

**Hypoxische Schädigung proximaler Nierentubuli:
Zelluläre Mechanismen,
Protektion und Regeneration**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr.rer.nat.
des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur
an der
Universität Essen

vorgelegt von
Bettina Lange

aus Essen

Oktober 2001

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden im Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Nieren und Hochdruckkrankheiten des Universitätsklinikums der Universität Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. de Groot

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Ch. Redies

3. Gutachter:

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. H. Schuhmacher

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Februar 2002

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1.	Das Hypoxie-induzierte akute Nierenversagen, Definition und Relevanz	1
1.2.	Der proximale Tubulus beim Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagen	2
1.3.	Intrazelluläre Mechanismen der hypoxischen Schädigung	2
1.4.	Bedeutung von Calcium bei der hypoxischen Schädigung	5
1.5.	Protektion und Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen	7
1.6.	Fragestellungen	11
2.	Material	
2.1.	Versuchstiere und Zelllinien	13
2.2.	Chemikalien	13
2.3.	Lösungen	13
2.3.1.	Lösungen zur Isolation proximaler Tubuli	13
2.3.2.	Lösungen zur Untersuchung individueller proximaler Tubuli	14
2.3.3.	Lösungen zur Kultivierung von Tubuluszellen	14
2.3.4.	Lösungen zur Untersuchung kultivierter Tubuluszellen	15
2.4.	Gefäße, Plastikwaren und Einmalartikel	16
2.5.	Geräte	16
3.	Methoden	
3.1.	Isolation proximaler Tubuli der Ratte	18
3.2.	Untersuchungen proximaler Tubuli in Suspension	19
3.2.1.	Induktion der Hypoxie und Ablauf der Untersuchungen	19
3.2.2.	Morphologische Begutachtung und Kontrolle der Vitalität der Tubuli	20
3.2.3.	Nachweis der Hypoxie	20
3.2.4.	LDH-Freisetzung	20
3.2.5.	Zellulärer Kalium-Gehalt	21
3.2.6.	Zellulärer ATP-Gehalt	21
3.2.7.	Malondialdehyd-Bildung	22
3.3.	Untersuchung individueller proximaler Tubuli mit digitaler Bildverarbeitung	22
3.3.1.	Digitales Bildverarbeitungssystem	22
3.3.1.1.	Überblick über das digitale Bildverarbeitungssystem	22
3.3.1.2.	Anforderungen an die Perfusionskammer	24
3.3.1.3.	Konstruktion der Perfusionskammer	24
3.3.1.4.	Konstruktion und Test des Kammereinsatzes	25
3.3.1.5.	Das digitale Bildverarbeitungssystem	27
3.3.1.6.	Steuerung der Datenaufnahme und Datenauswertung	28
3.3.2.	Fluoreszenzspektroskopische Messungen	29
3.3.2.1.	Ablauf der Untersuchungen	29
3.3.2.2.	NADH-assoziierte Autofluoreszenz	30
3.3.2.3.	Freie intrazelluläre Calciumkonzentration	30
3.3.2.4.	Propidium Jodid-Akkumulation in den Zellkernen	31
3.4.	Untersuchungen an kultivierten Tubuluszellen	33
3.4.1.	Kultivierungsbedingungen für LLC-PK ₁ -Zellen	33
3.4.2.	Kultivierungsbedingungen für OK-Zellen	33

3.4.3.	Reversible ATP-Depletion	34
3.4.4.	Zellulärer ATP-Gehalt	34
3.4.5.	MAP-Kinase Aktivität	34
3.4.6.	[³ H]-Thymidin-Einbau	35
3.4.7.	cAMP-Akkumulation	35
3.4.8.	Nachweis der Apoptose durch DNS-Fragmentierung	36
3.4.9.	Nachweis der Apoptose durch Apoptotische Körperchen	36
3.4.10.	Untersuchungen der intrazellulären Calcium-Speicher	36
3.5.	Nachweis der Spezifität der verwendeten Substanzen	37
3.6.	Statistische Auswertung	37
4.	Ergebnisse	
4.1.	Untersuchungen isolierter proximaler Tubuli in Suspension	38
4.1.1.	Morphologische Begutachtung und Vitalität	38
4.1.2.	Sauerstoffpartialdruck bei Hypoxie in Suspension	38
4.1.3.	LDH-Freisetzung durch Hypoxie	38
4.1.4.	Zellulärer Kalium-Gehalt bei Hypoxie	44
4.1.5.	Zellulärer ATP-Gehalt bei Hypoxie	44
4.1.6.	Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie	44
4.1.7.	Abbau von exogenem ATP in der Tubulussuspension	47
4.1.8.	Die Wirkung von ATP und der Abbauprodukte von ATP	47
4.1.9.	Die Wirkung von Quercetin	47
4.1.10.	Untersuchung der Spezifität von ATP, ADP, AMP und Quercetin	52
4.2.	Untersuchung individueller proximaler Tubuli mit digitaler Bildverarbeitung	52
4.2.1.	Die Perfusionskammer	52
4.2.2.	Untersuchungen der verschiedenen Schweregrade der Hypoxie	52
4.2.2.1.	Anstieg der Autofluoreszenz	52
4.2.2.2.	Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration	57
4.2.2.3.	Die strukturelle Zellschädigung	57
4.2.3.	Die Wirkung von ATP	62
4.2.3.1.	Die Wirkung von ATP auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration individueller proximaler Tubuli	62
4.3	Untersuchungen an kultivierten Tubuluszellen	62
4.3.1.	ATP-Depletion und Erholung an LLC-PK ₁ -Zellen als Modell für eine Hypoxie mit anschließender Erholung	62
4.3.1.1.	Zellulärer ATP-Gehalt bei Depletion und Erholung	62
4.3.1.2.	Zellschädigung bei ATP-Depletion und Erholung	62
4.3.1.3.	Die MAP-Kinase Aktivität bei ATP-Depletion und Erholung	62
4.3.1.4.	Apoptose bei ATP-Depletion und Erholung	66
4.3.1.5.	Zellwachstum bei ATP-Depletion und Erholung	66
4.3.2.	Der Einfluß protektiver Substanzen bei ATP-Depletion und Erholung untersucht an LLC-PK ₁ -Zellen	66
4.3.2.1.	Die Wirkung von ATP und Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) auf die MAP-Kinase Aktivität	66
4.3.2.2.	Die Wirkung von Glycin und Quercetin auf die MAP-Kinase Aktivität	68
4.3.2.3.	Die Wirkung auf die intrazellulären Calcium-Speicher	68
4.3.3.	Die Wirkung von β -Adrenoceptor Stimulation untersucht an OK-Zellen	68
4.3.3.1.	Die Wirkung von Adrenoceptor Stimulation auf den Zeitverlauf und die Konzentrationsabhängigkeit der MAP-Kinase Aktivierung	68
4.3.3.2.	Die Wirkung von Adrenoceptor-Agonisten und -Antagonisten auf die	71

4.3.3.3.	Adrenalin vermittelte Stimulation der MAP-Kinase Aktivität Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nach Pertussistoxin- Vorbehandlung	71
4.3.3.4.	Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nach PMA-Vorbehandlung	74
4.3.3.5.	Spezifität der MAP-Kinase Aktivierung	74
4.3.3.6.	cAMP-Akkumulation	74
4.3.3.7.	[³ H]-Thymidin-Einbau	74
5.	Diskussion	
5.1.	Strukturelle und funktionelle Folgen der hypoxischen Schädigung	77
5.2.	Verschiedene Schweregrade der Hypoxie	77
5.3.	Die Wirkung protektiver Substanzen	84
5.3.1.	Die Wirkung von ATP	84
5.3.2.	Die Wirkung von Quercetin	85
5.4.	Die Regeneration kultivierter Tubuluszellen	86
5.5.	Der Einfluß von β -Adrenoceptoren auf die Proliferation proximaler Tubuluszellen	89
6.	Zusammenfassung	93
7.	Literatur	95
8.	Lebenslauf	106
9.	Danksagungen	107

Abbildungsverzeichniss

Einleitung

Abb. 1.1.	Hypoxie-induziertes akutes Nierenversagen	3
Abb. 1.2.	Strukturelle Folgen der Hypoxie	4
Abb. 1.3.	Aktivierung und Regulation der MAP-Kinase	9

Methoden

Abb. 3.1.	Perfusion der Niere	18
Abb. 3.2.	Das digitale Bildverarbeitungssystem	23
Abb. 3.3.	Die Perfusionskammer und die konstruierten Kammereinsätze	26
Abb. 3.4.	Bestimmung struktureller Zellschäden mittels Propidium Jodid	32

Ergebnisse

Abb. 4.1.	Isolation proximaler Tubuli	39
Abb. 4.2.	Hypoxie-induzierter Abfall des Sauerstoffpartialdruckes proximaler Tubuli in Suspension	40
Abb. 4.3.	Strukturelle Zellschädigung proximaler Tubuli unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	41
Abb. 4.4.	LDH-Freisetzung durch Hypoxie	42
Abb. 4.5.	Hypoxische Schädigung frisch isolierter proximaler Tubuli in Suspension	43
Abb. 4.6.	Der zelluläre Kalium-Gehalt bei Hypoxie	45
Abb. 4.7.	Der zelluläre ATP-Gehalt bei Hypoxie	46
Abb. 4.8.	Die Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie	48
Abb. 4.9.	Die Wirkung von ATP auf proximale Tubuli in Suspension	49
Abb. 4.10.	Die Wirkung von Quercetin auf proximale Tubuli in Suspension	50

Abb. 4.11.	Die Wirkung von Quercetin auf die Malondialdehyd-Bildung	51
Abb. 4.12.	Untersuchung auf Spezifität der verwendeten Substanzen	53
Abb. 4.13.	Die Perfusionskammer	54
Abb. 4.14.	Reversibler Anstieg der Autofluoreszenz bei Hypoxie	55
Abb. 4.15.	Sauerstoffpartialdruck-Wirkungs Beziehung der NADH-assozierten Autofluoreszenz	56
Abb. 4.16.	Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie	58
Abb. 4.17.	Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie	59
Abb. 4.18.	Nachweis der Zellschädigung mit Propidium Jodid	60
Abb. 4.19.	Zellschädigung bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie	61
Abb. 4.20.	Die Wirkung von ATP auf die $[Ca^{2+}]_i$ individueller proximaler Tubuli	63
Abb. 4.21.	Zellulärer ATP-Gehalt bei Depletion und Erholung	64
Abb. 4.22.	Die Wirkung von ATP und EGF auf die MAP-Kinase Aktivität	65
Abb. 4.23.	Untersuchung auf DNS-Fragmentierung	67
Abb. 4.24.	Die Folgen von ATP-Depletion und Erholung auf die intrazellulären Calcium-Speicher	69
Abb. 4.25.	Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der MAP-Kinase Aktivierung bei Adrenoceptor Stimulation	70
Abb. 4.26.	Adrenoceptor stimulierte MAP-Kinase Aktivität bei Gabe verschiedener Adrenoceptor-Antagonisten	72
Abb. 4.27.	Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nach Pertussistoxin- und PMA-Vorbehandlung	73
Abb. 4.28.	cAMP-Akkumulation	75
Abb. 4.29.	$[^3H]$ -Thymidin-Einbau	76
	Diskussion	
Abb. 5.1.	Calcium-Regulation bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie	83

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ADP	Adenosin 5-Diphosphat
ATP	Adenosin 5-Triphosphat
AMP	Adenosin 5-Monophosphat
β	Verhältnis von Fura-2 freier Säure (in Abwesenheit von Ca^{2+}) und Fura-2 Ca^{2+} gesättigt bei 380 nm.
BHT	Butyliertes Hydroxytoluen
BSA	Rinderserumalbumin
Ca^{2+}	Calcium-Ion
$[Ca^{2+}]_i$	freie intrazelluläre Calciumkonzentration
CAMP	zyklisches Adenosin Monophosphat
CCD-chip	„Charge Coupled Device“
DNS	Deoxyribonuclein Säure
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DTT	Dithioereitol
EDTA	Ethylen dinitrilo Tetra Essigsäure
EGTA	Ethylen Glycol-bis(B-Aminoethylether)N,N,N',N´Tetra Essigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor („epidermal growth factor“)
ERK1	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase 1
ERK2	Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase 2
FKS	Fötale Kälberserum
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor

HEPES	N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethansulfon Säure
HOE	Hoechst 33342
Ig G	Imunglobulin G
JNK	JUN N-terminale/p38-Kinase
K⁺	Kalium-Ion
K_D	(Ca ²⁺) Dissoziationskonstante, 224 nmol/l (Gryniewicz et al. 1985)
MAP	Mitogen Aktivated Protein Kinase
MBP	Myelin Basic Protein
MDA	Malondialdehyd
MEK	= MAP
MEM	Eagles Medium
mmHg	Milimeter-Quecksilbersäule, 1 mmHg = 133,322 Pa
MOPS	3-[N-Morpholino]propansulfon Säure
Na⁺	Natrium-Ion
NAD⁺	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinamid Adenin Dinucleotid (reduzierte Form)
NOS	<u>NO</u> -Synthetase
PC	Personalcomputer
PI	Propidium Jodid
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKI	Proteinkinase A Inhibitor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pO₂	Sauerstoffpartialdruck
PTK	Nicht-Rezeptor-gekoppelte-Tyrosinkinasen
R	das Verhältnis der Intensitäten von 340/380 nm zu dem jeweiligen Zeitpunkt
R	Korrelationskoeffizient
R_{max}	R bei Ca ²⁺ -Sättigung
R_{min}	R in Abwesenheit von Ca ²⁺
ROI	„Region of interest“
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RTK	Rezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase Aktivität
SAPK	Stress Aktivierte Proteinkinase/p54
TBA	2-Thiobarbitursäure
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminoethan,2-Amino-2-hydroxy-methylpropan 1,3, diol

Publikationsverzeichnis

Diplomarbeit:

B. Lange (1995):
Die Wirkung von Digitoxigenin und Iso-Digitoxigenin auf Herzpräparate von Säugetieren.

Veröffentlichte Artikel:

Kribben A, Herget-Rosenthal S, Lange B, Erdbrügger W, Philipp Th, Michel MC (1997):
α₂-Adrenoceptors in opossum kidney cells couple to stimulation of mitogen-activated protein kinase independent of adenylyl cyclase inhibition. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356: 225-232.

Kribben A, Herget-Rosenthal S, Lange B, Michel MC, Philipp Th (1998): Stimulation of mitogen activated protein kinase and cellular proliferation in renal proximal tubular cells. *Ren. Fail.* 20:229-234.

Lange B, Philipp Th, Kribben A (2000): Activation of MAP kinase during recovery following chemical hypoxia in LLC-PK1 cells. *Cell. Phys. Biochem.* 10: 73-80.

Beiträge zu Kongressen:

Lange B, Herget S, Philipp Th, Kribben A (1997): Effects of hypoxia and recovery on mitogen-activated protein kinase in LLC-PK1 cells. *Nieren Hochdruck* 26: 425.

Feldkamp T, Lange B, Philipp Th, Kribben A (1998): Effect of different nucleotides on hypoxic injury in isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 21:93.

Kribben A, Kuhlmann MK, Jakoby S, Pietruck F, Lange B, Köhler H, Philipp Th (1998): Quercetin protects against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 21:98.

Pietruck F, Lange B, Jakoby S, Philipp Th, Kribben A (1999): Transport of the fluorescent organic cation 4-Di-1-ASP⁺ in isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 22:198.

Pietruck F, Kuhlmann MK, Lange B, Köhler H, Philipp Th, Kribben A (1999): Hypoxia induces lipid peroxidation in freshly isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 22:319.

Lange B, Pietruck F, Philipp Th, Kribben A (1999): Early increase of cytosolic Ca²⁺ in mild hypoxic injury in isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 22:326.

Feldkamp T, Lange B, Philipp Th, Kribben A (1999): Protection against hypoxic injury via P2y-receptors in isolated rat proximal tubules. *Kidney Blood Press Res* 22:326.

Pietruck F, Kuhlmann M, Lange B, Köhler H, Philipp Th, Kribben A (1999): Lipid peroxidation is induced by hypoxia in freshly isolated rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 10:638A-639A.

Lange B, Pietruck F, Hörbelt M, Philipp Th, Kribben A (2000): Oxygen threshold for increase of free intracellular calcium in isolated rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 11:603A.

Pietruck F, Lange B, Jakoby S, Philipp Th (2000): Hypoxia inhibits organic cation transport in freshly isolated rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 11:594A.

Pietruck F, Blaschke S, Lange B, Geng H, Philipp Th, Kribben A (2001): Hypoxia reversibly inhibits organic cation transport in isolated rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 12:790A.

Pietruck F, Blaschke S, Lange B, Geng H, Philipp Th, Kribben A (2001): Organic cation transport in isolated rat proximal tubules is reversibly inhibited by hypoxia. *Kidney Blood Press Res* 24:350.

1. Einleitung

1.1. Das Hypoxie-induzierte akute Nierenversagen, Definition und Relevanz

Das akute Nierenversagen verursacht eine rasche Reduktion der Nierenfunktion, die zu einer Retention harnpflichtiger Substanzen einschließlich Harnstoff und Kreatinin führt (Lameire und Vanholder 2001, Kribben und Philipp 1997, Thadhani et al. 1996). Die Ursachen des akuten Nierenversagens sind vielfältig. Liano und Pascual (Liano und Pascual 1999) zählen in einer Übersicht mehr als 50 verschiedene Ursachen auf. Die häufigste ist jedoch in 60% der Fälle der durch unzureichende Perfusion der Niere (Ischämie) hervorgerufene Sauerstoffmangel (Hypoxie). Hypoxie kann durch intravasale Volumendepletion, Schock mit arterieller Hypertonie, ein vermindertes effektives intravasales Volumen, das Hepatorenale Syndrom, Sepsis, nephrotoxische Medikamente, Erkrankungen der großen und kleinen Nierengefäße hervorgerufen werden (Thadhani et al. 1996). Die zweithäufigste Ursache in 25% der Fälle ist die Schädigung der Niere durch toxische Ursachen. Der Übergang zwischen ischämischen und toxischen Ursachen ist fließend und es können auch Mischformen auftreten.

Das akute Nierenversagen tritt bei 2-5% aller Patienten in stationärer Behandlung auf (Alkhunaizi und Schrier 1996, Liano et al. 1996), im Bereich der Intensivmedizin steigt der Anteil sogar auf 10-30% (Binswanger 1997, Alkhunaizi und Schrier 1996, Corwine und Bonventre 1988). Als Folge immer komplizierterer Interventionen bei zunehmend multimorbiden Patienten nimmt die Anzahl der Patienten mit akutem Nierenversagen auch weiterhin kontinuierlich zu (Binswanger 1997, Alkhunaizi und Schrier 1996). Trotz großer Fortschritte in der Behandlung hat sich in den letzten 40 Jahren der Anteil der Patienten, die am akuten Nierenversagen versterben, nicht wesentlich verringert. Noch immer sterben ca. 50% der betroffenen Patienten (Sural et al. 2000, Alkhunaizi und Schrier 1996, Liano et al. 1996). Tritt das akute Nierenversagen in Verbindung mit einer anderen Erkrankung auf, so ist die Wahrscheinlichkeit an dieser Erkrankung zu versterben 5-6 mal größer als bei der selben Erkrankung ohne akutes Nierenversagen (Levy et al. 1996). Dies ist nicht durch die zugrundeliegende Erkrankung bedingt, sondern durch den Anstieg der Wahrscheinlichkeit durch das akute Nierenversagen weitere extrarenale Komplikationen zu entwickeln, die letztendlich zum Tod führen (Levy et al. 1996, Chertow et al. 1998). Das akute Nierenversagen ist somit als eigenständiger Risikofaktor zu betrachten und nicht nur als Folge anderer Erkrankungen.

Der Verlauf des akuten Nierenversagens ist sehr unterschiedlich. Er reicht von einem symptomlosen Anstieg der Kreatininkonzentration für einige Tage mit einer vollständigen Erholung der Nierenfunktion, bis zu einem persistierenden Verlauf über Monate, der zur Notwendigkeit einer Dialyse führt. Es besteht kein erkennbarer Zusammenhang zwischen der Schwere der zugrundeliegenden Schädigung und dem Verlauf der Erkrankung, wohl jedoch zwischen der Dauer der Funktionseinschränkung und der Letalität (Edelstein et al. 1997). Die vollständige Erholung der Nierenfunktion trotz drastischer Funktionseinschränkungen mancher Patienten belegt die Existenz reversibler Komponenten beim akuten Nierenversagen. Ein verbessertes Verständnis der Vorgänge und eine darauf aufbauende optimierte Intervention sollte die Zeitdauer des akuten Nierenversagens verkürzen, und damit die Überlebenschancen der Patienten erhöhen (Edelstein et al. 1997).

1.2. Der proximale Tubulus beim Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagen

Der proximale Tubulus wird beim Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagen am schwersten geschädigt (Kribben et al. 1999, Bonventre et al. 1998, Nissenson 1998, Bonventre 1993). Sowohl der proximale Tubulus als auch der dicke absteigende Ast der Henle'schen Schleife sind metabolisch sehr aktiv und weisen eine hohe Transportaktivität auf, unterscheiden sich jedoch in der Fähigkeit ATP zu generieren. Die Zellen des dicken absteigenden Astes der Henle'schen Schleife sind in der Lage ATP durch die Glykolyse zu generieren, die Zellen des proximalen Tubulus sind dafür jedoch allein auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen (Bagnasco et al. 1985, Guder und Ross 1984). Aus diesem Grund werden primär die Zellen des proximalen Tubulus während des Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagens geschädigt (Bonventre et al. 1998, Nissenson 1998, Bonventre 1993).

Der proximale Tubulus ist beim Menschen in der Nierenrinde lokalisiert. Diese Region ist unter physiologischen Bedingungen nur marginal oxygeniert, obwohl 20% des Herzminutenvolumens der Nierenperfusion dienen und der renale Blutfluß über einen weiten Blutdruckbereich (ca. 80-170 mmHg) autoreguliert ist. Die Versorgung des proximalen Tubulus mit Sauerstoff erfolgt über das Vas efferens des Glomerulus, so daß die Sauerstoffversorgung direkt an die Durchblutung gekoppelt ist. Ein Sauerstoffmangel durch Ischämie oder erhöhten Bedarf führt daher zu einer hypoxischen Schädigung des proximalen Tubulus.

Die tubuläre Schädigung führt durch die Ablösung von geschädigten oder letaler Zellen und Zellfragmenten aus dem Epithel zu einer Verstopfung des Tubuluslumens (tubuläre Obstruktion). Diese tubuläre Obstruktion führt zu einem Anstieg des Druckes im Tubuluslumen und einer weiter verringerten glomerulären Filtrationsrate. Durch die Verringerung der Na^+ -Rückresorption, wird das tubuloglomeruläre Feedbacksystem initiiert (Goligorsky und Lieberthal 1999). Durch die erhöhte Na^+ -Konzentration in der frühdistalen tubulären Flüssigkeit auf Höhe der Macula densa kommt es, wahrscheinlich zu einer Stimulation des Juxtaglomerulären Apparates und einer lokalen Freisetzung von Angiotensin II. Dies führt zu einer Vasokonstriktion und zu einer weiteren Verringerung der Durchblutung der Nierenrinde (Kwon et al. 1998). Gleichzeitig treten vaskuläre Schädigungen auf, die zu einer Verringerung der glomerulären Filtration und zu einer veränderten Autoregulation der Gefäße führen. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber vasokonstriktiven Stimuli (zur Übersicht Conger 1997). Als Folge führt eine Ischämie in dieser Region zu besonders schwerer Hypoxie und die Rückkehr des Blutflusses nach Ende der Ischämie ist in dieser Region verzögert (Brezis und Rosen 1985).

1.3. Intrazelluläre Mechanismen der hypoxischen Schädigung

Proximale Tubuluszellen haben einen hochgradig polarisierten Aufbau mit apikalen und basolateralen Membrandomänen. Diese Polarität ermöglicht den unter physiologischen Bedingungen stattfindenden vektoriellen Transport von Elektrolyten, Wasser und anderen Stoffen aus dem Tubuluslumen ins Körperinnere. Der Aufbau und die Aufrechterhaltung dieser hochspezialisierten Organisation ist ein dynamischer und ATP-abhängiger Prozess, der die Ausbildung und den Erhalt des Zell-Zell und Zell-Substrat Zusammenhaltes, und den zielgerichteten Einbau von Membran-komponenten beinhaltet (Molitoris und Bacallo 1999). Grundlage dieser Organisation ist ein intaktes Zytoskelett (siehe hierzu auch **Abb. 1.2.**).

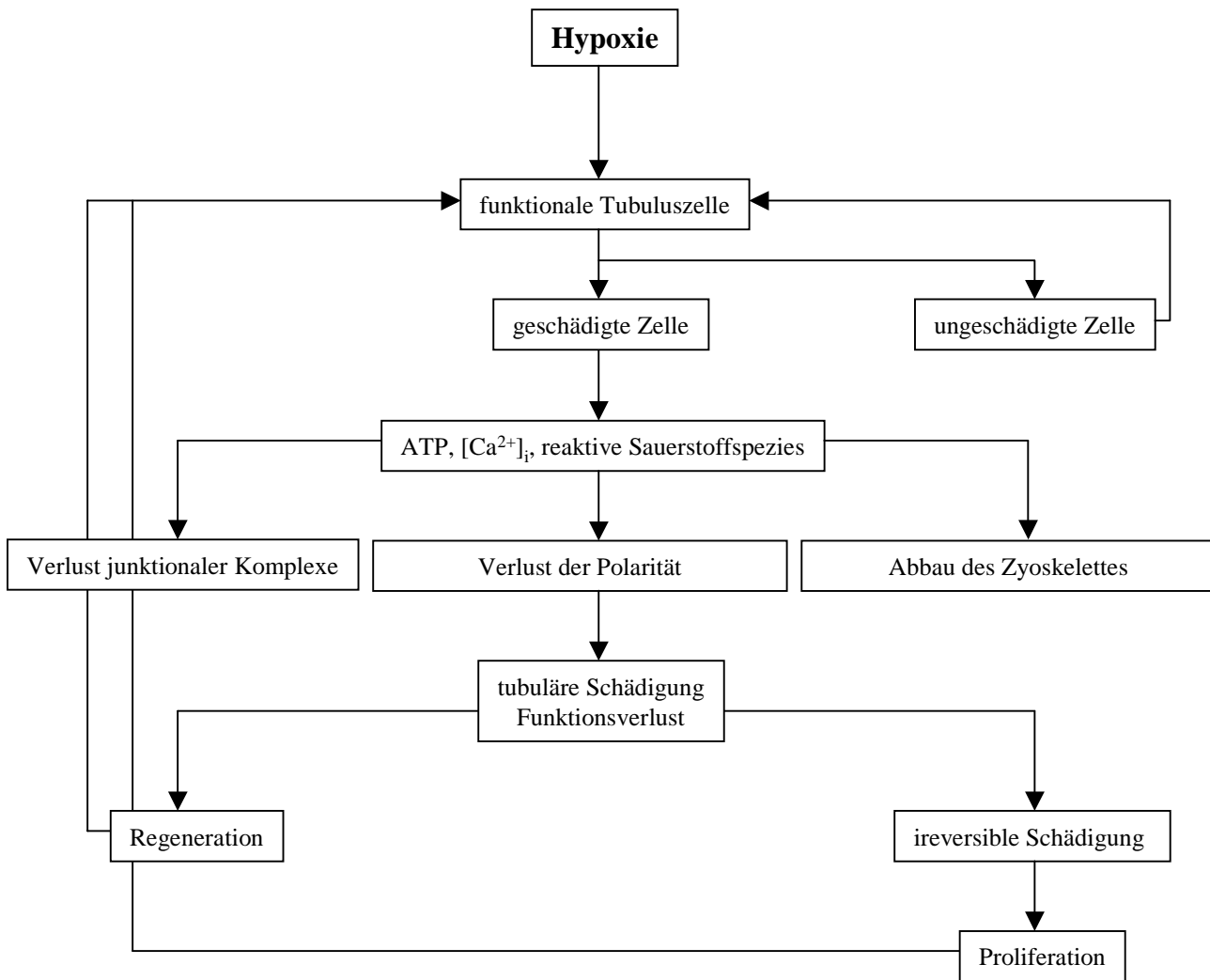


Abb. 1.1. Hypoxie-induziertes akutes Nierenversagen

Das Flußdiagramm illustriert die zelluläre Basis des Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagens. Wie in **1.3.** beschrieben führt die Hypoxie zu einer Vielzahl physiologischer und struktureller Veränderungen. Ist die Hypoxie von kurzer Dauer, so sind die Änderungen reversibel. Dauert sie jedoch an, so kommt es zur Ablösung von Zellen aus dem Epithel und zum Zelltod. Im Gegensatz zu einigen anderen Organen kann sich das geschädigte Epithel jedoch regenerieren und die normale Funktion wiederherstellen (vgl. **1.5**) (nach Bush et al. 1999).

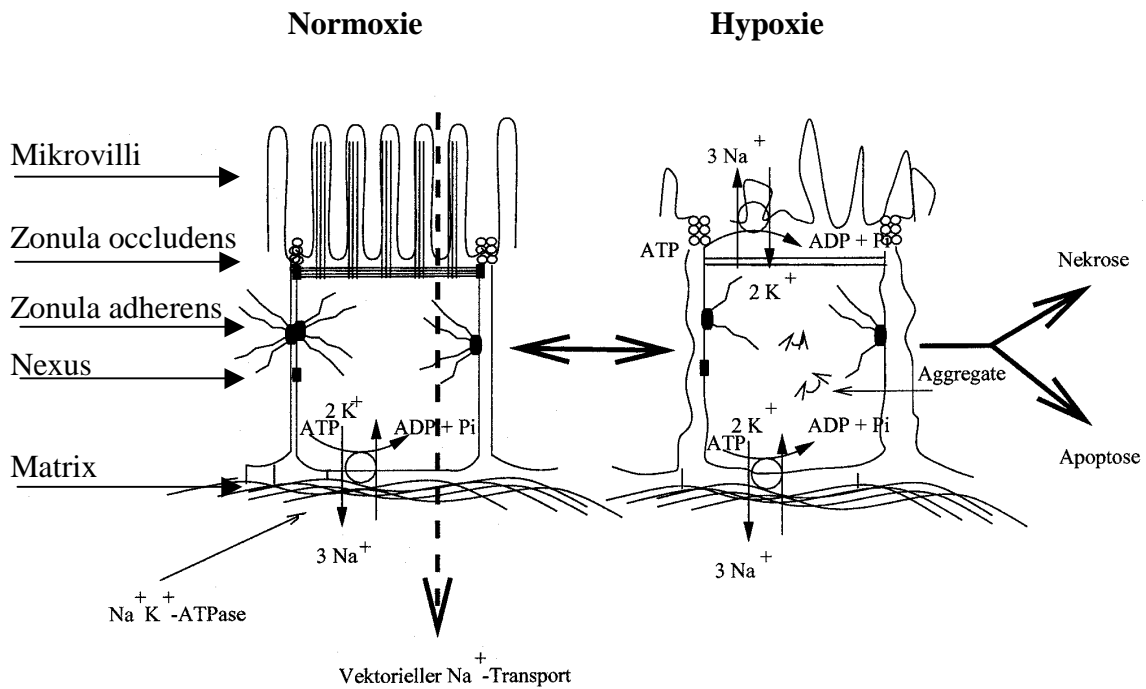


Abb. 1.2. Strukturelle Folgen der Hypoxie

Proximale Tubuluszellen besitzen einen hochgradig polarisierten Aufbau, mit Mikrovilli, Zonula occludens, Zonula adherens, Nexus und einer basolateralen Lokalisation der Na⁺/K⁺-ATPase. Dies ermöglicht den vektorialen Transport von Na-Ionen und anderen Elektrolyten aus dem Tubuluslumen ins Körperinnere. Hypoxie führt zum Verlust dieser Polarität und dadurch zur Hemmung des vektorialen Transportes (nach Molitoris und Bacallao 1999).

Während einer Hypoxie sinkt der Sauerstoffgehalt unter den kritischen Wert der für die vollständige Oxygenierung des Cytochrom c erforderlich ist (Weinberg 1991). Dadurch kommt es zur Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, zu einer Verringerung der ATP-Synthese und somit zu einem Abfall des zellulären ATP-Gehaltes. Diese ATP-Depletion kennzeichnet die frühe Phase der Hypoxie (Balaban et al. 1980, Kahng et al. 1978). Als Folge kommt es zu einer Vielzahl von strukturellen und funktionellen Veränderungen.

Diese strukturellen Veränderungen tragen zusätzlich zum ATP-Mangel zur Hemmung von Ionen-Pumpen und der indirekt ATP-abhängigen Ionen-Austauscher (Snowdowne und Borle 1985, Gmaj et al. 1979, Schatzmann 1966, Hodkin und Keynes 1955) bei. Dadurch akkumulieren Natrium-, Chlorid- und Calcium-Ionen im Zellinneren. Osmotisch strömt Wasser nach, und die Zellen schwellen an (Kribben et al. 1999, Takano et al. 1985, Mason et al. 1981).

1.4. Bedeutung von Calcium bei der hypoxischen Schädigung

Erste Hinweise auf die Bedeutung von Calcium für das akute Nierenversagen gaben tierexperimentelle Studien, in denen die Gabe von Calciumantagonisten das durch Abklemmen der Nierenarterie verursachte akute Nierenversagen abschwächte oder sogar verhinderte (Neumayer et al. 1989, Burke et al. 1984). Für diesen Effekt gab es zwei mögliche Ursachen:

1. Die durch die Hypoxie gestörte Autoregulation der Nierengefäße wird durch die Gabe von Calciumantagonisten positiv beeinflusst.
2. Es besteht eine direkte Wirkung von Calciumantagonisten auf den proximalen Tubulus.

Die erste mögliche Ursache, daß der protektive Effekt von Calciumantagonisten ausschließlich auf der Wiederherstellung der gestörten Autoregulation der Nierengefäße beruht, konnte nicht bestätigt werden, da durch die Gabe anderer Vasodilatoren wie z.B. Prostacycline die gestörte Autoregulation nicht wieder hergestellt werden konnte (Conger et al. 1988). Deshalb wurde der direkte Einfluß von Calciumantagonisten auf den proximalen Tubulus untersucht.

Da durch in vivo Studien nicht zwischen vaskulären Effekten und den Effekten, die direkt auf die Tubuluszellen ausgeübt werden, unterschieden werden kann, wurden in der Folge Methoden zur direkten Untersuchung proximaler Tubuli in Kultur oder frisch isolierter entwickelt (Lieberthal und Nigam 2000).

