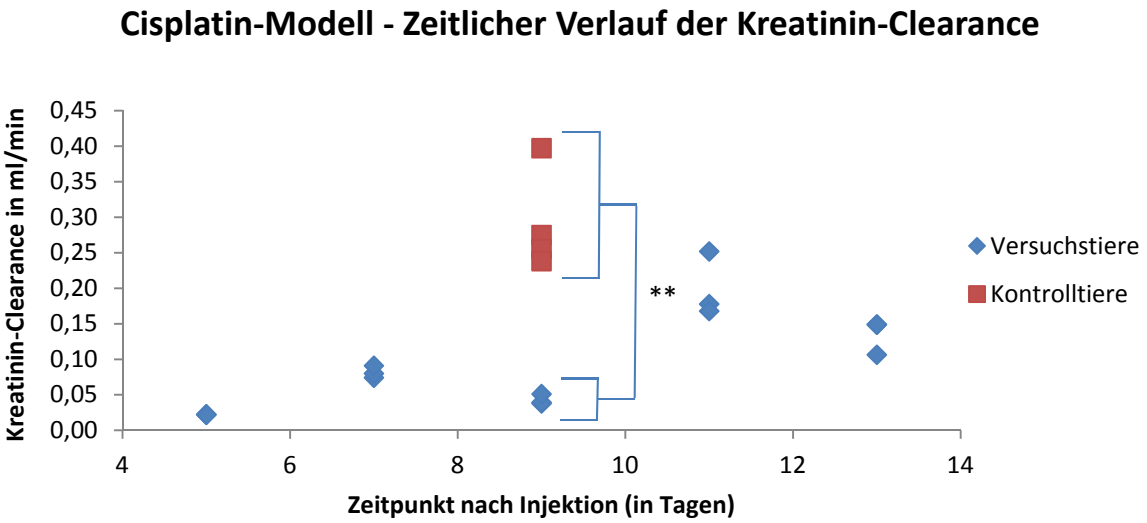


Abbildung 58: Cisplatin-Modell - Zeitlicher Verlauf der Kreatinin-Clearance. ** bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle.

In Einklang mit den oben gezeigten Ergebnissen war auch hier der deutlichste Unterschied zwischen Injektions- und Kontrollgruppe an Tag 9 zu beobachten. Damit konnte insgesamt nachgewiesen werden, dass das Ausmaß des Cisplatin-induzierten Nierenschadens auf funktioneller Ebene mittels klinisch-chemischer Parameter möglich war. Außerdem konnte der Zeitraum eingegrenzt werden, in dem der Schaden am deutlichsten Zutage trat. Im folgenden Tierversuch wurden dann, wie in Kapitel **2.2.7.2.** beschrieben, die Versuchstiere 9 Tage nach Injektion des Cisplatins getötet und das entsprechende Probenmaterial gewonnen.

3.5.2. Evaluierung der Testsubstanz 12-Imidazolyl-dodecanol

Nachdem das Modell des Cisplatin-induzierten Nierenschades etabliert war, folgte der eigentliche Tierversuch, in dem eine mögliche therapeutische Wirkung des 12-ID-ols herausgearbeitet werden sollte. Zusätzlich zu den Therapiegruppen, in denen 12-ID-ol in unterschiedlichen Konzentrationen appliziert wurde, wurden verschiedene Kontrollgruppen gebildet.

In der Absolutkontrolle bzw. in der Krankheitskontrolle erhielten die Tiere lediglich eine einzelne Injektion, entweder 500 µl PBS oder Cisplatin (12 mg/kg KG, ebenfalls in einem Volumen von 500 µl).

Kontrollgruppe eins erhielt statt der Experimental- die Trägersubstanz CD in einer der höchsten Therapiegruppe entsprechenden Konzentration. Den Tieren in der zweiten Kontrollgruppe wurde täglich das Lösungsmittel PBS in dem üblichen Injektionsvolumen von 500 µl verabreicht. Damit sollte die Volumenwirkung der zahlreichen Injektionen auf die Nierenfunktion kontrolliert werden. Die letzte Kontrollgruppe erhielt schließlich 12-ID-ol in der höchsten Konzentration, allerdings keine Cisplatin-Injektion. Sie diente zur Kontrolle der intrinsischen Nierenwirkung der Experimentalsubstanz.

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben, wurden aus dem gewonnenen Blut der Versuchstiere die Retentionsparameter Plasma-Kreatinin (Abildung 59) und

Plasma-Harnstoff (Abbildung 60) bestimmt. Zusätzlich wurde die *Kreatinin-Clearance* berechnet (Abbildung 61). In den folgenden Darstellungen entspricht wiederum jeder Meßpunkt den Werten eines individuellen Tieres.

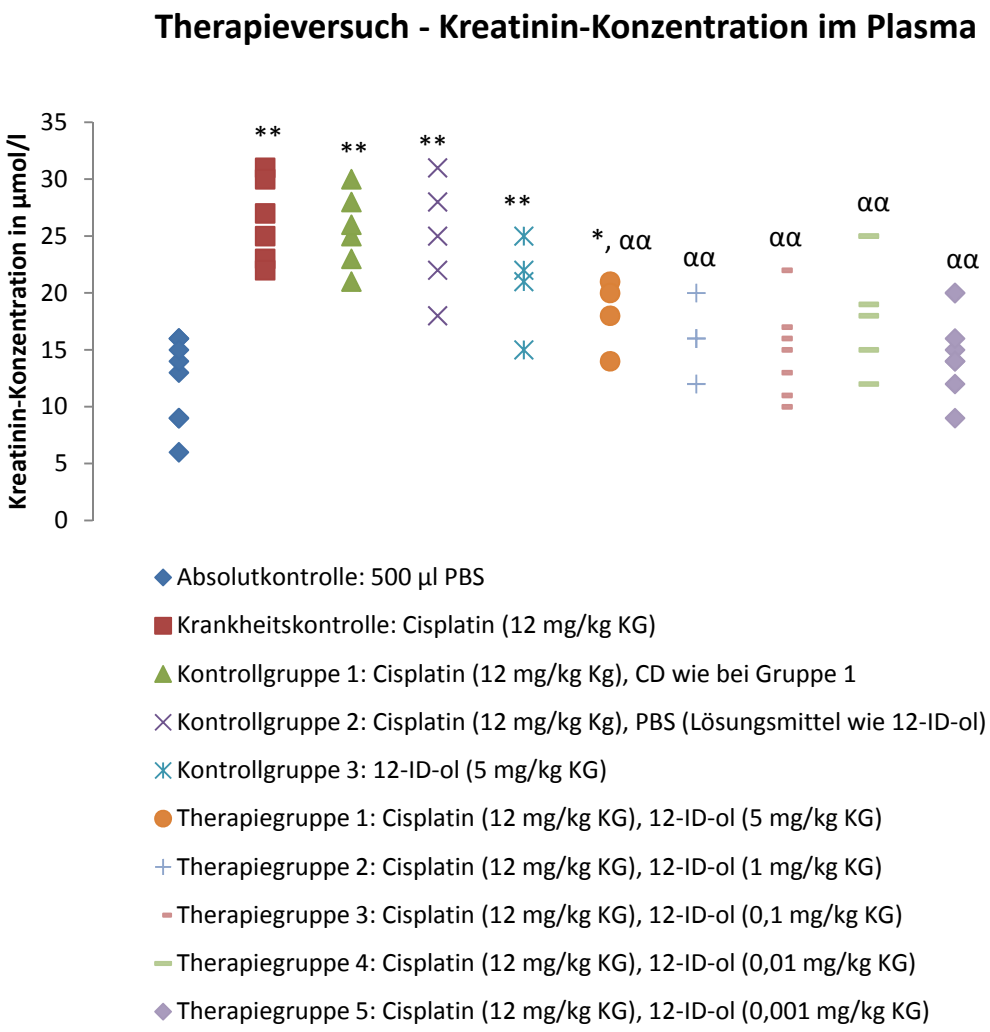


Abbildung 59: Therapieversuch: Kreatinin-Konzentration im Plasma. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle, ## bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, PBS: physiologische Kochsalzlösung, KG: Körpergewicht.

Wie bereits im Vorversuch herausgearbeitet, zeigten sich in der Krankheitskontrolle signifikant höhere Kreatinin-Werte als in der Absolutkontrolle. Des Weiteren war zu beobachten, dass auch die Lösungsmittel- beziehungsweise Volumenkontrollen ähnlich hohe Werte wie die „kranken“ Tiere aufwiesen. Durch die Applikation von 12-ID-ol ließ sich jedoch eine signifikante Minderung des Cisplatin-Effekts nachweisen, auch wenn die Ausganswerte der Absolutkontrolle nicht erreicht werden konnten. Außerdem zeigte sich, dass durch die Verabreichung von 12-ID-ol in einer vergleichsweise hohen Konzentration

(5 mg/kg KG) ein Anstieg des Plasma-Kreatinins zu verzeichnen war, was auf eine durchaus vorhandene intrinsische Wirkung der Experimentalsubstanz auf die Nierenfunktion schließen lässt.

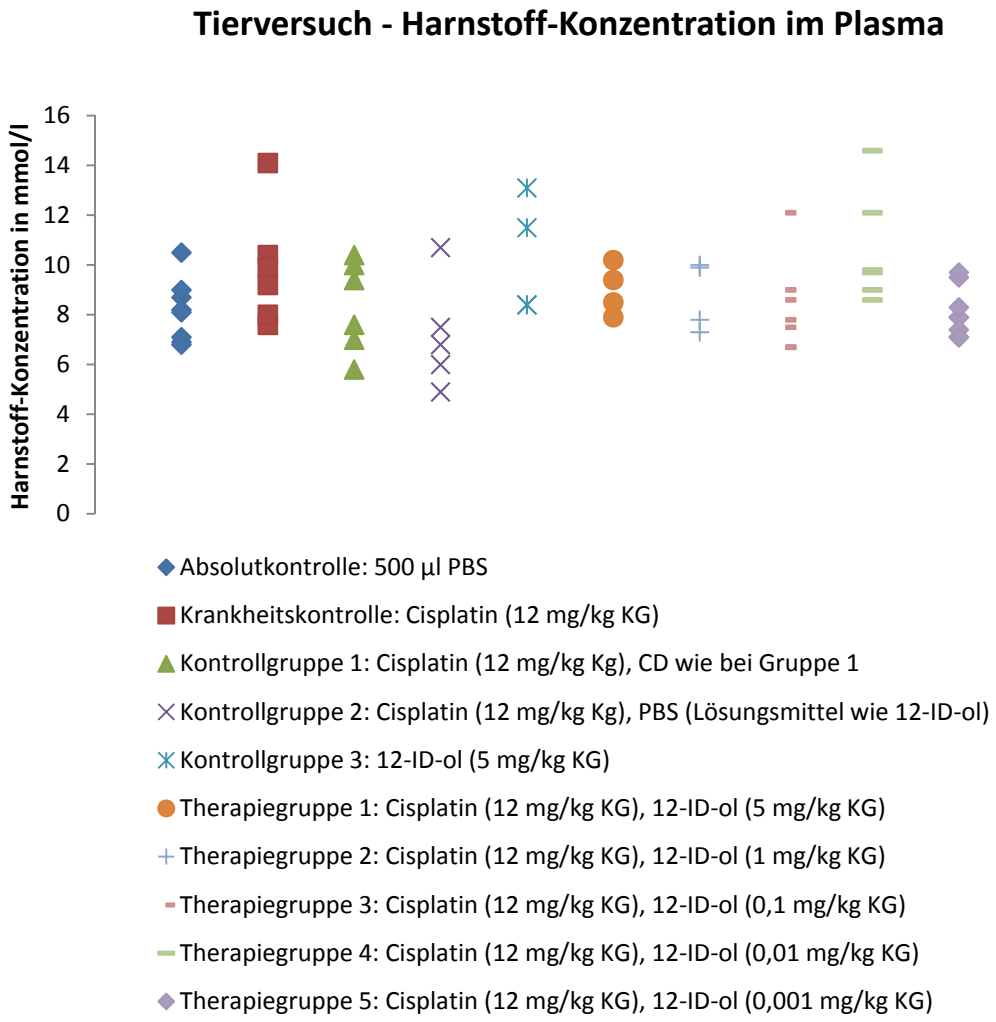


Abbildung 60: Tierversuch: Harnstoff-Konzentration im Plasma. 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, PBS: physiologische Kochsalzlösung. KG: Körpergewicht.