Zellkulturexperimente mit Tubuluszellen des Kaninchens belegten einen deutlichen Einfluß von Calcium auf die hypoxische Schädigung. Im Anschluß an eine zweistündigen starke Hypoxie kam es hierbei zu einem massiven Absterben der Zellen während der Reoxygenierung. Wurde das Calcium jedoch aus dem extrazellulären Medium entfernt, kam es zu einem signifikanten Anstieg der Anzahl überlebender Zellen (Wilson und Schrier 1986). Die Gabe von Calciumantagonisten erwies sich ebenfalls als protektiv (Schwertschlag et al. 1986). Dies führte zu der Vermutung, daß eine Hypoxie in Tubuluszellen zu einem vermehrten Calciumeinstrom, einer somit erhöhten freien intrazellulären Calciumkonzentration, und damit zu einer verstärkten Zellschädigung führt (Schrier et al. 1987). Allerdings sind kultivierte tubuläre Epithelzellen unter Standard-Zellkulturbedingungen chronisch hypoxisch und zeigen als Anpassung einen starken glykolytischen Metabolismus (Metzen et al. 1995, Gstraunthaler

et al. 1985), so daß für die Untersuchung Hypoxie-induzierter Schäden frisch isolierte proximale Tubuli geeigneter sind.

In frisch isolierten Tubuli des Kaninchens führte eine Hypoxie zu einer Erhöhung des gesamten zellulären Calciums (Takano et al. 1985, Weinberg 1985). Untersuchungen mit $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wiesen einen verstärkten Einstrom von Calcium unter hypoxischen Bedingungen, der durch Gabe der Calciumantagonisten Verapamil und Flunarizin hemmbar war, nach (Almeida et al. 1991). Das Absenken der extrazellulären Calciumkonzentration erwies sich ebenfalls als protektiv gegenüber der Hypoxie-induzierten Schädigung (Wetzels et al. 1993a). Da der zelluläre Calciumgehalt in diesen Untersuchungen durch die Atom-Absorptionsspektroskopie und die Calciumeinstrom-Messungen mit radioaktiven Isotopen bestimmt wurden, konnte in diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden, ob es durch Hypoxie zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration oder zu einer verstärkten Akkumulation von Calcium in den Mitochondrien oder anderen zellulären Kompartimenten kommt (Takano et al. 1985).

Durch die Entwicklung moderner fluoreszenzspektroskopischer Verfahren in Verbindung mit Perfusionskammern, die es ermöglichten, die freie intrazelluläre Calciumkonzentration während einer Hypoxie in individuellen proximalen Tubuli zu bestimmen, kann diese Frage untersucht werden.

In der Vergangenheit wurde sowohl ein Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration bei einer Hypoxie, wie auch unveränderte Werte beschrieben. Die Arbeiten von Kribben und Mitarbeitern belegen einen frühen, reversiblen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration vor dem Auftreten von Zellschädigungen (Kribben et al. 1994). Diese Ergebnisse wurden durch Arbeiten von Weinberg und Mitarbeitern bestätigt, die einen starken Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration während der Hypoxie in proximalen Tubuli des Kaninchens fanden, wenn Schädigungen der Zellemban durch Zugabe von Glycin verhindert wurden (Weinberg et al. 1997). Im Gegensatz dazu konnte Peters und Mitarbeiter keinen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration bei Hypoxie im proximalen Tubulus der Ratte finden, jedoch aber einen Anstieg bei Anoxie (Peters et al. 1996). Rose und Mitarbeiter beobachteten eine heterogene Veränderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration auf Anoxie in isolierten proximalen Tubuli der Ratte (Rose et al. 1994, Rose et al. 1993). Jacobs und Mitarbeiter wiederum zeigten, daß die freie intrazelluläre Calciumkonzentration weder während einer Anoxie, noch während einer chemischer Hypoxie in proximalen Tubuli des Kaninchens anstieg (Jacobs et al. 1991).

Alle angeführten Studien wurde unter verschiedenen Bedingungen ohne konsequente Messung des Sauerstoffpartialdruckes und ohne ausreichender Unterscheidung zwischen Anoxie (vollständig Abwesenheit von Sauerstoff), Hypoxie (Sauerstoffmangel) und chemischer ATP-Depletion durchgeführt, so daß der tatsächliche Schweregrad der Hypoxie ungeklärt ist. Dabei könnte der Schweregrad der Hypoxie, das heißt der Sauerstoffpartialdruck von ausschlaggebender Bedeutung für einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration sein.

Der Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration hat die Aktivierung verschiedener pathophysiologischer Mechanismen zur Folge. Hierbei sind insbesondere die Aktivierung von Phospholipase A_2 , Calpain und NO-Synthetase hervorzuheben (zum Überblick Lameire und Vanholder 2001, Kribben et al. 1999, Edelstein und Schrier 1995).

Der zellschädigende Effekt der Phospholipase A₂ beruht wahrscheinlich auf einer direkten Zerstörung der Integrität der Zellmembran durch Abbau von Phospholipiden oder auf der zytotoxischen Akkumulation von Lysophospholipiden (Zager et al. 1996, Chen et al. 1995). Substrate der Protease Calpain sind das Zytoskelett und Ankerproteine zur Zellmembran (Edelstein et al. 1997, Saido et al. 1994). Durch die Spaltung dieser Proteine trägt Calpain zu den bereits beschriebenen strukturellen Änderungen bei und erhöht die Anfälligkeit der Zelle gegenüber anderen abbauenden Enzymsystemen oder der schädigenden Wirkung von NO (Saido et al. 1994). NO-Synthetasen (NOS), zu denen die induzierbare Form iNOS und die konstitutiven Formen nNos und eNOS gehören bilden Stickstoffmonoxid (NO), daß verschiedene physiologische Funktionen besitzt (Moncada et al. 1991). Unter physiologischen Bedingungen produzieren Tubuluszellen keine nennenswerten Mengen an NO. Hypoxie führt zu einem Anstieg der NO Produktion und trägt zur hypoxischen Schädigung bei (Goligorsky und Noiri 1999, Yaqoob et al. 1996). Der Mechanismus der NO induzierten Zellschädigung ist komplex und bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch reagiert NO mit Sauerstoff oder Superoxid zu zellschädigenden Metaboliten. Die Reaktion von NO mit Superoxid zum Peroxynitrit-Anion ist hierbei hauptverantwortlich für die Zellschädigung (Beckman und Koppenol 1996), da das Peroxynitrit-Anion oxidative Zellschäden (Beckman und Koppenol 1996) verursacht und durch Nitrosylierung von Tyrosin-Resten Schlüsselproteine der Zellen schädigt (Mallozzi et al. 1997).

1.5. Protektion und Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen

Die Regeneration des proximalen Tubulus beim akutem Nierenversagen ist der entscheidende Schritt zur Wiederherstellung der Nierenfunktion (Bush et al. 1999). Je schneller und vollständiger diese Regeneration erfolgt, desto besser ist die Prognose für den Patienten (Kwon et al. 1998). Während des akuten Nierenversagens kommt es zu einer Bandbreite von Zellschädigungen, die von völlig intakten Zellen, sublethal geschädigten bis zu irreversibel geschädigten Zellen reicht (Toback 1992). Die Regeneration des proximalen Tubulus ist daher von mehreren Faktoren abhängig.

1. Von einer möglichst großen Anzahl intakt gebliebener Zellen,
2. von der Regeneration sublethal geschädigter Zellen, und
3. der Proliferation der überlebenden Zellen um die irreversible geschädigten oder abgelösten Zellen zu ersetzen und wieder ein funktionstüchtiges Epithel zu bilden (Gobe et al. 1999).

Um eine möglichst große Anzahl vitaler proximaler Tubuluszellen zu erhalten, wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl experimenteller Ansätze verwendet. Die untersuchten protektiven Mechanismen schlossen unter anderem die Gabe von Calciumantagonisten, um einen schädlichen Einstrom extrazellulären Calciums zu vermindern (Almeida et al. 1992, Neumayer et al. 1989, Burke et al. 1984), die Gabe von membranstabilisierenden Substanzen wie Glycin (Wetzels et al. 1993b, Weinberg et al. 1989) und Hemmstoffe der Phospholipasen (Bunnachak et al. 1994) und der Proteasen (Edelstein et al. 1995) ein. Trotz ermutigender Resultate in den verwendeten experimentellen Modellen gibt es bis heute keine allgemeine Therapie, die auf den dargestellten Ansätzen beruht und den natürlichen Verlauf des akuten Nierenversagens beim Menschen verändert (Kelly und Molitoris 2000). Andere mögliche Ansätze für die Therapie des akuten Nierenversagens sind die Verwendung von ATP und Radikalfängern wie Quercetin.

Untersuchungen belegen eine deutlich protektive Wirkung von ATP in vivo und in vitro in der Niere und im isolierten proximalen Tubulus des Kaninchens gegenüber der hypoxischen Schädigung (Mandel et al. 1988, Siegel et al. 1980). Jedoch stellt sich die Frage, ob für die protektive Wirkung ATP selbst oder Abbauprodukte des ATPs wie ADP, AMP und Adenosin verantwortlich sind. Diese Frage wurde bis heute nicht gezielt untersucht. Das Bioflavonoid Quercetin besitzt antioxidative Eigenschaften (Bors et al. 1990). In Untersuchungen über Ischämie und Reperfusion in der Niere erwies es sich als protektiv, ohne dass der Wirkungsmechanismus weiter untersucht wurde (Shoskes 1998).

In weiterer Ansatz für die Therapie des akuten Nierenversagens ist die gezielte Unterstützung der Regeneration der geschädigten proximalen Tubuluszellen, z.B. durch die Verwendung autokriner und parakriner Wachstumsfaktoren, die das zelluläre Wachstum verstärken (Toback 1992). Hierbei konzentrierten sich die Untersuchungen vor allem auf den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), den insulinähnlichen Wachstumsfaktor (IGF) und Erythropoetin (EPO). Obwohl diese Substanzen sich in den verwendeten experimentellen Modellen als erfolgreich erwiesen, konnte bis heute auch bei diesen Substanzen kein Erfolg beim Menschen erzielt werden (Kelly und Molitoris 2000). Untersuchungen zum Mechanismus der Regeneration beim akuten Nierenversagen wurden häufig in Tiermodellen einer renalen Ischämie untersucht (di Mari et al. 1999, Witzgal et al. 1995, Pombo et al. 1994, Oulette et al. 1990). Diese Modelle sind ausgesprochen komplex, so daß gezielte Untersuchungen zur Regeneration nach akutem Nierenversagen zunächst vorzugsweise mit kultivierten proximalen Tubuluszellen durchgeführt werden sollten (di Mari et al. 1999).

In Säugerzellen wird das Wachstum durch drei Signaltransduktionswege reguliert. Sie werden als Mitogen-Aktivierte-Protein- (MAP) Kinase Signaltransduktionswege bezeichnet (Bonventre und Force 1998, Neary 1997, Bokemeyer et al. 1996). Diese Signaltransduktionswege verlaufen über eine Kaskade von hintereinander geschalteten Proteinkinase. Ein extrazelluläres Signal wird von einem membranständigen Rezeptor registriert. Dadurch wird der Rezeptor aktiviert. Dieser gibt dann das Signal in Form einer Phosphorylierung eines Tyrosin-Restes an nachgeschalteter Effektormoleküle weiter. Als zentrale Schaltstationen dient das Ras-Protein oder andere Mitglieder der Superfamilie der Ras-Proteine (Krauss 1997). Bis zum Ras-Protein laufen die beteiligten Reaktionen überwiegend membranassoziiert ab (Neary 1997). Vom Ras-Protein aus wird das Signal mit Hilfe von Proteinkinase, die in Form einer Kaskade hintereinander geschaltet sind, ins Zellinnere geleitet. Das Signal kann so bis in den Zellkern hineingetragen werden. Als Resultat wird die Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen oder von Enzymen beobachtet, die Schlüsselreaktionen des Stoffwechsels katalysieren (Wilkinson und Milar 2000). Auf jeder Stufe dieser Proteinkinase-Kaskade ist eine positive oder negative Regulation möglich, und die Intensität eines Signals kann in weiten Grenzen moduliert werden (Krauss und Brand 1997). Es ist derzeit offen, nach welchem Mechanismus die Kopplung der Komponenten einer Proteinkinase-Kaskade erreicht wird. Denkbar ist, daß die beteiligten Proteinkinase in Multiprotein-Komplexen vorliegen oder daß eine Assoziation mit subzellulären Strukturen vorliegt (Krauss 1997).

Zwei der drei Signaltransduktionswege, der Stress-Aktivierte-Proteinkinase/p54 (SAPK) und der JUN N-terminale/p38-Kinase(JNK) Signaltransduktionsweg werden durch zellulären Streß aktiviert und führen zu Wachstumshemmung und Apoptose (Bonventre und Force 1998). Der dritte Signaltransduktionsweg ist die Extrazellulär-Signal-Regulierte-Kinase (ERK), dieser Signaltransduktionsweg führt zu zellulären Wachstum und Differenzierung (Bokemeyer et al. 1996). Der ERK Signal-transduktionsweg wird durch Stimulation von Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Kinase Aktivität, einschließlich des EGF-Rezeptors und

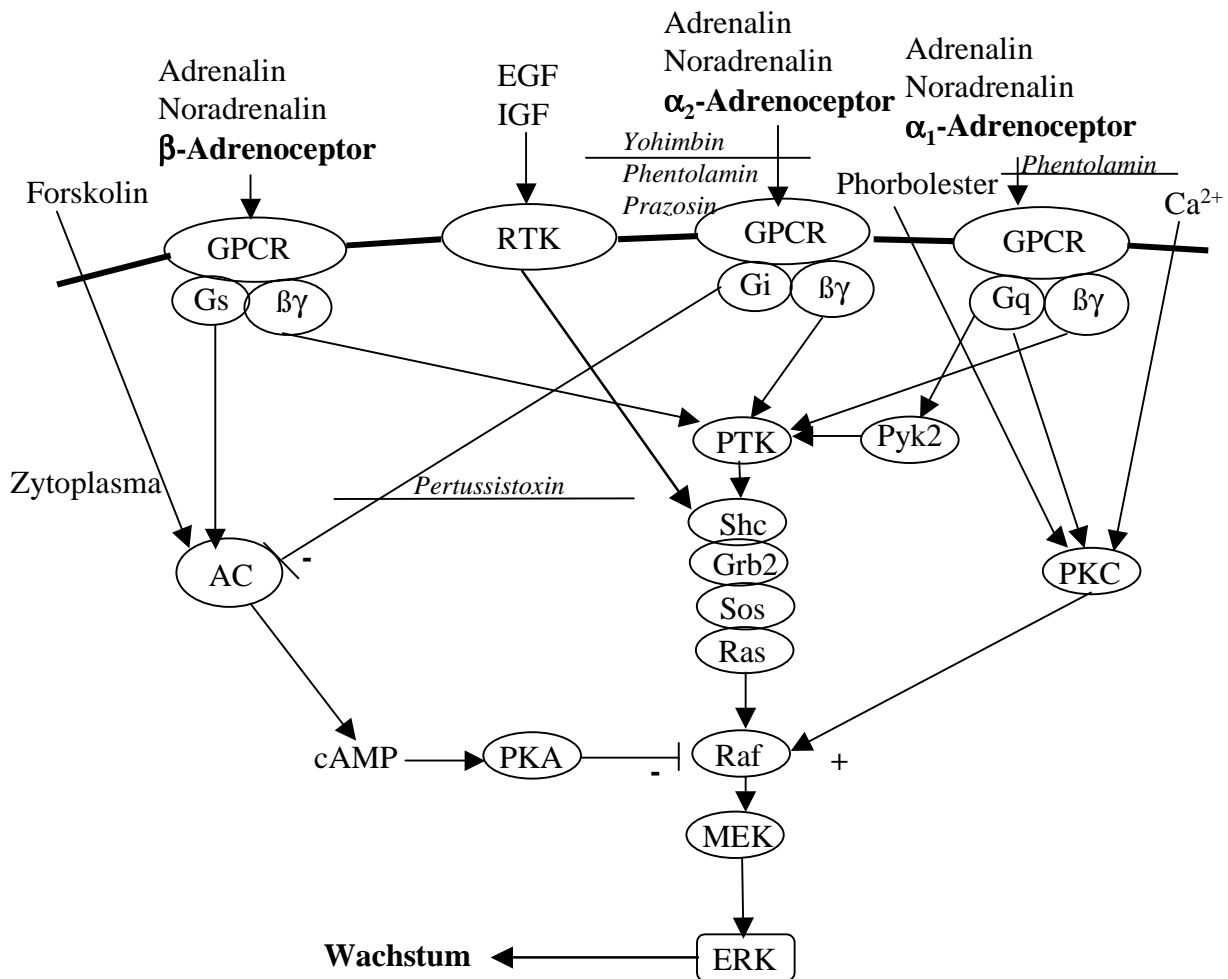


Abb. 1.3. Aktivierung und Regulation der MAP-Kinase

Aktivierung der MAP-Kinase (MEK) durch Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Kinase-Aktivität (RTK), G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) oder Phorbol ester und ihre Regulation durch sekundäre-Botenstoffe, sowie typische Hemmstoffe. Über die Aktivierung von nicht-Rezeptor-gekoppelten-Tyrosin-Kinasen (PTK) sind G-Proteine mit βγ-Untereinheiten an den MAP Signaltransduktionsweg gekoppelt. Durch Aktivierung der Calcium-abhängigen Protein Kinase Pyk2 oder durch die Proteinkinase C (PKC) führen Gq gekoppelte G-Proteine zur Aktivierung der MAP-Kinase. Die Aktivierung der Proteinkinase C führt unter Umgehung des Shc-Grb2-Sos-Ras Komplexes direkt zu einer Aktivierung von Raf. Während Proteinkinase C zu einer Aktivierung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges führt, kommt es in den meisten Zellen durch Aktivierung der Adenylzyklase (AC) und Akkumulation von cAMP über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zu einer Hemmung. Zum Zwecke der Übersichtlichkeit ist in dieser Darstellung der Shc-Grb2-Sos-Ras Komplex von der Zytoplasmamembran getrennt dargestellt (Nach Neary 1997).

durch Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, einschließlich der Adenin-Nukleotid-Rezeptoren und der Adrenoceptoren aktiviert (Kribben et al. 1998, Soltoff et al. 1998, Neary 1997, Kribben et al. 1997, Seger und Krebs 1995) (vergleiche **Abb. 1.3.**). Diese Rezeptoren geben das Signal an das ras-Protein weiter. Ras-GTP aktiviert die Serin-Threonin spezifische Raf-Kinase, die MEK (= Mitogen Aktiviert Protein-Kinase (MAP)) aktiviert. MEK wiederum phosphoryliert und aktiviert ERK1 und ERK2, welche im Zellkern Transkriptionsfaktoren aktivieren, und dadurch das Zellwachstum aktivieren (Tibbles und Woodgett 1999). Die Regulation dieses Signaltransduktionsweg ist somit ein potentieller Mediator der Regeneration nach akutem Nierenversagen, da eine Aktivierung zu einem verstärkten Zellwachstum führt.

Während die Aktivierung der MAP-Kinase durch klassische Wachstumsfaktoren gut untersucht ist, ist der Einfluß anderer Faktoren wie Katecholamine, die beim akuten Nierenversagen ausgeschüttete werden, sowie ihr Einfluß auf die Proliferation der proximalen Tubuluszellen weniger gut bekannt. Dieser ist jedoch nicht auszuschließen.

1.6. Fragestellungen

Die Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen ist der entscheidende Schritt zur Wiederherstellung der Nierenfunktion. Diese Regeneration ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

1. Vom Schweregrad der Hypoxie,
2. von der Anzahl intakter Zellen nach der Hypoxie,
3. von der Regeneration sublethal geschädigter Zellen, und
4. der Proliferation der überlebenden Zellen um die irreversibel geschädigten oder abgelösten Zellen zu ersetzen. Alle diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht!

Untersuchungen zum Schweregrad der Hypoxie an individuellen proximalen Tubuli.

1. Kommt es in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration?
2. Ab welchen Schwellenwert kommt es zu diesem postulierten Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration?
3. Ab welchem Schweregrad treten strukturelle Zellschädigungen auf?

Für diese Untersuchungen sind im Vorfeld folgende methodische Entwicklungen notwendig:

1. Die Entwicklung einer Perfusionskammer zur Erzeugung verschiedener Schweregrade der Hypoxie.
2. Die Integration eines geeigneten Messsystems zur Bestimmung des Sauerstoffpartialdruckes in dieser Perfusionskammer.
3. Die Entwicklung eines geeigneten Bildverarbeitungssystems für die geplanten Untersuchungen.

Untersuchungen zur Wirkung protektiver Substanzen bei Hypoxie zur Erhaltung einer möglichst großen Anzahl intakter Zellen an frisch isolierten proximalen Tubuli in Suspension:

1. Wie ist der Zeitverlauf der funktionellen und strukturellen Schädigung?
2. Welchen Einfluß hat der Radikalfänger Quercetin?
3. Ist die protektive Wirkung von ATP Rezeptor vermittelt?

Untersuchungen zu Regeneration des proximalen Tubulus im Anschluß an eine Hypoxie-induzierte Schädigung an kultivierten proximalen Tubuluszellen:

1. Führen ATP und EGF zu einer Aktivierung des MAP-Kinase?
2. Wie wird die MAP-Kinase reguliert?
3. Führen ATP und EGF zu einer Aktivierung des MAP-Kinase während der Hypoxie oder der Regeneration?
4. Welchen Einfluß besitzt Hypoxie und Regeneration auf intrazelluläre Calcium-Speicher?
5. Haben Quercetin und Glycin einen Einfluß während Hypoxie und Regeneration auf die MAP-Kinase?
6. Kommt es durch die Hypoxie zu Apoptose oder Nekrose?

Untersuchungen zur Proliferation bei Katecholamin-Ausschüttung an kultivierten proximalen Tubuluszellen:

1. Führt β -Adrenoceptor Stimulation zur Stimulation des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges?
2. Ist diese potentielle Stimulation G-Protein vermittelt?
3. Ist diese potentielle Stimulation c-AMP vermittelt?
4. Führt eine β -Adrenerge Stimulation zu einem verstärktem Zellwachstum?

2. Material

2.1. Versuchstiere und Zelllinien

Charles River, Sulzfeld, Deutschland: Spargue-Dawley-Ratten, männlich, 200-300 g Gewicht, Haltung im zentralen Tierlabor unter Standardbedingungen mit unbegrenztem Wasser- und Nahrungsangebot.

American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA: LLC-PK₁-Zellen, Passagen 198-218. OK-Zellen, Passagen 40-75.

2.2. Chemikalien

Aldrich, Deisenhofen, Deutschland: Dodecylbromid 97%.

Becton Dickinson Labware, Bedford, MA, USA: Cell-Tak.

Biorad, München, Deutschland: γ -Globulin Protein Standard, Imunglobulin G (Ig G).

Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland: Kollagenase A, Hyaluronidase, ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II, „Apoptotic DNS Ladder Kit“, NADH, Pyruvat, Fötale Kälberserum (FKS), N-2-hydroxyethyl-piperazine-N'-2-ethansulfon Säure (HEPES), Natriumdodecylsulfat, Bromphenolblau.

Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz: Heparin.

Merck, Darmstadt, Deutschland: MgCl₂, Trichloressigsäure, Perchloressigsäure, H₃PO₄ (Phosphorsäure), Pepstatin A, Leupeptin, Aprotinin, Titrisol (Kalium-Standard).

Messer Griesheim, Oberhausen, Deutschland: 5% CO₂ in O₂ (Carbogen) und 5% CO₂ in N₂.

Moleculare Probes, Leiden, Die Niederlande: Fura-2, Fura-2 Penta-Kalium, Acridin Orange, Pluronic, Propidium Jodid (PI) Hoechst 33342 (HOE).

New England Biolabs, Beverly, Ma, USA: MEK1 Inhibitor (PD 98059), Ionomycin.

New England Nuclear, Dreieich, Deutschland: Radioimmunnachweis für cAMP.

Serva, Heidelberg, Deutschland: Rinderserumalbumin (BSA).

Sigma, Deisenhofen, Deutschland: Natriumorthovanadat (Na₃VO₄), Ethylen Glycol-bis(B-Aminoethylether)N,N,N',N'Tetra Essigsäure (EGTA), Triton X-100, Dithioereitol (DTT), Proteinkinase A Inhibitor (PKI), Myelin Basic Protein (MBP), Adenosin 5-Triphosphat (ATP) Mg-Salz, Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), Eagles Medium (MEM), Dulbeccos Modifiziertes Eagles Medium (DMEM, 4,5 g/l Glukose), DMEM ohne Glukose, Angiotensin II, Propanolol, Yohimbin, Phenylephrin, L-Glutamin, Adenosin 5-Diphosphat (ADP), Adenosin 5-Mono-phosphat (AMP), Natriumbutyrat, Antimycin A, Natriumlaktat, Sigmacote, 1,1,3,3-Tetramethoxy-Propane (MDA Standard), Butyliertes Hydroxytoluen (BHT), 2-Thiobarbitursäure (TBA), 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS).

Upstate Biotechnology Inc., Lake Placid, N.Y., USA: Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF).

Pharmacia, Uppsala, Schweden: Percoll.

Alle anderen nicht gesondert aufgeführten Chemikalien wurden über den Chemikalienhandel erworben. Sie besaßen den höchsten erhältlichen Reinheitsgrad, wenigstens jedoch Analyse Grad.

2.3. Lösungen

2.3.1. Lösungen zur Isolation proximaler Tubuli

Lösung A	Lösung B	Substanz
112,0 mmol/l	106,0 mmol/l	NaCl
25,0 mmol/l	25,0 mmol/l	NaHCO ₃
5,0 mmol/l	5,0 mmol/l	KCl
1,6 mmol/l	1,0 mmol/l	CaCl ₂
2,0 mmol/l	2,0 mmol/l	Na ₂ HPO ₄
1,2 mmol/l	1,0 mmol/l	MgSO ₄
5,0 mmol/l	5,0 mmol/l	Glukose
2,5 mmol/l	-----	Mannitol
-----	2,5 mmol/l	HEPES
1,0 mmol/l	10,0 mmol/l	Glutamin
1,0 mmol/l	10,0 mmol/l	Natriumbutyrat
1,0 mmol/l	4,0 mmol/l	Natriumlaktat

pH 7,1; mit Carbogen äquilibriert, 4°C.

Kollagenase-Hyaluronidase Lösung:

30 ml Lösung A
5 mg Kollagenase
12,5 mg Hyaluronidase
pH 7,1; mit Carbogen äquilibriert, 4°C.

Kollagenase-Lösung:

30 ml Lösung A
10 mg Kollagenase
7,5 mg Hyaluronidase
pH 7,1; mit Carbogen äquilibriert, 4°C.

BSA-Lösung:

15 ml Lösung A
0,5 g BSA
pH 7,1; mit Carbogen äquilibriert, 4°C.

100% Percoll-Lösung: 36 ml Percoll in 4 ml

112,0 mmol/l NaCl
25,0 mmol/l NaHCO₃
5,0 mmol/l KCl
2,0 mmol/l Na₂HPO₄
1,2 mmol/l MgSO₄
5,0 mmol/l Glukose
pH 7,3; mit Carbogen äquilibriert, 4°C.

45% Percoll-Lösung:

100% Percoll-Lösung mit Lösung A auf 45% verdünnt
pH 6,9, mit Carbogen äquilibriert, 4°C.
Der pH aller Lösungen wurde bei Bedarf mit 1-molarer-HCl-Lösung eingestellt.

2.3.2. Lösungen zur Untersuchung individueller proximaler Tubuli**Perfusionslösung:**

106,0 mmol/l NaCl
25,0 mmol/l NaHCO₃
5,0 mmol/l KCl
1,0 mmol/l CaCl₂
2,0 mmol/l Na₂HPO₄
1,0 mmol/l MgSO₄
5,0 mmol/l Glukose
2,5 mmol/l HEPES
1,0 mmol/l Glutamin
1,0 mmol/l Natriumbutyrat
0,4 mmol/l Natriumlaktat
Normoxie: mit 5% CO₂ in O₂ äquilibriert.
Hypoxie: mit 5% CO₂ in N₂ äquilibriert
pH 7,35-7,40; 37°C.

Der pH der Lösung wurde mit 1-molarer-NaOH-Lösung eingestellt.

2.3.3. Lösungen zur Kultivierung von Tubuluszellen

LLC-PK₁-Zellen wurden in DMEM (4,5 g/l Glukose) kultiviert, ergänzt durch:

2 mmol/l L-Glutamin
100 IE/ml Penicilin
100 mg/ml Streptomycin
8% Fötale Kälberserum

pH 7,3

OK-Zellen wurden in MEM kultiviert, ergänzt durch:

2 mmol/l L-Glutamin

100 IE/ml Penicilin
100 mg/ml Streptomycin
10% Fötale Kälberserum
pH 7,3

Phosphatgepufferte-Salzlösung (PBS):

150,0 mmol/l NaCl
42,5 mmol/l Na₂HPO₄
8,0 mmol/l NaH₂PO₄
pH 7,4

2.3.4. Lösungen zur Untersuchung kultivierter Tubuluszellen

Nachweis der Freisetzung von Laktatdehydrogenase (LDH)

Testlösung:

50,00 mmol/l KH₂PO₄ wird mit
50,00 mmol/l K₂HPO₄ auf einen pH von 7,5 titriert
Dieser Phosphatpuffer ist mehrere Wochen haltbar.

0,19 mmol/l NADH
0,60 mmol/l Pyruvat
NADH und Pyruvat werden unmittelbar vor der Messung zum Phosphatpuffer zugegeben.

Bestimmung des zellulären Kalium-Gehaltes

Ficoll/Sucrose-Lösung:

275 mmol/l Succrose
4% Ficoll
in H₂O

Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes

Probenpuffer:

100 mmol/l Tris
4 mmol/l EDTA
in H₂O
pH 7,75

Bestimmung der Malondialdehyd-Freisetzung

BHT-Lösung:

200 mmol/l Butyliertes Hydroxytoluen
(BHT)
in Ethanol

TBA-Lösung:

0,465 mmol/l 2-Thiobarbitursäure (TBA)
in H₂O

Malondialdehyd- (MDA) Stammlösung für die Standardkurve:

10 mmol/l MDA
in 1% H₂SO₄

Lösungen zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]$

Fura-2-Lösung:

5 mmol/l Fura-2 AM
5% w/vol Pluronic F12
in wasserfreiem DMSO unmittelbar vor Versuchsbeginn angesetzt.

EGTA-Lösung (zur Bestimmung von R_{min})

500 mmol/l EGTA
700 mmol/l Tris
pH 7,8. Der pH der Lösung wurde mit 1-molarer-HCl-Lösung eingestellt.

Ionomycin-Lösung (zur Bestimmung von R_{max})

1 mmol/l Ionomycin
in DMSO

Lösungen zur Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität

Lyse-Puffer:

50 mmol/l β -Glycerophosphat
100 mmol/l Na_3VO_4
2 mmol/l $MgCl_2$
1 mmol/l EGTA
0.5% Triton X-100
1 mmol/l Dithiothreitol
pH 7,5

Lösung zum Nachweis der Apoptose durch DNS-Fragmentierung

5x TBE-Puffer:

54,0 g TrisBase
25,5 g Borsäure
1 mmol/l EDTA
pH 8,0

Ladungspuffer:

100 mg Natriumdodecylsulfat
25 mg Bromphenolblau
in 7 ml H_2O gelöst und mit
3 ml Glycerin verdünnt

Der pH aller Lösungen wurde bei Bedarf entweder mit 1-molarer-NaOH- oder 1-molarer-HCl-Lösung eingestellt.

2.4. Gefäße, Plastikwaren und Einmalartikel

Cole Parma Instrument, Vernon Hills, Illinois, USA: Tygon Schläuche (sauerstoffimpermeabel).

Falcon, Heidelberg, Deutschland: Zellkulturflaschen, Petrischalen und Gewebekulturplatten.

Nunc, Wiesbaden, Deutschland: Gewebekulturplatten.

Alle anderen nicht gesondert aufgeführten Verbrauchsmaterialien wurden über den Laorbedarfshandel erworben und besaßen die erforderliche Qualität.

2.5. Geräte

Digitales Bildverarbeitungs System: Realisierung nach Spezifikation: T.I.L.L. Photonics, München, Deutschland (vergleiche: 3.3.).

75-W-Xenon-Lampe: Ushio Inc., Japan.

Gittermonochromator: T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland.

Mono-Quartz-Fiber-Lichtleiter: T.I.L.L. Photonics, Planneg, Deutschland.
Infrarot-LED: T.I.L.L. Photonics, Planneg, Deutschland.
Invers-Mikroskope: Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland.
Objektiv: 20x Fluor, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland.
semipermeablen Spiegel und Emissionsfilter: T.I.L.L. Photonics, Planneg, Deutschland.
Motorisierter Mikroskoptisch: Luigs&Neumann, Ratingen, Deutschland.
12-bit-cooled-slow-scan-frame-transfer-Kamera: T.I.L.L. Photonics, Planneg, Deutschland.
Datenaufnahme, Verarbeitung und Steuerung: Program VisIon T.I.L.L. Photonics, Planneg, Deutschland.
Luminometer: Berthold Detections Systems, Pforzeheim, Deutschland.
Mikroskope: Nikon, Düsseldorf, Deutschland, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland.
Perfusionskammer: Realisierung nach Spezifikation: Feinmechanische Werkstatt des Universitätsklinikums Essen.
Photometer und Flammenphotometer: Eppendorf, Hamburg, Deutschland: ACP5040, Pharmacia Uppsala Schweden: Ultraspec III; Instrumentation Laboratory, Bornheim, Deutschland: IL451.
Sauerstoffmessgerät: Licox, Mielkendorf, Deutschland, Basierend auf einer Clark-Typ Elektrode, Meßfehler unter 1 mmHg.
Szintilisationszähler: Beckmann, Deutschland. LS 9000.
Zentrifugen: Hettich, Tuttlingen, Deutschland: Rotanta/R und EBA 12 R; Kontron Hernle, Gosheim, Deutschland: Centrikon H-401EBA 12.

Alle anderen nicht gesondert aufgeführten Geräte wurden über den Fachhandel erworben.

3. Methoden

3.1. Isolation proximaler Tubuli der Ratte

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden nach Erteilung der entsprechenden Genehmigungen durch das Land Nordrhein-Westfalen, sowie unter der Einhaltung der „principles of laboratory animal care“ (NHI publication 86-23, überarbeitet 1985) im Nephrologischen Labor der Abteilung für Nieren- und Hochdruckkrankheiten der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Essen durchgeführt. Zur Isolation proximaler Tubuli wurden die Ratten mit 60 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal narkotisiert. Anschließend wurde das Peritoneum durch einen Schnitt entlang der Linea alba eröffnet, die Arteria mesenterica ligiert und ein Katheter in die Aorta abdominalis distal der Arteriae renales in proximaler Richtung eingeführt (vergleiche **Abb 3.1.**). Der Katheter wurde mit einem Faden fixiert und die Blutzirkulation proximal der Arteriae renalis durch eine Ligatur unterbunden. Unmittelbar danach wurden 40 ml Lösung A (Temperatur 4° C)(vergleiche **2.3.1.**) mit 2500 U/ml Heparin über den Katheter in die Aorta und durch die Nieren perfundiert.

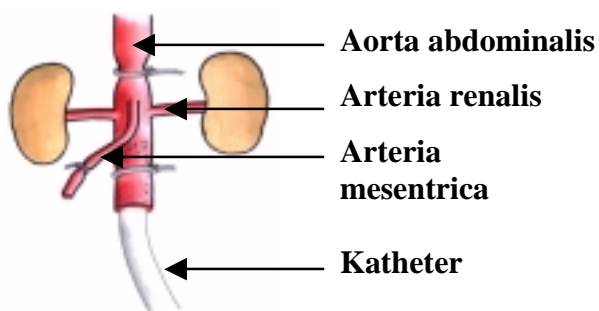


Abb. 3.1. Perfusion der Niere

Zur Isolation proximaler Tubuli der Ratte wurde ein Katheter in die Aorta abdominalis eingeführt und die Nieren mit kalter Lösung A perfundiert. Das Schema verdeutlicht die Lage des Katheters und die Lage der drei Ligaturen.

Anschließend wurde die Perfusion der Nieren mit 30 ml Kollagenase-Hyaluronidase Lösung (Temperatur 4°C) (vergleiche **2.3.1.**) fortgesetzt. Um eine Schädigung der Nieren durch einen zu hohen Perfusionsdruck zu vermeiden, wurde mit Beginn der Perfusion die Vena cava inzidiert. Nach Abschluß der Perfusion wurden die Nieren entnommen und die Ratte noch während der Narkose euthanasiert.

Der Nierencortex wurde mit einem Skapell auf einer eisgekühlten Petrischale von der restlichen Niere getrennt und mit einer Rasierklinge zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde in 50 ml Lösung A aufgenommen (Temperatur 4°C), 3-mal für jeweils 1 Minute mit 164 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Niederschlag resuspendiert.

Im Anschluß wurde der Niederschlag in 30 ml Kollagenase-Lösung (vergleiche **2.3.1.**) aufgenommen und bei 37°C im Wasserbad unter ständigem Schütteln mit 95% O₂/5% CO₂ inkubiert. Nach Erreichen des Äquilibrium betrug der pH Wert 7,3. Zu den Zeitpunkten 10, 20 und 30 Minuten wurde die Suspension mit einer Pasteurpipette durchmischt, um einzelne Tubuli vom noch bestehenden Gewebeverband abzulösen. Nach 10 und 20 Minuten wurden die in der Suspension oben schwimmenden, bereits separierten Tubuli durch Dekantieren eines

Teiles der Suspension entnommen und durch Zentrifugation für 1 Minute bei 164 g von der Kollagenase-Lösung getrennt. Der Überstand wurde wieder mit der verbliebenen restlichen Suspension vereinigt und der Niederschlag zur Inaktivierung der Kollagenase in 15 ml BSA-Lösung (vergleiche **2.3.1.**) überführt (Temperatur 4°C). Die nach 30 Minuten verbliebenen separierten Tubuli und Gewebereste in der Suspension wurden ebenfalls durch Zentrifugation von der Kollagenase-Lösung getrennt und in die BSA-Lösung überführt.

Nach 20 Minuten Inkubation in der BSA Lösung wurde die Suspension durch ein Sieb gefiltert und der Rückstand mit den noch verblieben Geweberesten verworfen. Das Filtrat wurde 1 Minute bei 164 g zentrifugiert und der Überstand verworfen, um das BSA wieder zu entfernen. Der Rückstand wurde in Lösung A resuspendiert (Temperatur 4°C).

Anschließend wurden die proximalen Tubuli von Glomerula, distalen Tubuli und Gewebetümmern durch eine isopyknische Dichtegradienten-Zentrifugation getrennt (Temperatur 4°C). Dazu wurde nach einer erneuten Zentrifugation der Niederschlag in 5 ml einer 45% Percoll-Lösung (vergleiche **2.3.1.**) resuspendiert. Diese Suspension wurde auf eine 45% Percoll-Lösung geschichtet, die mit einer 100% Percoll-Lösung (Tabelle **2.3.1.**) unterschichtet war. Die Tubuli wurden mit diesem Percoll-Gradienten für 10 Minuten bei 17500 g bei 4°C zentrifugiert. Dabei sedimentierten die einzelnen Bestandteile der Suspension entsprechend ihrer Dichte unterschiedlich weit und bildeten mehrere Banden. Die unterste Bande, unmittelbar über der 100% Percoll-Lösung wurde mit einer Pipette entnommen. Diese Bande enthielt keine Glomerula und bestand nach lichtmikroskopischen Kriterien fast ausschließlich, d.h. zu 95% aus proximalen Tubuli.

Um das Percoll wieder zu entfernen, wurden die Suspension 3-mal in insgesamt 50 ml Lösung A aufgenommen, 1 Minute bei 164 g zentrifugiert und der Niederschlag resuspendiert. Beim letzten Zentrifugationsschritt wurde der Niederschlag in Lösung-B resuspendiert (vergleiche **2.3.1.**). Diese Suspension proximaler Tubuli mit einem gesamt Proteingehalt von 1-1,5 mg Protein/ ml wurde für alle folgenden Versuche verwendet. Die Tubuli wurden in Suspension (vergleiche **3.2**) und als individuelle Tubuli (vergleiche **3.3.**) untersucht.

3.2. Untersuchungen proximaler Tubuli in Suspension

3.2.1. Induktion der Hypoxie und Ablauf der Untersuchungen

Im Anschluß an die Isolation wurde die Tubulussuspension nach Bedarf in Portionen zu je 5-6 ml in bis zu 6 silikonisierte Erlenmeyerkolben überführt. Die Suspension wurde für 5 Minuten auf Eis mit 95% O₂/5% CO₂ begast. Anschließend wurden die Erlenmeyerkolben mit Gummistopfen verschlossen und innerhalb von 5 Minuten auf Raumtemperatur erwärmt. Danach wurde die Suspension für 5 Minuten in einem Wasserbad unter ständigem schütteln auf 37°C erwärmt. Nach diesen insgesamt 15 Minuten hatte die Suspension einen pH Wert von 7,35-7,40 erreicht. Am Ende dieser Äquilibrierungsphase (= Zeitpunkt 0 Minuten) wurde mit den Untersuchungen der proximalen Tubuli in Suspension begonnen.

Die Hypoxie wurde durch Begasung der Suspension mit 95% N₂/ 5% CO₂ erzeugt. Die normoxische Kontrolle wurde mit 95% O₂/ 5% CO₂ begast. Sofern nicht anders angegeben wurden zu den Zeitpunkten 0 Minuten, 10 Minuten, 15 Minuten, 20 Minuten und 30 Minuten Proben für die Bestimmung der Laktatdehydrogenase-(LDH) Freisetzung (siehe **3.2.4.**), des zellulären Kalium-Gehaltes (siehe **3.2.5.**), des zellulären ATP-Gehaltes (siehe **3.2.6.**) und der Malondialdehyd-Freisetzung (siehe **3.2.7.**) entnommen. Zusätzlich wurden die proximalen

Tubuli zu den Zeitpunkten 0 Minuten und nach 30 Minuten unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen morphologisch begutachtet (siehe 3.2.2.). Im Anschluß an die Probenentnahme wurde die Suspension jeweils für 5 Minuten mit dem entsprechenden Gas begast und der Erlenmayerkolben anschließend wieder mit einem Gummistopfen bis zur nächsten Entnahme verschlossen.

Um festzustellen, ob die beobachteten Veränderungen reversible sind, wurde die Tubulus Suspension einer 10 oder 15 minütigen Hypoxie unterworfen und anschließend für 30 Minuten mit 95% O₂/ 5% CO₂ reoxygeniert.

3.2.2. Morphologische Begutachtung und Kontrolle der Vitalität der Tubuli

Die isolierten proximalen Tubuli wurden zur Begutachtung ihrer Qualität regelmäßig morphologisch beurteilt und zur Prüfung der Vitalität mit Trypanblau angefärbt. Dazu wurden 500 µl der Tubulussuspension mit 500 µl einer 0,8% Trypanblau-Lösung (in einer wässrigen 0,9% NaCl₂-Lösung) gemischt und die Tubuli in einem Phasenlichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung beurteilt. Da Trypanblau von Zellen nur bei Verlust der Membranintegrität der Plasmamembrane aufgenommen wird, war das Maß für die Zellschädigung die Aufnahme von Trypanblau in die Zelle. Angestrebt wurde eine reine Tubulussuspension ohne Verunreinigungen, einschließlich distaler Tubuli, mit wenigstens 95% morphologisch intakten proximalen Tubuli. Entsprechend eine Suspension im Anschluß an die Isolation nicht diesen Kriterien, so wurde sie verworfen und nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

3.2.3. Nachweis der Hypoxie

Zum Nachweis der Hypoxie wurde der Sauerstoffpartialdruck in den Erlenmayerkolben nach Induktion der Hypoxie bestimmt. Dazu wurden Mikrokathetersonden (Durchmesser ca. 0,8 mm) zur Sauerstoffmessung und zur Temperaturmessung durch den Stopfen des Erlenmayerkolbens eingeführt. Die notwendige Temperaturkompensation der verwendeten Clark-Typ Elektrode erfolgte durch die gleichzeitig gemessene Temperatur. Temperatur und Sauerstoffpartialdruck wurden mit dem Programm Licox auf einem Personalcomputer (PC) registriert. Die Sauerstoff- Mikrokathetersonde wurde vom Hersteller kalibriert geliefert und hatte einen Meßfehler von weniger als 1 mmHg. Die Güte der Sonde wurde regelmäßig mit einer sauerstofffreien Lösung (8,17 mmol/l Na₂B₄O₇ und 129,32 mmol/l Na₂SO₃ in H₂O) und mit sauerstoffgesättigter Raumluft (pO₂ ≈ 150 mmHg) überprüft. Lag hierbei der Wert für die sauerstofffreie Lösung außerhalb des angegebenen Meßfehlers wurde die Sonde nochmals mit dieser Lösung kalibriert. Gleichzeitig wurde mit diesen Verfahren die Langzeitstabilität der verwendeten Sonde überprüft. Sonden, die hierbei keinen konstanten Wert erreichten, wurden verworfen.

3.2.4. LDH-Freisetzung

Als Maß für den Verlust der Membranintegrität wurde die Freisetzung des ubiquitär vorkommenden Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) innerhalb des jeweils angegebenen Zeitraums gemessen. Zu diesem Zweck wurde der zelluläre und der extrazelluläre LDH-Gehalt bestimmt. Dafür wurde 1 ml der Tubulussuspension durch 1-minütige Zentrifugation bei 3000 g in den aus Tubuli bestehenden Niederschlag und in den aus dem extrazellulären Medium bestehenden Überstand aufgetrennt. Der Niederschlag wurde durch Zugabe von 500

µl 1% Triton X lysiert. Der LDH-Gehalt in Niederschlag und Überstand wurde photometrisch bestimmt. Bei der LDH vermittelten Reduktion von Pyruvat zu Laktat kommt es zur Oxidation von $\text{NADH} + \text{H}^+$ zu NAD^+ . Das dabei entstehende NAD^+ wurde in einem Photometer durch Absorption bei 340 nm nachgewiesen (Burnier et al. 1988). Der Prozentsatz der freigesetzten LDH wurde aus der Gesamtmenge an LDH in Überstand und Niederschlag bestimmt (Freigesetztes LDH (%) = $\text{LDH (Überstand)} / ((\text{LDH (Niederschlag)} + \text{LDH (Überstand)}) \times 100)$). Die LDH-Freisetzung wird im weiteren Verlauf als % der gesamt-LDH angegeben.

3.2.5. Zellulärer Kalium-Gehalt

Der Abfall des zellulären Kalium-Gehaltes wurde als Maß für die funktionelle Schädigung des proximalen Tubulus bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 500 µl der Tubulussuspension für 1 Minute durch eine 750 µl Schicht Dodecylbromid bei 12000 g in die darunter geschichtete 200 µl Schicht Ficoll/ Succrose zentrifugiert. Dabei treten allein vitale proximale Tubuli durch die Dodecylbromid-Schicht in die Ficoll/ Succrose-Schicht ein. Anschließend wurde die oberste Schicht, die hauptsächlich aus Puffer besteht, vollständig entfernt, und durch 500 µl H_2O ersetzt, um eine Kontamination der Ficoll/Succrose mit K^+ durch den kaliumhaltigen Puffer zu vermeiden. Nach einer 1-minütigen Zentrifugation bei 12000 g wurde die oberste Schicht abgenommen, und das Dodecylbromid abpipettiert. Die verbleibende unterste Schicht mit den sedimentierten proximalen Tubuli wurde mit 500 µl H_2O verdünnt. Aus diesen Proben wurden jeweils 2 mal 25 µl zu Bestimmung der Proteinkonzentration entnommen und der Rest bis zur Bestimmung der Kaliumkonzentration bei 20°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Die Kaliumkonzentration der Proben wurde durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

Trotz aller Vorsichtsmaßnahmen kann es bei der Aufarbeitung der Proben zu einer Überschätzung der Kaliumkonzentration durch Kontamination der Ficoll/ Sucrose-Lösung mit dem von den proximalen Tubuli bei der Zentrifugation passiv extrazellulär mitgezogenen kaliumhaltigen Puffer der Tubulussuspension kommen. Um diesen Anteil festzustellen wurde in separaten Experimenten [^{14}C] Inulin zur Tubulussuspension zugegeben und im weiteren wie oben beschrieben verfahren. Im Anschluß wurde die Menge an [^{14}C] Inulin in der Ficoll/Succrose Schicht bestimmt. Die Menge gibt Aufschluß über den passiv mitgeschleppten Anteil. Diese Experimente zeigen eine lineare Korrelation zwischen der [^{14}C] Inulin-Konzentration und der Proteinkonzentration in der Ficoll/ Succrose Schicht. Der Anteil dieses mitgezogenen, extrazellulären Kaliums liegt unter 10%. Die gemessene Kaliumkonzentration wurde, basierend auf der eingesetzten Proteinkonzentration korrigiert. Die Angaben erfolgen als nmol K^+ / mg Protein.

3.2.6. Zellulärer ATP-Gehalt

Der zelluläre ATP-Gehalt wurde als Maß für den Zustand des Energiemetabolismus bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 500 µl der Tubulussuspension entnommen und sofort mit 1 mol/l eiskalter Perchlorsäure (Stammlösung 10 mol/l) lysiert, auf der Stelle in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Bestimmung bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes wurde der Luciferase-Test verwendet (Beutler und Mathai 1967). Die Proben wurden aufgetaut und 1: 10000 mit Probenpuffer verdünnt. Die Proben wurden mit der selben Menge Luciferase-Reagenz versetzt. Das emittierte Licht wurde in einem Luminometer bestimmt. Für jede Probe wurde eine dreifach-Bestimmung durchgeführt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Die Angaben des zellulären ATP-Gehaltes erfolgen in nmol/ mg Protein.

3.2.7. Malondialdehyd-Bildung

Die Bildung von Malondialdehyd (MDA), einem Endprodukt der nicht-enzymatisch vermittelten Lipid-Peroxidation, wurde als Maß für eine strukturelle Schädigung des proximalen Tubulus bestimmt. Zu diesem Zweck wurden aus dem Überstand, der zur Bestimmung der LDH-Freisetzung verwendet wurde (vergleiche 3.2.4.) eine Probe von 200 µl entnommen und 2 µl BHT-Lösung zugesetzt. Bis zur Bestimmung der Malondialdehyd-Bildung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Der Nachweis von MDA erfolgte durch Absorptionsspektroskopie (Aust 1985). Zu diesem Zweck wurden die Proben aufgetaut und mit 200 µl 2% Phosphorsäure versetzt. 300 µl dieses Ansatzes wurden mit 600 µl der TBA-Lösung versetzt und 30 Minuten bei 100°C inkubiert. MDA reagiert mit Thiobarbitursäure bei einem pH von 2-3 unter Energiezufuhr (90-100°C) zu einem rosafarbenen Pigment mit einem Absorptionsmaximum zwischen 532 bis 535 nm. Nach einer 5-minütigen Abkühlung in Eis wurden die Absorption bei 532 nm in Glasküvetten bestimmt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Lowry (Lowry et al. 1951) mit Rinderserumalbumin als Standard. Die Angaben der Malondialdehyd-Bildung erfolgen in nmol/ mg Protein.

3.3. Untersuchung individueller proximaler Tubuli mit digitaler Bildverarbeitung

3.3.1. Digitales Bildverarbeitungssystem

3.3.1.1. Überblick über das digitale Bildverarbeitungssystem

Individuelle proximale Tubuli wurden mit einem speziell für diese Untersuchungen entwickelten digitalen Bildverarbeitungssystem untersucht. Die Abbildung 3.2. zeigt den schematischen Überblick über die Hauptkomponenten des verwendeten Systems, bestehend aus Computer, Tischsteuerung mit Steuerpult, Mikroskop, CCD-Kamera, Perfusionskammer und Monochromator mit Lichtleiter und optischer Bank.

Kernstück des Versuchsaufbaus ist eine Perfusionskammer, in die die proximalen Tubuli zur Untersuchung eingebracht werden (vergleiche 3.3.1.2.-4.). In dieser Kammer sind eine Sauerstoff- und eine Temperatursonde lokalisiert. Über das Sauerstoffmeßgerät (Licox) erfolgt die zeitgleiche Registrierung des Sauerstoffpartialdruckes und der Temperatur während des Versuches. Die anderen Komponenten sind dem eigentlichen digitalen Bildverarbeitungssystem zuzuordnen (vergleiche 3.3.1.5.).

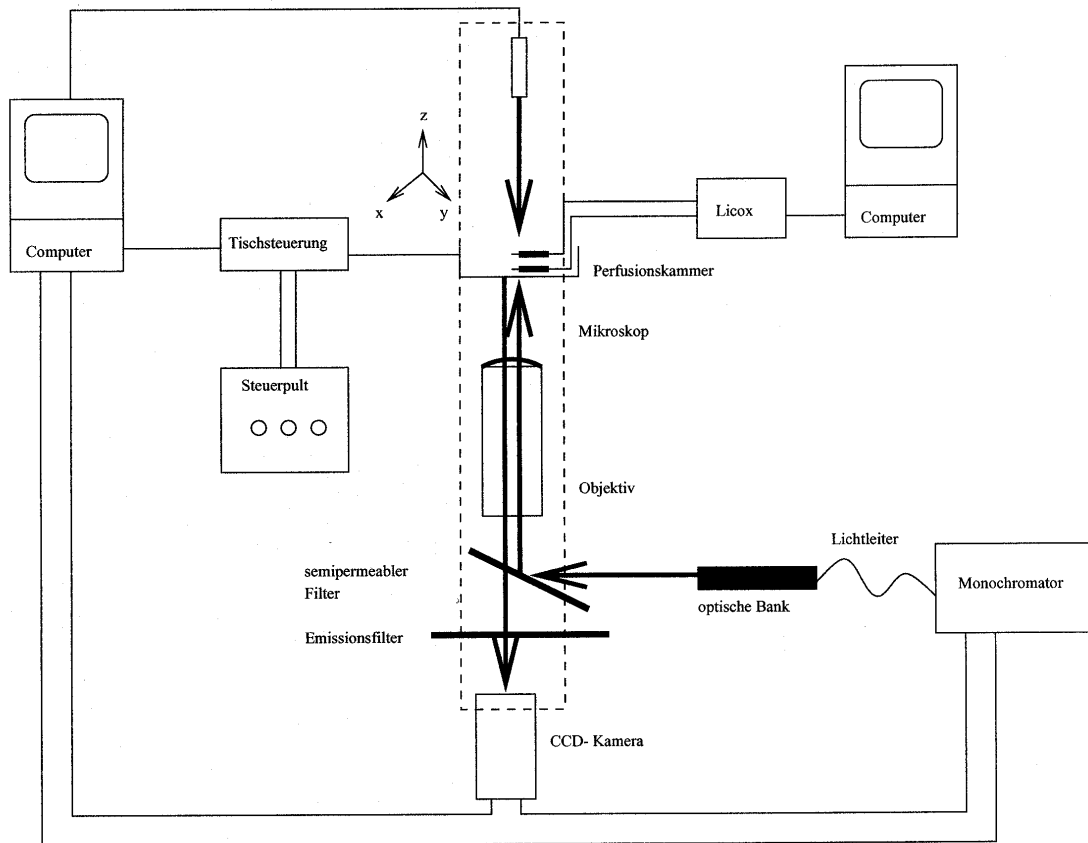


Abb. 3.2. Das digitale Bildverarbeitungssystem

Überblick über die Hauptkomponenten des digitale Bildverarbeitungssystems, bestehend aus Computer, Tischsteuerung mit Steuerpult, Mikroskop mit Objektiv, semipermeablen Spiegel und Emissionsfilter, CCD-Kamera, Perfusionskammer mit Sauerstoff- und Temperatur- Sonden, Sauerstoffmeßgerät (Licox) und Monochromator mit Lichtleiter und optischer Bank.

3.3.1.2. Anforderungen an die Perfusionskammer

Zur Untersuchung pathophysiologischer Veränderungen während einer Hypoxie ist die Verwendung einer Perfusionskammer essentiell. Nur eine Perfusionskammer erlaubt eine Variation des Sauerstoffpartialdruckes, dem die proximalen Tubuli ausgesetzt sind bei gleichbleibender Temperatur und gleichbleibendem Nährstoffgehalt. Geschlossene Systeme ohne Perfusion führen zu einem kontinuierlichen Sauerstoffverbrauch, Dissimilation von Nährstoffen und Assimilation von Stoffwechsel-Endprodukten. Somit können bei geschlossenen Systemen die Folgen der Verringerung des Nährstoffangebotes und der Ansammlung von Stoffwechsel Endprodukten nicht von den Folgen der Hypoxie unterschieden werden.

Die zu konstruierende Perfusionskammer mußte deshalb folgende Kriterien erfüllen:

1. Es muß sich um eine Perfusionskammer handeln.
2. Das Volumen der Kammer soll so klein wie möglich sein, da der Austausch der Perfusionslösung schnellstmöglich erfolgen muß.
3. Der Fluß der Perfusionslösung durch die Kammer muß sehr hoch sein, um einen schnellen Austausch der Lösung zu erreichen.
4. Die Perfusionslösung muß laminar durch die Kammer strömen. Es dürfen keine Turbulenzen auftreten, damit die proximalen Tubuli während des Versuches an ihrem Standort verbleiben und untersucht werden können.
5. Die Kammer darf keine Toträume aufweisen.
6. Es muß die Möglichkeit bestehen Sauerstoff- und Temperatursonden in die Perfusionskammer einzuführen, um eine zeitgleiche Registrierung des Sauerstoffpartialdruckes zu ermöglichen.

3.3.1.3. Konstruktion der Perfusionskammer

Das Grundprinzip der für die Versuche verwendeten Perfusionskammer basierte auf der kommerziell erhältlichen Leiden-Kammer, die modifiziert werden mußte, da die Leiden-Kammer nicht die erforderlichen Anforderungen erfüllt und einen deutlichen Totraum aufweist (Wetzels et al. 1991).

Abbildung 3.3. zeigt die eigens für die durchgeführten Untersuchungen entwickelte Perfusionskammer. Sie besteht aus einer Grundplatte, die durch zwei Schrauben auf dem Mikroskoptisch befestigt wird. Den Boden der Kammer bildet ein Deckglas, welches mit einem Quetschring an der Grundplatte befestigt wird, und die Kammer nach unten abdichtet. In die Grundplatte wird ein Ring mit dem daran befestigten Kammereinsatz eingesetzt. In diesen Ring sind die Anschlüsse für den Zulauf, den Ablauf, die Begasung der Perfusionslösung in der Kammer und eine Entlüftung eingelassen. Durch die Entlüftung können die Sauerstoff- und die Temperatursonde in die Kammer eingesetzt werden. Auf diesen Ring wird zum Verschluss der Kammer ein weiteres Deckglas aufgelegt und mit Klammern befestigt.

Die Perfusionslösung wurde mit einer Peristaltikpumpe über weitgehend sauerstoffimpermeable Tygon Schläuche in die Perfusionskammer gepumpt. Um eine Kontamination mit Sauerstoff zu verhindern, war die Kammer bis auf die notwendigen Zu- und Ausgänge vollständig geschlossen, und die Perfusionslösung in der Kammer wurde zusätzlich mit dem entsprechenden Gasgemisch überströmt, so daß die Kammer unter

leichtem Überdruck stand. Dies hat einen Einstrom von Raumluft in die Kammer verhindert. Um einen turbulenzfreien, laminaren Fluß der Perfusionslösung zu erzielen, wurde ein Kammereinsatz verwendet. Die Perfusionslösung wurde durch eine Unterdruckpumpe abgesaugt.

3.3.1.4. Konstruktion und Test des Kammereinsatzes

Der Kammereinsatz ist für den notwendigen laminaren Fluß der Perfusionslösung von entscheidender Bedeutung. Deshalb wurden verschiedene Kammereinsätze konstruiert und getestet (vergleiche: Abbildung **3.3.**).

Der erste Kammereinsatz besaß eine langgestreckt Hauptkammer, mit kleinen separaten Einlauf- und Absaugkammern. Eine Schwelle vor der Absaugkammer gewährleistete eine gleichmäßige Füllhöhe, einen laminaren Fluß der Perfusionslösung und verhinderte ein Leerlaufen der Kammer. Tests mit Farbstoffen zeigten jedoch, daß sich vor der Schwelle ein deutlicher Totraum befand. Aus diesem Grund wurde diese Konstruktion nicht verwendet.

Im zweiten Kammereinsatz wurde diese Schwelle entfernt. Die Strömungs-eigenschaften waren unverändert gut, aber die separate Einlaufkammer zeigte bei Tests mit Farbstoffen einen deutlichen Totraum. Da dieser einen schnellen Austausch der Perfusionslösung behindert wurde auch diese Konstruktion nicht verwendet.

Der dritte Kammereinsatz wurde ohne separate Kammer konstruiert. Der Einlauf der Kammer befindet sich direkt in der Hauptkammer. Dies führt zu geringfügigen Störung des laminaren Flusses der Perfusionslösung, aber es war auch kein Totraum mehr sichtbar. Aus diesem Grund wurde dieser Kammereinsatz genauer auf seine Strömungseigenschaften und seine Toträume untersucht. Dazu wurden zwei in der Literatur beschriebene Methoden verwendet (Wetzels et al. 1991).

Für die erste Methode wurde der Kammereinsatz und die zuleitenden Schläuche mit einer 140 mmol/l NaCl-Lösung befüllt und mit dieser Lösung mit 2 ml/ Minute perfundiert. Nach 3 Minuten wurde die Kammer für 15 Minuten mit einer 140 mmol/l KCl-Lösung perfundiert. Anschließend wurde für 13 Minuten mit der ursprünglichen 140 mmol/l NaCl-Lösung perfundiert. Nach Ende der Perfusion wurde die Kammer vorsichtig geöffnet und der gesamte Inhalt der Kammer entnommen. Während der Perfusion wurde jede Minute eine Probe aus dem Auslauf der Kammer entnommen und die Konzentrationen von Na^+ und K^+ flammenphotometrisch bestimmt.

Für die zweite Methode wurde der Kammereinsatz mit 400 μl einer 5 $\mu\text{mol/l}$ Fura-2-Lösung (Penta-Kalium Salz) gefüllt. Nach 75 Sekunden wurde mit der Perfusion einer Fura-2-freien-Lösung begonnen. Alle 15 Sekunden wurde die Intensität der Fluoreszenz bestimmt. Diese zweite Methode erlaubt zwar eine erhebliche höherer Auslesefrequenz der Werte als die erste Methode, erfaßt jedoch nur den Teil der Kammer, der im Fokus liegt und nicht das gesamte Kammervolumen. Aus diesem Grund ist die Verwendung dieser beiden Methoden zur Beurteilung der konstruierten Kammer notwendig.

Aus den Messungen der Ionenkonzentrationen und der Fluoreszenz-Intensität wurde der mittlere Verteilungsraum und die mittlere Halbwertszeit der Kammer berechnet. Die so getestete Kammer erfüllt alle unter **3.3.1.2.** dargelegten Kriterien (siehe auch **Abb. 4.13.**) und wurde für alle im folgenden dargestellten Versuche verwendet.

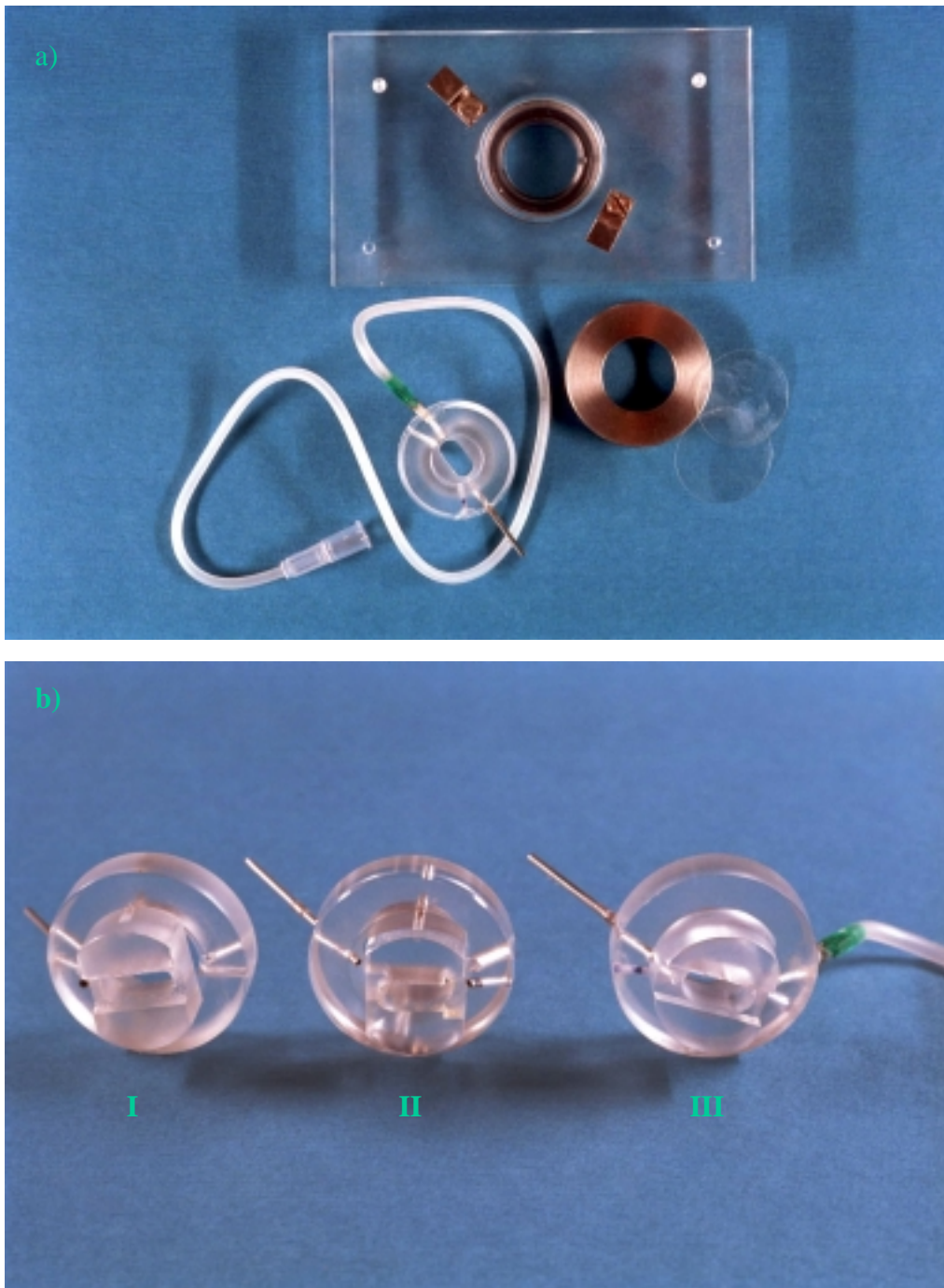


Abb. 3.3. Die Perfusionskammer und die konstruierten Kammereinsätze

- a)** Die Perfusionskammer, bestehend aus Grundplatte, Deckgläsern, Quetschring und für die Versuche verwendeten Kammereinsatz.
- b)** Drei verschiedene getestet Kammereinsätze (I, II und III).
Für die später durchgeführten Untersuchungen wurde Kammereinsatz III verwendet.

3.3.1.5. Das digitale Bildverarbeitungssystem

Das verwendete digitale Bildverarbeitungssystem wurde für die vorgestellten Untersuchungen aus Grundkomponenten zusammengestellt und optimiert. Die Auswahl und die Tests der Komponenten, sowie der in Auftrag gegebenen Computerprogramme erforderte umfangreiche Vorarbeiten. Die ausgewählten Grundkomponenten des digitalen Bildverarbeitungssystems sind in Abbildung 3.2. dargestellt. Für die vorgestellten Untersuchungen mußten diese eine Reihe von Anforderungen erfüllen:

1. Die Kamera mußte ein schnelles fokussieren über den Monitor ermöglichen. Darüber hinaus war eine große dynamische Breite des Meßsignals erforderlich. Da mit sehr unterschiedlichen zu detektierenden Intensitäten zu rechnen war, sollte eine variable Belichtung der Kamera möglich sein um eine notwendige Verwendung von Graufiltern zu vermeiden.

Da eine variable Belichtungszeit notwendig war, kam als Kamera nur eine CCD-Kamera in Frage. Ausgewählt wurde eine neuartige 12-bit-cooled-slow-scan-frame-transfer-Kamera (Imago, T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland). Diese bietet im Gegensatz zu einer konventionellen 8-bit-Kamera den Vorteil einer höheren dynamischen Breite. Zudem ermöglicht sie eine hohe Auslesefrequenz, so daß während des Versuches innerhalb von 5 Sekunden ein Gesichtsfeld ausgewählt und fokussiert werden kann.

2. Der Mikroskoptisch sollte motorisiert sein. Der motorisierte Mikroskoptisch ermöglicht es in einem Experiment eine Vielzahl von Gesichtsfeldern auszuwählen, digital zu speichern und während des Experimentes mehrfach zu verschiedenen Zeitpunkten wiederaufzufinden. Dies ermöglichte es, pro Versuch eine erheblich größere Anzahl individueller proximaler Tubuli auszuwerten. Für derartige Untersuchungen ist eine hohe Präzision erforderlich, da die Fehler beim Wiederaufsuchen eines Gesichtsfeldes direkt in die Auswertung eingehen.

Deshalb wurde ein Tisch der Firma Luigs&Neumann (Luigs&Neumann, Ratingen, Deutschland) ausgewählt. Dieser ursprüngliche für elektrophysiologische Anwendungen (Positionierung von Patch-Pipetten) konstruierte Tisch wies die beste Genauigkeit auf (der Tisch findet eine Position mit einer Genauigkeit von 1 µm wieder auf). Die Möglichkeit eines digitalen Speicherns verschiedener Gesichtsfelder und im Gegensatz zu Lösungen mit einem Joystick gezielte Bewegungen auf nur einer Achse war ebenfalls gegeben.

3. Der Monochromator sollte es ermöglichen eine Vielzahl von Fluoreszenz-indikatoren mit verschiedenen Wellenlängen anzuregen. Dabei durften keine Erschütterungen auftreten, da diese zu einer Bewegung der Tubuli und damit zu Auswertungsfehlern führen können.