Bezüglich der Plasma-Harnstoff-Konzentration ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen herausarbeiten; auch der im Vorversuch nachweisbare Unterschied zwischen der Krankheits- und Absolutkontrolle zeigte sich im Hauptversuch nicht mehr. Somit scheint die Harnstoff-Konzentration ein zu unempfindlicher Marker der Nierenfunktion zu sein, um in diesem Zusammenhang verwertet werden zu können.

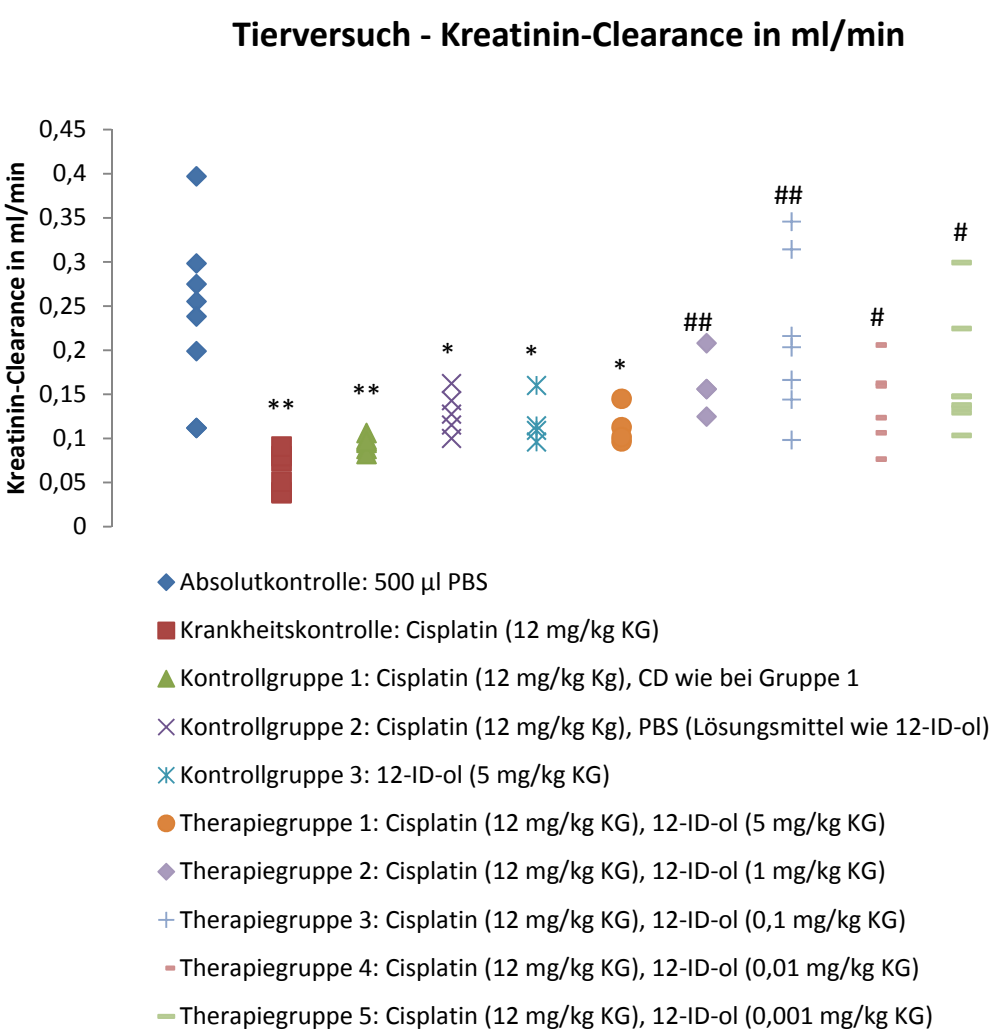


Abbildung 61: Tierversuch: Kreatinin-Clearance. ** bzw. * bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$) gegenüber der Kontrolle. ## bzw. # bedeutet Signifikanz ($p < 0,01$ bzw. 0,05) gegenüber der Cisplatin-Gruppe. 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, PBS: physiologische Kochsalzlösung, KG: Körpergewicht.

Da in die Berechnung der *Kreatinin-Clearance* die Plasma-Kreatinin-Konzentration eingeht, zeigte sich hier ein ähnliches, wenn auch reziprokes Bild zu Abbildung 59. Dabei waren in der Krankheitskontrolle wie auch in Kontrollgruppe 1 signifikant niedrigere Werte als in der Absolutkontrolle zu verzeichnen. Jedoch zeigte sich ein meßbarer – wenn auch nicht signifikanter – Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen und der Volumenkontrolle (Kontrollgruppe 2), die höhere *Clearance*-Werte aufwies. Als weiteres Indiz für eine intrinsisch vorhandene, nierenschädigende Wirkung des 12-ID-ols lagen die Werte der Kontrollgruppe 3 deutlich unter denen der entsprechenden Absolutkontrolle. Des Weiteren bestätigte sich bei den Therapiegruppen der Trend aus der Messung des Plasma-Kreatinins: Hier konnte vor allem in der Therapiegruppe 3 eine hoch signifikante Abmilderung des Cisplatin-Effekts beobachtet werden.

3.6. Histologische Untersuchungen der Organproben

3.6.1. Lichtmikroskopische Untersuchungen (HE)

Die Beurteilung der aus den Tierversuchen stammenden Organe erfolgte durch die Nephropathologische Abteilung des Pathologischen Instituts der Uniklinik Erlangen.

Darüber hinaus wurde der Therapieversuch zweimal unabhängig voreinander durchgeführt (siehe auch Kapitel **2.2.7.4.)**. Es muss davon ausgegangen werden, dass die Fixierung der Organe im ersten Versuchsdurchlauf unzureichend war: Diese Nieren wiesen insgesamt eine schlechte Beurteilungsqualität auf, so dass keine Unterschiede zwischen den Versuchstieren herausgearbeitet werden konnten. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Fixierungsprotokoll für den zweiten Durchlauf überarbeitet und angepasst, was die adäquate Beurteilung dieser Organe durch die Erlanger Spezialistin Frau Professor Dr. Kerstin Amann möglich machte.

Die semiquantitative Auswertung der Nieren aus dem zweiten Versuchsteil gibt Tabelle 1 wieder (vgl. Kapitel **2.2.8.2.**).

Tabelle 1: Tierversuch: Semiquantitative histopathologische Beurteilung der Nierenpräparate aus dem zweiten Versuchsdurchlauf. + bedeutet vorhanden, - bedeutet nicht vorhanden. 12-ID-ol: 12-Imidazolyldodecanol, CD: Cyclodextrin, PBS: physiologische Kochsalzlösung, KG: Körpergewicht.

	Vakuolen	vergrößerte Zellkerne
Absolutkontrolle: 500µl PBS	-	-
	-	-
	-	-
Krankheitskontrolle: Cisplatin (12mg/kg KG)	+	+
	+	+
	+	+
Kontrollgruppe 1: Cisplatin (12 mg/kg Kg), CD wie bei Gruppe 1	+	+
	+	+
	+	+
	+	+
Therapiegruppe 3: Cisplatin (12 mg/kg KG), 12-ID-ol (0,1 mg/kg KG)	+	-
	-	-
	+	-

Man sieht, dass die typischen pathologischen Veränderungen der Cisplatin-Nephropathie in der Krankheits- sowie in der Kontrollgruppe bei jedem Versuchstier zu beobachten

waren. In der Therapiegruppe ließen sich diese Veränderungen zwar ebenfalls nachweisen, allerdings traten sie in deutlich geringerem Ausmaß auf.

Bezüglich der entnommenen Herzen und Lebern ließen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchs- und Kontrolltieren nachweisen.

4. Diskussion

4.1. Interaktion von CYP2E1, Cisplatin und 12-Imidazolyldodecanol auf Proteinebene

Mikrosomenextrakte aus LLC-Pk_1-Zellen

Wie in Kapitel **3.1.1.1.** bereits ausgeführt, resultiert die Inkubation der verwendeten Nierenzellen mit Cisplatin in einer im Immunoblot nachweisbaren Abnahme der CYP2E1-Expression. Diese Beobachtung steht dabei im Einklang zu den in der Literatur beschriebenen Arbeiten [97, 98, 101]. Da es weiterhin zahlreiche Anhaltspunkte dafür gibt, dass die P450-abhängigen Cytochrome – insbesondere die Isoform 2E1 – durch die bei ihrer katalytischen Aktivität auftretenden Sauerstoffmetabolite inaktiviert und sogar zerstört werden können, wurde angenommen, dass Cisplatin die *mechanism based inactivation* (vergl. Kapitel **1.2.**) dieses Enzyms befördert und dadurch die Abnahme des CYP2E1-Gehaltes in den proximalen Tubuluszellen bedingt [57, 82, 98, 178].

Darüber hinaus wurde diese Annahme zusätzlich durch den Umstand gestützt, dass durch die Verwendung unspezifischer Cytochrom-Inhibitoren die durch Cisplatin-Exposition auftretende CYP2E1-Abnahme verhindert werden konnte [98]. In der vorliegenden Arbeit wiederum konnte diese Beobachtung bei der Koinkubation von Cisplatin mit dem spezifischen CYP-Inhibitor 12-ID-ol nicht nachvollzogen werden: Hier kam es zu einer vergleichbaren Abnahme des CYP2E1-Signals im Immunoblot, auch wenn es durchaus Anzeichen für eine Hemmung des Enzyms auf funktioneller Ebene gab (siehe unten) [42, 140].

Eine mögliche Erklärung für diese Tatsache wäre, dass die Bindung von 12-ID-ol an das Cytochrom einerseits das Enzym inaktivieren und es andererseits für den „geregelten“ intrazellulären Abbau prädestinieren könnte: Für einige CYP450 Isoformen ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass sie nach posttranslationaler Modifikation durch Substrate oder Inhibitoren dem vermehrten Abbau über – unter anderem – das Ubiquitin-abhängige proteasomale System zugeführt werden [33]. Für die 2E1-Isoform besteht diesbezüglich noch keine klare Datenlage; es wurde beschrieben, dass für dieses Protein unterschiedliche Abbauwege zur Verfügung stehen und sowohl autophagisch-lysosomale als auch proteasomale Wege beschritten werden [33, 98]. Auch scheinen bestimmte Substrate den

Abbau zu fördern, während andere hingegen eher eine Substratstabilisierung bewirken. Jedenfalls gibt es Evidenz dafür, dass auch CYP2E1 nach einer Substrat-Modifikation einem gesteigerten Abbau unterliegen kann [33]. Für eine tiefergehende mechanistische Aufklärung wären hier allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Ein weiterer Erklärungsansatz für diese Beobachtung könnte sein, dass 12-ID-ol seine Effekte über andere oder zumindest zusätzliche Targets entfaltet als nur über das CYP2E1. Diesbezüglich wurden noch keine Untersuchungen durchgeführt, allerdings konnte eine Kooperation mit der Abteilung für Biotechnologie der Technischen Universität München initiiert werden. Gemeinsames Ziel ist es, die Wirkung von Cisplatin auf die proximalen Tubuluszellen auf Proteomebene darzustellen, um im nächsten Schritt zusätzliche Angriffspunkte des Wirkstoffkandidaten 12-ID-ol identifizieren zu können [150]. Erste Ergebnisse dieser Bemühungen stehen zurzeit noch aus.

Hämoxygenase 1 (HO-1)

Die in den meisten Geweben vorkommende Hämoxygenase 1 katalysiert den Geschwindigkeits-limitierenden Schritt im Abbau von intrazellulär anfallendem Häm [27]. Häm und seine Vorläufer (δ-Aminolävulinsäure, Prophyrine) sind in der Lage, reaktive Sauerstoffspezies über Autooxidations- und photochemische Reaktionen zu produzieren und damit der Zelle erheblichen Schaden zuzufügen [147]. Durch die Fähigkeit, diese abzubauen, stellt die Hämoxygenase, insbesondere die induzierbare Isoform 1, eine wichtige Einheit in der zellulären Verteidigung gegen oxidativen Stress dar [89]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion der HO-1 nicht nur durch vermehrt anfallendes Häm, sondern auch in anderen Zuständen höherer ROS-Belastung stattfindet [88]. Daher wird der Hämoxygenase in der Literatur eine wichtige Rolle in der allgemeinen zellulären Antwort auf (ROS-) Stress zugesprochen; möglicherweise übt sie dabei ihre zytoprotektive Funktion unter anderem über die vermehrte Produktion der potenten Antioxidantien Biliverdin und Bilirubin aus [88, 89, 147].