Da der Monochromator eine Vielzahl von Wellenlängen erzeugen sollte wurde ein Gittermonochromator ausgewählt, da dieser eine variable Auswahl der Wellenlänge ermöglicht. Um eine erschütterungsfreie Messung zu gewährleisten sollte der Monochromator vom Mikroskop getrennt werden und das Licht über ein Glasfaserkabel geleitet werden, wobei eine Monofaser gegenüber einem Faserbündel zu bevorzugen ist. Monofasern ermöglichen im Gegensatz zu Faserbündeln eine erheblich homogenere Ausleuchtung des Gesichtsfeldes und damit eine homogene Anregung des Fluoreszenz-Indikators. Der Monochromator der Firma T.I.L.L. Photonics (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) entsprach diesen Anforderungen.

Für die vorgestellten Untersuchungen wurde der folgender Meßaufbau verwendet: Als Lichtquelle diente eine 75-W-Xenon-Lampe (Ushio Inc., Japan). Monochromatisches Licht mit einer Bandbreite von 10-nm wurde mittels des Gittermonochromators auf einen Mono-Quart-Faser-Lichtleiter projiziert und über eine optische Bank in den Strahlengang des Invers-Mikroskopes (Axiovert 100, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) eingekoppelt. Das Licht wurde über einen semipermeablen Spiegel durch das Objektiv (20x Fluor, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) auf das Objekt projiziert. Das emittierte Licht fiel durch den Emissionsfilter auf die 12-bit-cooled-slow-scan-frame-transfer-Kamera. In Tabelle 3.1. sind die verwendeten Fluoreszenz Indikatoren, die dazugehörigen Anregungswellenlängen, semipermeablen Spiegel und Emissionsfilter aufgeführt. Zusätzlich zur fluoreszenzspektroskopischen Ausrüstung des Bildverarbeitungssystems bestand die Möglichkeit mittels der Infrarot-LED zur Fokussierung Durchlicht zu verwenden, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz-Indikatoren zu vermeiden. Die Datenaufnahme und Verarbeitung, die Steuerung aller Komponenten einschließlich des motorisierten Mikroskopisches erfolgte über das Program VisIon (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) (vergleiche 3.3.1.6.).

Tabelle 3.1.: Untersuchte Parameter, verwendete Fluoreszenz-Indikatoren, Anregungswellenlängen, semipermeabler Spiegel, Emissionsfilter.

Parameter	Fluoreszenz-Indikator	Anregungswellenlänge	semipermeabler Spiegel	Emissionsfilter
Autofluoreszenz	NADH	360 nm	> 400 nm	> 420 nm
$[Ca^{2+}]_i$	Fura-2	340 nm 360 nm 380 nm	> 400 nm	> 420 nm
Zellzahl	Hoechst 33342	360 nm	> 400 nm	> 420 nm
strukturelle Zellschädigungen	Propidium Jodid	480 nm	> 550 nm	—————

3.3.1.6 Steuerung der Datenaufnahme und Datenauswertung

Das Datenaufnahme- und Verarbeitungsprogramm VisIon wurde entsprechend den Anforderungen der vorgestellten Untersuchungen für das Digitale Bildverarbeitungssystem entwickelt. Es besitzt neben der normalen Funktionalität eines Bildverarbeitungssystems, das heißt der Aufnahme und Auswertung von Bildsequenzen eines Gesichtsfeldes zusätzliche Funktionen. Das für die vorgestellten Untersuchungen entwickelte Programm VisIon ermöglicht dem Experimentator komplexe Protokolle mit mehreren verschiedenen Wellenlängen in Kombination mit unterschiedlichen, im Vorfeld des eigentlichen Versuches ausgewählten Tischpositionen, selbstständig zu programmieren. Die Auswertung der Daten ist von der Datenaufnahme vollständig getrennt. Dadurch wird die Aufnahme schneller zeitgenauer Bildsequenzen erst ermöglicht, da rechenintensive Operationen wie die der verwendeten Auswertungsverfahren erst später durchgeführt werden. Die hierfür verwendeten Makros wurden von der Firma T.I.L.L. Photonics entsprechend der aufgestellten Spezifikationen entwickelt. Die für die Untersuchungen verwendeten Auswertungsverfahren werden im folgenden separat dargestellt. Um die geplanten Untersuchungen durchzuführen, wurden folgende spezielle Funktionalitäten in die Software integriert.

I. Bei der Datenaufnahme:

1. Es wurden im Vorfeld des Experimentes eine Reihe von Gesichtsfeldern (über 20) ausgewählt. In diesen Gesichtsfeldern waren proximale Tubuli lokalisiert, die untersucht werden sollten. Jedes Gesichtsfeld wurde einzeln fokussiert.
2. Diese Gesichtsfelder und ihre Fokusebenen wurden gespeichert und zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten wieder aufgesucht.
3. Zu den Zeitpunkten 0, 5, 15 und 20 Minuten wurde die Autofluoreszenz oder die $[Ca^{2+}]_i$ bestimmt. Zu den Zeitpunkten 0 und 20 Minuten wurde die strukturelle Zellschädigung und nach 20 Minuten die Zellzahl bestimmt.
4. Zur Messung der strukturellen Zellschädigung und der Zellzahl wurden bei jeder Messung jeweils drei unterschiedliche Fokusebenen verwendet (vergleiche **3.3.2.4.**).
5. Für die Bestimmung der Autofluoreszenz betrug die Belichtungszeit 500 Millisekunden, für die $[Ca^{2+}]_i$ 50 Millisekunden, für strukturelle Zellschädigung und Zellzahl jeweils 5 Millisekunden.

II. Bei der Auswertung:

1. Die für die einzelnen Gesichtsfelder mit den entsprechenden proximalen Tubuli erhobenen Daten werden einander zugeordnet, so daß eine Bildsequenz entsteht. Dadurch kann die Autofluoreszenz oder die $[Ca^{2+}]_i$ zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten beziehungsweise die strukturelle Zellschädigung zu den Zeitpunkten 0 und 20 Minuten und die Zellzahl für jeden Tubulus nach 20 Minuten bestimmt werden.
2. Für jede Bildsequenz muß für jeden Pixel vor jeder anderen Auswertung ein sogenannter Background (entweder ein frei gewählt oder dynamisch aus dem jeweiligen Bild berechnet) subtrahiert werden. Dies ist notwendig, da die detektierten Intensitäten teilweise sehr unterschiedlich sind.
3. Da Tubuli schlauchförmig ausgebildet sind müssen zur Auswertung seien es Verhältnisse oder Intensitäten echte Polygone gebildet werden können, um eine korrekte Auswertung zu ermöglichen.
4. Wurde die Fokuseben eines Gesichtfeldes variiert, so muß aus der entstandenen Bildreihe ein neues Bild, das aus den maximalen Intensitäten aller aufgenommenen Bilder berechnet wurde erstellt werden.

3.3.2. Fluoreszenzspektroskopische Messungen

3.3.2.1. Ablauf der Untersuchungen

400 µl der Tubulussuspension wurden in die Perfusionskammer eingebracht. Die Kammer wurde verschlossen, am Mikroskopisch befestigt und mit der Begasung der Kammer mit 95% O₂/ 5% CO₂ begonnen. Innerhalb von 10 Minuten sedimentieren die proximalen Tubuli auf den Grund und hefteten an dem mit Cell-Tak beschichteten Deckglas, das den Boden der Perfusionskammer bildet an. Anschließend wurde mit der Perfusion der Kammer mit Perfusionslösung (Fluß: 2 ml/ Minute) begonnen und die proximalen Tubuli langsam binnen 10 Minuten auf 37°C erwärmt. Innerhalb dieser zehn-minütigen Adaptionsphase wurde die Perfusionskammer auf ihrer Längsachse, ausgehend vom Einlauf des Perfusates, durch Positionierung des Mikroskopisches nach proximalen Tubuli abgesehen. Durch dieses Verfahren wurde sichergestellt, daß die Auswahl der Tubuli zufällig erfolgte und somit eine repräsentative Stichprobe vorlag. Jeder aufgefundene proximale Tubulus, der sich fokussieren ließ und stabil am Boden angeheftet war (sich nicht im Perfusionsstrom bewegte), wurde

ausgewählt, und die dazugehörige Tischposition gespeichert. Nach Ende der Adaptionphase (Zeitpunkt 0 Minuten) wurde mit dem Versuch begonnen.

3.3.2.2. NADH-assoziierte Autofluoreszenz

Als Maß für den Redoxzustand der oxidativen Phosphorylierung wurde die NADH-assoziierte Autofluoreszenz bestimmt. Der Anstieg der Autofluoreszenz wurde in einzelnen proximalen Tubuli 2,5 Minuten nach Induktion der Hypoxie oder wie beschrieben zu den Zeitpunkten 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten bestimmt. Dazu wurde zunächst der Background bestimmt. Unter Background ist an dieser Stelle der Anteil des gemessenen Signals zu verstehen, der nicht durch die Autofluoreszenz des proximalen Tubulus hervorgerufen wurde, sondern durch andere Ursachen, wie den Dunkelstrom des Detektors, die Fluoreszenz der verwendeten optischen Komponenten wie Filter und Linsen, der Fluoreszenz des Deckglases und der perfundierten Lösungen. Um den prozentualen Wert des Backgrounds zu bestimmen wurde eine in der Mitte des Bildfeldes liegende polygonale „Region of interest“ (ROI), in der sich keine proximale Tubuli befanden definiert und der Mittelwert über alle eingeschlossenen Pixel berechnet. Dieser Wert wurde von jedem einzelnen Pixel des Bildes subtrahiert. Für jeden Tubulus im Fokus wurde eine polygonale ROI definiert und der Mittelwert über alle eingeschlossenen Pixel berechnet. Vergleichsmessungen bei Normoxie zeigten einen Mittelwert nach 2,5 Minuten von 100% des Ursprungswertes und eine Standardabweichung von 9%. Ein Hypoxie induzierter Anstieg der Autofluoreszenz, der mehr als doppelt so hoch wie diese Standardabweichung war, also ein Anstieg um mehr als 18%, wurde daraufhin als signifikant gewertet.

In Vergleichsmessungen wurden den Tubuli um einen maximalen Anstieg zu erzielen 0,1 mmol/l des Cytochrom-Oxidase-Hemmers KCN zugesetzt. KCN verursacht keine optischen Artefakte und hemmt den Elektronenfluß über die mitochondriale Atmungskette. Dadurch kommt es zu einer Reduktion aller beteiligten Enzyme und einer Akkumulation von NADH (Balaban et al. 1981). Die Angaben erfolgen als Prozentsatz der proximalen Tubuli, die einen signifikanten Anstieg der Autofluoreszenz bei dem jeweiligen Schweregrad der Hypoxie zeigen.

3.3.2.3. Freie intrazelluläre Calciumkonzentration

Die Messung der freien intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erfolgte durch den Fluoreszenz-Indikator Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985). 1 ml der Tubulussuspension wurde mit 5 mmol/l Fura-2 AM für 45 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln geladen. Innerhalb der ersten 5 Minuten wurde die Tubulussuspension mit 1 l 95% O₂/ 5% CO₂/ Minute begast und anschließend verschlossen. Die Fura-2 AM Stammlösung wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn in wasserfreiem DMSO mit 5 g/ 100 ml Pluronic F12 angesetzt.

Unter diesen Bedingungen ist das Fura-2 ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert und die intrazelluläre Konzentration beträgt ca. 15 mmol/l (Kribben et al. 1994). Die Autofluoreszenz ist bei 510 nm 10-mal geringer als das interessierende Fura-2 Signal. Proximale Tubuluszellen verlieren im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen sehr schnell Fura-2, wahrscheinlich indem sie es aktiv aus der Zelle herauszutransportieren (Kribben et al. 1994). Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Verlust von 1,5% Fluoreszenz/ Minute bestimmt.

Die Berechnung der freien intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte mittels der Grynkiewicz-Gleichung durch in vivo Kalibrierung (Grynkiewicz et al. 1985):

$$[\text{Ca}^{2+}]_i = K_D \beta \frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R}$$

R = das Verhältnis von 340/380 nm
zu dem jeweiligen Zeitpunkt

R_{\min} = R in Abwesenheit von Ca^{2+}

R_{\max} = R bei Ca^{2+} -Sättigung

K_D = Ca^{2+} -Dissoziationskonstante, 224 nmol/l (Grynkiewicz et al. 1985)

β = Verhältnis von Fura-2 freier Säure (in Abwesenheit von Ca^{2+}) und Fura-2 Ca^{2+} -gesättigt bei 380 nm.

Die Werte für R_{\min} und R_{\max} wurden in normoxischen Tubuli entsprechend der Methode von Grynkiewicz (Grynkiewicz et al. 1985) bestimmt. R_{\max} wurde nach Zugabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ Ionomycin-Lösung zur Perfusionslösung bestimmt. Nach Erreichen von R_{\max} wurde R_{\min} durch zusätzliche Zugabe von 10 mmol/ EGTA-Lösung erzielt. Unter Verwendung dieser Werte wurde die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ berechnet.

Die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurde für jeden proximalen Tubulus vor Beginn des Versuches ($t= 0$ Minuten) bestimmt. Diese betrug vor Beginn im Mittel $121 \pm 2,4$ nmol/l ($n= 810$ proximale Tubuli). Tubuli deren $[\text{Ca}^{2+}]_i$ vor Beginn des Versuches außerhalb des 5%-95% Quantiels (das heißt unter 38 nmol/l oder über 372 nmol/l) lagen, wurden als vorgeschädigt betrachtet und von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Der Mittelwert der freien intrazellulären Calciumkonzentration wurde, zu den untersuchten Zeitpunkten für jedes Experiment separat aus jeweils 7-18 individuellen proximalen Tubuli berechnet. Die Angaben der freien intrazellulären Calciumkonzentration erfolgen als Differenzen zum 0 Minuten Wert bzw. als Absolutwerte in nmol/l.

3.3.2.4. Propidium Jodid-Akkumulation in den Zellkernen

Die Bestimmung struktureller Zellschäden erfolgte mit dem Fluoreszenz-Indikator Propidium Jodid (PI) (Kribben et al. 1993a). Das für intakte Zellen membranimpermeable PI permeiert durch die Membran geschädigter Zellen, gelangt in die Zelle und akkumuliert dort in den Zellkernen durch Bindung an die DNS. Diese Akkumulation führt zu einer Fluoreszenzfärbung von Zellkernen strukturell geschädigter Zellen. Da die Anregungswellenlänge von PI nicht mit der von Fura-2 interferiert, ist eine simultane Messung der Zellschädigung und der freien intrazellulären Calciumkonzentration möglich.

Der Perfusionslösung wurde 2 Minuten vor der Bestimmung der Zellschädigung für 1,5 Minuten 5 $\mu\text{g/ml}$ PI zugegeben. Im Anschluß an eine 0,5 minütigen Auswaschphase ohne PI, die der Entfernung des extrazelluläre lokalisierten PI diente, wurde die Zellschädigung bestimmt. Um den Prozentsatz der geschädigten Zellen zu bestimmen wurde der Perfusionslösung am Ende des Versuches für 1,5 Minuten 10 $\mu\text{g/ml}$ des membrangängigen Fluoreszenz-Indikators Hoechst 33342 (HOE) zugesetzt. HOE akkumuliert in den Zellkernen und färbt diese an. Im Anschluß an die 0,5-minütige Auswaschphase ohne HOE wurde die Anzahl aller Zellkerne eines proximalen Tubulus bestimmt.

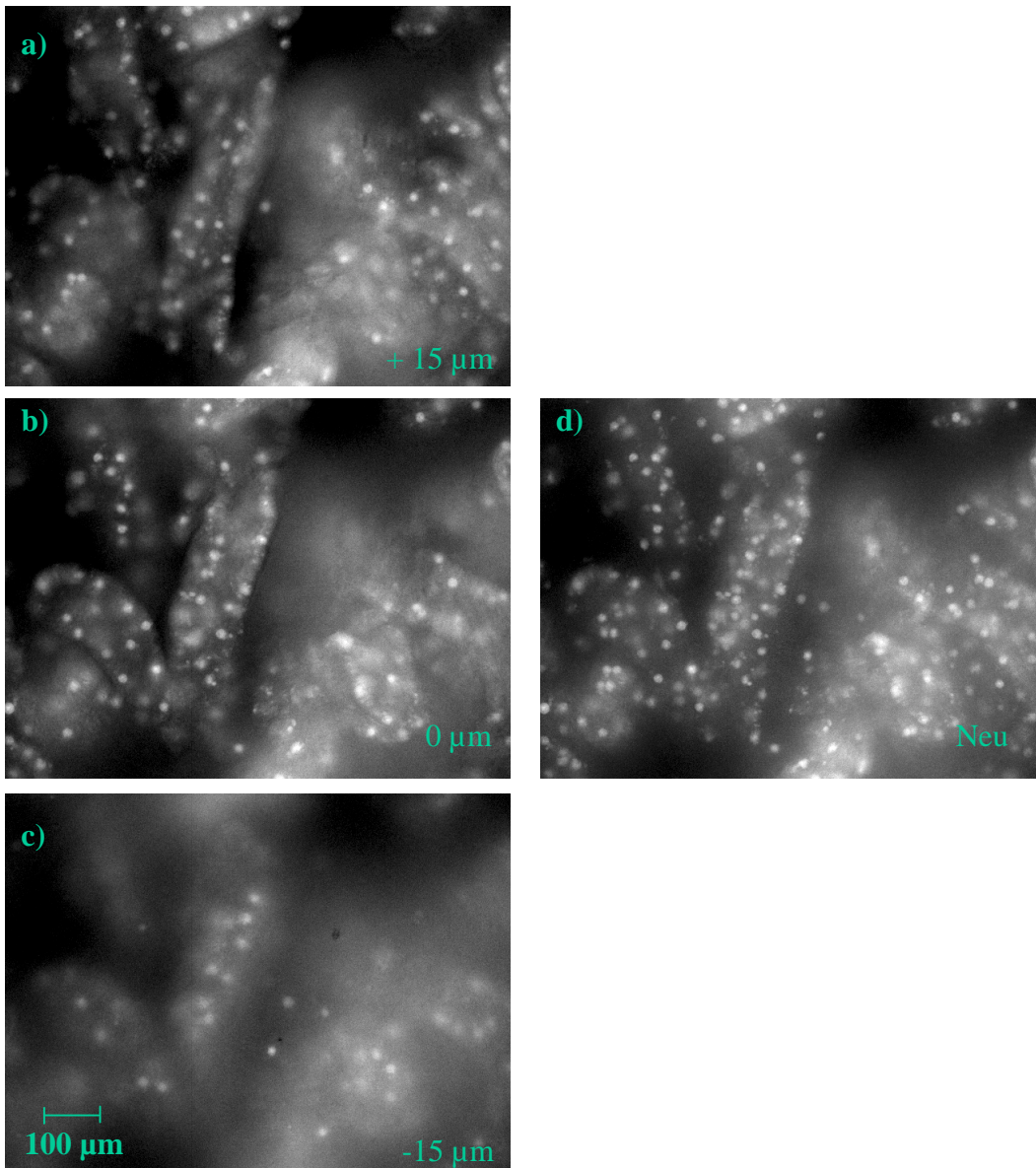


Abb. 3.4. Bestimmung struktureller Zellschäden mittels Propidium Jodid

Der Nachweis strukturelle Zellschäden erfolgte durch Propidium Jodid. Dazu wurde ausgehend von der Ebene des Fokus der Mikroskopisch um 15 μm nach oben und unten bewegt. Von der Fokusebenen (**b**) 15 μm nach oben (**a**) und 15 μm nach unten (**c**) wurde jeweils ein Bild aufgenommen. Aus den Maximalwerten der Bilder **a**), **b**) und **c**) wurde das resultierende Bild **d**) berechnet und dieses zur Auswertung verwendet. Die Darstellung erfolgt bei 150-fache Vergrößerung.

Proximale Tubuli sind schlauchförmig ausgebildet. Daher befinden sich die Zellkerne, anders als z.B. die adherenter Zellen einer Zellkultur, nicht auf einer optischen Schnittebene des Objektivs. Bei dem verwendeten Objektiv mit hoher numerischer Apertur und den damit verbundenen scharfen Abbildungseigenschaften führt das dazu, daß sich nur eine geringe Anzahl der Zellkerne im Fokus befindet und damit ausgewertet werden kann. Aus diesem Grund wurde für jede Tischposition die optische Schnittebene variiert, d.h. die Höhe des Mikroskopisches wurde verändert. Vorversuche mit mehreren verschiedenen Schnittebenen ergaben, daß eine Variation um jeweils 15 µm nach oben und unten ausreicht um alle Zellkerne eines proximalen Tubulus zu erfassen. Für jede Tischposition und die Variation nach oben und unten wurde jeweils ein Bild aufgenommen. Damit wurde die räumliche Ausdehnung des proximalen Tubulus durch 3 optischen Ebenen erfaßt. Diese 3 optischen Ebenen wurden zu einem Bild zusammengefaßt. Das resultierende Bild ist Pixel für Pixel aus den jeweiligen Maximalwerten der 3 Ursprungsbilder zusammengesetzt. Abbildung 3.4. zeigt diese 3 Ursprungsbilder und das daraus resultierende Bild, welches zur Auswertung verwendet wurde und eine erheblich größere Anzahl von Zellkernen erfaßt, als es ohne dieses Verfahren möglich gewesen wäre. Durch dieses Verfahren wird auch bei einer Schwellung der proximalen Tubuli, wie sie bei hypoxischer Schädigung auftritt, eine richtige Bestimmung der Zellzahl gewährleistet.

Zur Auswertung wurden die Bilder ausgedruckt und die Anzahl der mit PI und HOE angefärbter Zellkerne für jeden individuellen Tubulus separat ausgezählt. Für jeden individuellen proximalen Tubulus wurde der Prozentsatz der geschädigten Zellen berechnet. Für jedes durchgeführte Experiment wurde der Mittelwert der geschädigten Zellen über alle individuellen proximalen Tubuli berechnet.

3.4. Untersuchungen an kultivierten Tubuluszellen

3.4.1. Kultivierungsbedingungen für LLC-PK₁-Zellen

LLC-PK₁-Zellen sind eine aus Tubuluszellen des Schweins entwickelt Zelllinie und zeigen wesentliche Merkmale proximaler Tubuluszellen (Toutain und Morin 1992). Die Zellen wurden in DMEM unter Zusatz von 4,5 g/l Glukose, 2 mmol/l L-Glutamin, 100 IE/ml Penicilin, 100 mg/l Streptomycin und 8% FKS in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte einmal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:5 unter Verwendung von 0,1% Trypsin in 175-cm² Zellkulturflaschen (1100 Zellen/cm²) und für die Untersuchungen im selben Verhältnis in 21-cm² Gewebekulturplatten.

3.4.2. Kultivierungsbedingungen für OK-Zellen

OK-Zellen sind eine aus Tubuluszellen des amerikanischen Opssums entwickelt Zelllinie und zeigen wesentliche Merkmale proximaler Tubuluszellen (Toutain und Morin 1992). Die Zellen wurden in MEM unter Zusatz von 2 mol/l L-Glutamin, 100 IE/ml Penicilin, 100 mg/l Streptomycin und 10% FKS in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Die Subkultivierung erfolgte einmal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:5 unter Verwendung von 0,1% Trypsin/EDTA in 75 cm² Zellkulturflaschen (1100 Zellen/ cm²) und für die Untersuchungen im selben Verhältnis in 21-cm² oder in 6-fach (9,6 cm²/ Vertiefung) bzw. 24-fach (2,9 cm²/ Vertiefung) Gewebekulturplatten .

3.4.3. Reversible ATP-Depletion

Als Modell für die Hypoxie wurde ein chemisch induzierte reversible intrazelluläre ATP-Depletion in LLC-PK₁-Zellen verwendet (Canfield et al. 1991). Zur Untersuchung der Folgen der ATP-Depletion und der Erholung wurden die LLC-PK₁-Zellen in 21 cm² Gewebekulturplatten subkultiviert. 16-20 Stunden vor Beginn der Experimente wurde das Medium von den in diesem Stadium subkonfluenten LLC-PK₁-Zellen entfernt und durch ein Glukose-, L-Glutamin- und FKS-freies-DMEM ersetzt. Bei den Kontrollgruppen wurde das Medium durch FKS-freies-DMEM ersetzt. Die ATP-Depletion wurde in konfluenten Zellen durch Zugabe von 0,1 µmol/l des mitochondrialen Inhibitors Antimycin A (Stammlösung 10 µmol/l in 1% Ethanol induziert. Für die Erholung im Anschluß an die einstündige ATP-Depletion wurde das Medium durch DMEM mit 4,5 g/l Glukose ohne Antimycin A ersetzt. Derartig behandelte Kulturen wurden zur Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes (siehe 3.4.4), der MAP-Kinase Aktivität (siehe 3.4.5.), zum Nachweis der Apoptose (siehe 3.4.8. und 3.4.9.) und zur Untersuchung intrazellulärer Calcium-Speicher (siehe 3.4.10.) bei reversibler ATP-Depletion verwendet.

3.4.4. Zellulärer ATP-Gehalt

Die Bestimmung des zellulären ATP-Gehaltes erfolgte durch den Luciferase-Test (Beutler und Mathai 1967). Dafür wurden die LLC-PK₁-Zellen in 36-mm Gewebekulturplatten kultiviert und der reversiblen ATP-Depletion unterzogen. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 1 mol/l eiskalter Perchlorsäure lysiert. Die Zellysate wurden auf der Stelle in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur Bestimmung bei -80°C gelagert. Die Proben wurden aufgetaut, 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert und der Überstand 1:10000 mit Probenpuffer verdünnt. Die Proben wurden mit der selben Menge Luciferase Reagenz versetzt. Das emittierte Licht wurde im Luminometer gemessen. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Der Proteingehalt wurde durch den Bradford Microassay (Bradford 1976) mit IgG als Standard bestimmt. Die Angabe des zellulären ATP-Gehaltes erfolgt in nmol/mg Protein.

3.4.5. MAP-Kinase Aktivität

Die Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität erfolgte durch Phosphorylierung des Myelin Basic Protein (MBP) (Kribben et al. 1993b). 16-20 Stunden vor dem Beginn des Experimentes wurde das Medium gegen FKS-freies ausgetauscht. Soweit nicht anders angegeben, wurden die Zellen mit den verwendeten Substanzen durch Zugaben zum Medium für 5 Minuten bei 37°C stimuliert. Als Kontrolle diente die alleinige Zugabe des verwendeten Lösungsmittels. Im Anschluß an die Stimulation wurde das Medium entfernt und die Zellen 3-mal mit eiskalter PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl eiskaltem Lyse-Puffer solubilisiert. Die Zellysate wurden für 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert, im Anschluß wurde der Überstand auf 100 µl aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität gelagert. Zur Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität wurden die Zellysate für 10 Minuten bei 37°C mit 1 mg/ml MBP und 50 µmol/l [³²P]-ATP (37 kBq) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskalter 25 g/100ml Trichlor-Essigsäure gestoppt. 25 µl der Reaktionsprodukte wurden auf Whatman P81 Phosphocellulose-Filterpapier aufgetragen, an die das MBP bindet. Freies [³²P]-ATP wurde durch viermaliges Waschen in 1% Phosphorsäure und einmaliges waschen mit 95% Ethanol entfernt. Anschließend wurden die Phosphocellulose-Filterpapiere

getrocknet und in Szintillationsröhrchen überführt. Jede Probe wurde im Szintillationszähler für die Dauer von 5 Minuten gemessen. Für jedes Lysat wurde die MAP-Kinase Aktivität als Dreifachbestimmung gemessen. Zusätzlich wurde der Probenleerwert, durch Zugabe von H₂O anstelle von MBP, der Leerwert ohne MBP und Zellysat, sowie der MBP-Wert, der die Phosphorylierung von MBP ohne Zellysat bestimmt. Die Werte der Zellysate wurden gemittelt und von ihnen der Probenleerwert und der MBP-Wert abgezogen und der Probenleerwert addiert. Diese errechnete Aktivität wurde mit der Verdünnung der MBP-Lösung multipliziert und durch die Gesamtmenge der eingesetzten Radioaktivität dividiert. Der erhaltene Wert in pmol/min wurde dann auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Der Proteingehalt wurde durch den Bradford Microassay (Bradford 1976) mit IgG als Standard bestimmt. Die Angabe der MAP-Kinase Aktivität erfolgt als pmol/mg Protein/min.

3.4.6. [3H]-Thymidin-Einbau

Als Maß für die Zellproliferation wurde der [³H]-Thymidin-Einbau in die DNS bestimmt. Für diese Untersuchungen wurden die Zellen in 2,9 cm² Gewebekulturplatten kultiviert. 16-20 Stunden vor Beginn der Experimente wurde das FKS-haltige Medium entfernt und durch FKS-freies Medium ersetzt. Die verwendeten Substanzen wurden in Gegenwart von 185 kBq/Vertiefung (185 kBq/mol) [³H]-Thymidin zu den konfluenten Zellen zugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit eiskalter PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch 10-minütige Inkubation bei 4°C mit 10 g/100 ml Trichloressigsäure und anschließend durch 30-minütige Inkubation bei 37°C in 0,5 mol/l NaOH lysiert und die DNS isoliert. Die Zellysate wurden zu 5 ml Szintillations-Lösung transferriert und die radioaktive Aktivität mit einem Szintillationszähler bestimmt. Wegen der großen Variabilität der basalen [³H]-Thymidin-Inkorporation werden die Ergebnisse der Experimente als % der Kontrolle angegeben. Als Kontrolle dienen Experimente, in den anstelle der verwendeten Substanzen deren Lösungsmittel zugegeben wurden. Für jedes Experiment wurde die [³H]-Thymidin-Aufnahme vierfach bestimmt.

3.4.7. cAMP-Akkumulation

Um die cAMP-Akkumulation nachzuweisen, wurden die Zellen in 9,6 cm² Gewebekulturplatten kultiviert. 16-20 Stunden vor dem Beginn der Experimente wurde das Medium durch FKS-freies Medium ersetzt. Anschließend wurden die konfluenten Zellen in frischem Medium, das die Phosphodiesterase-Inhibitoren Isobutylmethylxantin (100 µmol/l) und Ro 20-1724 (199 µmol/l) für 10 Minuten bei 37°C präinkubiert. Nach Ende dieser Präinkubation wurden die verwendeten Substanzen zugegeben. Nach 10 Minuten wurde das Medium entfernt und durch 500 µl eiskaltes Methanol ersetzt. Als Kontrollen dienten Experimente, bei denen anstelle der verwendeten Substanzen deren Lösungsmittel zugegeben wurden. Das Methanol wurde in Mikrozentrifugationsröhrchen überführt und die Vertiefungen der Zellkulturplatten mit zusätzlichen 500 µl Methanol gewaschen. Die vereinigten Methanol Fraktionen wurden für 5 Minuten bei 1300 g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde auf neutrale Aluminium Säulen, die mit 100 mM Tris-Puffer pH 7,4 equilibriert worden waren, aufgetragen. Die Säulen wurden zweimal mit 1 ml Tris-Puffer gewaschen und das cAMP wurde mit zusätzlichen 2 ml Tris-Puffer eluiert. Der cAMP-Gehalt dieser Fraktionen wurde durch einen spezifischen Radioimmunnachweis bestimmt. Jedes Experiment wurde als Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Angaben erfolgen in % der jeweiligen Kontrolle.

3.4.8. Nachweis der Apoptose durch DNS-Fragmentierung

Ein möglicher Hinweis auf apoptotische Vorgänge innerhalb der Zelle ist die Fragmentierung der DNS, die bei elektrophoretischer Auftrennung als charakteristisches Bild einer sogenannten DNS-Leiter nachweisbar ist. Es wurde untersucht, ob es durch ATP-Depletion und anschließender Erholung zu einer DNS-Fragmentierung kommt. Zu diesem Zweck wurde das „Apoptotic DNS Ladder Kit“ verwendet. Nach einer 16 stündigen Erholung wurden die Zellen mit 1% Trypsinlösung vom Substrat gelöst, in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen mit dem Lysepuffer lysiert. Die Isolation erfolgte nach dem Prinzip der Bindung von DNS an die Oberfläche von Glas in der Gegenwart von chaotropen Salz. Nach Elution der mitgelieferten Säulen wurden 20 µl der DNS-Lösung mit 5 µl des Ladungspuffers gemischt. Die Proben wurden auf ein 1,2% Agarose-Gel aufgetragen und bei 75 mA aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Als positiv- Kontrolle apoptotischer Zellen dienten U937 Zellen, die eine typische leiterartige DNS-Fragmentierung aufweisen. Die DNS wurde mit einer wässrigen Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) gefärbt und mit einer UV-Quelle visualisiert.

3.4.9. Nachweis der Apoptose durch Apoptotische Körperchen

Eine andere Methode, Apoptose nachzuweisen ist der Nachweis von apoptotische Körperchen. Apoptotische Körperchen sind als vom Zellkern abgeschnürte Strukturen mit einem hohen Nukleinsäureanteil durch Kernfarbstoffe nachweisbar. Im Gegensatz zu nekrotischen Zellen können apoptotische Zellen mit Vitalfarbstoffen wie PI nicht angefärbt werden.

Um apoptotische Körperchen nachzuweisen, wurden die Zellen in 21 cm² Gewebekulturplatten subkultiviert. Nach einer 24- und 48-stündigen Erholung im Anschluß an eine einstündige ATP-Depletion wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff HOE angefärbt. Pro Zellkulturschale wurden entlang einer Achse der Gewebekulturplatte 20 Tischpositionen ausgewählt, auf die Zellkerne fokussiert und jeweils ein Bild aufgenommen. Im Anschluß wurden die Zellen mit 5 µg/ml PI angefärbt und von den selben 20 Tischpositionen jeweils ein Bild aufgenommen. Die aufgenommenen Bilder wurden im Anschluß auf apoptotische Körperchen untersucht, und im Falle eines aufgefundenen apoptotischen Körperchens wurde mittels PI für diese Zelle nachgewiesen, daß bei dieser Zelle keine Nekrose vorlag.

3.4.10. Untersuchung der intrazellulären Calcium-Speicher

Um die intrazellulären Calcium-Speicher zu untersuchen wurde das digitale Bildverarbeitungssystem verwendet. Eine vollständige Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher in das Zytosol erfolgte durch Zugabe von 5 µmol/l Thapsigargin in das Zellmedium. Die Messung der freien intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erfolgte durch den Fluoreszenz-Indikator Fura-2 (Grynkiewicz et al. 1985).

LLC-PK₁-Zellen wurden für eine Stunde im Dunkeln mit 15 mmol/l Fura-2 AM in Wasserdampf gesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C geladen. Die Fura-2 AM Stammlösung wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn in DMSO mit 5g/100 ml Pluronic F12 angesetzt. Die Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ erfolgte mittels der Grynkiewicz-Gleichung durch in vivo Kalibration (Grynkiewicz et al. 1985)(vergleiche **3.4.4.3.**).