Darüber hinaus wurde beschrieben, dass es im Rahmen der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität zu einer Induktion der Hämoxygenase 1 kommt: Dabei soll auf der einen Seite der erhöhte ROS-Stress, auf der anderen Seite die Zerstörung des Cytochroms mit konsekutiver Häm-Freisetzung für die entsprechende Induktion sorgen [51, 98]. In der vorliegenden Arbeit konnte nun keine HO-1-Induktion nach Inkubation der LLC-Pk_1-Zellen mit Cisplatin nachgewiesen werden (Kapitel **3.1.1.2.**). Es zeigte sich lediglich, dass durch die Koinkubation von Cisplatin mit dem Inhibitor 12-ID-ol eine Abnahme des

entsprechenden Signals zu verzeichnen war. Es muss wiederum daraufhin hingewiesen werden, dass die HO-1-Immunoblots allesamt eine unbefriedigende Qualität aufwiesen, was am ehesten dem verwendeten HO-1-Antikörper geschuldet war. Auch ein zweiter Antikörper erbrachte hier keine klareren Ergebnisse. Dennoch könnte – auch bei insgesamt nur eingeschränkt aussagekräftigen Resultaten – die Abnahme des HO-1-Signals durch 12-ID-ol-Inkubation auf einen gewissen präventiven Effekt des Inhibitors auf das Auftreten von ROS-Stress sprechen.

Immunoblots aus Nierenextrakten

Bezüglich des CYP2E1-Gehaltes konnte dabei kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Möglicherweise spielte diesbezüglich der Zeitpunkt der Organentnahme eine entscheidende Rolle: Im gewählten Ansatz wurde das Ausmaß der Nierenschädigung durch Cisplatin anhand klinisch-chemischer Parameter kontrolliert (siehe Kapitel **2.2.7.3.**). Diese geben zwar Aufschluss über die funktionelle Beeinträchtigung der Nierenfunktion, können den morphologisch-strukturellen Organveränderungen aber zum Teil deutlich nachhängen [5, 157]. Des Weiteren konnte in der Zellkultur gezeigt werden, dass ein CYP2E1-Verlust bereits nach kurzer Exposition gegenüber Cisplatin stattgefunden hat (siehe oben). Neben dieser Tatsache macht auch die besonders kurze Halbwertszeit des CYP2E1 den Nachweis transienter Veränderungen der Protein-Konzentration im lebenden Modell sehr schwierig [178]. Zusammenfassend könnte also eine Rekonstitution auf Organebene bereits stattgefunden haben, während die Retentionsparameter im Blut der Versuchstiere noch erhöht waren.

Die Expression von HO-1 hingegen schien in den Gruppen mit Cisplatin-Exposition größer zu sein als bei den entsprechenden Tieren der Kontrolle, denen lediglich das Lösungsmittel verabreicht wurde. Dabei scheint eine unter solchen Bedingungen stattfindende HO-1-Induktion zeitlich einigermaßen stabil zu sein, so dass entsprechende Veränderungen auf Proteinebene bereits erfolgreich in Tierversuchen nachgewiesen werden konnten [51, 52]. Entgegen der Ergebnisse aus den *in vitro*-Experimenten ließ sich eine präventive Wirkung der Testsubstanz 12-ID-ol auf die HO-1-Expression *in vivo* jedoch nicht nachvollziehen. Es sei wiederum darauf hingewiesen, dass die unzureichende Qualität der verfügbaren Antikörper eine abschließende Beurteilung allerdings kaum zulässt.

Zusammenfassende Beurteilung

Die Inkubation von LLC-Pk_1-Zellen mit Cisplatin führt zu einem nachweisbaren Verlust des CYP2E1-Proteins. Auch bei Verwendung des CYP2E1-Inhibitors 12-ID-ol tritt diese

Veränderung ein, obwohl eine Abschwächung der zellschädigenden Wirkung von Cisplatin nachgewiesen werden kann (siehe unten). Auswirkungen auf die Expression der Hämoxygenase 1 können aufgrund der unzureichenden Antikörperqualität nicht sicher beurteilt werden.

4.2. Viabilität, Zytotoxizität und Apoptose durch Cisplatin

Viabilitätsmessung mit CellTiter-Blue

Die Koinkubation von Cisplatin mit dem CYP2E1-Inhibitor 12-ID-ol führt zu einer partiellen Abschwächung der Cisplatin-Wirkung, wobei hier keine vollständige Angleichung an die Kontrolle erreicht werden kann. Allerdings lässt sich dieser Effekt auch dann beobachten, wenn statt des 12-ID-ol eine Koinkubation mit dem Trägerstoff Cyclodextrin durchgeführt wird. Aktuelle Arbeiten der Arbeitsgruppe lassen dabei eine noch nicht weiter spezifizierte, proproliferative Wirkung dieser Substanz in *in vitro*-Modellen vermuten, die möglicherweise eine Erklärung für dieses Phänomen bietet [17]. Damit lässt sich ein spezifischer Effekt des 12-ID-ol in diesem Ansatz nur begrenzt herausarbeiten, was eine Interpretation kaum möglich macht. Letztlich scheint eine direkte Interaktion von Cisplatin mit dem CYP2E1-Inhibitor bzw. Cyclodextrin auf Molekülebene aufgrund der großen Unterschiede in den eingesetzten Konzentrationen eher unwahrscheinlich.

Zytotoxizitätsmessung mit CytoTox-Glo

Hier zeigt sich eine partielle, aber dennoch signifikante Abschwächung des Cp-Effekts durch den CYP2E1-Inhibitor in einer Konzentration von 1 µM. In Zusammenschau mit den weiter unten diskutierten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass der Inhibitor in bestimmte Mechanismen eingreift, mit denen Cisplatin eine Schädigung der Nierentubuluszellen bewirkt, so dass daher keine vollständige Aufhebung der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität zu erreichen ist. [102]. Ein weiterer Anhaltspunkt für eine spezifische Wirkung von 12-ID-ol ist darüber hinaus der Umstand, dass der Inhibitor in einer niedrigeren Konzentration nicht mehr in der Lage ist, den schädigenden Cisplatin-

Effekt abzumildern [68]. Von einer Steigerung der 12-ID-ol-Konzentration wurde allerdings abgesehen, da in entsprechenden Studien der Arbeitsgruppe eine direkte zellschädigende Wirkung der Testsubstanz in höheren Konzentrationen beobachtet wurde [17]. Dementsprechend muss bei dem CYP2E1-Inhibitor von einer vergleichsweise hohen Potenz bei gleichzeitig kleiner „therapeutischer" Breite ausgegangen werden.

Schließlich bleibt zu erwähnen, dass – im Gegensatz zu den CellTiter-Blue-Studien – eine Koinkubation von Cisplatin mit dem Löslichkeitsvermittler Cyclodextrin zu keiner Reduktion des Zelltodes im Vergleich zu einer alleinigen Cisplatin-Inkubation führte, was wiederum für eine spezifische Wirkung des CYP2E1-Inhibitors im Modell des Cisplatin-induzierten Nierenschadens spricht.

Messung der Caspasenaktivierung mit Caspase-Glo 3/7

Da man mit dem CytoTox-Glo-Assay nicht zwischen den verschiedenen möglichen Mechanismen des Zelluntergangs unterscheiden kann, sollte in einem weiteren Testsystem untersucht werden, inwiefern Cisplatin seine schädigende Wirkung auf die Nierentubuluszellen über Apoptose bzw. Nekrose entfaltet [119]. Hierfür wurde der Caspase-Glo 3/7-Assay eingesetzt, mit dem man die Aktivität der Effektor-Proteasen des programmierten Zelltodes über ein spezielles, luminometrisch nachweisbares Testsubstrat messen kann (vlg. Kapitel **2.2.4.3.**) [85, 158].

In der Literatur wurden Schädigungsmechanismen durch Cisplatin beschrieben, die sowohl zum apoptotischen als auch zum nekrotischen Zelluntergang führen können (vlg. Kapitel **1.4.**) [102, 138]. Die oben ausgeführten Beobachtungen lassen vermuten, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration überwiegend einer der beiden möglichen Mechanismen beschritten wird, wobei höhere Konzentrationen eher zur Nekrose, niedrigere Konzentrationen dementsprechend eher zur Apoptose führen. Darüber hinaus konnte in der Literatur nachgewiesen werden, das der vorwiegend gewählte Weg des Zelltodes vom Redox-Gleichgewicht der betroffenen Zellen abhängt; dabei wird bei verstärktem oxidativem Stress eher die Nekrose begünstigt [164, 165]. Es wird argumentiert, dass es bei hoher ROS-Belastung zur irreversiblen Oxidation von Cystein-Resten intrazellulärer Proteine kommen kann, was wiederum eine Inaktivierung der Caspasen zur Folge haben könnte [102, 164]. Schließlich wurde in einem anderen Modell der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität bereits gezeigt, dass es bei steigender Cisplatin-Konzentration zur Inhibierung der Caspasen-Aktivierung kommt, was letztlich auch in der

vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte und im Einklang zu den oben ausgeführten Überlegungen steht [102, 151].

Da eine 12-ID-ol-Inkubation aber durchaus in der Lage ist, den Cisplatin-vermittelten Zelltod zu mildern (siehe oben), kann man vermuten, dass die positive Wirkung der CYP2E1-Inhibition vor allem durch die Verhinderung des nekrotischen Zelluntergangs zustande kommt. Diese Hypothese wird durch andere Untersuchungen zu diesem Thema unterstützt [98].

Zusammenfasssende Beurteilung

In Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration führte die Inkubation von Nierentubuluszellen mit Cisplatin entweder zur Aktivierung oder zur Inaktivierung der Endstrecke des apoptotischen Zelltodes. In jedem Fall lässt sich nach einiger Zeit ein Anstieg des Anteils toter Zellen innerhalb der exponierten Population, beziehungsweise eine entsprechende Reduktion der Zellviabilität beobachten. Der CYP2E1-Inhibitor 12-ID-ol ist in der Lage, den schädigenden Effekt von Cisplatin abzumildern. Dabei scheint er vor allem in jene Mechanismen einzugreifen, über die eine Cisplatin-Exposition den Zelluntergang durch Nekrose bewirkt.

4.3. Ursache und Wirkung des reaktiven Sauerstoffstresses durch Cisplatin

Messung von intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Wie bereits ausgeführt, existieren zahlreiche Arbeiten, die die besondere Bedeutung des vermehrt auftretenden Sauerstoffstress in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität betonen [7, 8, 9, 102, 125]. Zur genaueren Untersuchung des Ausmaßes und der zeitlichen Entwicklung der ROS-Produktion wurde daher ein durchflusszytometrisches Verfahren angewandt, dass auf der Oxidation der Nachweisreagenz Dichlorofluorescin-diacetat (DCFH-DA) beruht (vgl. Kapitel **2.2.6.2.**) [63, 93]. Dabei ist anzumerken, dass die Chemikalie als unspezifischer Indikator von erhöhtem ROS-Stress angesehen werden

muss; ein differenzierter Nachweis bestimmter reaktiver Sauerstoffspezies ist also mir ihr nicht direkt möglich [74].

Es konnte herausgearbeitet werden, dass der CYP2E1-Inhibitor 12-ID-ol in hoher Konzentration zu einer gesteigerten ROS-Konzentration in den verwendeten Zellen führt. Möglicherweise ist diese Induktion von Sauerstoffstress auf die chemischen Eigenschaften des Inhibitors zurückzuführen, der aufgrund seiner sowohl lipophilen als auch hydrophilen Anteile in höheren Konzentrationen als Seife wirken könnte, die unspezifisch zur Solubilisierung von Membranen führt (siehe auch Kapitel **1.3.**) [67]. Dadurch könnte es zur Beeinträchtigung der Integrität auch der mitochondrialen Membranen mit Entkopplung der Atmungskette und nachfolgend vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kommen [118]. Diese Annahme wird durch weiter unten beschriebene Experimente unterstützt; im JC-1-Assay, der die Integrität des mitochondrialen Membranpotentials misst, konnte durch die Applikation hoher 12-ID-ol-Konzentrationen eine rasche mitochondriale Depolarisation festgestellt werden.