3.5. Nachweis der Spezifität der verwendeten Substanzen

Um protektive Wirkungsmechanismen, die am proximalen Tubulus über spezifische Effekte vermittelt sind, von allgemeinen, durch membranstabilisierende Wirkungen vermittelte protektive Mechanismen zu unterscheiden, wurde das Model der Protektion vor osmotischer Hämolyse (Peters et al. 1998a) verwendet. Damit wurden die Substanzen untersucht, die sich bei Versuchen mit Hypoxie an frisch isolierten proximalen Tubuli als protektiv erwiesen hatten. Zu diesem Zweck wurden Erythrocyten aus menschlichen Blut isoliert und in PBS resuspendiert. Der Hämatokrit wurde auf einen Wert von 30-35% eingestellt. Durch schrittweise Verdünnung des PBS mit H₂O wurde eine Standardkurve für das Ausmaß der Hämolyse erstellt, und die Verdünnung ermittelt, bei der 70% der Erythrocyten hämolysiert wurden (33% PBS). Diese Verdünnung wurde eingesetzt, um die protektive Wirkung der getesteten Substanzen zu untersuchen. Das durch die Hämolyse freigesetzte Hämoglobin wurde in einem Photometer bei 540 nm nachgewiesen.

3.6. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse werden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert und mittlerer Fehler des Mittelwertes angegeben. Als Ausschlußkriterium bei der Analyse der $[Ca^{2+}]_i$ proximaler Tubuli wurde ein mediantreuer Schätzer zugrundegelegt. Proximale Tubuli deren berechnete $[Ca^{2+}]_i$ zu Beginn des Experimentes außerhalb des 5%-95% Quantils lagen wurden von allen weiteren Analysen ausgeschlossen. Zur Analyse der NADH-assoziierten Autofluoreszenz, der $[Ca^{2+}]_i$ und der strukturellen Zellschädigung wurden die Experimente in Abhängigkeit von dem nach 20 Minuten ermittelten Sauerstoffpartialdruck in folgende Klassen eingeteilt: <10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-60 mmHg und Normoxie. Der Vergleich zwischen zwei untersuchten Parametern wurde unter der Annahme einer Normalverteilung für die ermittelten Werte aus unabhängigen Stichproben mittels des F-Testes durchgeführt. Multiple Vergleiche wurden durch eine Varianzanalyse mit einem Posttest nach Neuman-Keuls bzw. Bonferroni durchgeführt. P- Werte, die kleiner als 0,05 waren, wurden als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1. Untersuchungen isolierter proximaler Tubuli in Suspension

4.1.1. Morphologische Begutachtung und Vitalität

Im Anschluß an die Präparation lagen die isolierten proximalen Tubuli in einer 95% reinen Suspension vor. Abbildung **4.1.** zeigt einen Gewebeschnitt des renalen Cortex mit proximalen Tubuli in situ und frisch isolierte proximale Tubuli in Suspension wie sie für die Versuche verwendet wurden. Die Suspension wurde mit Trypanblau angefärbt und zeigt morphologisch intakte, nicht geschwollene, proximale Tubuli, wie sie für die nachfolgend beschriebenen Versuche verwendet wurden.

4.1.2. Sauerstoffpartialdruck bei Hypoxie in Suspension

Die Induktion der Hypoxie in einer Suspension proximaler Tubuli führte zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes. Abbildung **4.2.** gibt den typischen Zeitablauf dieses Abfalls wieder. Bereits innerhalb von 7 Minuten lag der Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg. Nach 15 Minuten war der Sauerstoffpartialdruck unter 5 mmHg abgefallen und stieg bis zum Ende des Versuches nicht mehr an.

Abbildung **4.3.** zeigt die strukturelle Zellschädigung, wie sie nach einer 30-minütigen Hypoxie auftrat. Proximale Tubuli, die hypoxischen Bedingungen ausgesetzt waren, wiesen starke strukturelle Schäden, erkennbar an der positiven Trypanblau-Färbung auf. Im Gegensatz dazu waren bei proximalen Tubuli nach 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen mit Trypanblau keine strukturellen Zellschäden nachweisbar.

4.1.3. LDH-Freisetzung durch Hypoxie

Hypoxie führte in einer Suspension proximaler Tubuli zu einer Freisetzung von LDH. Innerhalb der ersten 10 Minuten unter hypoxischen Bedingungen war kein Unterschied zur normoxischen Kontrolle nachweisbar. Im Anschluß daran kam es in Abhängigkeit von der Zeit zu einer signifikant erhöhten LDH-Freisetzung (20 Minuten: $43,9 \pm 2,1\%$ versus $12,3 \pm 0,6\%$, $p < 0,001$, $n = 39$; 30 Minuten: $62,2 \pm 1,4\%$ versus $17,8 \pm 1,0\%$, $p < 0,001$, $n = 39$) (vergleiche **Abb. 4.4.**). Normoxie führte im selben Zeitraum lediglich zu einer leichten nicht signifikanten Freisetzung von LDH. Das freigesetzte LDH betrug zu Versuchsbeginn (0 Minuten) $7,2 \pm 0,5\%$ und erhöhte sich innerhalb von 30 Minuten auf $17,8 \pm 1,0\%$ ($n = 39$).

Eine 10-minütiger Hypoxie gefolgt von einer 30-minütiger Reoxygenierung führte im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe zu keiner erhöhten LDH-Freisetzung. Im Gegensatz dazu kam es nach einer 15-minütigen Hypoxie mit einer anschließenden 30-minütigen Reoxygenierung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer deutlich erhöhten LDH-Freisetzung (vergleiche **Abb. 4.5.**).

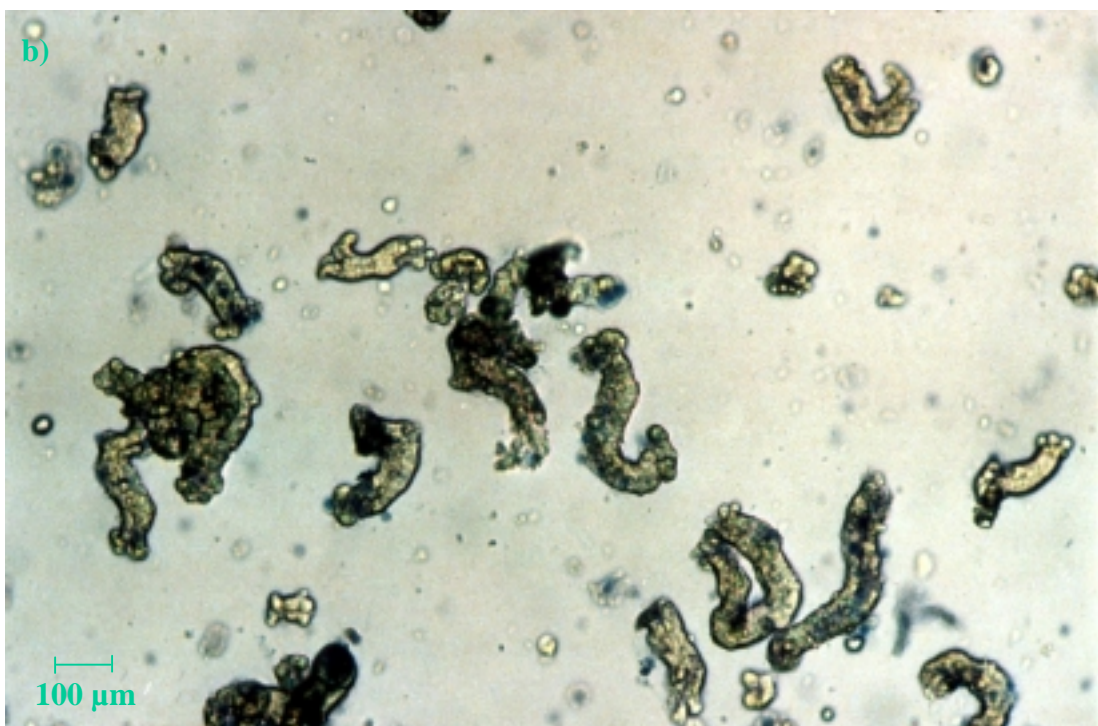
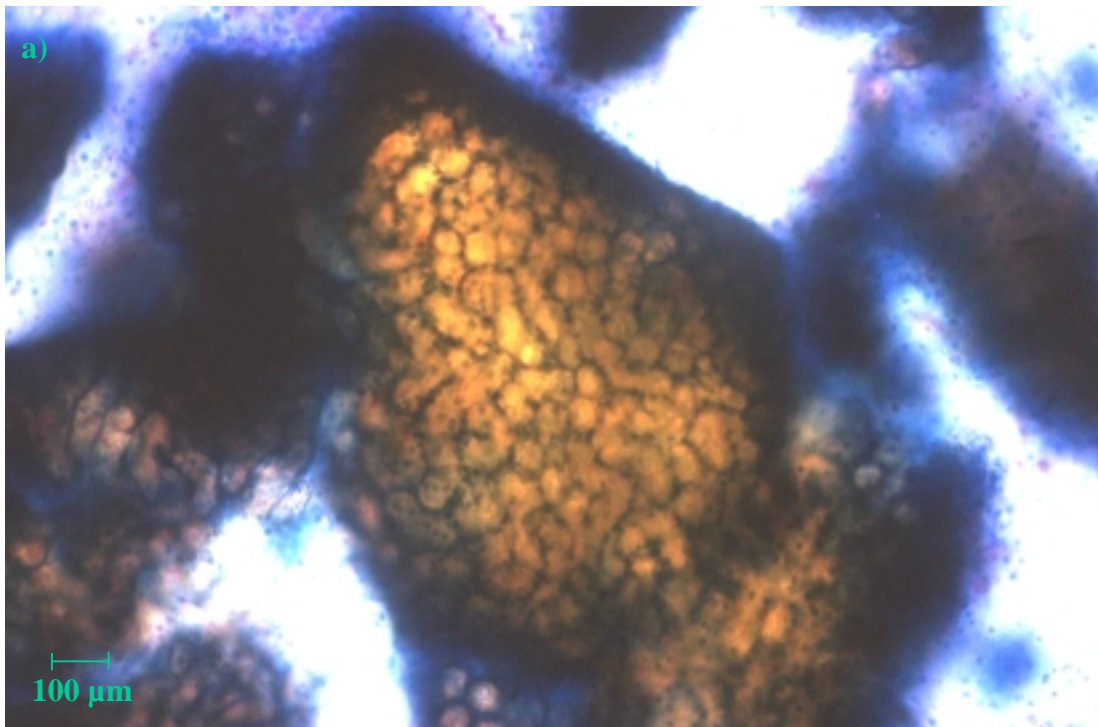


Abb. 4.1. Isolation proximaler Tubuli

- a) Gewebeschnitt des renalen Cortex der Ratte. Zwischenschritt der Isolation.
 - b) Frisch isolierte proximale Tubuli, wie sie für die Versuche verwendet wurden (0 Minuten).
- Trypanblau Färbung bei 75-facher Vergrößerung.

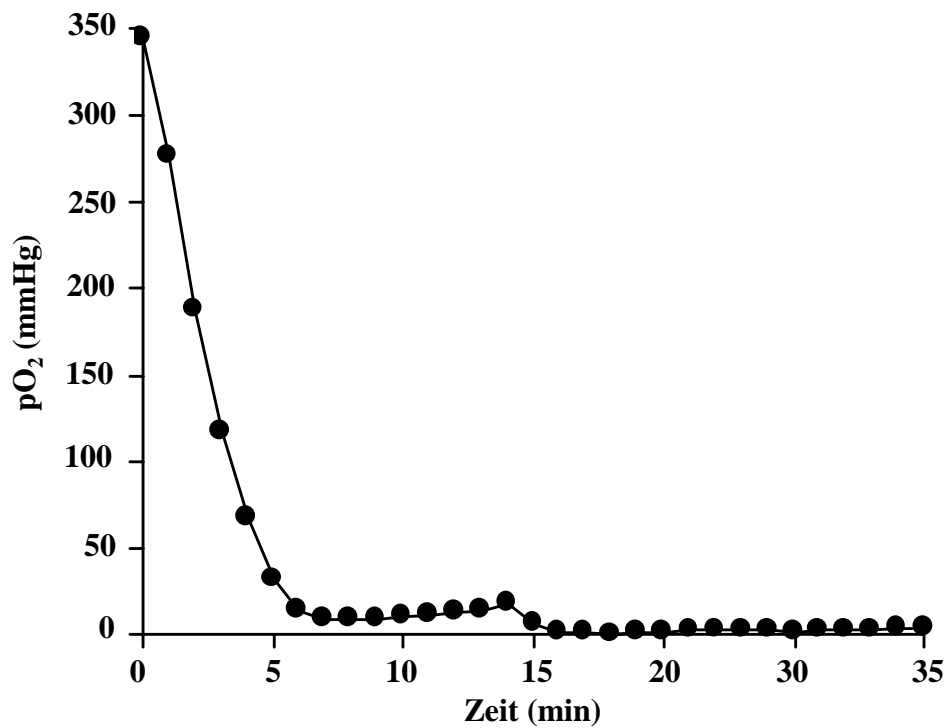


Abb. 4.2. Hypoxie-induzierter Abfall des Sauerstoffpartialdrucks proximaler Tubuli in Suspension

Die Abbildung zeigt in einem repräsentativen Experiment den Abfall des Sauerstoffpartialdrucks in einer Suspension proximaler Tubuli nach Induktion der Hypoxie durch Begasung mit 95% N₂/ 5% CO₂.

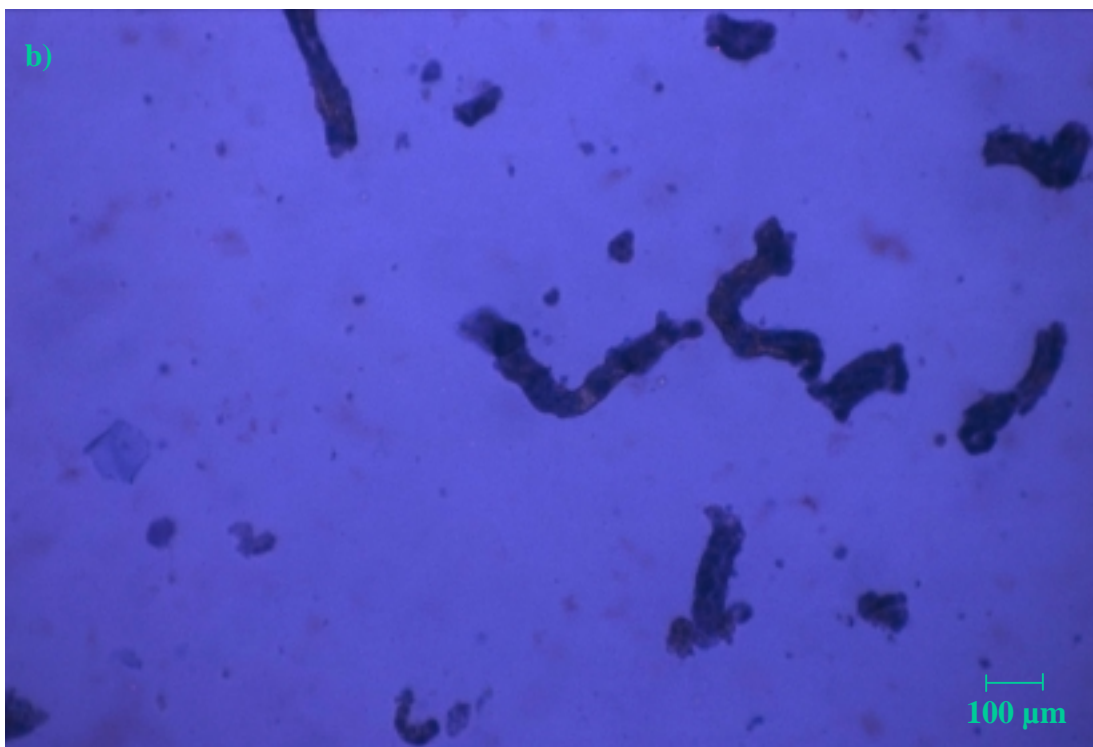
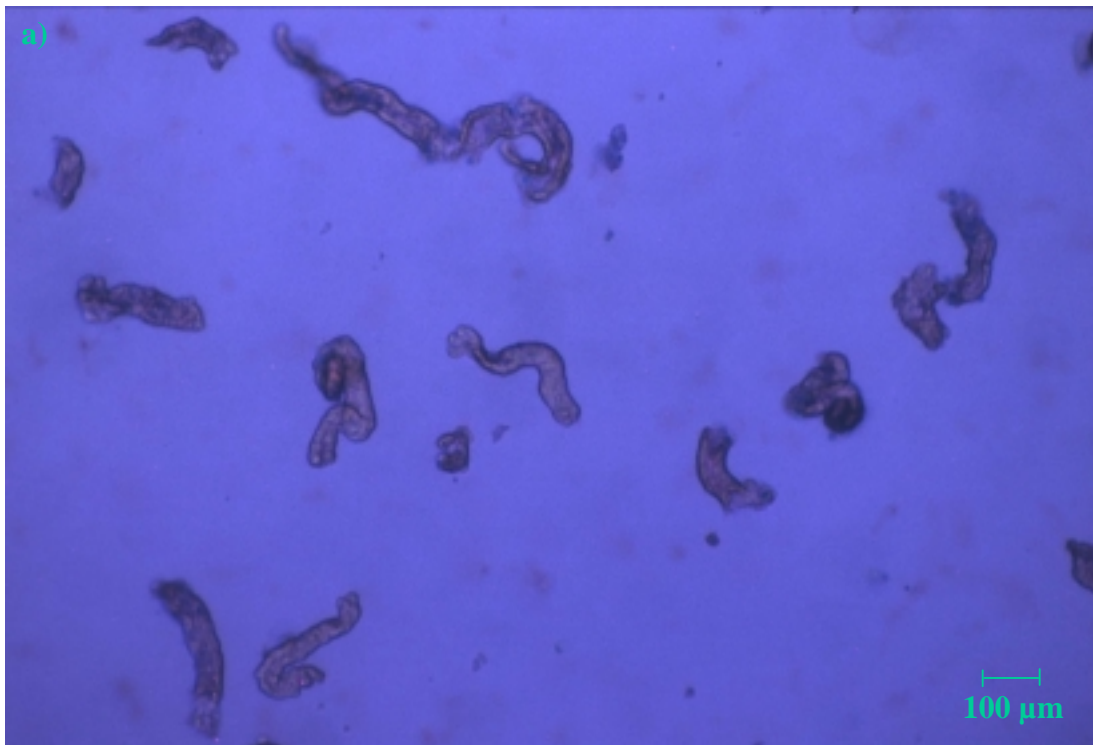


Abb. 4.3. Strukturelle Zellschädigung proximaler Tubuli unter
a) normoxischen und
b) hypoxischen Bedingungen

Proximale Tubuli wurden für 30 Minuten normoxischen oder hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Anschließend wurden die Tubuli mit Trypanblau angefärbt und unter dem Mikroskop bei 75-facher Vergrößerung begutachtet.

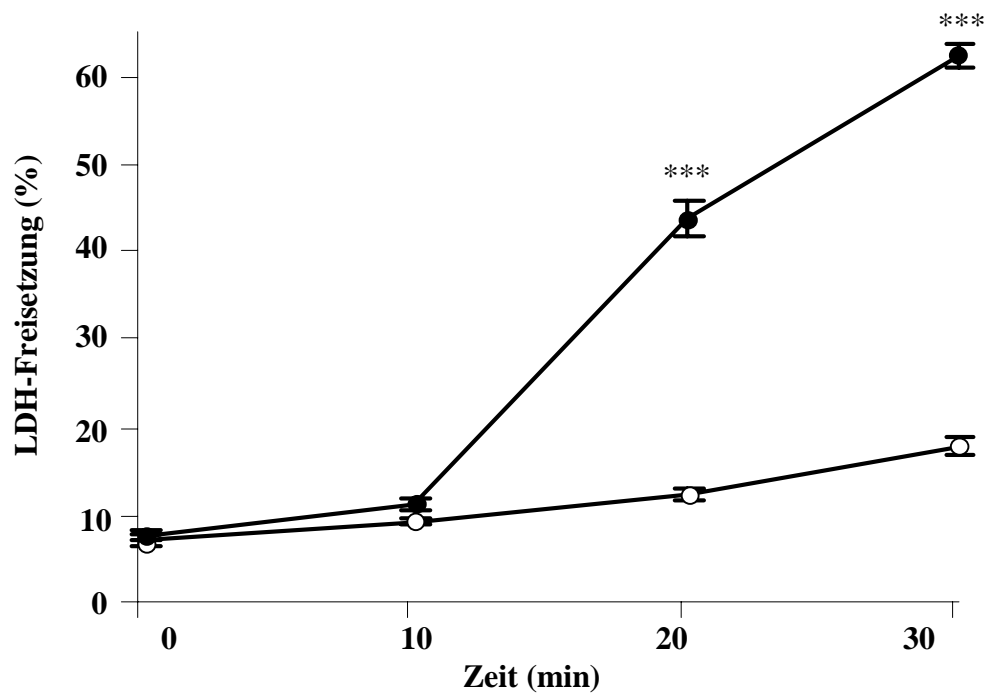


Abb. 4.4. LDH-Freisetzung durch Hypoxie

Proximale Tubuli in Suspension wurden auf die LDH-Freisetzung unter hypoxischen (●) und normoxischen (○) Bedingungen zu den Zeitpunkten 0, 10, 20 und 30 Minuten untersucht. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 39 getrennten Präparationen. ***: $p < 0,001$ vs. Normoxie.

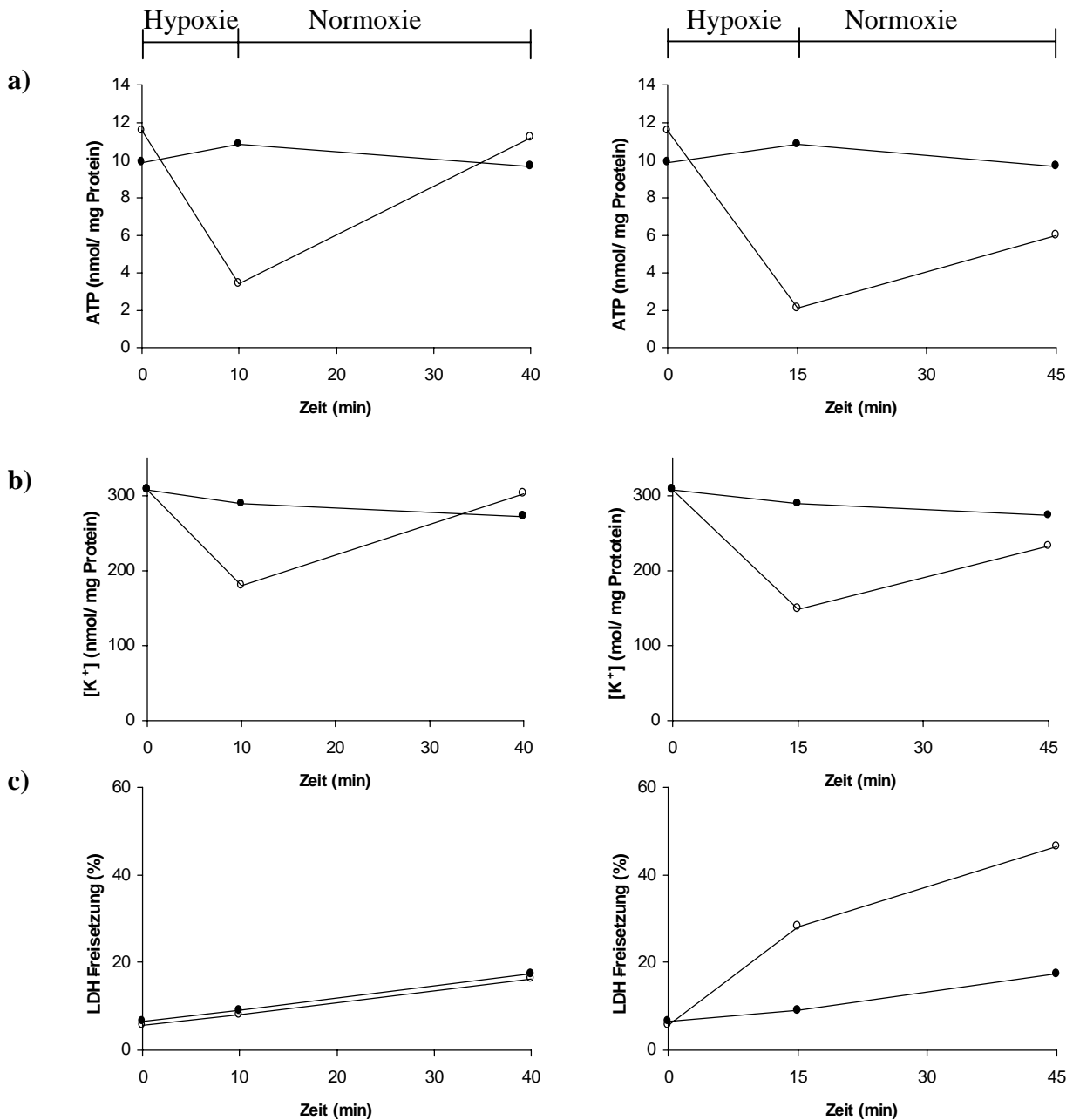


Abb. 4.5. Hypoxische Schädigung frisch isolierter proximaler Tubuli in Suspension

Zellulärer ATP-Gehalt (a), zellulärer Kalium-Gehalt (b) und LDH-Freisetzung (c), nach 10- (linke Seite) bzw. 15-minütiger Hypoxie (rechte Seite) und anschließender 30 minütiger Reoxygenierung (●). Normoxische Kontrollen zu den entsprechenden Zeitpunkten (○). Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert von 3 getrennten Präparationen.

4.1.4. Zellulärer Kalium-Gehalt bei Hypoxie

Hypoxie führte in einer Suspension proximaler Tubuli zu einem starken Abfall des zellulären Kalium-Gehaltes. Bereits nach 10 Minuten (269 ± 16 nmol/mg Protein bei hypoxischen Bedingungen versus 379 ± 16 nmol/mg Protein bei normoxischen Bedingungen, $p < 0,01$, $n = 16$) erhöhte sich zeitabhängig (20 Minuten: 203 ± 19 nmol/ mg Protein bei hypoxischen Bedingungen versus 386 ± 16 nmol/mg Protein bei normoxischen Bedingungen, $p < 0,001$, $n = 16$) (vergleiche **Abb. 4.6.**). Im Gegensatz dazu veränderte sich der zelluläre Kalium-Gehalt unter normoxischen Kontrollbedingungen innerhalb von 20 Minuten nicht. Zu Versuchsbeginn (0 Minuten) lag er bei 421 ± 17 nmol/mg Protein und nach 20 Minuten bei 386 ± 16 nmol/mg Protein.

Eine 30-minütige Reoxygenierung im Anschluß an eine 10-minütiger Hypoxie führte zu einem Anstieg des zellulären Kalium-Gehaltes bis auf den Wert der normoxischen Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde der zellulären Kalium-Gehalt bei einer 15-minütigen Hypoxie mit einer anschließenden 30-minütigen Reoxygenierung nicht mehr ganz erreicht (vergleiche **Abb. 4.5.**).

4.1.5. Zellulärer ATP-Gehalt bei Hypoxie

Hypoxie führte in einer Suspension proximaler Tubuli zu einem zu einem Abfall des zellulären ATP-Gehaltes. Bereits innerhalb von 10 Minuten kam es zu einem signifikanten Abfall des zellulären ATP-Gehaltes von $10,00 \pm 0,47$ auf $5,00 \pm 0,51$ nmol/mg Protein ($p < 0,001$, $n = 9$). Dieser Abfall setzte sich weiter fort und führte nach 20 Minuten zu einem zellulären ATP-Gehalt von $2,40 \pm 0,32$ nmol/mg Protein ($p < 0,001$, $n = 9$) (vergleiche **Abb. 4.7.**). Im Gegensatz dazu veränderte sich der zelluläre ATP-Gehalt unter normoxischen Kontrollbedingungen nicht. Er lag zu Versuchsbeginn (0 Minuten) bei $10,00 \pm 0,47$ und nach 20 Minuten bei $10,14 \pm 1,18$ nmol/mg Protein.

Eine 30-minütige Reoxygenierung im Anschluß an eine 10-minütiger Hypoxie führte zu einem Anstieg des zellulären ATP-Gehaltes bis auf den Wert der normoxischen Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde der zellulären ATP-Gehalt bei einer 15-minütigen Hypoxie mit einer anschließenden 30 minütigen Reoxygenierung nicht mehr ganz erreicht (vergleiche **Abb. 4.4.**).

Die Gabe von $10 \mu\text{mol/l}$ Antimycin A führte zu einem Abfall des zellulären ATP-Gehaltes innerhalb von 20 Minuten auf $0,74 \pm 0,05$ nmol/mg Protein ($n = 3$). Die Gabe von 1 mmol/l KCN führte innerhalb von 2 Minuten zu einem Abfall des zellulären ATP-Gehaltes auf $0,73$ nmol/mg Protein ($n = 2$).

4.1.6. Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie

Hypoxie führte zu einer Zunahme der Malondialdehyd-Bildung. Nach 20 Minuten ($0,41 \pm 0,04$ bei normoxische Bedingungen versus $0,25 \pm 0,03$ nmol/mg Protein bei hypoxischen Bedingungen, $p < 0,05$, $n = 22$) und nach 30 Minuten Hypoxie ($0,55 \pm 0,04$ bei

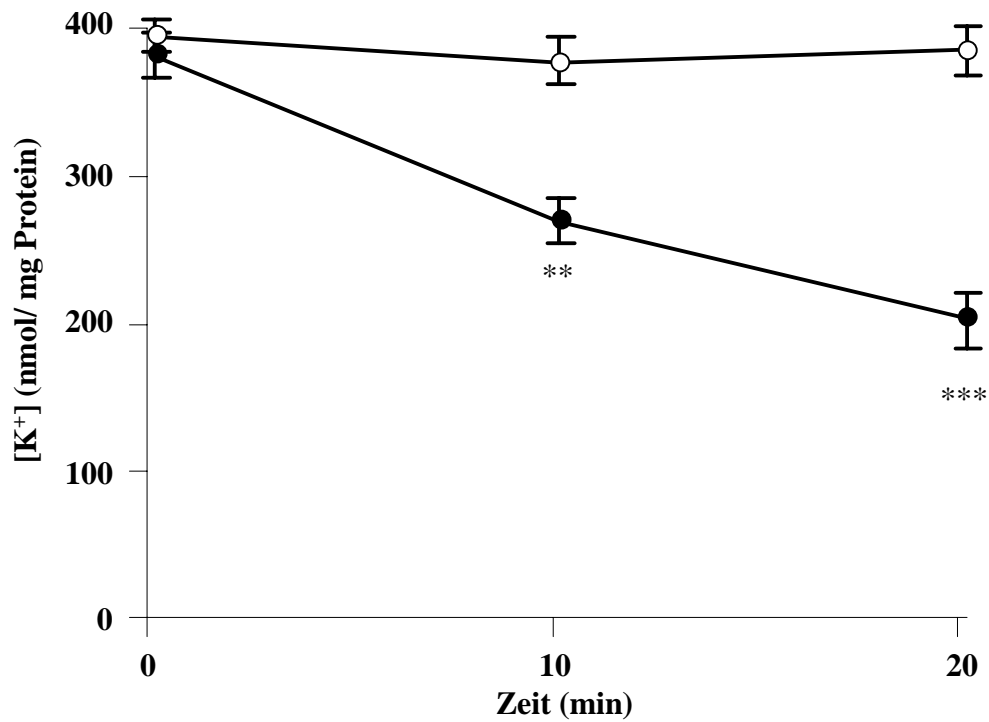


Abb. 4.6. Der zelluläre Kalium-Gehalt bei Hypoxie

Proximale Tubuli in Suspension wurden auf den zellulären Kalium Gehalt unter hypoxischen (●) und normoxischen (○) Bedingungen zu den Zeitpunkten 0, 10 und 20 Minuten untersucht. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert ± SEM von 16 getrennten Präparationen. ***: p < 0,001 und **: p < 0,01 jeweils vs. Normoxie.

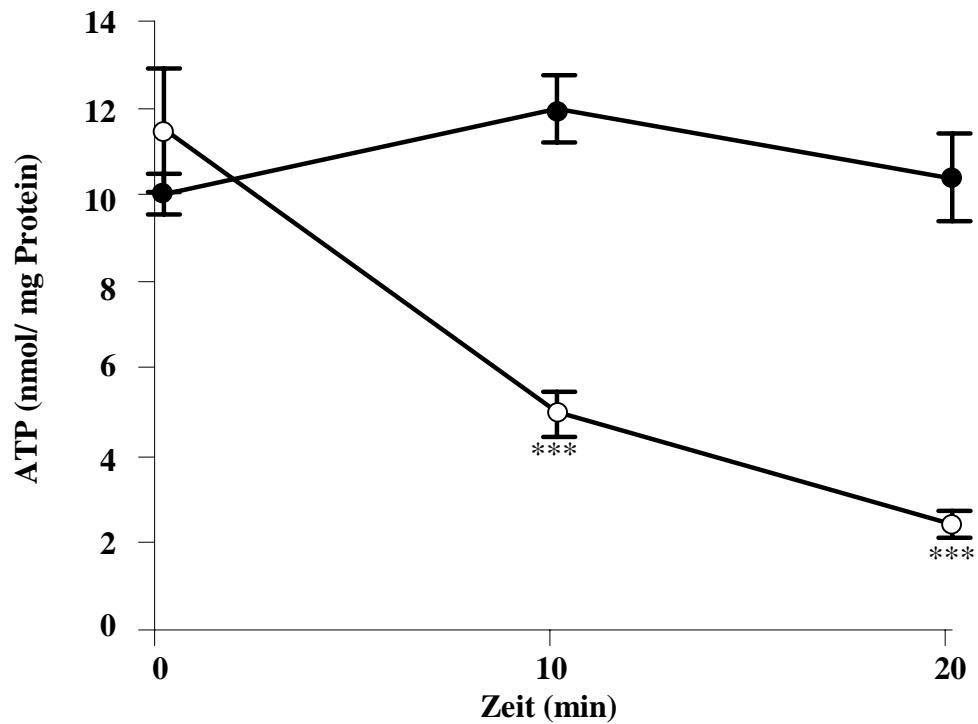


Abb. 4.7. Der zelluläre ATP-Gehalt bei Hypoxie

Proximale Tubuli wurden auf ihren zellulären ATP-Gehalt unter hypoxischen (●) und normoxischen (○) Bedingungen zu den Zeitpunkten 0, 10 und 20 Minuten untersucht. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 9 getrennten Präparationen. ***: $p < 0,001$ versus Normoxie.

hypoxischen Bedingungen versus $0,38 \pm 0,03$ nmol/mg Protein bei normoxischen Bedingungen, $p < 0,001$, $n = 22$) war die Bildung signifikant erhöht (vergleiche **Abb. 4.8.**). Unter normoxischen Kontrollbedingungen kam es lediglich zu einer geringfügig Erhöhung während des 30-minütigen Versuchs von $0,13 \pm 0,02$ nmol/mg Protein (0 Minuten) auf $0,38 \pm 0,03$ nmol/mg Protein.

4.1.7. Abbau von exogenem ATP in der Tubulussuspension

Exogen zugegebenes ATP wurde in der Suspension proximaler Tubuli schnell abgebaut. Bereits 10 Minuten nach Zugabe von 1 mmol/l ATP waren 70% des zugegebenen ATPs abgebaut, nach 20 Minuten mehr als 80%. Ein Unterschied zwischen normoxischen und hypoxischen Bedingungen lag nicht vor.

4.1.8. Die Wirkung von ATP und der Abbauprodukte von ATP

1 mmol/l ATP verringerte die Hypoxie induzierte LDH-Freisetzung in einer Suspension proximaler Tubuli nach 20 Minuten signifikant auf $78 \pm 4\%$ der LDH-Freisetzung ohne ATP ($p < 0,05$, $n = 8$) (vergleiche **Abb. 4.9.**). Das Abbauprodukt von ATP, ADP führte in einer Konzentration von 1 mmol/l zu einer deutlich weniger starken, jedoch ebenfalls signifikanten Verringerung der Hypoxie induzierten LDH-Freisetzung auf $85 \pm 7\%$ ($p < 0,05$, $n = 8$). Das Abbauprodukt AMP hatte in einer Konzentration von 1 mmol/l mit einer LDH-Freisetzung von $100 \pm 11\%$ keinen Effekt.

Der Hypoxie induzierte Abfall des zellulären Kalium-Gehaltes wurde durch Zugabe von 1 mmol/l ATP nicht beeinflusst (vergleiche **Abb. 4.9.**).

4.1.9. Die Wirkung von Quercetin

100 μ mol/l Quercetin verringerte die Hypoxie induzierte LDH-Freisetzung in einer Suspension proximaler Tubuli nach 20 Minuten signifikant auf $72,2 \pm 4,1$ der LDH-Freisetzung ohne ATP ($p < 0,001$, $n = 39$). Unter normoxischen Kontrollbedingungen hatte Quercetin keine Wirkung auf die LDH-Freisetzung (vergleiche **Abb. 4.10.**).

Der Hypoxie-induzierte Abfall des zellulären Kalium-Gehaltes wurde durch Zugabe von 100 μ mol/l Quercetin verringert (vergleiche **Abb. 4.10.**). Durch Zugabe von Quercetin war nach 10 Minuten (379 ± 16 nmol/mg Protein) und 20 Minuten (386 ± 16 nmol/mg Protein) kein Unterschied zwischen normoxischen Bedingungen ohne Quercetin und hypoxischen Bedingungen mit Quercetin (343 ± 18 nmol/mg Protein (nach 10 Minuten) und 247 ± 15 nmol/mg Protein (nach 20 Minuten), $n = 16$) mehr nachweisbar. Unter normoxischen Bedingungen führte Quercetin zu einem leichten Anstieg des zellulären Kalium-Gehaltes von 409 ± 11 nmol/mg Protein auf 436 ± 27 nmol/mg Protein ($n = 9$).

Der Hypoxie-induzierten Anstieg der Malondialdehyd-Bildung wurde durch Quercetin signifikant verringert (vergleiche **Abb. 4.11.**). Nach 20 Minuten Hypoxie

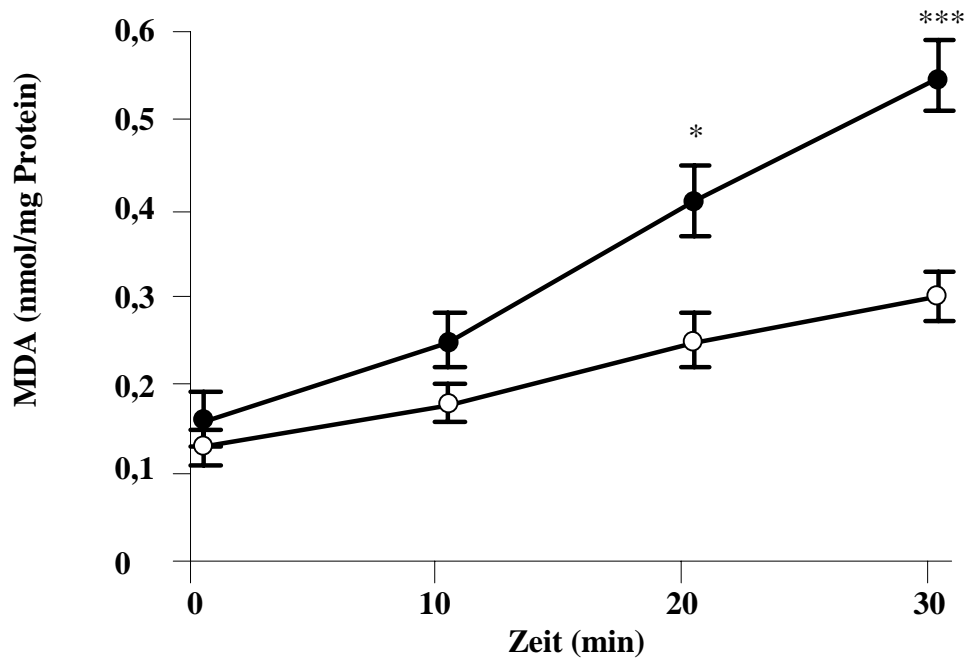


Abb. 4.8. Die Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie

Proximale Tubuli wurden auf die Malondialdehyd (MDA)-Bildung unter hypoxischen (●) und normoxischen (○) Bedingungen zu den Zeitpunkten 0, 10, 20 und 30 Minuten untersucht. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 22 getrennten Präparationen. *: $p < 0,05$ und ***: $p < 0,001$ jeweils versus Normoxie.

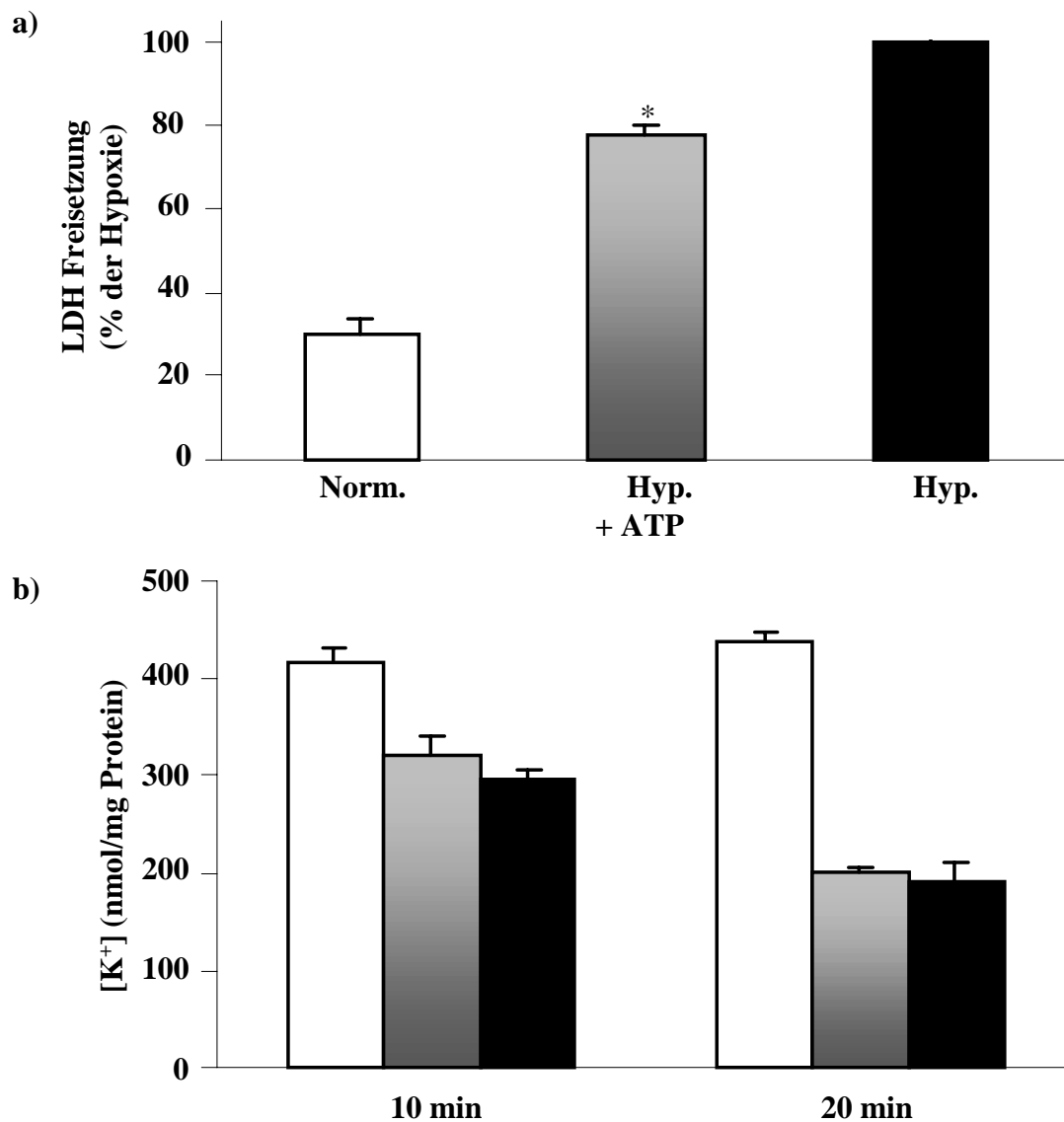


Abb. 4.9. Die Wirkung von ATP auf proximale Tubuli in Suspension

Proximale Tubuli in Suspension wurden auf

a) die LDH-Freisetzung nach 20 Minuten und

b) den zellulären Kalium-Gehalt nach 10 und 20 Minuten

Hypoxie bei Zugabe von 1 mmol/l ATP (■) untersucht. Zum Vergleich sind sowohl die normoxischen (Norm.) (□) als auch die hypoxischen (Hyp.) (■) Kontrollgruppen dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von 8 (LDH-Freisetzung) bzw. 16 (zellulärer Kalium-Gehalt) getrennten Präparationen. *: $p < 0,05$ versus Hypoxie.

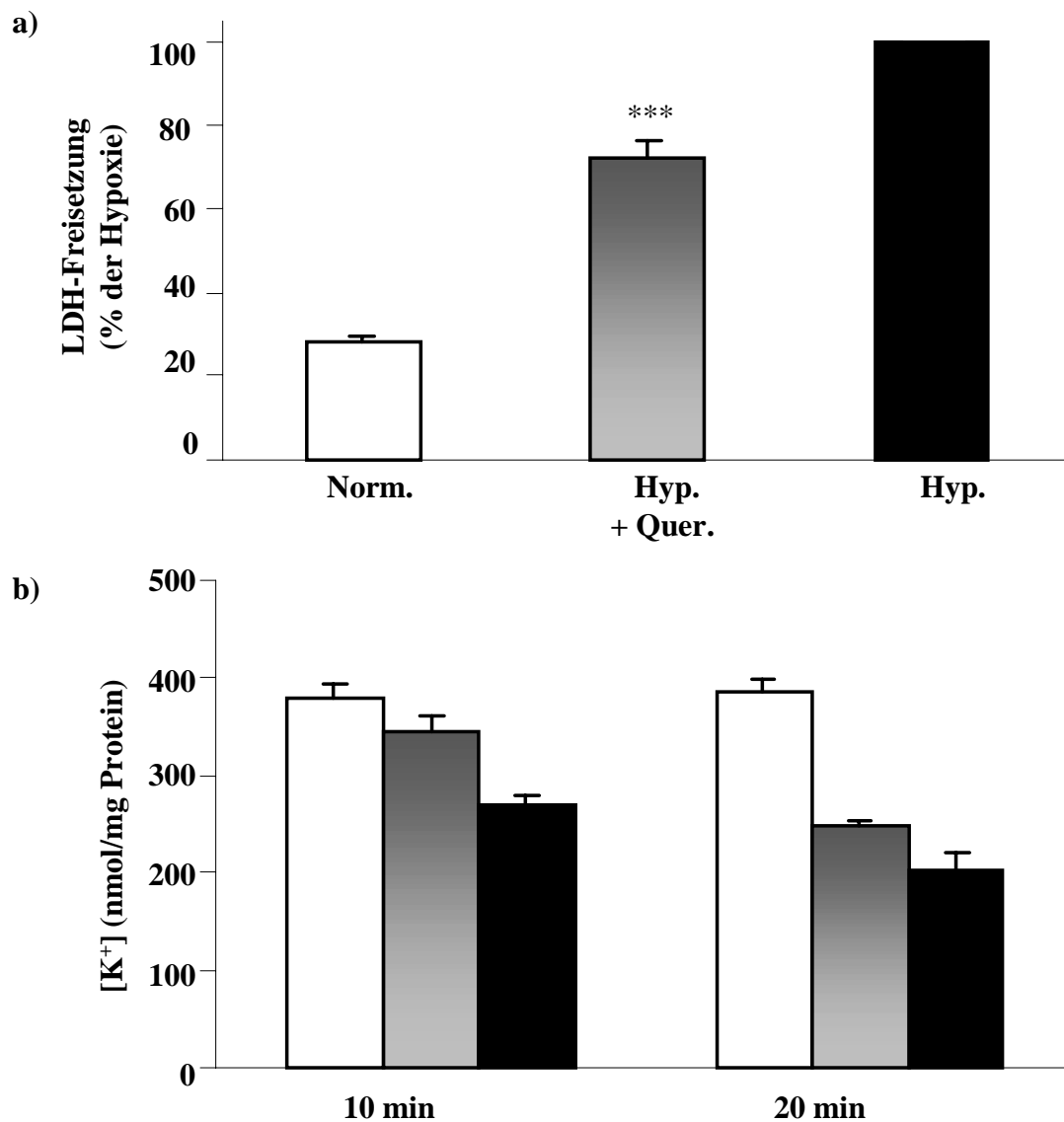


Abb. 4.10. Die Wirkung von Quercetin auf proximale Tubuli in Suspension

Proximale Tubuli in Suspension wurden auf

a) die LDH Freisetzung nach 20 Minuten und

b) den zelluläre Kalium Gehalt nach 10 und 20 Minuten

Hypoxie bei Anwesenheit von 100 $\mu\text{mol/l}$ Quercetin (■) untersucht. Zum Vergleich sind sowohl die normoxischen (□) als auch die hypoxischen (■) Kontrollgruppen dargestellt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 39 (LDH Freisetzung) bzw. 16 (zellulärer Kaliumgehalt) getrennten Präparationen. ***: $p < 0,001$ versus Hypoxie.

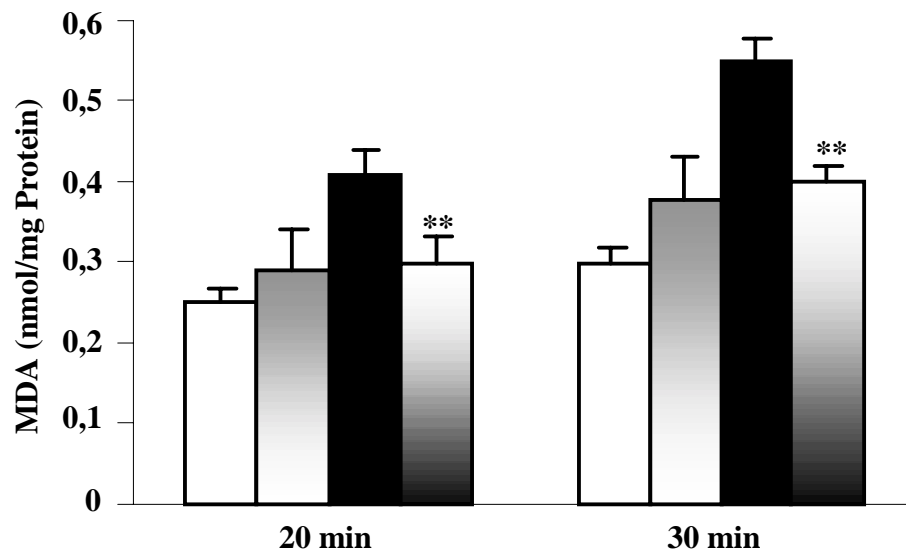


Abb. 4.11. Die Wirkung von Quercetin auf die Malondialdehyd-Bildung

Proximale Tubuli in Suspension wurden auf die Malondialdehyd Bildung unter hypoxischen Bedingungen in Anwesenheit (■) und Abwesenheit von Quercetin (▒) und unter normoxischen Bedingungen in Anwesenheit (▒) und Abwesenheit (□) von Quercetin untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 22 getrennten Präparationen. **: $p < 0,01$ jeweils versus Hypoxie.

waren in Gegenwart von Quercetin lediglich $0,29 \pm 0,06$ und nach 30 Minuten $0,38 \pm 0,06$ nmol/mg Protein Malondialdehyd ($p < 0,01$ beide versus Hypoxie ohne Quercetin Zugabe, $n = 22$) gebildet worden. Unter normoxischen Bedingungen war kein Effekt von Quercetin auf die Malondialdehyd-Bildung nachweisbar.

4.1.10. Untersuchung der Spezifität von ATP, ADP, AMP und Quercetin

Weder 1 mmol/l ATP, ADP, AMP, Adenosin oder 100 μ mol/l Quercetin schützten Erythrocyten vor osmotischer Hämolyse. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von 10 mmol/l des membranstabilisierenden Glycins zu einer deutlichen Protektion (vergleiche **Abb. 4.12.**).

4.2. Untersuchung individueller proximaler Tubuli mit digitaler Bildverarbeitung

4.2.1. Die Perfusionskammer

Die verwendete Perfusionskammer ermöglichte eine schnelle Veränderung des Perfusates. Abbildung **4.13. a)** zeigt die Veränderung der Kalium-Konzentration im Effluat der Perfusionskammer. Beim Wechsel der Perfusionslösung von 140 mmol/l NaCl auf 140 mmol/l KCl war bei einem Perfusionsfluß von 2 ml/Minute nach 2 Minuten kein Kalium im Effluat mehr nachweisbar. In der Kammer konnte nach insgesamt 35 Minuten Perfusion kein Kalium mehr nachgewiesen werden.

Abbildung **4.13. b)** zeigt die Abnahme der Fluoreszenz bei einem Perfusionsfluß von 2 ml/Minute, nachdem die Kammer zuvor mit einer Fura-2 Lösung gefüllt worden war. Nach 30 Sekunden Perfusion war keine weitere Abnahme der Fluoreszenz mehr nachweisbar. Das Durchmischen der Kammer führte ebenfalls zu keiner Erhöhung der Fluoreszenz. Aus diesen Messungen wurde ein Verteilungsvolumen von 370 μ l bei einer Halbwertszeit von 28 Sekunden des Perfusataustausches bei einer Perfusion von 2 ml/Minute für die verwendete Kammer berechnet.

4.2.2. Untersuchungen der verschiedenen Schweregrade der Hypoxie

4.2.2.1. Anstieg der Autofluoreszenz

Hypoxie führte zu einem Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz in individuellen proximalen Tubuli. Dieser Anstieg der Autofluoreszenz war reversibel. Durch die Induktion einer zweiten Hypoxie kam es wiederum zu einem reversiblen Anstieg der Autofluoreszenz. Abbildung **4.14.** zeigt den typischen Verlauf eines derartigen Experimentes.

Der Prozentsatz der proximalen Tubuli, die auf die Induktion einer Hypoxie mit einem signifikanten Anstieg der Autofluoreszenz reagierten, war abhängig vom Schweregrad der Hypoxie (vergleiche **Abb. 4.15.**). In der Gruppe der Experimente mit einem Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg kam es in 76% aller Tubuli zu einem Anstieg der Autofluoreszenz (21 Tubuli in 8 Experimenten). In der Gruppe von 10-15 mmHg stieg die Autofluoreszenz ebenfalls in 76% aller Tubuli an (63 Tubuli in 9 Experimenten). Zwischen 15 und 60 mmHg nahm der Prozentsatz der Tubuli, die auf die Verringerung

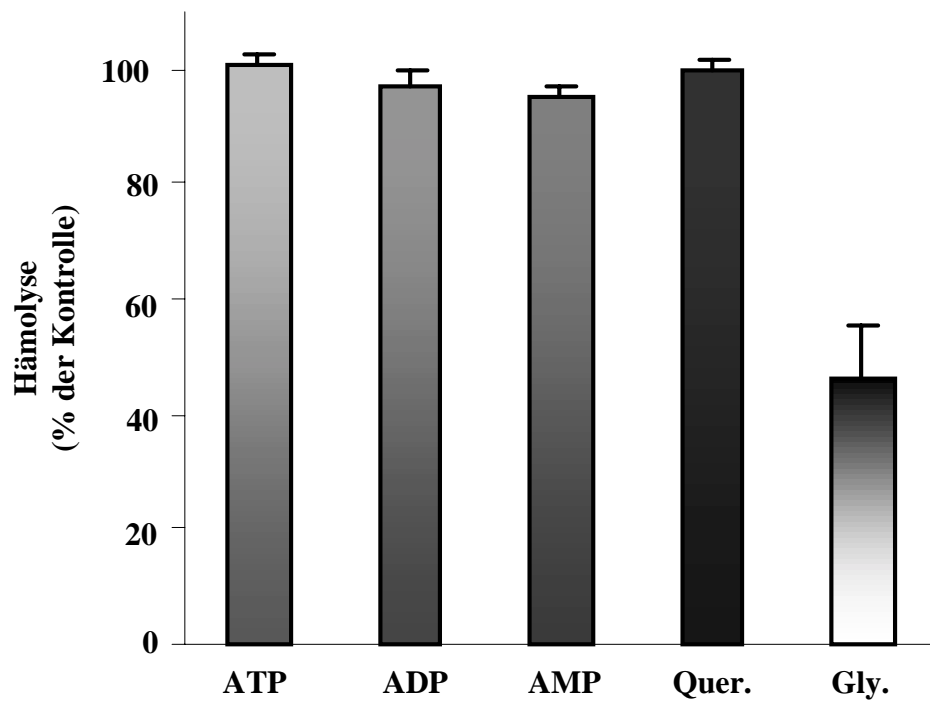


Abb. 4.12. Untersuchung auf Spezifität der verwendeten Substanzen

ATP, ADP, AMP (jeweils 1 mmol/l) und Quercetin (Quer.) (100 mmol/l) wurden auf die Spezifität ihrer Wirkung am Modell menschlicher Erthrocyten untersucht. Als positiv-Kontrolle diente das membran-stabilisierende Glycin (Gly.; 10 mmol/l). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 6-11 getrennten Präparationen.

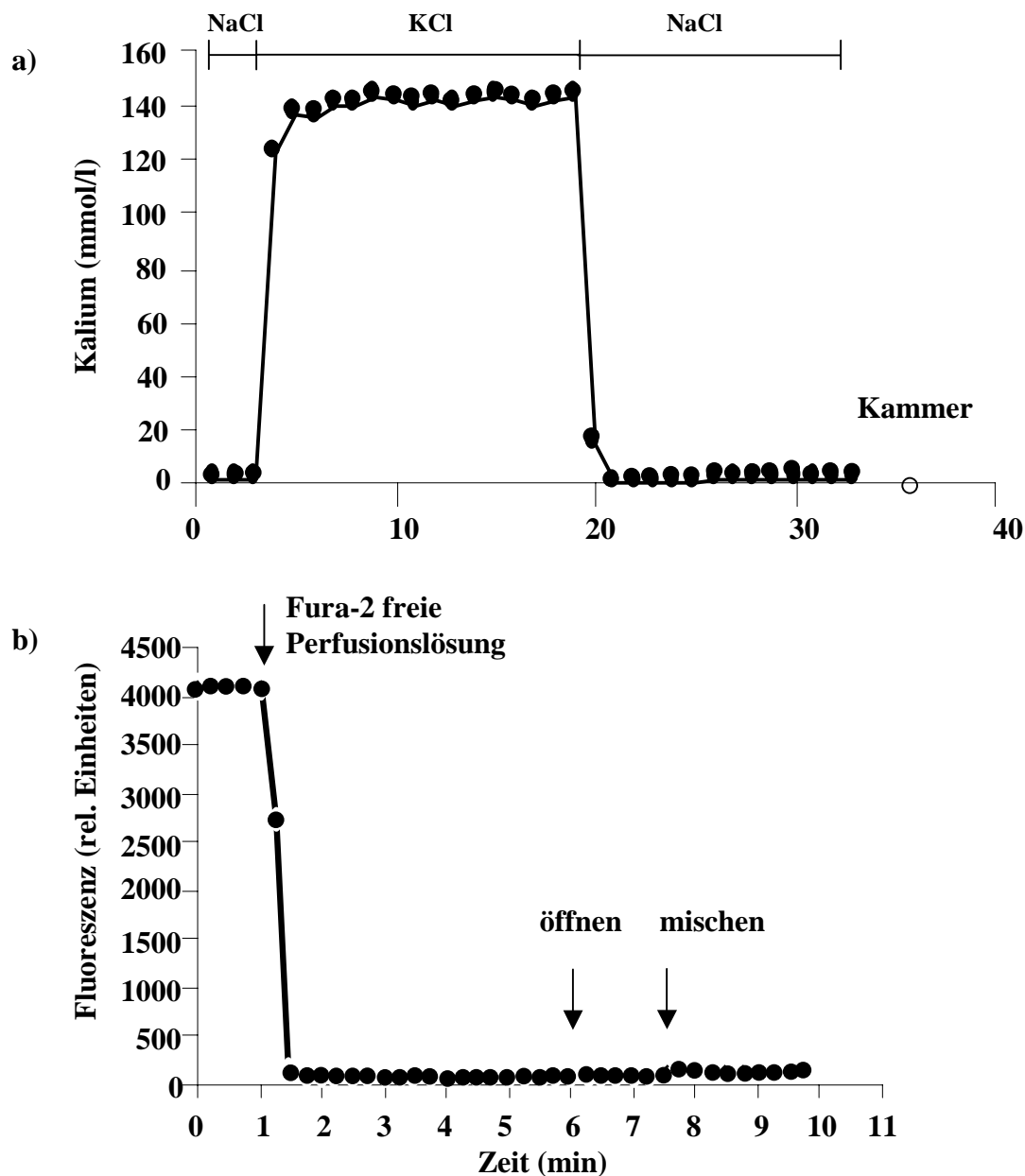


Abb. 4.13. Die Perfusionskammer

a) Veränderung der Kaliumkonzentration im Effluat der Perfusionskammer. Perfusionsfluß 2 ml/min. Die Perfusionskammer wurde mit 140 mmol/l NaCl-Lösung gefüllt und perfundiert, nach 3 Minuten wurde die Perfusionslösung durch eine 140 mmol/l KCl-Lösung ersetzt. Nach 19 Minuten wurde die Perfusionslösung durch die ursprüngliche NaCl-Lösung ersetzt.

b) Die Perfusionskammer und die zuleitenden Schläuche wurden mit Fura-2 Lösung gefüllt und perfundiert. Nach 75 Sekunden wurde die Perfusionslösung durch eine Fura-2-freie-Lösung ersetzt. Der Perfusionsfluß betrug 2 ml/min. Nach 6 min wurde die Kammer geöffnet und der Inhalt durchmischt.

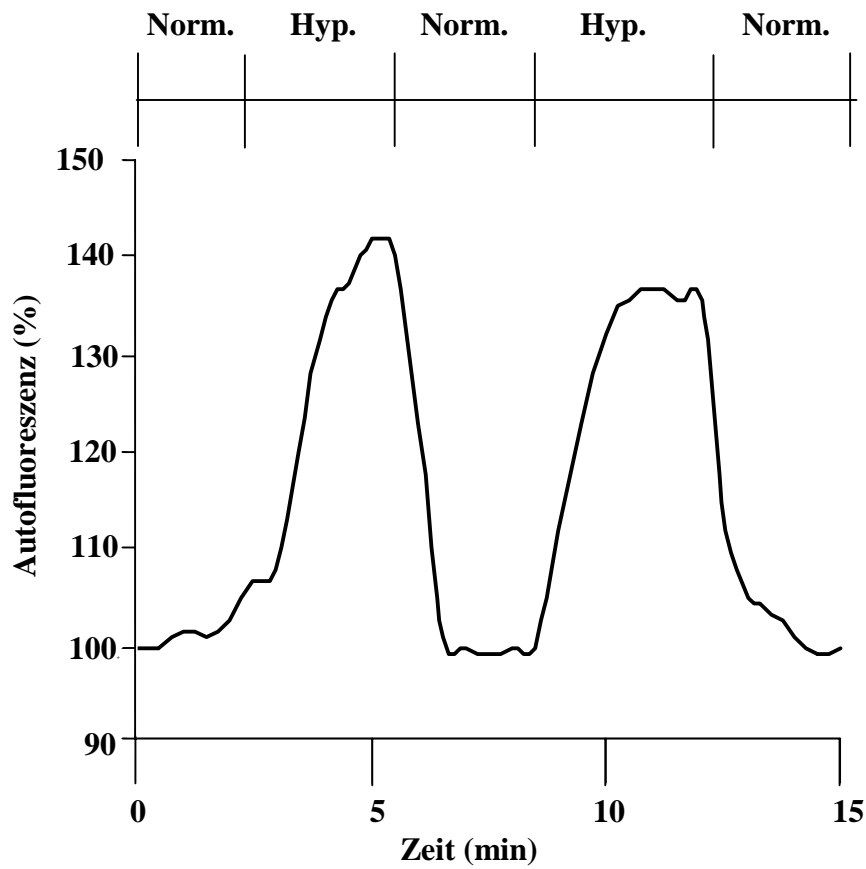


Abb. 4.14. Reversibler Anstieg der Autofluoreszenz bei Hypoxie

NADH-assoziierte Autofluoreszenz eines individuellen proximalen Tubulus bei Normoxie (Norm.) und bei Hypoxie (Hyp.) im Zeitverlauf. Hypoxie führte zu einem schnellen reversiblen Anstieg der Autofluoreszenz.

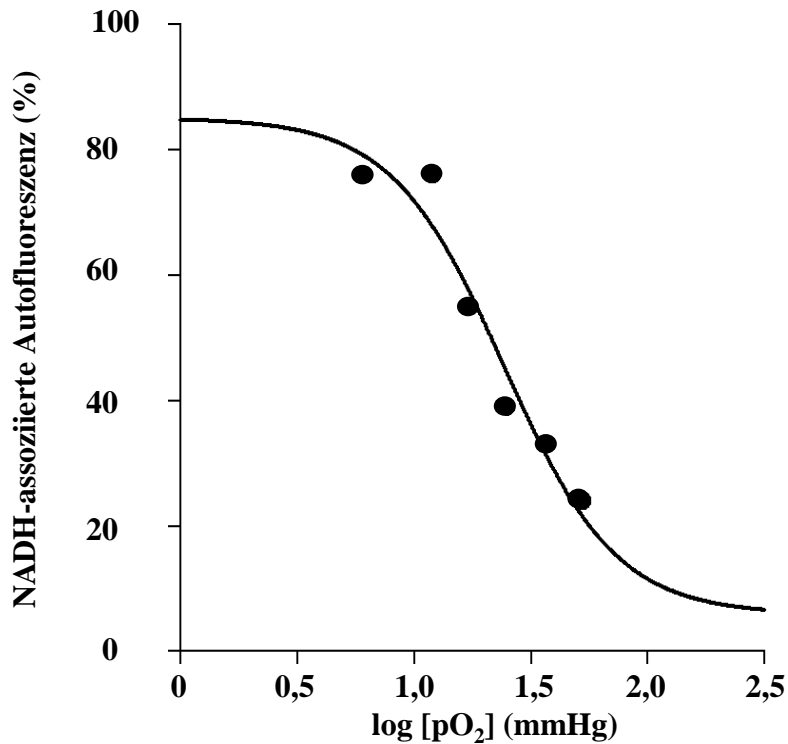


Abb. 4.15. Sauerstoffpartialdruck-Wirkungs Beziehung der NADH-assozierten Autofluoreszenz

Individuelle proximale Tubuli wurden verschiedenen Schweregraden einer Hypoxie ausgesetzt und der Prozentsatz der Tubuli berechnet bei denen der jeweilige Schweregrad zu einem signifikanten Anstieg der Autofluoreszenz führte. Daraus wurde eine Schweregrad Wirkungsbeziehung erstellt. Bei 24 mmHg kam es in der Hälfte aller untersuchten Tubuli zu einem signifikanten Anstieg der Autofluoreszenz.

des Sauerstoffpartialdruckes mit einem Anstieg der Autofluoreszenz reagierten ab (15-20 mmHg 55% (20 Tubuli in 6 Experimenten), 20-30 mmHg 39% (31 Tubuli in 12 Experimente), 30-40 mmHg 33% (67 Tubuli in 9 Experimenten), 40-60 mmHg 24% (75 Tubuli in 7 Experimenten)). In der normoxischen Kontrollgruppe kam es im selben Zeitraum nur bei 5% aller Tubuli (43 Tubuli in 9 Experimenten) zu einem Anstieg der Autofluoreszenz. Durch Zugabe von 100 µmol/l des Cytochromoxidase-Hemmers Kaliumcyanid (KCN) kam es in 85% (n= 53 Tubuli in 5 Experimenten) aller untersuchten proximalen Tubuli zu einem Anstieg der Autofluoreszenz. Der aus der Sauerstoffpartialdruck-Wirkungs Beziehung der NADH-assoziierte Autofluoreszenz berechnete Halbsättigungsdruck lag bei 24 mmHg (r= 0,99).

4.2.2.2. Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration

Hypoxie führte innerhalb von 10 Minuten zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Dieser Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration war abhängig vom Schweregrad der Hypoxie (vergleiche **Abb. 4.16.**). Ein Sauerstoffpartialdruck unter 10 mmHg führte zu einem signifikanten Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration um 88 ± 28 nmol/l (n= 12, p< 0,001 versus Normoxie). Lag der Sauerstoffpartialdruck zwischen 10-15 mmHg, kam es zu einem signifikanten Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration um 143 ± 50 nmol/l (n= 17, p< 0,05 versus Normoxie). Im Gegensatz dazu verändert sich die freie intrazelluläre Calciumkonzentration bei einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 15 und 20 und 20 und 30 mmHg nicht.

Der Zeitverlauf des Anstiegs der freien intrazellulären Calciumkonzentration ist in **Abbildung 4.17.** dargestellt. Hypoxie unter 15 mmHg führte zu einem signifikanten Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration von 112 ± 28 nmol/l nach 10 Minuten auf 236 ± 38 (n= 28, p< 0,01 versus 0 Minuten) und nach 15 Minuten auf 279 ± 57 (n= 28, p< 0,001 versus 0 Minuten). Unter normoxischen Kontrollbedingungen lag die freie intrazelluläre Calciumkonzentration zu Beginn des Versuches bei 113 ± 18 nmol/l (n= 7) und blieb innerhalb der untersuchten 15 Minuten konstant.

4.2.2.3. Die strukturelle Zellschädigung

Hypoxie führte zu einer strukturellen Schädigung individueller proximaler Tubuli. **Abbildung 4.18.** zeigt das Ergebnis eines typischen Experimentes. Dargestellt sind mit PI gefärbte proximale Tubuli als Maß für die strukturelle Zellschädigung. 30 Minuten Hypoxie führte zu einer massiven Anstieg PI angefärbter Zellkerne. Im Gegensatz dazu waren nach 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen nicht mehr Zellkerne mit PI angefärbt als zu Beginn des Experimentes.