Darüber hinaus konnte auch bei der Trägersubstanz Cyclodextrin ein Effekt auf die ROS-Produktion der inkubierten Zellen beobachtet werden: Hier zeigt sich bei Verwendung höherer CD-Konzentrationen eine Abnahme der gemessenen ROS-Belastung. Auch dieses Phänomen könnte durch die chemischen Eigenschaften des Poly-Zuckers erklärt werden. Durch die zahlreichen Hydroxylgruppen könnte dieser, ähnlich wie das weit verbreitete Mannitol, als unspezifischer ROS-*Scavenger* wirken.

Schließlich wurde Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen mit den Experimentalsubstanzen koinkubiert und anschließend die resultierende ROS-Produktion in den LLC-Pk_1-Zellen gemessen. Hier zeigt sich, dass durch die Verwendung des 12-ID-ols in einer geeigneten Konzentration,der Cisplatin-vermittelte Sauerstoffstress im beobachteten Zeitraum völlig aufgehoben werden kann. Diese Beobachtung kann dabei nicht durch die oben beschriebene Eigenschaften des Cyclodextrins erklärt werden: Selbst CD in hohen Konzentrationen kann die Cisplatin-Wirkung nicht in gleicher Weise wie das 12-ID-ol abschwächen, auch wenn man einen gewissen Effekt nachweisen kann. Es sei nochmals erwähnt, dass Cisplatin in einer ein- bzw. zweitausendfach höheren Konzentration als das 12-ID-ol eingesetzt wurde; eine direkte Interaktion auf Molekülebene zwischen den beiden Substanzen ist damit als sehr unwahrscheinlich anzusehen. Diese Überlegung spricht hingegen für einen spezifischen Eingriff des 12-ID-ols in den Mechanismus, mit dem Cisplatin eine Steigerung der ROS-Produktion bewirkt.

Die beschriebenen Beobachtungen sollten nun durch Verwendung der anerkannten ROS-*Scavenger* Mannitol und Melatonin sowie des Eisenchelators 2,2‘-Bipyridin bestätigt werden. Allerdings konnte die Wirkung von Melatonin, einem potenten Hydroxyl-Radikal-Fänger, in dem verwendeten Testsystem nicht untersucht werden, da aufgrund einer direkten Interaktion des Melatonins mit dem Nachweisreagenz keine brauchbaren Ergebnisse zu produzieren waren (Ergebnisse nicht gezeigt) [66,140].

Die Beobachtung, dass Mannitol vor allem bei hohen Cisplatin-Konzentrationen – im Gegensatz zu 12-ID-ol – nicht in der Lage war, die durch Cp ausgelöste ROS-Belastung auf das Niveau der Kontrollzellen zu senken

stellt wiederum ein Indiz dafür dar, dass 12-ID-ol offensichtlich an einem fundamentalen Punkt innerhalb des Mechanismus der Cisplatin-vermittelten ROS-Produktion eingreift. Eine Erklärung für die Differenz der ROS-Konzentration gegenüber der Kontrolle bei Verwendung von Mannitol als *Scavenger* könnte seine vornehmliche Affinität für Wasserstoffperoxid sein: So könnte die Anwesenheit anderer Sauerstoffspezies, zum Beispiel des Hydroxyl-Radikals und des Superoxidanions, für dieses Differenz verantwortlich sein [160].

Des Weiteren wurde der Eisenchelator 2,2‘-Bipyridin eingesetzt. Dieser ist in der Lage, ionisiertes Eisen mit großer Affinität zu binden, weist allerdings keine Eigenschaften als ROS-*Scavenger* auf [73]. Auch mit ihm kann die Cisplatin-abhängige Induktion von Sauerstoffstress in den Nierentubuluszellen gemildert werden, wobei wiederum keine komplette Normalisierung auf Niveau der Kontrollzellen zu erzielen ist. Dennoch stellt dieses Ergebnis ein Argument für die aufgestellte These dar, dass durch Interaktion von Cisplatin mit Cytochromen eine Zerstörung derselben mit Freisetzung des gebundenen Häm-Eisens und vermehrter ROS-Produktion bewirkt wird [7, 8, 9, 102, 125].

Zu weiteren Untermauerung dieser These wurden LLC-Pk_1-Zellen schließlich mit verschiedenen Konzentrationen des Eisen-Donators Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat inkubiert und anschließend die so induzierte ROS-Konzentration gemessen. Hier zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung des reaktiven Sauerstoffstresses, die durch gleichzeitige Verwendung des oben genannten Eisenchelators komplett aufgehoben werden kann. Es sei hier nochmals auf die besondere Bedeutung der Anwesenheit von zweiwertigem Eisen in Zuständen vermehrten oxidativen Stresses

hingewiesen, die in der Vermittlung der *Fenton-Reaktion* mit Bildung hochtoxischer Hydroxyl-Radikale besteht [62, 168].

Messung des Mitochondrienpotentials mit dem JC-1-Assay

Neben den P450-abhängigen Monooxygenasen des Fremdstoff-metabolisierenden Systems müssen auch die Mitochondrien mit den hier lokalisierten Enzymen der Atmungskette als Produzenten des oxidativen Stresses in Betracht gezogen werden, der durch Exposition der Zellen gegenüber Cisplatin auftritt [29]. Daher sollte mit dem in Kapitel **2.2.6.3.** beschriebenen JC-1-Assay die Frage der Herkunft bzw. der Auswirkungen der reaktiven Sauerstoffspezies und deren zeitliche Entwicklung eingehender untersucht werden.

In Zusammenschau mit den oben beschriebenen Ergebnissen lässt sich schließen, dass der Zusammenbruch des Mitochondrienpotentials als Folge der gesteigerten Belastung der Zellen mit reaktiven Sauerstoffspezies nach Cisplatin-Inkubation auftritt [22]. Dies könnte wiederum selbst zu einer Induktion des oxidativen Stresses führen, ein Teufelskreis, der in der Literatur als *ROS-induced ROS release* (ROS-induzierte ROS-Freisetzung) beschrieben wurde [22].

Weiterhin scheint der Verlust der mitochodrialen Integrität ein wichtiges Ereignis auf dem Weg der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität zu sein: In Abhängigkeit der Cisplatin-Konzentration kann es dadurch zu einer fulminanten ROS-Belastung mit nekrotischem Zelluntergang, oder zur Aktivierung des mitochondrialen Weges der Apoptose mit Freisetzung entsprechender Signalproteine kommen [76, 90, 94, 95, 131,138,158,175].

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob die Cisplatin-vermittelte Depolarisation der Mitochondrienmembran durch die gleichzeitige Verwendung der verschiedenen Experimentalsubstanzen beeinflusst werden kann. Hier konnte wieder ein positiver Effekt des CYP2E1-Inhibitors 12-ID-ol nachgewiesen werden, bei dessen Koinkubation ein Erhalt des mitochondrialen Potentials, vergleichbar zu dem der Kontrolle, beobachtet werden kann. Darüber hinaus waren vergleichbar gute Ergebnisse mit den oben beschriebenen ROS-*Scavengern* Mannitol und Melatonin zu erzielen, nicht allerdings mit der Vehikelkontrolle Cyclodextrin. Dies unterstreicht wiederum die Annahme, dass die vermehrte Produktion toxischer Sauerstoffspezies zeitlich vor dem Verlust der Mitochondrienfunktion stattfinden muss.

Um außerdem ein weiteres Indiz für die Bedeutung des freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität herausarbeiten zu können, sollten die Auswirkungen einer

Koinkubation von Cisplatin mit dem ebenfalls oben beschriebenen Eisenchelator 2,2‘-Bipyridin auf das Mitochondrienpotential von LLC-Pk_1-Zellen untersucht werden. Hier musste jedoch ein direkter Effekt der Substanz auf das Testsystem festgestellt werden, weshalb eine Auswertung dieser Versuche nicht möglich war. Die Inkubation der Zellen mit Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat führte allerdings zum Verlust der mitochondrialen Integrität, wobei kaum zu beurteilen ist, inwiefern dieser Effekt durch vermehrte ROS-Produktion oder durch andere Interaktionen des Eisens zustande kommt.

Zusammenfassende Beurteilung

Cisplatin führt in den verwendeten LLC-Pk_1-Zellen zur erhöhten ROS-Belastung und anschließend zum Verlust der mitochondrialen Integrität. Dieser Vorgang ist durch Verwendung des CYP2E1-Inhibitors 12-ID-ol vollständig zu unterbinden. Weiterhin konnten indirekte Indizien für die These gesammelt werden, wonach Cisplatin zu einer gesteigerten Freisetzung ionisierten Eisens führt.

4.4. Die Rolle freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität

Pathophysiologische Bedeutung des freien Eisens

In der Literatur gibt es zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass es durch die Zerstörung Häm-haltiger Proteine zur Freisetzung des im Häm enthaltenden, zweiwertigen Eisens kommen kann [57, 61, 84, 99]. Dieses soll wiederum in der Lage sein, durch seine katalytischen Eigenschaften die Bildung hochreaktiver Sauerstoffspezies zu befördern und damit in entscheidendem Maße zur Zellschädigung beitragen [6, 62, 168]. Darüber hinaus wird eine bedeutende Rolle des freien Eisens auch in den Modellen des Cisplatin-induzierten Nierenschadens angenommen: Wie schon erwähnt soll es hier durch Interaktion von Cisplatin mit dem Cytochrom 2E1 zu dessen Zerstörung und nachfolgend zur Freisetzung des in ihm gebundenen Eisens kommen [7, 98].

Es besteht daher nicht nur bei der Untersuchung der Cisplatin-abhängigen Zytotoxizität großes Interesse daran, die zum Teil äußerst subtilen Veränderungen im intrazellulären

Eisenpool feststellen zu können, sondern auch in anderen beschriebenen pathologischen Zuständen [78, 156].

Ein gängiges Nachweisverfahren für zweiwertiges Eisen stellt dabei der Bleomycin-Assay dar: Nach Etablierung des Testprotokolls (Kapitel **2.2.5.**) wurden LLC-Pk_1-Zellen Cisplatin-Inkubationen ausgesetzt. Anschließend wurden verschiedene Zellaufschlussmethoden mit dem Ziel angewandt, Änderungen im Gehalt an freiem Eisen im zytosolischen Kompartiment der Zellen nachweisen zu können [20, 67, 79]. Wie in Kapitel **3.3.** beschrieben, konnten hierbei jedoch keine Unterschiede zwischen den Cisplatin-exponierten und den jeweiligen Kontrollzellen beobachtet werden.

Die verwendeten Lyse-Methoden könnten jedoch möglicherweise zu aggressiv gewesen sein, was eine vollständige Freisetzung des ionisierten Eisens aus allen bestehenden Proteinbindungen zur Folge gehabt haben könnte [20, 79]. Dies hätte letzten Endes dazu geführt, dass nicht nur das vormals freie Eisen, sondern der komplette Eisenpool der untersuchten Zellen detektiert worden wäre: Eine konsequente Weiterentwicklung und Verfeinerung der Zellaufschlusstechnik wäre hier vonnöten, ebenso die Analyse, inwieweit es durch sie zur Destabilisierung eisenhaltiger Proteine mit anschließender Freisetzung des gebundenen Eisens kommt [78].

Im nächsten Schritt wurden die – nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Experimentalsubstanzen – anfallenden Überstände aus der Zellkultur auf ihren Gehalt an freiem Eisen hin untersucht. Das entsprechende Protokoll wurde dabei anderen, bereits bestehenden Arbeiten zur Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität entlehnt [7, 8, 98].

Im Einklang mit der Literatur zeigt sich hier ein scheinbar deutlicher Anstieg der Menge freien Eisens nach Inkubation der LLC-Pk_1-Zellen mit Cisplatin gegenüber der Kontrolle (vgl. Kapitel **3.3.**). Allerdings kann dieser Anstieg auch dann beobachtet werden,wenn eine Cisplatin-Lösung ohne Zellen dem Test unterworfen wird.

Da die Nachweisreaktion des Bleomycin-Assays über die Degradationsprodukte von DNA funktioniert und Cisplatin bekanntermaßen ebenfalls direkt mit der DNA interagiert, könnte hier eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen zu finden sein [44, 46, 86].

Vor diesem Hintergrund müssen die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse allerdings äußerst kritisch bewertet werden. Eine entsprechende Kontrolle, in der die intrinsische

Wirkung von Cisplatin auf das Testsystem untersucht wird, wurde hier von den anderen Autoren bislang nicht präsentiert [7, 8, 98].