Zu Versuchsbeginn waren $7 \pm 1\%$ (n= 9, aus 9 verschiedenen Präparationen) aller Zellkerne mit PI angefärbt (vergleiche **Abb. 4.19.**). Dieser Anteil erhöhte sich unter normoxischen Bedingungen innerhalb von 20 Minuten leicht auf $10 \pm 2\%$ (n= 6, aus 6 verschiedenen Präparationen). Ein Sauerstoffpartialdruck unter 30 mmHg führte zu einer signifikanten Erhöhung der mit PI angefärbter Zellkerne. Ein Unterschied zwischen

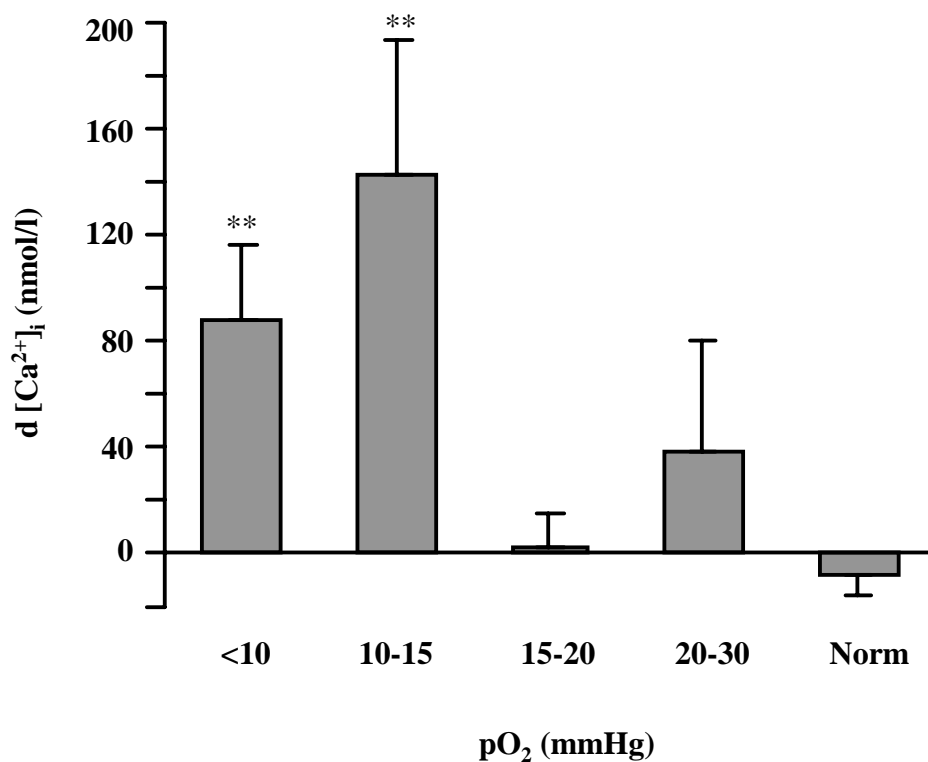


Abb. 4.16. Anstieg der [Ca²⁺]_i in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie

Individuelle proximale Tubuli wurden auf den Anstieg der [Ca²⁺]_i bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert der Differenz zum Ursprungswert ± SEM nach 10-minütiger Hypoxie von 12 -17 getrennten Untersuchungen.**: p < 0,01 jeweils versus Normoxie (Norm).

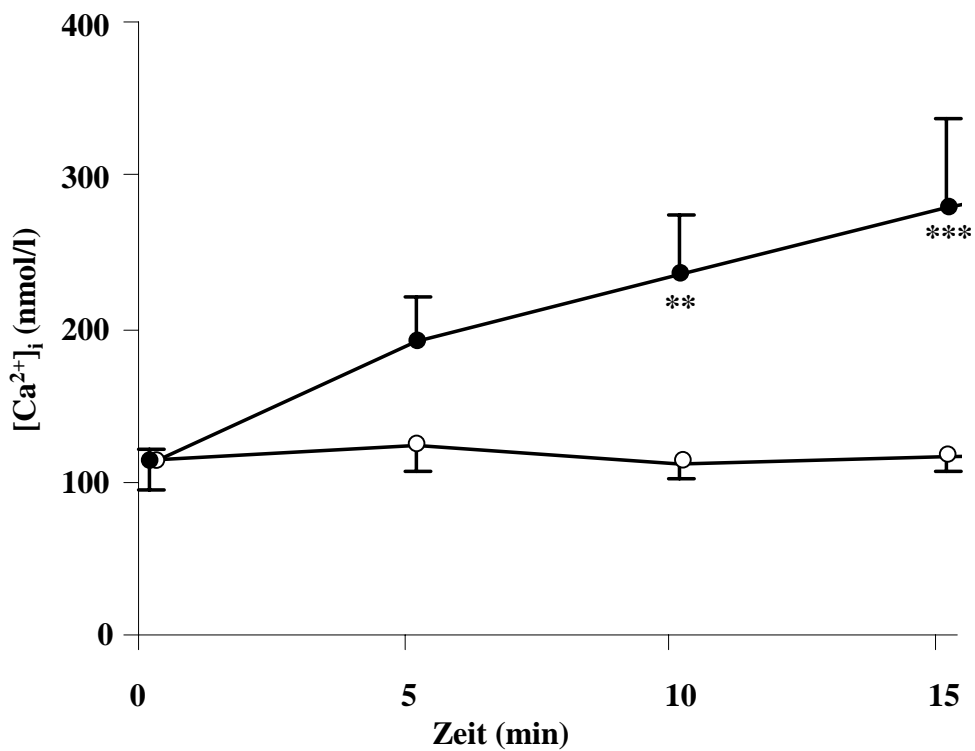


Abb. 4.17. Zeitverlauf der [Ca²⁺]_i in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie

Individuelle proximale Tubuli wurden auf den Zeitverlauf der [Ca²⁺]_i bei 0-15 (●) und 15-20 (○) mmHg untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert ± SEM von 8 bzw. 28 getrennten Untersuchungen. ** p< 0,01 und *** p< 0,001 jeweils versus Normoxie.

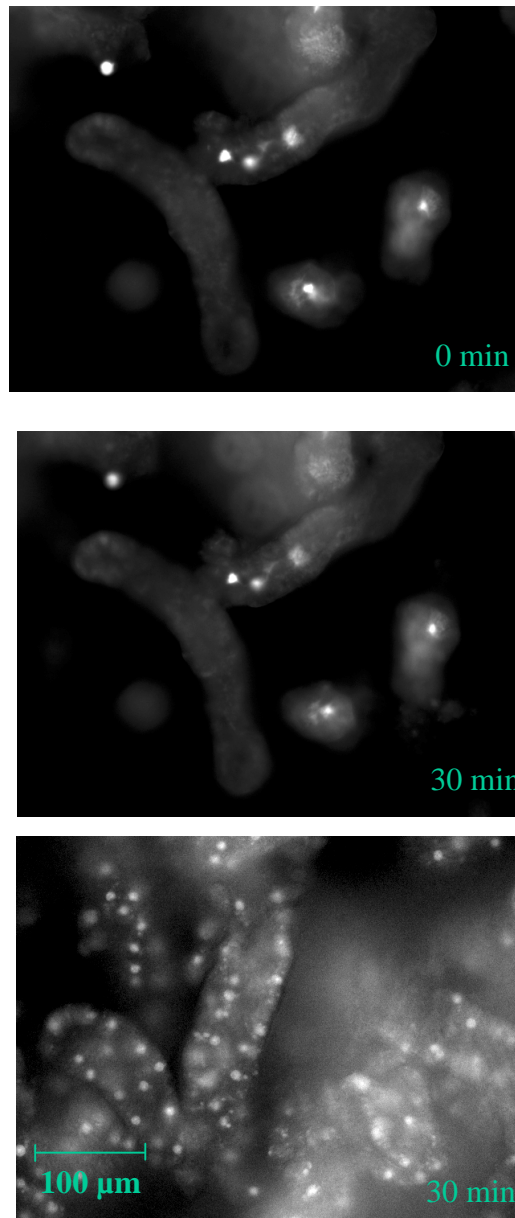


Abb. 4.18. Nachweis der Zellschädigung mit Propidium Jodid

Strukturelle Zellschädigung wurde an individuellen proximalen Tubuli durch den Fluoreszenzfarbstoff PI nachgewiesen.

Oben: proximale Tubuli zu Beginn des Versuches,

mitte: dieselben proximalen Tubuli nach 30 Minuten unter normoxischen Bedingungen und

unten: zum Vergleich einen anderen Versuch nach 30 Minuten Hypoxie bei 150-facher Vergrößerung.

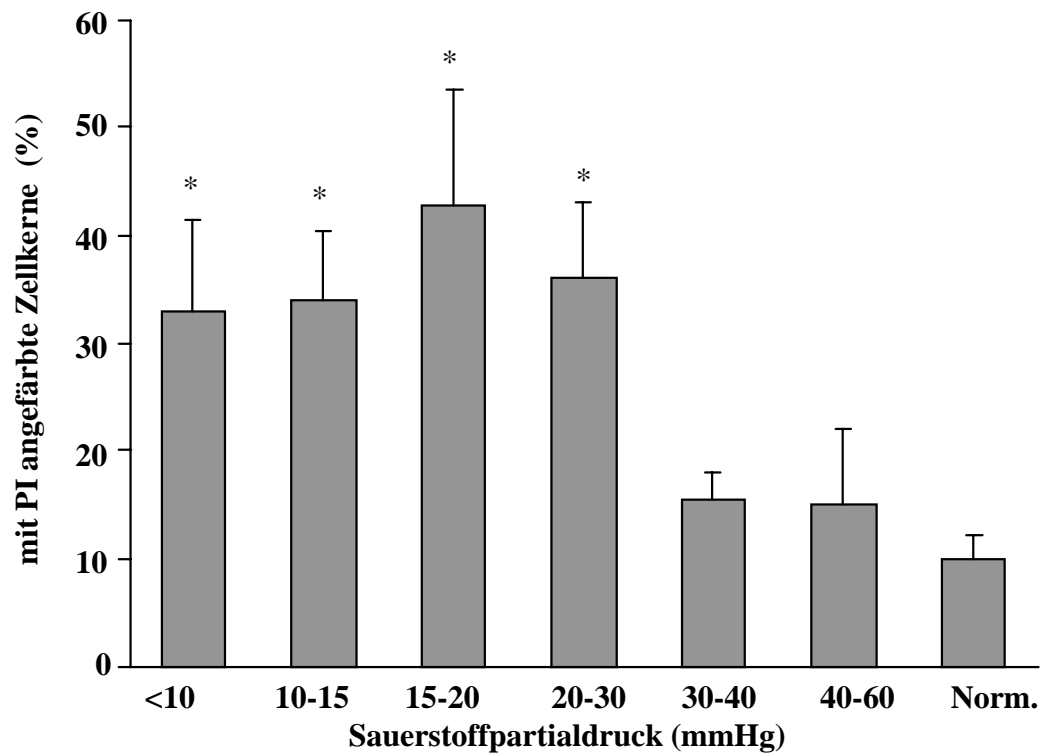


Abb. 4.19. Zellschädigung bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie

Individuelle proximale Tubuli wurden auf strukturelle Zellschäden bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie und bei Normoxie (Norm.) untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 6 bis 8 getrennten Untersuchungen. *: $p < 0,05$ jeweils versus Normoxie.

den untersuchten Klassen des Sauerstoffpartialdruckes war nicht nachweisbar. Ein Sauerstoffpartialdruck über 30 mmHg verursachte keinen Anstieg der mit PI angefärbten Zellkerne.

4.2.3. Die Wirkung von ATP

4.2.3.1. Die Wirkung von ATP auf die freie intrazelluläre Calciumkonzentration individueller proximaler Tubuli

Die Applikation von 1 mmol/l ATP führte zu einem reversiblen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Abbildung 4.20. zeigt eine typische Registrierung mit einer anschließenden in vivo Kalibrierung. ATP führte zu einem schnellen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration von 161 ± 17 (n= 7) auf 414 ± 32 nmol/l (n= 7) und einem anschließenden Abfall zurück auf den Basalwert.

4.3. Untersuchungen an kultivierten Tubuluszellen

4.3.1. ATP-Depletion und Erholung an LLC-PK₁-Zellen als Modell für eine Hypoxie mit anschließender Erholung

4.3.1.1. Zellulärer ATP-Gehalt bei Depletion und Erholung

0,1 μ mol/l Antimycin A führte in LLC-PK₁-Zellen innerhalb von einer Stunde zu einem signifikanten Abfall des zellulären ATP-Gehaltes von $18,9 \pm 4,5$ auf $0,3 \pm 0,1$ nmol/mg Protein (n= 8, p< 0,01 versus Kontrolle) (vergleiche **Abb. 4.21.**). Die anschließende insgesamt 15-minütige Erholung führte zu einem Anstieg des zellulären ATP-Gehaltes zurück auf den Ursprungswert ($20,8 \pm 3,5$ nmol/mg Protein, n= 8, p< 0,01 versus Erholung).

4.3.1.2. Zellschädigung bei ATP-Depletion und Erholung

Die ATP-Depletion führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der strukturellen Zellschädigung. Es kam weder zu einer erhöhten LDH-Freisetzung (Depletion 85% der Kontrolle, n= 4, nicht signifikant) noch zu einem Verlust der Fähigkeit, den Vitalfarbstoff Trypanblau auszuschließen (Depletion 87 % der Kontrolle, n= 5, nicht signifikant).

4.3.1.3. Die MAP-Kinase Aktivität bei ATP-Depletion und Erholung

Zelluläre ATP-Depletion führte zu einer leichten, jedoch nicht-signifikanten Verringerung der basalen MAP-Kinase Aktivität von 524 ± 45 (n= 27) auf 374 ± 35 pmol/mg Protein/Minute (n= 27). Eine 15-minütige Erholung führte zu einer signifikanten Aktivierung der basalen MAP-Kinase-Aktivität auf 768 ± 77 pmol/mg Protein/Minute (n= 27, p< 0,01 versus unbehandelt und versus Depletion)(vergleiche **Abb. 4.22.**).

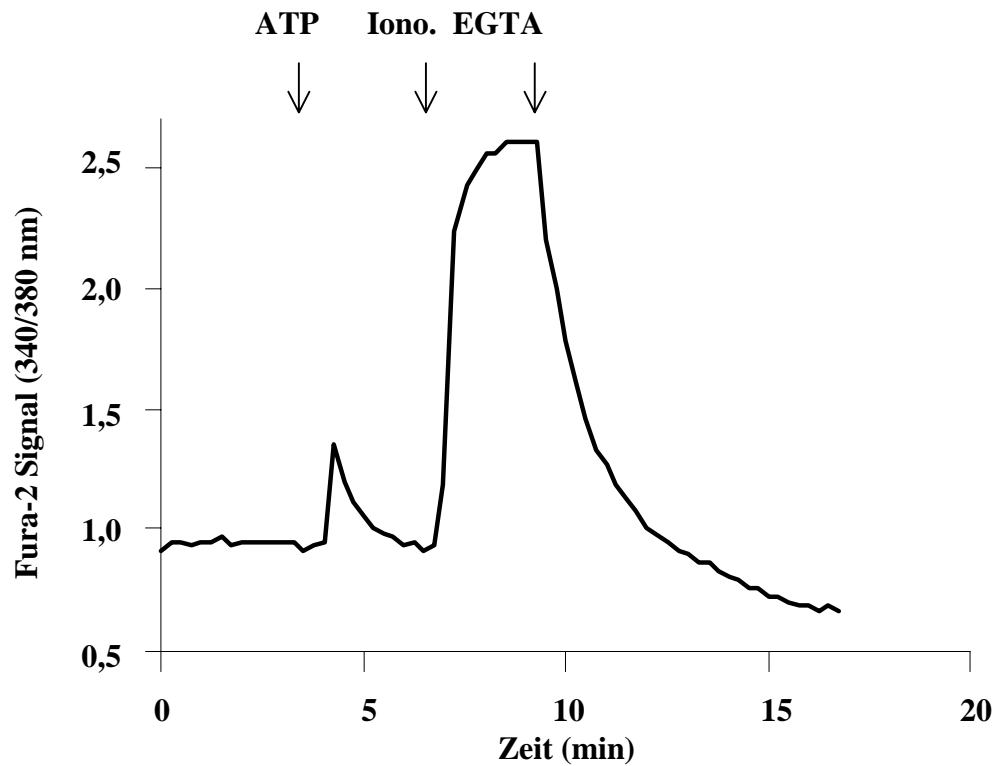


Abb. 4.20. Die Wirkung von ATP auf die $[Ca^{2+}]_i$ individueller proximaler Tubuli

Exemplarische Originalregistrierung zur Bestimmung der $[Ca^{2+}]_i$ eines individuellen proximalen Tubulus bei Gabe von ATP. Dem proximalen Tubulus wurde 1 mmol/l ATP (**ATP**) durch Injektion in die Perfusionskammer appliziert. Im Anschluß wurde eine Kalibration durch Zugabe von 10 μ mol/l Ionomycin (**Iono.**) und darauffolgend 10 mmol/l EGTA (**EGTA**) durchgeführt.

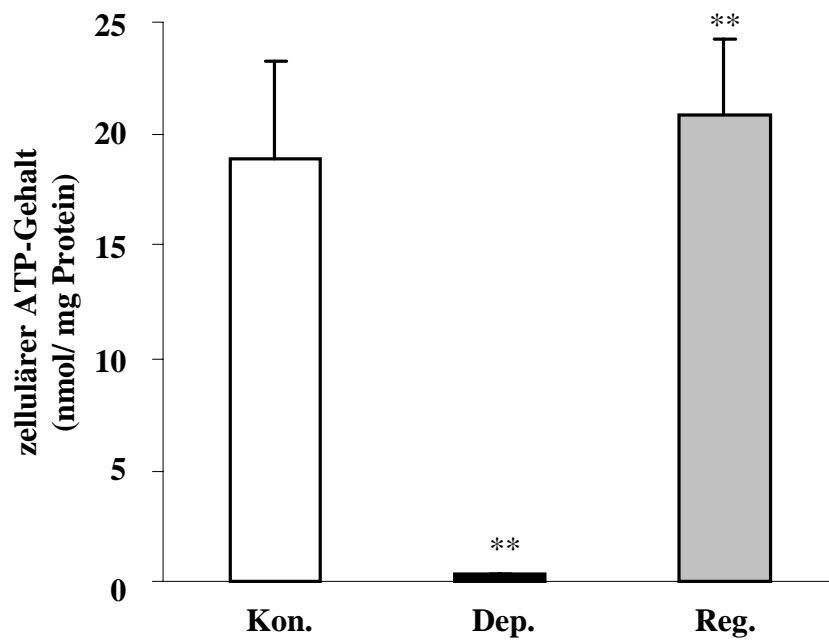


Abb. 4.21. Zellulärer ATP-Gehalt bei Depletion und Erholung

LLC-PK1-Zellen wurden auf ihren zellulären ATP-Gehalt unter Kontrollbedingungen (Kon.), nach einer Stunde ATP-Depletion (Dep.) und nach 15 Minuten Erholung (Reg.) untersucht. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM der Dreifachbestimmungen von 8 separaten Experimenten. **: $p < 0,01$ Depletion versus Kontrollbedingungen und Regeneration versus Depletion.

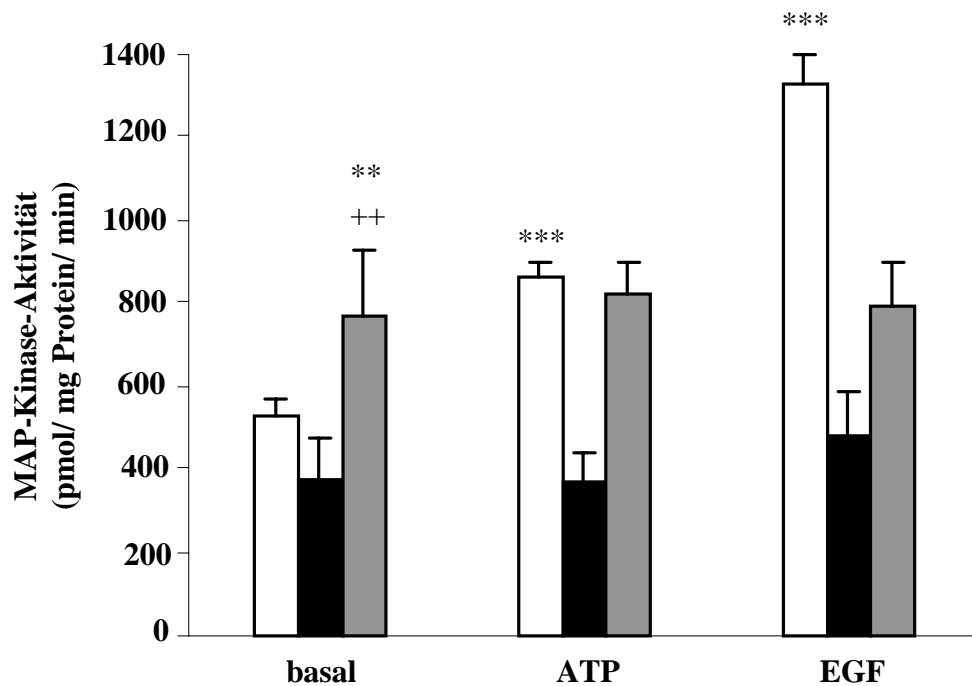


Abb. 4.22. Die Wirkung von ATP und EGF auf die MAP-Kinase Aktivität

LLC-PK₁-Zellen wurden auf die MAP-Kinase Aktivität unter Kontrollbedingungen (□), nach einer einstündigen ATP-Depletion (■) und nach insgesamt 15-minütiger Erholung (■) untersucht. Dargestellt ist die MAP-Kinase Aktivität der Zellen in pmol/mg Protein/min unter Basalbedingungen (basal), bei Zugabe von 10 µmol/l ATP (ATP) und 100 nmol/l EGF (EGF). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert ± SEM von 12-27 unabhängigen Dreifachbestimmungen. **: p < 0,01 Kontrollbedingungen versus Repletion, ++: p < 0,01 ATP-Depletion versus Repletion und ***: p < 0,001 ATP und EGF versus Basalbedingungen.

Um zu testen, ob es sich bei der nachgewiesenen Aktivierung ausschließlich um die MAP-Kinase handelt, wurden die Zellen eine Stunde vor Beginn der Experimente mit 50 $\mu\text{mol/l}$ des MEK1-Inhibitors PD 98059 inkubiert. PD 98059 führte zu einer signifikanten Abnahme der basalen MAP-Kinase Aktivität unter Kontrollbedingungen von auf 370 ± 77 pmol/mg Protein/Minute ($n= 6$, $p < 0,05$). Während der ATP-Depletion hatte PD 98059 keinen Einfluß auf die basale MAP-Kinase Aktivität. Der durch die Regeneratio hervorgerufene Anstieg der basalen MAP-Kinase Aktivität konnte durch PD 98059 vollständig gehemmt werden ($n= 6$, $p < 0,05$).

Eine Veränderung der Osmolarität des Medium verursachten keinen Anstieg der basalen MAP-Kinase Aktivität (390 ± 52 pmol/mg Protein/Minute, in glukosefreien Medium versus 444 ± 70 pmol/mg Protein/Minute in glukosehaltigen Medium, $n= 7$, nicht signifikant).

4.3.1.4. Apoptose bei ATP-Depletion und Erholung

Nach 16-stündiger ATP-Erholung nach ATP-Depletion wurden die Zellen auf DNS Fragmentierung untersucht. Es fand sich kein als Hinweis auf Apoptose. Abbildung **4.23.** zeigt die aufgetrennte DNS unter Kontrollbedingungen, nach einer Stunde ATP-Depletion und nach 16 stündiger Erholung. Nach einer 24-stündigen Erholung wurden Kulturen mit dem Kernfarbstoff Hoechst angefärbt, und auf das Auftreten von apoptotischen Körperchen untersucht. Es wurden dabei keinerlei Hinweise auf Apoptose gefunden.

4.3.1.5. Zellwachstum bei ATP-Depletion und Erholung

Durch eine ATP-Depletion mit anschließender Erholung konnte weder nach 24 noch nach 48 Stunden eine Veränderung des Zellwachstums ($n= 6$) nachgewiesen werden.

4.3.2. Der Einfluß protektiver Substanzen bei ATP-Depletion und Erholung untersucht an LLC-PK₁-Zellen

4.3.2.1. Die Wirkung von ATP und Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) auf die MAP-Kinase Aktivität

Unter Kontrollbedingungen führte die Gabe von 100 nmol/l EGF für 5 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der MAP-Kinase Aktivität von 524 ± 45 auf 1327 ± 161 pmol/mg Protein/Minute ($n= 12$, $p < 0,001$) (vergleiche **Abb. 4.22.**). Nach einer Stunde ATP-Depletion führte eine 5-minütige Stimulation mit EGF nicht mehr zu einem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität. Nach einer einstündigen ATP-Depletion mit einer insgesamt 15-minütigen Erholung führte eine 5-minütige Stimulation mit EGF zu keinem weiteren Anstieg der bereits signifikant erhöhten MAP-Kinase Aktivität.

Unter Kontrollbedingungen führte die Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ ATP für 5 Minuten zu einem signifikanten Anstieg der MAP-Kinase Aktivität von 524 ± 45 auf 865 ± 97 pmol/mg Protein/Minute ($n= 16$, $p < 0,001$) (vergleiche **Abb. 4.22.**). Nach einer Stunde ATP-Depletion führte eine 5-minütige Stimulation mit exogenen ATP zu nicht



Abb. 4.23. Untersuchung auf DNS-Fragmentierung

Foto eines mit Ethidiumbromid-Lösung gefärbten und mittels einer UV-Quelle visualisierten Agarose-Gels zur Untersuchung auf DNS-Fragmentierung. LLC-PK₁-Zellen wurden unter Kontrollbedingungen (K), nach einer Stunde ATP-Depletion (D) und nach 16 Stunden Regeneration (R) untersucht. Zum Vergleich ist ein Standard (S) mit fragmentierter DNS aufgetragen.

mehr zu einem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität. Nach einer ein stündigen ATP-Depletion mit einer insgesamt 15-minütigen Erholung führt eine 5-minütige Stimulation mit exogenen ATP ebenfalls zu keinem weiteren Anstieg der bereits signifikant erhöhten MAP-Kinase Aktivität.

4.3.2.2. Die Wirkung von Glycin und Quercetin auf die MAP-Kinase Aktivität

Glycin führte zu keinem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität bei ATP-Depletion (73% der Basalaktivität, n= 7) und konnte auch die Stimulierbarkeit durch ATP nicht wiederherstellen (78% der Basalaktivität, n= 7). Auch nach Erholung des zellulären ATP-Gehaltes besaß Glycin keinen Einfluß auf die MAP-Kinase Aktivität.

Quercetin führte nicht zu eine Anstieg der MAP-Kinase Aktivität bei ATP-Depletion (70% der Basalaktivität, n= 6) und konnte ebenfalls die Stimulierbarkeit durch ATP nicht wiederherstellen (86% der Basalaktivität, n= 7). Auch nach Erholung des zellulären ATP-Gehaltes besaß Quercetin keinen Einfluß auf die MAP-Kinase Aktivität.

4.3.2.3. Die Wirkung auf die intrazellulären Calcium-Speicher

Zelluläre ATP-Depletion führte zu einer Entleerung intrazellulärer Calcium-Speicher. Die Applikation von 5 µmol/l Thapsigargin führte zu einer Entleerung der intrazellulären Calcium-Speicher, mit einem schnellen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration innerhalb von 15 Sekunden, einem schnellen Abfall und einer anschließend leicht erhöhten freien intrazellulären Calciumkonzentration (vergleiche **Abb. 4.24.**). Die freie intrazelluläre Calciumkonzentration stieg signifikant von 456 ± 21 auf 659 ± 64 nmol/l (n= 5, $p < 0,01$ versus Basalaktivität) und einer anschließenden Konzentration von 573 ± 47 nmol/l (n= 5, $p < 0,05$ versus Basalaktivität). Nach einer Stunde ATP-Depletion führte Thapsigargin zu einem immer noch signifikanten, jedoch deutlich geringeren Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration von 471 ± 39 auf 533 ± 31 nmol/l (n= 5, $p < 0,001$) und einer anschließenden Konzentration von 505 ± 32 nmol/l (n= 5, $p < 0,03$). Nach einer insgesamt 15-minütigen Erholung kam es durch Thapsigargin ebenfalls zu einem deutlich verringerten, jedoch noch immer signifikanten Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration (n= 5, $p < 0,001$).

4.3.3. Die Wirkung von β -Adrenoceptor Stimulation untersucht an OK-Zellen

4.3.3.1. Die Wirkung von Adrenoceptor Stimulation auf den Zeitverlauf und die Konzentrationsabhängigkeit der MAP-Kinase Aktivierung

1 µmol/l des Adrenoceptor-Agonisten Adrenalin stimulierte die MAP-Kinase Aktivität. Abbildung **4.25.** zeigt den typischen Zeitverlauf. Die maximale Stimulation war bereits nach 5 Minuten erreicht, und nahm anschließend langsam ab. 30 Minuten nach der Stimulation war keine erhöhte Aktivität der MAP-Kinase mehr feststellbar. Diese Stimulation der MAP-Kinase Aktivität durch Adrenalin war konzentrationsabhängig (vergleiche

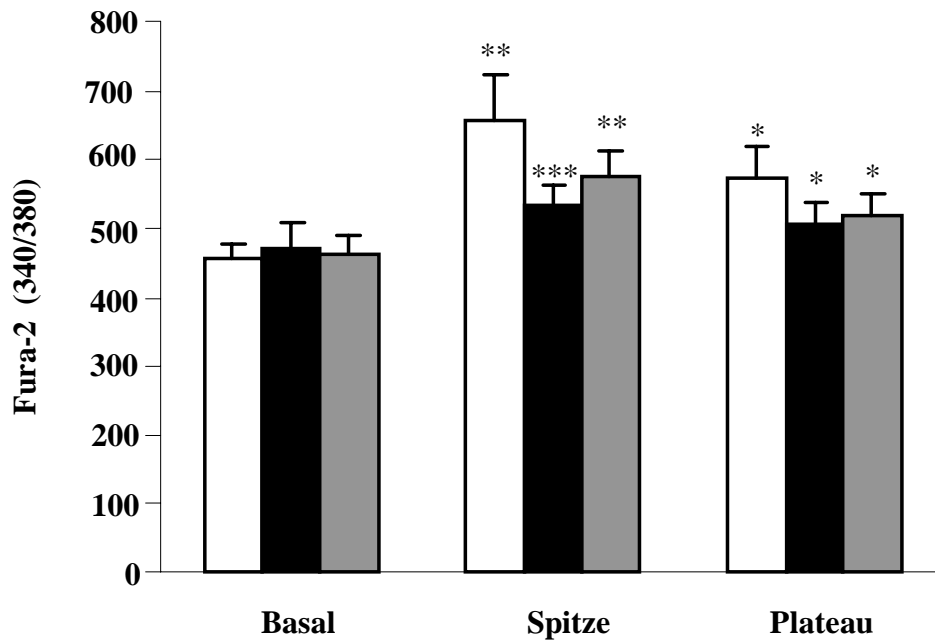


Abb. 4.24. Die Folgen von ATP-Depletion und Erholung auf die intrazellulären Calcium-Speicher

Die Folgen von ATP-Depletion und Erholung auf intrazelluläre Ca^{2+} -Speicher wurde in LLC-PK₁ Zellen durch Zugabe 5 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin unter Kontrollbedingungen (\square), nach einer einstündigen ATP-Depletion (\blacksquare) und nach insgesamt 15-minütiger Regeneration (\blacksquare) untersucht. Dargestellt ist das Verhältnis der Intensität der Fura-2 abhängigen Fluoreszenz bei 340 und 380 nm unter Basalbedingungen (Basal), zum Zeitpunkt des Maximal- (Spitze) und nach Erreichen eines stabilen Endwertes (Plateau). Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 6 unabhängigen Messungen mit bis zu 5 Zellen. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$ jeweils versus Basalbedingungen.

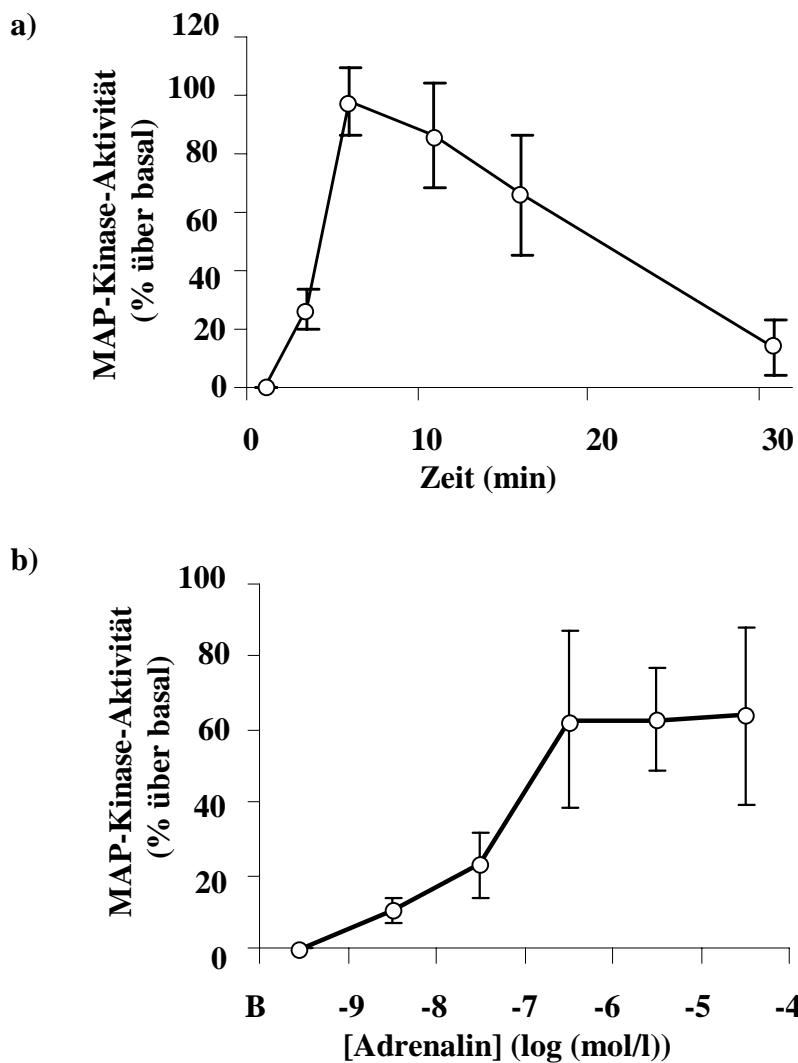


Abb. 4.25. Zeitverlauf und Konzentrationsabhängigkeit der MAP-Kinase Aktivierung bei Adrenoceptor Stimulation

- a) Zeitverlauf der MAP-Kinase-Aktivierung nach Stimulation mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin.
- b) Abhängigkeit der MAP-Kinase-Aktivierung von der eingesetzten Adrenalin Konzentration.

Jeder Punkt entspricht dem Mittelwert \pm SEM von 6 unabhängigen Dreifachbestimmungen.