Messung von intrazellulärem Eisen mit Phen Green SK

Da mit dem Bleomycin-Assay offensichtlich keine Aussage bezüglich der Eisenfreisetzung nach Inkubation mit Cisplatin zu treffen war, wurde versucht, ein neuartiges Nachweissystem für ionisiertes Eisen in *in vitro*-Modellen zu etablieren (siehe auch Kapitel **2.2.6.4.**). Basis dieses Assays sollte der Eisenchelator Phen Green SK sein [43, 45, 73, 134, 137, 152, 161].

Gemäß der weiter oben ausgeführten Eigenschaften dieser Substanz war es möglich, ein Testprotokoll zu erstellen, mit dem man in der Lage war, Veränderungen im Fluoreszenzverhalten einer mit Ammoniumeisen-(II)-sulfat-hexahydrat inkubierten Präparation von LLC-Pk_1-Zellen gegenüber einer entsprechenden Kontrollprobe nachzuvollziehen (vgl. Kapitel **3.4.3.**). Allerdings musste man, um eine brauchbare Positivkontrolle zur Evaluation des Tests zur Verfügung zu haben, eine verhältnismäßig große Menge des Eisen-Donators einsetzen.

Somit ist fraglich, ob diese Methode eine ausreichend hohe Sensitivität aufweist, um die – möglicherweise im niedrigen mikromolaren Bereich liegenden – Veränderungen im intrazellulären Eisenpool nachweisen zu können, die im Rahmen subtiler pathologischer Vorgänge auftreten könnten [78]. Dennoch ist es prinzipiell gelungen, ein neues Verfahren zur Messung intrazellulär auftretenden freien Eisens zu etablieren, auch wenn weitere Verfeinerungen nötig erscheinen, um die Sensitivität des Tests weiter zu steigern.

Bis dahin lassen sich somit auch mit dem Phen Green SK-Assay keine direkten Argumente für oder gegen die postulierte Hypothese der Erhöhung der Konzentration freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität finden.

Zusammenfassende Beurteilung

In der vorliegenden Arbeit konnte die Frage nach der Rolle von freiem Eisen in der Cisplatin-induzierten Zytotoxizität weder mittels des Bleomycin-Assays noch mit dem Phen Green SK-Assay direkt beantwortet werden. Es konnten allerdings indirekte Indizien für das Zutreffen der beschriebenen These gefunden werden, da die Verwendung des Eisenchelators 2,2‘-Bipyridin in einer Abschwächung der durch Cisplatin erzeugten Erhöhung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies resultierte.

Sichere Aussagen über Änderungen des intrazellulären Eisenpools stellen darüber hinaus aufgrund der technischen Schwierigkeiten – zum Beispiel der Etablierung eines adäquaten Zellaufschlussprotokolls – ganz allgemein eine besondere Herausforderung dar. Weiterhin konnte eine direkte Wirkung von Cisplatin auf beide Testsysteme nachgewiesen werden, was diese im Sinne der Fragestellung als unbrauchbar erscheinen lässt. Die bislang zu diesem Themenkomplex publizierten Ergebnisse, die sich vor allem auf Verwendung des Bleomycin-Assays stützen, müssen daher vor diesem Hintergrund äußerst kritisch hinterfragt werden.

4.5. 12-Imidazolyldodecanol als therapeutische Substanz *in vivo*

Vorversuch und Etablierung des Modells des Cisplatin-induzierten Nierenschadens

Nach den *in vitro*-Studien, die zur Klärung mechanistischer Fragen im Modell des Cisplatin-induzierten Nierenschadens durchgeführt wurden, sollte das therapeutische Potential des CYP2E1-Inhibitors 12-ID-ol im lebenden Modell getestet werden. Darüber hinaus sollte die Frage geklärt werden, inwieweit die Nierenleistung der Versuchstiere auf funktioneller Ebene über die Messung von klinisch-chemischen Parametern möglich ist, um gegebenenfalls ein weiteres Werkzeug zur Etablierung geeigneter Tierversuchsmodelle in der Hand zu haben.

Hier zeigt sich, dass neun Tage nach der Cisplatin-Injektion eine maximale Abnahme der Nierenfunktion festzustellen war. Damit konnte zunächst bestätigt werden, dass sich die erhobenen, aus der Humanmedizin bekannten Parameter Serum-Kreatinin, Serum-Harnstoff und Kreatinin-*Clearance* auch im Tierversuch zum Überwachen der Nierenfunktion eignen [5, 130]. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Versuchstiere - gemessen an der Kreatinin-*Clearance* - einen Abfall ihrer Nierenleistung von über 75 % erlitten. Übertragen auf die Situation beim Menschen würde ein solcher Verlust der Nierenfunktion die formalen diagnostischen Kriterien eines akuten Nierenversagens erfüllen [15, 16, 87]. Interessanterweise kam es bei den Versuchstieren anschließend zu einem raschen Wiederanstieg der Kreatinin-*Clearance* und damit

gleichbedeutend zu einer Rekonstitution der Nierenfunktion. Diese Beobachtung unterstreicht die Wertigkeit der Messung funktioneller Nierenparameter, da durch sie der enge Zeitraum der maximalen Auswirkung einer nierenschädigenden Therapie am sichersten nachzuweisen und einzugrenzen ist [5, 130].

Der eigentliche Therapieversuch mit 12-ID-ol

Nachdem im oben beschriebenen Vorversuch der zeitliche Rahmen der maximalen Nierenschädigung durch Cisplatin eingegrenzt werden konnte, sollte das therapeutische Potential von 12-ID-ol evaluiert werden. Dazu wurde den Versuchstieren die Testsubstanz in einer großen Dosis-Bandbreite injiziert, da sichere Aussagen über die Pharmakokinetik und -dynamik von 12-ID-ol zum Zeitpunkt der Versuche noch nicht vorlagen [42]. Außerdem wurden Kontrollgruppen in das Experiment eingeschlossen, deren Mitglieder lediglich das Injektionsvolumen in Form reiner PBS-Lösung erhielten (vgl. Kapitel **2.2.7.4.**). Dieses Vorgehen war deshalb von großer Bedeutung, da die bisherige Standarttherapie des Cisplatin-induzierten Nierenschadens die Applikation großer Mengen freier Flüssigkeit beinhaltet und ausgeschlossen werden sollte, dass ein möglicher positiver Effekt einer Behandlung mit 12-ID-ol alleinig auf der Zufuhr des Flüssigkeitsvolumens beruht, die mit den zahlreichen Injektionen verbunden ist [32, 125].

Wie schließlich in Kapitel **3.5.2.** beschrieben, konnte eine nierenprotektive Wirkung einer Behandlung der Versuchstiere mit 12-ID-ol gezeigt werden. Diese fiel dabei – bei Betrachtung der geeigneten Dosis des CYP2E1-Inhibitor – signifikant größer aus als der beobachtete Effekt in den entsprechenden „Volumen-Kontrollen“: Im geeigneten Dosisbereich war damit die annähernde Aufrechterhaltung physiologischer Werte insbesondere für den sensitivsten Parameter der Nierenfunktion, der Kreatinin-*Clearance,* möglich. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass höhere 12-ID-ol-Dosierungen (mit oder ohne gleichzeitige Applikation von Cisplatin) eine schädigende Wirkung auf die Nierenfunktion der Versuchstiere aufwiesen. In Zusammenschau mit den weiter oben besprochenen Ergebnissen der *in vitro*-Studien spricht auch diese Beobachtung für die hohe Potenz der untersuchten Substanz bei gleichzeitig schmaler therapeutischer Breite [111].

Histologische Untersuchungen der Organproben

Neben der Messung klinisch-chemischer Parameter der Nierenfunktion erfolgte des Weiteren die Entnahme und Aufarbeitung von Herz, Leber und Nieren der Versuchstiere,

um mögliche Cisplatin- oder 12-ID-ol-induzierte Veränderungen auf histologischer Ebene nachweisen zu können (vgl. Kapitel **2.2.7.2.**).

Wie bereits im Kapitel **3.6.1.** ausgeführt, konnte eine sichere Beurteilung der Organe aus dem ersten Versuchsdurchlauf allerdings aufgrund der unzureichenden Fixierungsqualität nicht durchgeführt werden, so dass schließlich nur die Organe aus dem zweiten Versuchsteil zur Verfügung standen. Dementsprechend konnten weniger Individuen in die histopathologische Auswertung eingeschlossen werden, was die Aussagekraft der Untersuchung in gewissem Maße schmälert.

Dennoch konnten bei den Tieren, denen man entweder nur Cisplatin oder Cisplatin und die Vehikel- bzw. Volumenkontrolle Cyclodextrin verabreicht hatte, in der lichtmikroskopischen Untersuchung typische Veränderungen der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität beobachtet werden [148, 171]. Diese Veränderungen traten in der Kontrolle überhaupt nicht und in der Therapiegruppe mit 12-ID-ol wesentlich seltener auf, so dass auch auf dieser Ebene von einem nephroprotektiven Effekt der Testsubstanz ausgegangen werden kann.

Weiterhin muss allerdings in Betracht gezogen werden, dass der Zeitpunkt der Organentnahme durch den Verlauf der Nierenfunktionsparameter bestimmt wurde. Es kann dabei vermutet werden, dass das Maximum des Ausmaßes der pathologischen Veränderungen in der Histologie und auf funktioneller Ebene nicht notwendigerweise zusammenfällt und daher eine noch deutlichere Aussage über die Wirkung von Cisplatin und 12-ID-ol auf Organebene zu einem anderen Zeitpunkt mit höherer Aussagekraft möglich gewesen wäre [142].

4.6. Zusammenfassung, Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Exposition von Nierentubuluszellen gegenüber Cisplatin in einer gesteigerten intrazellulären ROS-Belastung mit anschließendem Verlust der mitochondrialen Integrität resultiert, die in einer

Abnahme der Viabilität der entsprechenden Zellpopulation mündet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration Zelltodmechanismen ausgelöst werden, die entweder vornehmlich zur Apoptose oder zur Nekrose der betroffenen Zellen führen.

Weiterhin konnten Anhaltspunkte gefunden werden, die eine Interaktion von Cisplatin mit der Cytochrom P450 Isoform 2E1 nahelegen. Die Frage, inwieweit diese Interaktion zu einer Freisetzung des im Häm gebundenen, zweiwertigen Eisens führt, kann allerdings aufgrund der technischen Schwierigkeit des intrazellulären Eisennachweises noch nicht abschließend geklärt werden. Hier liegen lediglich indirekte Indizien vor, die diese Schlussfolgerung wahrscheinlich machen. Daher sollte versucht werden, Beweise für diese Hypothese durch den Einsatz weiterer biophysikalischer Methoden (zum Beispiel der Massenspektrometrie) und zellbiologischer Experimenter (Pulldown von CYP2E1 und von Interaktionspartnern des Proteinabbaus) zu finden.

Schließlich konnte ein Tierversuchsmodell etabliert werden, in dem ein Cisplatin-induzierter Nierenschaden anhand klinisch-chemischer Parameter der Nierenfunktion und entsprechender histopathologischer Veränderungen nachgewiesen werden konnte.

Darüber hinaus sollte das mögliche therapeutische Potential einer Inhibition der Cytochrom P450 Isoform 2E1 durch den rational designten Wirkstoffkandidaten 12-ID-ol untersucht werden. Hier konnte sowohl *in vitro*, vor allem aber auch im lebenden Modell gezeigt werden, dass durch die Verabreichung der Experimentalsubstanz die Cisplatin-abhängige Nephrotoxizität in ihrem Ausmaß deutlich abgeschwächt werden konnte, wobei ihr positiver Effekt vor allem in Vermeidung des nekrotischen Zelltodes bestand. Damit konnten Argumente erarbeitet werden, die für den Ansatz einer spezifischen Hemmung fremdstoffmetabolisierender Enzyme im Themenkomplex des Medikamenten-induzierten, akuten Nierenschadens sprechen.

Bis dahin müssen in Zukunft allerdings noch einige Fragen geklärt werden: Zunächst sollte herausgearbeitet werden, inwieweit Cisplatin neben einer Interaktion mit CYP2E1 noch andere intrazelluläre *Targets* angreift, die für die schädliche Wirkung des Chemotherapeutikums verantwortlich sein könnten. Außerdem müssen die hier präsentierten Ergebnisse auf die Situation im Menschen übertragen werden. Dazu sind letztlich geeignete humane Nierenzelllinien notwendig, die in ihrer Cytochrom-Expression den Zuständen *in vivo* gleichen.

Darüber hinaus müssen auch die Auswirkungen einer gezielten Cytochrom-Inhibition im Menschen weiter untersucht werden, um Aussagen über mögliche unerwünschte Nebenwirkungen treffen können.

Schließlich sollte untersucht werden, inwiefern sich der hier postulierte Mechanismus auf andere nephrotoxische Medikamente und Wirkstoffe – zum Beispiel auf die Antibiotika der Aminoglykoside – übertragen lässt. Es bestehen dabei bereits Anhaltspunkte, die auf ähnliche Mechanismen der Nierenschädigung hinweisen, so dass auch hier eventuell das Potential zu einem therapeutischen Eingreifen besteht [106, 115, 132].

5. Zusammenfassung

Das akute, Medikamenten-induzierte Nierenversagen stellt aufgrund seiner Häufigkeit und seiner Bedeutung hinsichtlich Mortalität und Morbidität der Patienten eine große Herausforderung für die klinische Medizin dar. Es werden dabei unterschiedliche Pathomechanismen diskutiert, wobei sich in letzter Zeit Anhaltspunkte häufen, die auf eine bedeutende Rolle fremdstoffmetabolisierender Enzyme in seiner Entstehung hinweisen. In erster Linie sind hier die Vertreter der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenasen (CYP450 Isoformen) zu nennen.

Insbesondere beim Nierenschaden, der regelmäßig als Folge einer Therapie mit Cisplatin auftritt, wurde eine Interaktion zwischen dem Chemotherapeutikum und der CYP-Isoform 2E1 postuliert, die eine gesteigerte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mit konsekutiver Degradation des Enzyms und anschließender Freisetzung des in ihm gebundenen Häm-Eisens zur Folge haben soll. Dieser Mechanismus führt wiederum zum Untergang der proximalen Tubuluszellen, die gegenüber dieser Kaskade besonders vulnerabel sein sollen.

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit ist es der Arbeitsgruppe gelungen, auf rationalem Weg einen spezifischen Inhibitor des Cytochroms 2E1 mit dem vorläufigen Namen 12-ID-ol zu designen und anschließend herzustellen. Daraufhin sollte untersucht werden, inwieweit sich diese Substanz dazu eignet, den Nierenschaden durch Cisplatin abzuschwächen oder gar aufzuheben und somit beispielhaft für eine neuartige Wirkstoffklasse zu stehen, die für die Behandlung und Prophylaxe der Medikamenten-induzierten Nephrotoxizität eingesetzt werden könnte.

Zur Klärung dieser Frage wurden verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Methoden eingesetzt: So sollte auf zellulärer Ebene die Interaktion von Cisplatin beziehungsweise 12-ID-ol mit der Cytochrom-Isoform 2E1 nachgewiesen werden. Weiterhin sollten mit verschiedenen Methoden, wie zellbasierten Assays im Microplateformat oder der Durchflusszytometrie, die Auswirkungen einer Cisplatin-Exposition auf Nierenzellen bezüglich Viabilität, Zelltod, Apoptose, ROS-Belastung und mitochondrialer Integrität beleuchtet werden. Darüber hinaus sollte versucht werden, die Rolle des freien Eisens in der Cisplatin-induzierten Nephrotoxizität zu klären. Schließlich sollten die so gewonnen Ergebnisse auf

ein lebendiges Modell übertragen werden, um das mögliche therapeutische Potential des Wirkstoffkandidaten 12-ID-ol evaluieren zu können.

So konnte gezeigt werden, dass Cisplatin zu einer gesteigerten ROS-Belastung mit anschließendem Verlust der mitochondrialen Integrität in den Nierenzellen führt, was in einer Abnahme der Viabilität der betroffenen Zellen mündet. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass in Abhängigkeit der eingesetzten Cisplatin-Konzentration Zelltodmechanismen ausgelöst werden, die entweder vornehmlich zur Apoptose oder zur Nekrose führen. Weiterhin konnten Anhaltspunkte gefunden werden, die eine Interaktion von Cisplatin mit dem Cytochrom 2E1 nahelegen. Die Frage, inwieweit diese Interaktion die Freisetzung des gebundenen Häm-Eisens bedingt, ließ sich allerdings noch nicht abschließend klären.

Schließlich konnte ein Tierversuchsmodell etabliert werden, in dem anhand klinisch-chemischer Nierenfunktionsparameter die nierenschädigende Wirkung einer Cisplatin-Applikation nachvollzogen werden konnte.

Im nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass sich die oben beschriebenen, negativen Effekte von Cisplatin durch eine gleichzeitige Behandlung mit 12-ID-ol sowohl *in vitro*, vor allem aber auch *in vivo* deutlich abschwächen ließen. Damit konnten Argumente erarbeitet werden, die für das therapeutische Potential einer spezifischen Hemmung fremdstoffmetabolisierender Enzyme im Rahmen der Medikamenten-induzierten Nephrotoxizität sprechen.

Diesbezüglich müssen allerdings noch einige Fragen beantwortet werden: So sollte untersucht werden, welche intrazellulären *Targets* außer des Cytochroms 2E1 von Cisplatin bzw. 12-ID-ol adressiert werden, um den Mechanismus, mit dem Cisplatin seine schädigende Wirkung auf die betroffenen Zellen ausübt, weiter aufklären zu können.

Darüber hinaus müssen die hier präsentierten Ergebnisse auf die Situation beim Menschen übertragen werden, was geeignete humane Nierenzelllinien notwendig macht.

Schließlich sollte untersucht werden, inwiefern der hier postulierte Mechanismus der Nierenschädigung durch Medikamente auch auf andere nephrotoxische Wirkstoffe anwendbar ist, da sich hier ein großes Potential für die mögliche Behandlung dieser unerwünschten Nebenwirkung erkennen lässt.

6. Literaturverzeichnis

1. Al Bahrani BJ, Moylan EJ, Forouzesh B, Della-Fiorentina SA, Goldrick AJ. A short outpatient hydration schedule for cisplatin administration. Gulf J Oncolog 5: 30-6 (2009)

2. Al-Ghamdi SS, Chatterjee PK, Raftery MJ, Thiemermann C, Yaqoob MM. Role of cytochrome P4502E1 activation in proximal tubular cell injury induced by hydrogen peroxide. Ren Fail 26: 103-10 (2004)

3. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, Mortis G, Fick GH, Mucenski M, Godinez-Luna T, Svenson LW, Rosenal T. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study. Crit Care 9: 700-9 (2005)

4. Bagshaw SM, Bellomo R. Acute renal failure: definition, epidemiology and prognosis. Springer Paris: 31-48 (2007)

5. Bagshaw SM, Gibney RT. Conventional markers of kidney function. Crit Care Med 36: 152-8 (2008)

6. Baliga R, Ueda N, Shah SV. Increase in bleomycin-detectable iron in ischaemia/reperfusion injury to rat kidneys. Biochem J 291: 901-5 (1993)

7. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. In vitro and in vivo evidence suggesting a role for iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. Kidney Int 53: 394-401 (1998 a)

8. Baliga R, Zhang Z, Baliga M, Ueda N, Shah SV. Role of cytochrome P 450 as a source of catalytic iron in cisplatin-induced nephrotoxicity. Kidney Int 54: 1562-9 (1998 b)

9. Baliga R, Ueda N, Walker PD, Shah SV. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure. Drug Metab Rev 31: 971-97 (1999)

10. Barker K. Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch. Elsevier, München: 198-206 (2006 a)

11. Barker K. Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch. Elsevier, München: 211-214 (2006 b)

12. Barker K. Das Cold Spring Harbor Laborhandbuch. Elsevier, München: 369-390 (2006 c)

13. Beaune P, Dansette PM, Mansuy D, Kiffel L, Finck M, Amar C, Leroux JP, Homberg JC. Human anti-endoplasmic reticulum autoantibodies appearing in a drug-induced hepatitis are directed against a human liver cytochrome P-450 that hydroxylates the drug. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 551-5 (1987)

14. Beckman Coulter. Vi-CELL Series Cell Viability Analyzers Brochure. USA: 1-8 (2010)

15. Bellomo R, Kellum J, Ronco C. Acute renal failure: time for consensus. Intensive Care Med 11: 1685-8 (2001)

16. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P. Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. Crit Care 8: 204-12 (2004)

17. Bergler, S. Antineoplastische Wirkung des Arzneistoffkandidaten 12-ID-ol im Kontext des hepatozellulären Karzinoms. Med Dissertation, Universiät Ulm. (2011)

18. Bogdanos DP, Dalekos GN. Enzymes as target antigens of liver-specific autoimmunity: the case of cytochromes P450s. Curr Med Chem 22: 2285-92 (2008)

19. Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure. Curr Opin Nephrol Hypertens 11: 301-8 (2002)

20. Bordier C. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J Biol Chem 256: 1604-7 (1981)

21. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 7: 248-54 (1976)

22. Brady NR, Hamacher-Brady A, Westerhoff HV, Gottlieb RA. A wave of reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release in a sea of excitable mitochondria. Antioxid Redox Signal 8: 1651-65 (2006)

23. Brière KM, Goel R, Shirazi FH, Stewart DJ, Smith CP. The integrity of cisplatin in aqueous and plasma ultrafiltrate media studied by 195Pt and 15N nuclear magnetic resonance. Cancer Chemother Pharmacol 37: 518-24 (1996)

24. Buysen JG, Houthoff HJ, Krediet RT, Arisz L. Acute interstitial nephritis: a clinical and morphological study in 27 patients. Nephrol Dial Transplant 5: 94-9 (1990)

25. Chaney SG, Vaisman A. Specificity of platinum-DNA adduct repair. J Inorg Biochem 77: 71-81 (1999)

26. Chen C, Krausz KW, Idle JR, Gonzalez FJ. Identification of novel toxicity-associated metabolites by metabolomics and mass isotopomer analysis of acetaminophen metabolism in wild-type and Cyp2e1-null mice. J Biol Chem 283: 4543-59 (2008)

27. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 15: 9-19 (1996)

28. Ciarimboli G, Ludwig T, Lang D, Pavenstädt H, Koepsell H, Piechota HJ, Haier J, Jaehde U, Zisowsky J, Schlatter E. Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. Am J Pathol 167: 1477-84 (2005)

29. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. Free Radic Biol Med 48: 749-62 (2010)

30. Cohen SM, Lippard SJ. Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 67: 93-130 (2001)

31. Constan AA, Sprankle CS, Peters JM, Kedderis GL, Everitt JI, Wong BA, Gonzalez FL, Butterworth BE. Metabolism of chloroform by cytochrome P450 2E1 is required for induction of toxicity in the liver, kidney, and nose of male mice. Toxicol Appl Pharmacol 160: 120-6 (1999)

32. Cooley ME, Davis L, Abrahm J. Cisplatin: a clinical review. Part II- Nursing assessment and management of side effects of cisplatin. Cancer Nurs 17: 283-93 (1994)

33. Correia MA. Hepatic cytochrome P450 degradation: mechanistic diversity of the cellular sanitation brigade. Drug Metab Rev 35: 107-43 (2003)

34. Correia MA, Sadeghi S, Mundo-Paredes E. Cytochrome P450 ubiquitination: branding for the proteolytic slaughter? Annu Rev Pharmacol Toxicol 45: 439-64 (2005)

35. Crichton RR, Wilmet S, Legssyer R, Ward RJ. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. J Inorg Biochem 91: 9-18 (2002)

36. Criddle DN, Gillies S, Baumgartner-Wilson HK, Jaffar M, Chinje EC, Passmore S, Chvanov M, Barrow S, Gerasimenko OV, Tepikin AV, Sutton R, Petersen OH. Menadione-induced reactive oxygen species generation via redox cycling promotes apoptosis of murine pancreatic acinar cells. J Biol Chem 281: 40485-92 (2006)

37. Cummings BS, Zangar RC, Novak RF, Lash LH. Cellular distribution of cytochromes P-450 in the rat kidney. Drug Metab Dispos 27: 542-8 (1999)

38. De Duve C. The separation and characterization of subcellular particles. Harvey Lect 59: 49-87 (1965)

39. De Duve C. Tissue fractionation. Past and present. J Cell Biol 50: 20-55 (1971)

40. De Mendonça A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, Takala J, Sprung C, Cantraine F. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. Intensive Care Med 26: 915-21 (2000)

41. De Muth JE. Overview of biostatistics used in clinical research. Am J Health Syst Pharm 66: 70-81 (2009)

42. Diesinger, T. (Publikation in Vorbereitung)

43. Doulias PT, Vlachou C, Boudouri C, Kanavaros P, Siamopoulos KC, Galaris D. Flow cytometric estimation of 'labile iron pool' in human white blood cells reveals a positive association with ageing. Free Radic Res 42: 253-9 (2008)

44. Eastman A. The formation, isolation and characterization of DNA adducts produced by anticancer platinum complexes. Pharmacol Ther 34: 155-66 (1987)

45. Espósito BP, Epsztejn S, Breuer W, Cabantchik ZI. A review of fluorescence methods for assessing labile iron in cells and biological fluids. Anal Biochem 304: 1-18 (2002)

46. Evans PJ, Halliwell B. Measurement of iron and copper in biological systems: bleomycin and copper-phenanthroline assays. Methods Enzymol 233: 82-92 (1994)

47. Fink D, Aebi S, Howell SB. The role of DNA mismatch repair in drug resistance. Clin Cancer Res 4: 1-6 (1998)

48. Freeman JE, Stirling D, Russell AL, Wolf CR. cDNA sequence, deduced amino acid sequence, predicted gene structure and chemical regulation of mouse Cyp2e1. Biochem J 281: 689-95 (1992)

49. Genter St Clair MB, Amarnath V, Moody MA, Anthony DC, Anderson CW, Graham DG. Pyrrole oxidation and protein cross-linking as necessary steps in the development of gamma-diketone neuropathy. Chem Res Toxicol 1: 179-85 (1988)

50. Gloeckner H, Jonuleit T, Lemke HD. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar Blue. J Immunol Methods 252: 131-8 (2001)

51. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Heme oxygenase-1 protects HepG2 cells against cytochrome P450 2E1-dependent toxicity. Free Radic Biol Med 36: 307-18 (2004)

52. Gong P, Cederbaum AI, Nieto N. Increased expression of Cytochrome P450 2E1 induces heme oxygenase-1 through ERK MAPK pathway. J Biol Chem 278: 29693-700 (2003)

53. Gonzalez FJ. Molecular genetics of the P-450 superfamily. Pharmacol Ther 45: 1-38 (1990)

54. Gonzalez FJ. The use of gene knockout mice to unravel the mechanisms of toxicity and chemical carcinogenesis. Toxicol Lett 120: 199-208 (2001)

55. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36: 59-74 (1977)

56. Guengerich FP, Shimada T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. Chem Res Toxicol 4: 391-407 (1991)

57. Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. Chem Res Toxicol 14: 611-50 (2001)

58. Guengerich FP, Rendic S. Update information on drug metabolism systems--2009, part I. Curr Drug Metab 11: 1-3 (2010)

59. Gunkel M, Erdel F, Rippe K, Lemmer P, Kaufmann R, Hörmann C, Amberger R, Cremer C. Dual color localization microscopy of cellular nanostructures. Biotechnol J 4: 927-38 (2009)

60. Gutteridge JM, Rowley DA, Halliwell B. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals and lipid peroxidation in the presence of iron salts. Detection of 'catalytic' iron and anti-oxidant activity in extracellular fluids. Biochem J 206: 605-9 (1982)

61. Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett 201: 291-5 (1986)

62. Gutteridge JM, Halliwell B. Comments on review of Free Radicals in Biology and Medicine, second edition, by Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Free Radic Biol Med 12: 93-5 (1992)

63. Hafer K, Iwamoto KS, Schiestl RH. Refinement of the dichlorofluorescein assay for flow cytometric measurement of reactive oxygen species in irradiated and bystander cell populations. Radiat Res 169: 140-8 (2008)

64. Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J Pathol 162: 285-94 (1990)

65. Halliwell B, Gutteridge JM. The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. Mol Aspects Med 8: 193 (1985)

66. Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance. Endocrine 27: 119-30 (2005)

67. Helenius A, Simons K. Solubilization of membranes by detergents. Biochim Biophys Acta 415: 29-79 (1975)

68. Hill AB. The Environment and Disease: Association or Causation? Proc R Soc Med 58: 295-300 (1965)

69. Hojs R, Ekart R, Sinkovic A, Hojs-Fabjan T. Rhabdomyolysis and acute renal failure in intensive care unit. Ren Fail 21: 675-84 (1999)

70. Hou SH, Bushinsky DA, Wish JB, Cohen JJ, Harrington JT. Hospital-acquired renal insufficiency: a prospective study. Am J Med 74: 243-8 (1983)

71. Hull RN, Cherry WR, Weaver GW. The origin and characteristics of a pig kidney cell strain, LLC-PK. In Vitro 12: 670-7 (1976)

72. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 14298-302 (2002)

73. Iwatsuki H, Meguro R, Asano Y, Odagiri S, Li C, Shoumura K. Chelatable Fe (II) is generated in the rat kidneys exposed to ischemia and reperfusion, and a divalent metal chelator, 2, 2'-dipyridyl, attenuates the acute ischemia/reperfusion-injury of the kidneys: a histochemical study by the perfusion-Perls and -Turnbull methods. Arch Histol Cytol 71: 101-14 (2008)

74. Jakubowski W, Bartosz G. 2,7-dichlorofluorescin oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? Cell Biol Int 24: 757-60 (2000)

75. Jiang JG, Chen CL, Card JW, Yang S, Chen JX, Fu XN, Ning YG, Xiao X, Zeldin DC, Wang DW. Cytochrome P450 2J2 promotes the neoplastic phenotype of carcinoma cells and is up-regulated in human tumors. Cancer Res 65: 4707-15 (2005)

76. Jiang M, Wei Q, Wang J, Du Q, Yu J, Zhang L, Dong Z. Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. Oncogene 25. 4056-66 (2006)

77. Kadkhodaee M, Khastar H, Faghihi M, Ghaznavi R, Zahmatkesh M. Effects of co-supplementation of vitamins E and C on gentamicin-induced nephrotoxicity in rat. Exp Physiol 90: 571-6 (2005)

78. Kakhlon O, Cabantchik ZI. The labile iron pool: characterization, measurement, and participation in cellular processes(1). Free Radic Biol Med 33: 1037-46 (2002)

79. Kampen I, Einfluss der Zellaufschlussmethode auf die Expanded Bed Chromatographie. Dissertation (Dr.-Ing.), Technische Universität Braunschweig. 2005

80. Kang JS, Wanibuchi H, Morimura K, Gonzalez FJ, Fukushima S. Role of CYP2E1 in diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis in vivo. Cancer Res 67: 11141-6 (2007)

81. Kapucuoglu N, Coban T, Raunio H, Pelkonen O, Edwards RJ, Boobis AR, Iscan M. Immunohistochemical demonstration of the expression of CYP2E1 in human breast tumour and non-tumour tissues. Cancer Lett 196: 153-9 (2003)

82. Karuzina II, Archakov AI. Hydrogen peroxide-mediated inactivation of microsomal cytochrome P450 during monooxygenase reactions. Free Radic Biol Med 17: 557-67 (1994 a)

83. Karuzina II, Archakov AI. The oxidative inactivation of cytochrome P450 in monooxygenase reactions. Free Radic Biol Med 16: 73-97 (1994 b)

84. Karuzina II, Zgoda VG, Kuznetsova GP, Samenkova NF, Archakov AI. Heme and apoprotein modification of cytochrome P450 2B4 during its oxidative inactivation in monooxygenase reconstituted system. Free Radic Biol Med 26: 620-32 (1999)

85. Karvinen J, Hurskainen P, Gopalakrishnan S, Burns D, Warrior U, Hemmilä I. Homogeneous time-resolved fluorescence quenching assay (LANCE) for caspase-3. J Biomol Screen 7: 223-31 (2002)

86. Kelland LR. New platinum antitumor complexes. Crit Rev Oncol Hematol 15: 191-219 (1993)

87. Kellum JA. Acute kidney injury. Crit Care Med 36: 141-5 (2008)

88. Kikuchi G, Yoshida T. Function and induction of the microsomal heme oxygenase. Mol Cell Biochem 54: 163-83 (1983)

89. Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation. Biochem Biophys Res Commun 338: 558-67 (2005)

90. Kim YK, Kim HJ, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim JM. Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. J Appl Toxicol 25: 374-82 (2005)

91. Kulkarni GV, Lee W, Seth A, McCulloch CA. Role of mitochondrial membrane potential in concanavalin A-induced apoptosis in human fibroblasts. Exp Cell Res 245: 170-8 (1998)

92. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-5 (1970)

93. LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7' dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chem Res Toxicol 5: 227-31 (1992)

94. Lee RH, Song JM, Park MY, Kang SK, Kim YK, Jung JS. Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. Biochem Pharmacol 62: 1013-23 (2001)

95. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. Biochim Biophys Acta 1366: 177-96 (1998)

96. Lieber CS. Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. J Hepatol 32: 113-28 (2000)

97. Liu H, Shah SV, Baliga R. Cytochrome P-450 as a source of catalytic iron in minimal change nephrotic syndrome in rats. Am J Physiol Renal Physiol 280: 88-94 (2001)

98. Liu H, Baliga M, Baliga R. Effect of cytochrome P450 2E1 inhibitors on cisplatin-induced cytotoxicity to renal proximal tubular epithelial cells. Anticancer Res 22: 863-8 (2002 a)

99. Liu H, Bigler SA, Henegar JR, Baliga R. Cytochrome P450 2B1 mediates oxidant injury in puromycin-induced nephrotic syndrome. Kidney Int 62: 868-76 (2002 b)

100. Liu H, Baliga R. Cytochrome P450 2E1 null mice provide novel protection against cisplatin-induced nephrotoxicity and apoptosis. Kidney Int 63: 1687-96 (2003)

101. Lu Y, Cederbaum AI. Cisplatin-induced hepatotoxicity is enhanced by elevated expression of cytochrome P450 2E1. Toxicol Sci 89: 515-23 (2006)

102. Lu Y, Cederbaum A. The mode of cisplatin-induced cell death in CYP2E1 overexpressing HepG2 cells: modulation by ERK, ROS, glutathione, and thioredoxin. Free Radic Biol Med 43: 1061-75 (2007)

103. Lu Y, Zhuge J, Wang X, Bai J, Cederbaum AI. Cytochrome P450 2E1 contributes to ethanol-induced fatty liver in mice. Hepatology 47: 1483-94 (2008)

104. Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D. Renal filtration, transport, and metabolism of low-molecular-weight proteins: a review. Kidney Int 16: 251-70 (1979)

105. Maher J. The CYP2E1 knockout delivers another punch: first ASH, now NASH. Alcoholic steatohepatitis. Nonalcoholic steatohepatitis. Hepatology 33: 311-2 (2001)

106. Markowitz GS, Perazella MA. Drug-induced renal failure: a focus on tubulointerstitial disease. Clin Chim Acta 351: 31-47 (2005)

107. Martien S, Abbadie C. Acquisition of oxidative DNA damage during senescence: the first step toward carcinogenesis? Ann N Y Acad Sci 1119: 51-63 (2007)

108. McCarthy JT. Prognosis of patients with acute renal failure in the intensive-care unit: a tale of two eras. Mayo Clin Proc 71: 117-26 (1996)

109. Mehta RL, Pascual MT, Soroko S, Savage BR, Himmelfarb J, Ikizler TA, Paganini EP, Chertow GM; Program to Improve Care in Acute Renal Disease. Spectrum of acute renal failure in the intensive care unit: the PICARD experience. Kidney Int 66: 1613-21 (2004)

110. Murray RGE, Robinow CF. Light microscopy. Methods for genral and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 7-20 (1995)

111. Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M. Arzneimittelwirkungen. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 8: 78-82 (2001)

112. Nabi N, Kominami S, Takemori S, Omura T. Contributions of cytoplasmic free and membrane-bound ribosomes to the synthesis of mitochondrial cytochrome P-450(SCC) and P-450(11 beta) and microsomal cytochrome P 450(C-21) in bovine adrenal cortex. J Biochem 94: 1517-27 (1983)

113. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. J Toxicol Sci 32: 453-68 (2007)

114. Nash K, Hafeez A, Hou S. Hospital-acquired renal insufficiency. Am J Kidney Dis 39: 930-6 (2002)

115. Naughton CA. Drug-induced nephrotoxicity. Am Fam Physician 78: 743-50 (2008)

116. Newcomb M, Toy PH. Hypersensitive radical probes and the mechanisms of cytochrome P450 catalyzed hydroxylation reactions. Acc Chem Res 33: 449-455 (2000)

117. Nielsen R, Birn H, Moestrup SK, Nielsen M, Verroust P, Christensen EI. Characterization of a kidney proximal tubule cell line, LLC-PK1, expressing endocytotic active megalin. J Am Soc Nephrol 9: 1767-79 (1998)

118. Nieminen AL, Saylor AK, Tesfai SA, Herman B, Lemasters JJ. Contribution of the mitochondrial permeability transition to lethal injury after exposure of hepatocytes to t-butylhydroperoxide. Biochem J 307: 99-106 (1995)

119. Niles AL, Moravec RA, Eric Hesselberth P, Scurria MA, Daily WJ, Riss TL. A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. Anal Biochem 366: 197-206 (2007)

120. Novis BK, Roizen MF, Aronson S, Thisted RA. Association of preoperative risk factors with postoperative acute renal failure. Anesth Analg 78: 143-9 (1994)

121. Odaka Y, Takahashi T, Yamasaki A, Suzuki T, Fujiwara T, Yamada T, Hirakawa M, Fujita H, Ohmori E, Akagi R. Prevention of halothane-induced hepatotoxicity by hemin pretreatment: protective role of heme oxygenase-1 induction. Biochem Pharmacol 59: 871-80 (2000)

122. Ogata K, Arakawa M, Kasahara T, Shioiri-Nakano K, Hiraoka K. Detection of toxoplasma membrane antigens transferred from SDS polyacrylamide gel to nitrocellulose with monoclonal antibody and avidin biotin, peroxidase anti-peroxidase and immunoperoxidase methods. J Immunol Methods 65: 75-82 (1983)

123. Olbricht CJ, Fink M, Gutjahr E. Alterations in lysosomal enzymes of the proximal tubule in gentamicin nephrotoxicity. Kidney Int 39: 639-46 (1991)

124. Oprian DD, Coon MJ. Oxidation-reduction states of FMN and FAD in NADPH-cytochrome P-450 reductase during reduction by NADPH. J Biol Chem 257: 8935-44 (1982)

125. Pabla N, Dong Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. Kidney Int 73: 994-1007 (2008)

126. Palm M, Lundblad A. Creatinine concentration in plasma from dog, rat, and mouse: a comparison of 3 different methods. Vet Clin Pathol 34: 232-6 (2005)

127. Palmer BF. Renal dysfunction complicating the treatment of hypertension. N Engl J Med 347: 1256-61 (2002)

128. Pan J, Hong JY, Yang CS. Post-transcriptional regulation of mouse renal cytochrome P450 2E1 by testosterone. Arch Biochem Biophys 299: 110-5 (1992)

129. Pannu N, Nadim MK. An overview of drug-induced acute kidney injury. Crit Care Med 36: 216-23 (2008)

130. Parikh CR, Devarajan P. New biomarkers of acute kidney injury. Crit Care Med 36: 159-65 (2008)

131. Park MS, De Leon M, Devarajan P. Cisplatin induces apoptosis in LLC PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. J Am Soc Nephrol 13: 858-65 (2002)

132. Perazella MA. Drug-induced nephropathy: an update. Expert Opin Drug Saf 4: 689-706 (2005)

133. Perazella MA. Renal vulnerability to drug toxicity. Clin J Am Soc Nephrol 4: 1275-83 (2009)

134. Petrat F, de Groot H, Rauen U. Determination of the chelatable iron pool of single intact cells by laser scanning microscopy. Arch Biochem Biophys 376 74-81 (2000)

135. Plate AY, Crankshaw DL, Gallaher DD. The effect of anesthesia by diethyl ether or isoflurane on activity of cytochrome P450 2E1 and P450 reductases in rat liver. Anesth Analg 101: 1063-4 (2005)

136. Porubsky PR, Meneely KM, Scott EE. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates. J Biol Chem 283: 33698-707 (2008)

137. Prus E, Fibach E. Flow cytometry measurement of the labile iron pool in human hematopoietic cells. Cytometry A 73: 22-7 (2008)

138. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. Am J Physiol Renal Physiol 285: 610-8 (2003)

139. Raucy JL, Lasker J, Ozaki K, Zoleta V. Regulation of CYP2E1 by ethanol and palmitic acid and CYP4A11 by clofibrate in primary cultures of human hepatocytes. Toxicol Sci 79: 233-41 (2004)

140. Renz, Ch. Untersuchungen zur pathogenetischen Rolle von CYP2E1 bei alkoholischer Steatohepatitis (ASH). Bachelorarbeit, Universität Ulm. 2008

141. Ressmeyer AR, Mayo JC, Zelosko V, Sáinz RM, Tan DX, Poeggeler B, Antolín I, Zsizsik BK, Reiter RJ, Hardeland R. Antioxidant properties of the melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK): scavenging of free radicals and prevention of protein destruction. Redox Rep 8: 205-13 (2003)

142. Robbins SL, Kumar V, Abbas A, Fausto N, Mitchell R. Robbins Basic Pathology. Saunders Elsevier, Philadelphia 8: 1-30 (2007)

143. Roberts BJ, Shoaf SE, Jeong KS, Song BJ. Induction of CYP2E1 in liver, kidney, brain and intestine during chronic ethanol administration and withdrawal: evidence that CYP2E1 possesses a rapid phase half-life of 6 hours or less. Biochem Biophys Res Commun 205: 1064-71 (1994)

144. Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in Escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. Nature 205: 689-9 (1965)

145. Ross CW. Flow Cytometry: First Principles. Arch Pathol Lab Med 126: 384-385 (2002)

146. Rossert J. Drug-induced acute interstitial nephritis. Kidney Int 60: 804-17 (2001)

147. Ryter SW, Tyrrell RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. Free Radic Biol Med 28: 289-309 (2000)

148. Schödel J, Klanke B, Weidemann A, Buchholz B, Bernhardt W, Bertog M, Amann K, Korbmacher C, Wiesener M, Warnecke C, Kurtz A, Eckardt KU, Willam C. HIF-prolyl hydroxylases in the rat kidney: physiologic expression patterns and regulation in acute kidney injury. Am J Pathol 174: 1663-74 (2009)

149. Schoolwerth AC, Sica DA, Ballermann BJ, Wilcox CS; Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and the Council for High Blood Pressure Research of the American Heart Association. Renal considerations in angiotensin converting enzyme inhibitor therapy: a statement for healthcare professionals from the Council on the Kidney in Cardiovascular Disease and the Council for High Blood Pressure Research of the American Heart Association. Circulation 104: 1984-91 (2001)

150. Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. Proteomics 3: 1408-17 (2003)

151. Shin JN, Seo YW, Kim M, Park SY, Lee MJ, Lee BR, Oh JW, Seol DW, Kim TH. Cisplatin inactivation of caspases inhibits death ligand-induced cell death in vitro and fulminant liver damage in mice. J Biol Chem 280: 10509-15 (2005)

152. Shingles R, North M, McCarty RE. Direct measurement of ferrous ion transport across membranes using a sensitive fluorometric assay. Anal Biochem 296: 106-13 (2001)

153. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. Oncogene 22: 7265-79 (2003)

154. Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol 82: 291-5 (1997)

155. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD Jr, Chen LB. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. Proc Natl Acad Sci U S A 88: 3671-5 (1991)

156. Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med 9: 315-25 (1990)

157. Stevens LA, Levey AS. Measurement of kidney function. Med Clin North Am 89: 457-73 (2005)

158. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem 69: 217-45 (2000)

159. Swenberg JA. Alpha 2u-globulin nephropathy: review of the cellular and molecular mechanisms involved and their implications for human risk assessment. Environ Health Perspect 101: 39-44 (1993)

160. Tauber AI, Babior BM. Evidence for hydroxyl radical production by human neutrophils. J Clin Invest 60: 374-9 (1977)

161. Thomas F, Serratrice G, Béguin C, Aman ES, Pierre JL, Fontecave M, Laulhère JP. Calcein as a fluorescent probe for ferric iron. Application to iron nutrition in plant cells. J Biol Chem 274: 13375-83 (1999)

162. Tosaki A, Das DK. The role of heme oxygenase signaling in various disorders. Mol Cell Biochem 232: 149-57 (2002)

163. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Biotechnology 24: 145-9 (1992)

164. Troyano A, Fernández C, Sancho P, de Blas E, Aller P. Effect of glutathione depletion on antitumor drug toxicity (apoptosis and necrosis) in U-937 human promonocytic cells. The role of intracellular oxidation. J Biol Chem 276: 47107-15 (2001)

165. Troyano A, Sancho P, Fernández C, de Blas E, Bernardi P, Aller P. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. Cell Death Differ 10: 889-98 (2003)

166. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, Doig GS, Morimatsu H, Morgera S, Schetz M, Tan I, Bouman C, Macedo E, Gibney N, Tolwani A, Ronco C; Beginning and Ending Supportive Therapy for the Kidney (BEST Kidney) Investigators. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. JAMA 294: 813-8 (2005)

167. Uchino S. The epidemiology of acute renal failure in the world. Curr Opin Crit Care 12: 538-43 (2006)

168. Valko M, Morris H, Cronin MT. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr Med Chem 12: 1161-208 (2005)

169. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 160: 1-40 (2006)

170. Von Bonsdorff L, Lindeberg E, Sahlstedt L, Lehto J, Parkkinen J. Bleomycin-detectable iron assay for non-transferrin-bound iron in hematologic malignancies. Clin Chem 48: 307-14 (2002)

171. Weidemann A, Bernhardt WM, Klanke B, Daniel C, Buchholz B, Câmpean V, Amann K, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Willam C. HIF activation protects from acute kidney injury. J Am Soc Nephrol 19: 486-94 (2008)

172. Welch KD, Davis TZ, Aust SD. Iron autoxidation and free radical generation: effects of buffers, ligands, and chelators. Arch Biochem Biophys 397: 360-9 (2002)

173. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. Am J Med Sci 334: 115-24 (2007)

174. Ympa YP, Sakr Y, Reinhart K, Vincent JL. Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature. Am J Med 118: 827-32 (2005)

175. Yu F, Megyesi J, Safirstein RL, Price PM. Identification of the functional domain of p21(WAF1/CIP1) that protects cells from Cisplatin cytotoxicity. Am J Physiol Renal Physiol 289: 514-20 (2005)

176. Zhang B, Ramesh G, Norbury CC, Reeves WB. Cisplatin-induced nephrotoxicity is mediated by tumor necrosis factor-alpha produced by renal parenchymal cells. Kidney Int 72: 37-44 (2007)

177. Zhang K. Integration of ER stress, oxidative stress and the inflammatory response in health and disease. Int J Clin Exp Med 3: 33-40 (2010)

178. Zhukov A, Ingelman-Sundberg M. Relationship between cytochrome P450 catalytic cycling and stability: fast degradation of ethanol-inducible cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) in hepatoma cells is abolished by inactivation of its electron donor NADPH-cytochrome P450 reductase 340: 453-8 (1999)

Danksagung

Mein besonderer Dank gebührt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Professor Dr. Thomas Wirth für die Überlassung dieses interessanten Themas, die fachlichen Ratschläge und Anregungen sowie für die gewährte Unterstützung und Förderung dieser Arbeit,

Dr. Thomas Haehner und **Dr. Torsten Diesinger** für ihre stete fachliche und moralische Betreuung und Unterstützung während der gesamten Zeit, die dieses Projekt verschlang. Darüber hinaus vielen Dank für das Heranführen an wissenschaftliches Arbeiten und die Tätigkeiten im Labor,

Den **Mitarbeitern** des Instituts für Physiologische Chemie für ihre freundliche und kompetente Hilfe in allen Lebenslagen,

Sebastian Bergler, dessen Unterstützung mir die vielen Stunden im Labor sehr viel erträglicher gemacht hat und der damit einen großen Anteil am Zustandekommen dieser Arbeit trägt,

und schließlich den wichtigsten Menschen in meinem Leben: **Meinen Eltern, meiner Schwester** und **meiner Freundin**, auf deren liebevollen Rückhalt ich immer vertrauen konnte und die nie die Geduld mit mir verloren haben.