Abb. 4.25.) Eine maximale Stimulation lag bei 10 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin vor (100%), die halbmaximale Wirkung lag zwischen 10 und 100 nmol/l .

4.3.3.2. Die Wirkung von Adrenoceptor-Agonisten und -Antagonisten auf die Adrenalin vermittelte Stimulation der MAP-Kinase Aktivität

Der α_2 -Adrenoceptor Agonist UK14,304 führte zu einem signifikanten Anstieg der MAP-Kinase Aktivität von 270 ± 15 auf 420 ± 30 $\text{pmol/mg Protein/Minute}$ ($n= 10, p < 0,01$). Das die Adenylylzyklase hemmende Serotonin (Serotonin: 687 ± 67 $\text{pmol/mg Protein/Minute}$, $n= 11$, $p < 0,001$) und das die Proteinkinase C stimulierende PMA (PMA 428 ± 53 $\text{pmol/mg Protein/Minute}$, $n= 11$, $p < 0,001$) führten zu einem ähnlich hohen, ebenfalls signifikanten Anstieg der MAP-Kinase Aktivität.

Die Stimulation der MAP-Kinase Aktivität durch gleichzeitige Gabe von Adrenalin und PMA war größer als bei der Gabe der Einzelsubstanzen (1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin: $225 \pm 20\%$ von Basal, 1 $\mu\text{mol/l}$ PMA $167 \pm 10\%$, Adrenalin + PMA: $316 \pm 26\%$; $n= 8$, $p < 0,05$ versus Adrenalin oder PMA alleine).

Eine 5 minütige Präinkubation der Zellen mit 10 $\mu\text{mol/l}$ des α -Adrenoceptor Antagonisten Phentolamin ($n= 10$, $p < 0,001$) oder 1 $\mu\text{mol/l}$ des α_2 -Adrenoceptor Antagonisten Yohimbin ($n= 10$, $p < 0,05$) hemmte die Adrenalin induzierte MAP-Kinase Aktivierung, wie in Abbildung **4.26.** gezeigt signifikant. 100 nmol/l des α_1 -Adrenoceptor Antagonist Prazosin und 200 nmol/l des β -Adrenoceptor Antagonisten Pindolol führten zu keiner signifikanten Hemmung der Adrenalin induzierten MAP-Kinase Aktivierung.

Eine unspezifische Wirkung von Phentolamin und Yohimbin konnte ausgeschlossen werden, da Phentolamin weder die Basalaktivität (Phentolamin: $112 \pm 9\%$ von Basal, $n= 5$, Yohimbin: $122 \pm 9\%$ von Basal, $n= 5$), noch die durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin stimulierte MAP-Kinase Aktivität beeinflusste (Serotonin: $233 \pm 48\%$ von Basal, Serotonin und Phentolamin: $205 \pm 47\%$ von Basal, $n= 5$). Die verwendeten Konzentrationen des α_2 -Adrenoceptor Antagonisten Prazosin ($125 \pm 23\%$ von Basal, $n= 5$) und des partiellen β -Adrenoceptor Agonisten Pindolol ($111 \pm 7\%$ von Basal, $n= 11$) beeinflusste die MAP-Kinase Aktivität ebenfalls nicht.

4.3.3.3. Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nach Pertussistoxin-Vorbehandlung

Die Hemmung der Adenylylzyklase durch Pertussistoxin- (200 ng/ml) Vorbehandlung für 20 Stunden hemmte die Adrenalin und die UK14,304 (415 ± 30 unbehandelt und 266 ± 30 $\text{pmol/mg Protein/Minute}$) induzierte Stimulation der MAP-Kinase Aktivität, aber nicht die Stimulation durch PMA (vergleiche **Abb. 4.27.**).

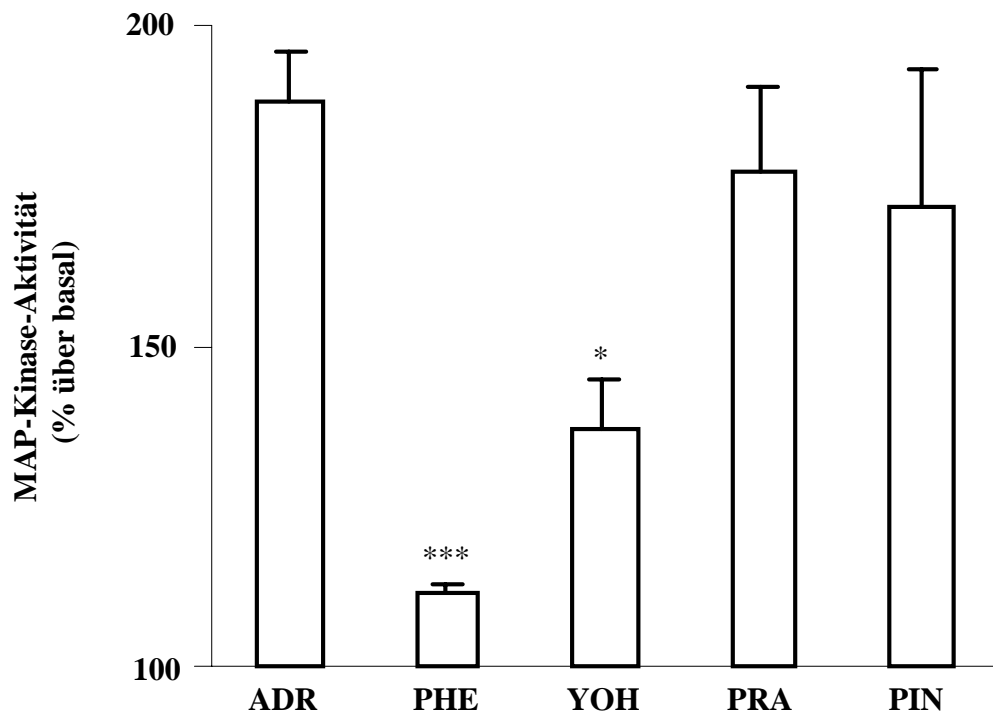


Abb. 4.26. Adrenoceptor stimulierte MAP-Kinase-Aktivität bei Gabe verschiedener Adrenoceptor-Antagonisten

Wirkung von 10 $\mu\text{mol/l}$ Phentolamin (PHE), 1 $\mu\text{mol/l}$ Yohimbin(YOH), 100 nmol/l Prazosin (PRA) und 200 nmol/l Pindolol (PIN) auf die Adrenalin (ADR) stimulierte MAP Kinase Aktivität von OK-Zellen. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 10 getrennten Dreifachbestimmungen. *: $p < 0,05$ und ***: $p < 0,001$ jeweils versus Adrenalin Stimulation.

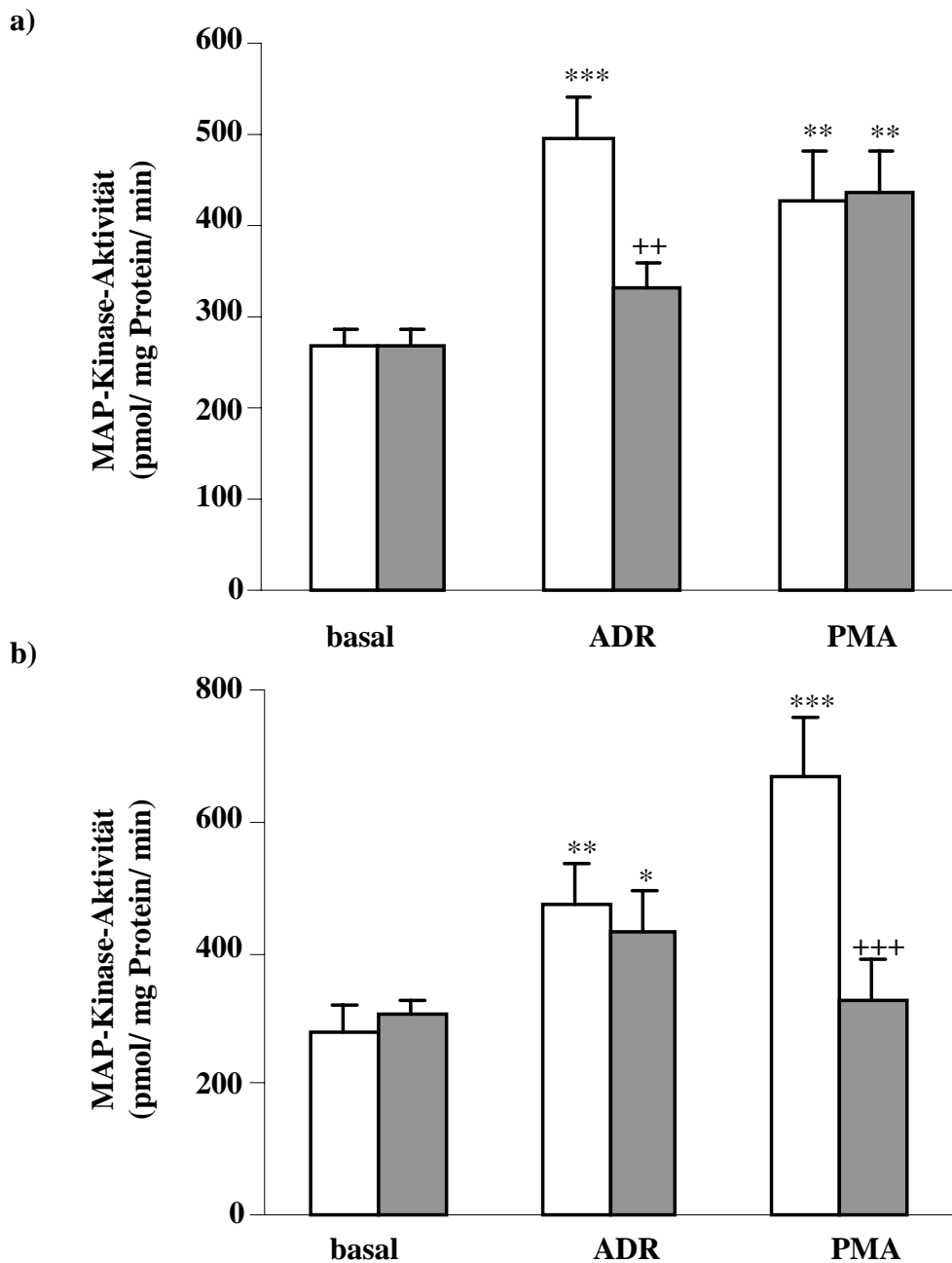


Abb. 4.27. Stimulation der MAP-Kinase-Aktivität nach Pertussistoxin- und PMA- Vorbehandlung

Die MAP-Kinase-Aktivität von OK-Zellen wurde auf die Basalaktivität (basal), die Stimulierbarkeit durch 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin (ADR) und 1 $\mu\text{mol/l}$ PMA (PMA) ohne (□) oder mit (■) einer 20-stündigen Vorbehandlung mit
a) 200ng/ml Pertussistoxin oder
b) 5 $\mu\text{mol/l}$ PMA untersucht.

Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 10 (a) oder 8 (b) unabhängigen Dreifachbestimmungen. *: $p < 0,05$, *: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$ jeweils versus basal, ++: $p < 0,01$ und +++: $p < 0,001$ jeweils versus Pertussistoxin-Vorbehandlung (a) oder PMA-Vorbehandlung (b).

4.3.3.4. Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nach PMA-Vorbehandlung

Die Hemmung der Proteinkinase C durch PMA- (5 $\mu\text{mol/l}$) Vorbehandlung für 20 Stunden hemmte die Stimulation der MAP-Kinase Aktivität durch akute Zugabe von PMA, beeinflusste jedoch nicht die basale oder die Adrenalin stimulierte MAP-Kinase Aktivität (vergleiche **Abb. 4.27.**).

4.3.3.5. Spezifität der MAP-Kinase Aktivierung

Vorinkubation mit 100 $\mu\text{mol/l}$ des MEK1-Inhibitors PD 98059 führte zu einer signifikanten Abnahme der basalen MAP-Kinase Aktivität ($n= 5$, $p< 0,05$). In Anwesenheit von PD 98059 stimulierten die zuvor verwendeten Konzentrationen von Adrenalin, Serotonin oder PMA die MAP-Kinase Aktivität nicht mehr.

4.3.3.6. cAMP-Akkumulation

Die basale cAMP-Akkumulation betrug $5,08 \pm 0,50$ pmol/Gewebekulturschale ($n= 20$). 10 Minuten Inkubation mit 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin ($n= 8$, $p< 0,05$) oder 100 nmol/l des Adenylatcyclase aktivierenden Forskolin ($n= 8$, $p< 0,01$) stimulierten die cAMP Bildung ungefähr um das Dreifache (vergleiche **Abb. 4.28.**). Im Gegensatz dazu führte die Gabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ des α_2 -Adrenoceptor Agonist UK14,304 zu keiner signifikanten Änderung. 1 $\mu\text{mol/l}$ des die Adenylatcyclase hemmenden Serotonins inhibierte signifikant die cAMP-Akkumulation. UK14,302 ($n= 8$, $p< 0,05$) und Serotonin ($n= 8$, $p<0,001$) inhibierten auch die Forskolin stimulierte cAMP-Akkumulation.

4.3.3.7. [^3H]-Thymidin-Einbau

1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin ($n= 8$, $p< 0,001$), 10 $\mu\text{mol/l}$ UK14,302 ($n= 8$, $p< 0,01$), 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin ($n= 8$, $p<0,01$) und 1 $\mu\text{mol/l}$ PMA ($n= 8$, $p< 0,001$) führten zu einem signifikant erhöhten [^3H] Thymidin-Einbau (vergleiche **Abb. 4.29.**). Die Inkubation der Zellen mit dem MEK1-Inhibitor PD 98059 führte zu keiner Veränderung des basalen [^3H]-Thymidin-Einbaus ($n= 5$, $115 \pm 23\%$ von Basal), wohl aber zu einem signifikant um 50-60% verminderten Adrenalin ($n= 8$, $p< 0,001$), Serotonin ($n= 8$, $p<0,001$) und PMA ($n= 8$, $p< 0,01$) induzierten [^3H]-Thymidin-Einbau (vergleiche **Abb. 4.29.**).

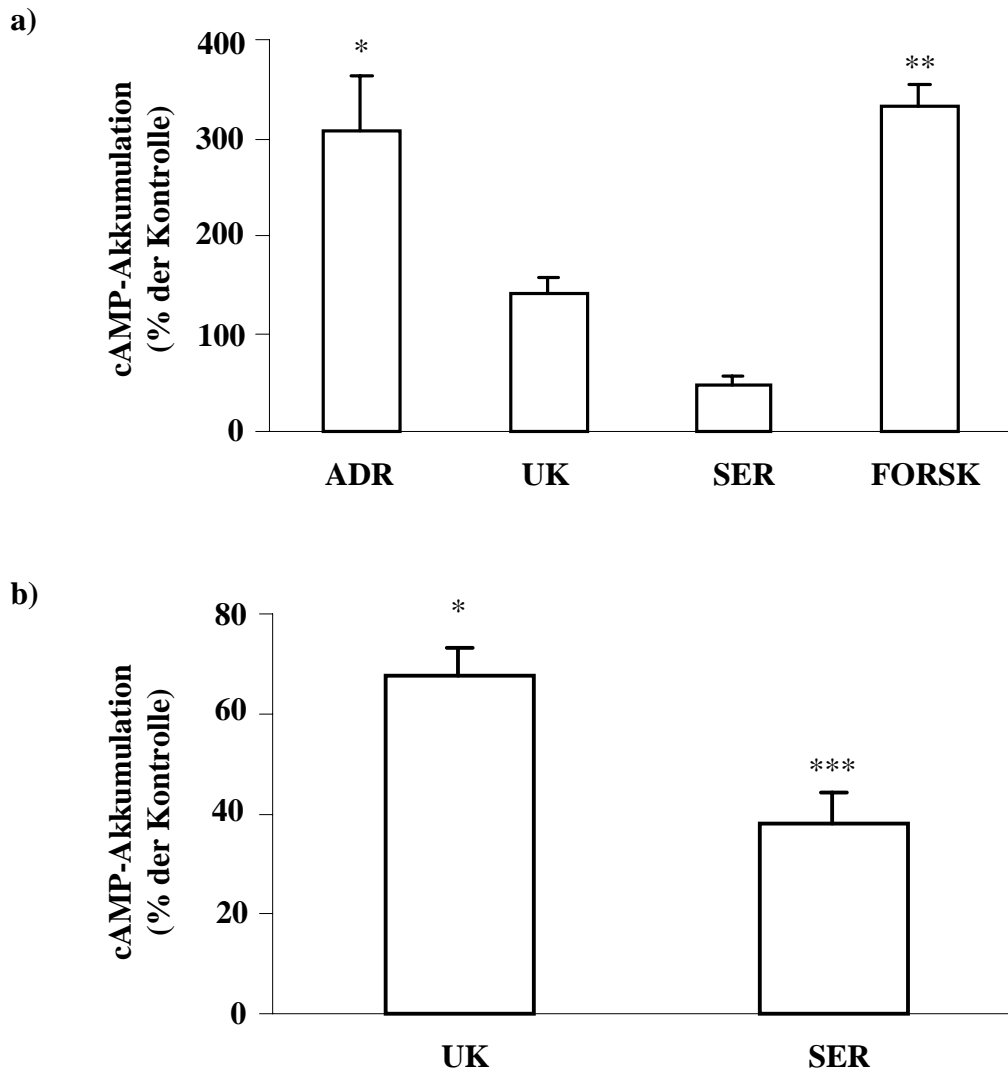


Abb. 4.28. cAMP-Akkumulation

- a) OK-Zellen wurden auf ihre cAMP-Akkumulation bei Gabe von 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin (ADR), 10 $\mu\text{mol/l}$ UK14,304 (UK), 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin (SER) und 100 nmol/l Forskolin (FORSK) untersucht.
- b) OK-Zellen wurden auf ihre cAMP-Akkumulation bei gleichzeitiger Gabe von 100 nmol/l Forskolin und 10 $\mu\text{mol/l}$ UK14,304 (UK) oder 100 nmol/l Forskolin und 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin (SER) untersucht.
- Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ jeweils versus Kontrolle.

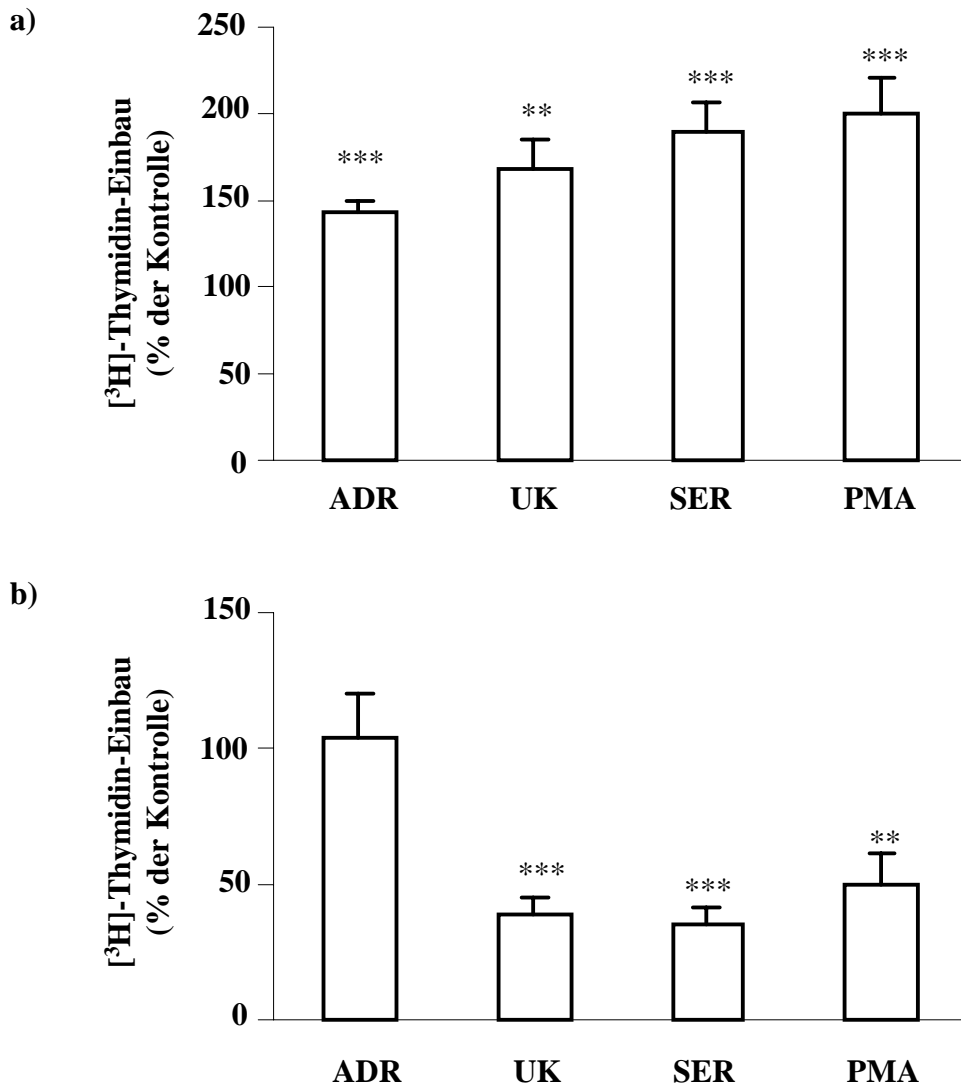


Abb. 4.29. [³H]-Thymidin-Einbau

OK-Zellen wurden auf den Einbau von [³H]-Thymidin bei Gabe von

a) 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin (ADR), 10 $\mu\text{mol/l}$ UK14,304 (UK), 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin (SER) und 1 $\mu\text{mol/l}$ PMA untersucht.

b) 1 $\mu\text{mol/l}$ Adrenalin (ADR), 10 $\mu\text{mol/l}$ UK14,304 (UK), 1 $\mu\text{mol/l}$ Serotonin (SER) und 1 $\mu\text{mol/l}$ PMA Wirkung nach Vorinkubation mit PD 98059.

Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm SEM von 8 unabhängigen Experimenten. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ und ***: $p < 0,001$ jeweils versus Kontrolle.

5. Diskussion

5.1. Strukturelle und funktionelle Folgen der hypoxischen Schädigung

Hypoxie führt in Abhängigkeit von der Zeitdauer zu einer Reihe funktioneller und struktureller Schäden. Die bereits innerhalb der ersten 10 Minuten auftretenden funktionellen Schäden sind nach Beendigung der Hypoxie reversibel. Nach 15 Minuten Hypoxie treten die ersten strukturellen Schädigungen auf, welche genau wie die bis dahin aufgetretenen funktionellen Schädigungen nicht mehr vollständig reversibel sind (vergleiche Abbildung 4.4.).

Die Induktion einer Hypoxie führt in der Suspension proximaler Tubuli zu einem schnellen Abfall des Sauerstoffpartialdruckes unter 10 mmHg. Jedoch sind auch nach 30 Minuten noch geringe Mengen Sauerstoff nachweisbar (vergleiche Abbildung 4.2.). Bei den vorliegenden Untersuchungen handelt es sich also um eine echte Hypoxie und nicht um eine Anoxie beziehungsweise um eine Ischämie. Durch die Hypoxie ist die ATP-Synthese behindert, so daß es zu einer intrazellulären ATP-Depletion kommt. Eine Folge ist die verminderte Aktivität der in der Plasmamembran lokalisierten Na^+/K^+ -Pumpe (Balaban et al. 1980, Kahng et al. 1978) zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung auswärtsgerichteter Kalium-Kanäle (Peters et al. 1995, Reeves und Shah 1994), so daß der zelluläre Kalium-Gehalt sinkt (vergleiche Abbildung 4.5.). Strukturelle Schäden, nachweisbar durch eine verstärkte LDH-Freisetzung, treten innerhalb dieser ersten 10 Minuten nicht auf. Wird im Anschluß an die 10-minütige Hypoxie eine Reoxygenierung durchgeführt, so sind die untersuchten funktionellen Schäden nach 30 Minuten vollständig reversibel. Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen an proximalen Tubuluszellen der Ratte, bei denen funktionelle Veränderung innerhalb der ersten 10 Minuten ebenfalls vollständig reversibel waren (Kribben et al. 1994). Untersuchungen über die Entwicklung struktureller Schäden bei Anoxie im proximalen Tubulus des Kaninchens belegen, daß die Plasmamembran mit andauernder Anoxie für immer größere Moleküle permeabel wird, wobei es innerhalb der ersten 10 Minuten zu einem Durchtritt von kleinen Molekülen bis zu einem Molekulargewicht von 668 Da kommen kann. Größere Moleküle wie LDH mit einem Molekulargewicht von 140 kDa werden in dieser Phase noch zurückgehalten. Diese Schäden, die innerhalb der ersten 10 Minuten auftreten sind durch Reoxygenierung ebenfalls reversibel (Chen et al. 2001). Im Gegensatz dazu treten nach 15 Minuten Hypoxie zusätzlich zu den bereits beschriebenen jedoch verstärkt auftretenden funktionellen auch strukturelle Schäden auf (Chen et al. 2001, Peters et al. 1995, Almeida et al. 1992)(vergleiche Abbildung 4.5.). Diese funktionellen Schäden sind durch eine 30-minütige Reoxygenierung nicht mehr vollständig reversibel. Zu den später als Folge der funktionellen Schädigung auftretenden strukturellen Schäden gehören die nach 15, 20 und 30 Minuten erhöhte LDH-Freisetzung und die nach 20 und 30 Minuten verstärkte Malondialdehyd-Bildung (vergleiche Abbildung 4.8.). Zur Untersuchung funktioneller Schäden sind also die ersten 10 Minuten der Hypoxie herangezogen worden, um diese eindeutig von den später auftretenden Folgen struktureller Schäden zu unterscheiden.

5.2. Verschiedene Schweregrade der Hypoxie

Die hier vorgestellten Untersuchungen sollen die These überprüfen, ob der Schweregrad der Hypoxie von ausschlaggebender Bedeutung für einen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration ist (Peters et al. 1996). Untersuchungen an hypoxischen Primärkulturen von Nierenzellen der Maus und kultivierten renalen Epithelzellen belegen, daß das Schicksal der durch Hypoxie geschädigten Zelle vom Schweregrad abhängig ist (Lieberthal et al. 1998,

Wiegele et al. 1998). Bei schwacher Hypoxie sind möglicherweise nur schwache strukturelle Veränderungen apparent. Systematische Untersuchungen zu den Folgen verschiedener Schweregrade der Hypoxie im proximalen Tubulus unter besonderer Berücksichtigung der Calcium-Regulation wurden bis jetzt noch nicht veröffentlicht. Eine mögliche Ursache hierfür könnte die Notwendigkeit verschiedener methodischer Entwicklungen im Vorfeld der Untersuchungen sein. Für die hier vorgestellten Untersuchungen sind diese methodischen Entwicklungen von entscheidender Bedeutung. Erstmals wurde eine Sauerstoffsonde dauerhaft in eine Perfusionskammer zur Bestimmung funktioneller (freie intrazelluläre Calciumkonzentration und NADH-assoziierte Autofluoreszenz) und struktureller Zellschädigungen (PI) integriert. In Kombination mit dem speziell für diese Untersuchungen entwickelten digitalen Bildverarbeitungssystem wurde es möglich eine aussagefähige Anzahl individueller proximaler Tubuli zu untersuchen. Dadurch sind erstmals verlässliche Aussagen über den Zusammenhang zwischen einer Hypoxie und funktionellen und strukturellen Schäden möglich.

Durch die neu konstruierte Perfusionskammer kann die Perfusionslösung schnell und turbulenzfrei ausgetauscht werden. Die Halbwertszeit des Austausches beträgt bei einem Perfusionsfluß von 2 ml 28 Sekunden bei einem Verteilungsvolumen von 370 µl. Ein Totraum lag nicht vor, so daß ein schneller vollständiger Austausch des Perfusates erfolgte. Die Perfusionskammer ermöglichte es erstmals den Sauerstoffpartialdruck, dem die untersuchten Tubuli ausgesetzt waren zu bestimmen und zu variieren, wobei Probleme die durch einen unvollständigen oder zu langsamen Austausch des Perfusates entstehen vermieden wurden (Wetzels et al. 1991). Bereits nach 2,5 Minuten Hypoxie konnte ein Anstieg der Autofluoreszenz als Maß für funktionelle Veränderungen der Tubuluszellen nachgewiesen werden. Damit entspricht das verwendete Modell sehr gut den Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes, wie er während des Hypoxie induzierten akuten Nierenversagens auftritt, da anders als bei dem ebenfalls häufig verwendeten Modell der vollständigen Okkulsion einer Renalarterie, eine marginale Versorgung der proximalen Tubuli mit Sauerstoff gewährleistet ist (Lieberthal und Nigam 2000). Das verwendete Modell entspricht somit den tatsächlichen Gegebenheiten beim Hypoxie-induzierten akuten Nierenversagen.

Das neuentwickelte digitale Bildverarbeitungssystem erwies sich für die vorgestellten Untersuchungen als gut geeignet. Insbesondere die Integration des motorisierten Mikroskoptisches war bei den vorgestellten Untersuchungen von entscheidender Bedeutung. Im Untersuchungszeitraum verblieben die proximalen Tubuli im Fokus, so daß sie während des Versuches mehrfach aufgesucht werden konnten. Die Variation der Fokusebene ermöglichte die Auswertung aller Zelle durch Kernfarbstoffe, auch wenn die Zellen als Folge der Hypoxie geschwollene waren. Das ebenfalls für diese Untersuchungen neu entwickelte Datenverarbeitungsprogramm VisIon ermöglichte in Verbindung mit dem motorisierten Mikroskoptisch die Auswertung einer aussagefähigen Anzahl proximaler Tubuli.

Als Maß für strukturelle Zellschäden bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie wurde in der vorliegenden Untersuchung der Fluoreszenzfarbstoff PI verwendet. Für proximale Tubuluszellen ist ein Transport von PI, der in einer schwachen Anfärbung des Cytosols resultiert, beschrieben (Kribben et al. 1993a). Aus diesem Grund wurde auf eine kontinuierliche Gabe von PI durch Zugabe von PI zur Perfusionslösung verzichtet. Unter normoxischen Kontrollbedingungen kam es nach 20 Minuten nicht zu strukturellen Zellschäden (vergleiche Abbildung 4.19.). Ein Sauerstoffpartialdruck zwischen 30 und 60 mmHg verursachte ebenfalls keine verstärkte strukturelle Zellschädigung. Erst ein Absenken des Sauerstoffpartialdruckes unter 30 mmHg führte zu einem signifikanten Anstieg der

Anzahl geschädigter Zellen. Unterschiede im Prozentsatz der geschädigten Zellen in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie konnten unter 30 mmHg nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck im renalen Cortex der Ratte. Diese dokumentieren einen physiologischen Sauerstoffpartialdruck von 38-43 mmHg (Welch et al. 2001, Lübbers und Baumgärtel 1997). Eine unzureichende Sauerstoffversorgung des Gewebes wurde im Cortex zellfrei perfundierten Nieren zwischen 6-28 mmHg nachgewiesen (Leichtweiss et al. 1969). Tatsächlich kommt es in den vorliegenden Untersuchungen erst bei einem unphysiologisch niedrigen Sauerstoffpartialdruck unter 30 mmHg zu einer gegenüber der normoxischen Kontrollgruppe signifikant erhöhten strukturellen Zellschädigung (vergleiche Abbildung 4.19.).

Als Maß für eine funktionelle Zellschädigungen wurde die NADH-assoziierte Autofluoreszenz bestimmt (Peters et al. 1996, Kribben et al. 1994, Balaban et al. 1981). NADH besitzt innerhalb der aerobischen Atmung eine Schlüsselposition. Der Redoxstatus von NADH ist eine Funktion sowohl der reduktiven Reaktionen der Dehydrogenasen des intermediären Metabolismus, als auch der oxidativen Reaktionen des unteren Teils der respiratorischen Kette. Bei der oxidativen Phosphorylierung ist die ATP-Synthese an den Elektronenfluß von NADH über einen Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran auf molekularen Sauerstoff gekoppelt. Durch den Elektronenfluß wird ein Membranpotential generiert, das von der ATP-Synthetase zur ATP-Synthese verwendet wird. Bei Hypoxie kommt es zu einer Hemmung der oxidativen Phosphorylierung, da der Elektronentransfer von NADH auf den molekularen Sauerstoff eingeschränkt wird. Da die metabolisch hochaktiven proximalen Tubuluszellen zur Generierung von ATP nahezu vollständig auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen sind (Bagnasco et al. 1985, Guder und Ross 1984), nimmt als Folge die ATP-Synthese ab und NADH akkumuliert in den Zellen. Diese NADH-Akkumulation ist als Anstieg der Autofluoreszenz bei 360 nm nachweisbar (Peters et al. 1996, Kribben et al. 1994, Balaban et al. 1981). In der vorliegenden Untersuchung wurde diese in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck untersucht. Durch Hypoxie kommt es in proximalen Tubuli zu einem reversiblen Anstieg der Autofluoreszenz (vergleiche Abbildung 4.14.). Der Redoxzustand des NADH spiegelt hierbei sowohl den intermediären Metabolismus als auch den Zustand der mitochondrialen Atmungskette wieder (Balaban et al. 1981). In der verwendeten Perfusionskammer werden die Metaboliten konstant gehalten, während es gleichzeitig zu einem Abfall des Sauerstoffpartialdruckes kommt. Der daraus resultierende Anstieg der Autofluoreszenz ist somit ausschließlich auf die Hemmung der mitochondrialen Atmungskette durch Hypoxie zurückzuführen (Weinberg et al. 2000b). Da die ATP-Produktion proportional zur NADH-Konzentration ist, selbst dann, wenn NAD^+ zu mehr als 50% reduziert ist, ist die NADH-assoziierte Autofluoreszenz in proximalen Tubuli, die zur Generierung von ATP ausschließlich auf die oxidative Phosphorylierung angewiesen sind (Bagnasco et al. 1985, Guder und Ross 1984), ein guter Marker für die Abnahme der ATP-Produktion während der Hypoxie. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen eine hochgradige Abhängigkeit des Anstiegs der Autofluoreszenz vom Sauerstoffpartialdruck d.h. vom Schweregrade der Hypoxie (vergleiche Abbildung 4.15.). Der halbmaximale Anstieg der Autofluoreszenz lag bei 24 mmHg. Unter 15 mmHg war mit 76% ein nahezu maximaler Anstieg feststellbar. Durch Zugabe des potenten Cytochromoxidase-Hemmstoffes KCN, der zu einer vollständigen Hemmung des Elektronenflusses durch die mitochondriale Atmungskette und zu einer netto Reduktion aller dazu beitragenden Enzyme einschließlich der NADH-Q-Reduktase führt, kam es lediglich zu einem Anstieg auf 85%. Ein geringerer Anstieg der Autofluoreszenz wurde in proximalen Tubuli zwischen 15 und 30 mmHg nachgewiesen, was eine partielle Hemmung der ATP-Synthese belegt.

Untersuchungen zum Sauerstoffpartialdruck im renalen Cortex der Ratte dokumentieren einen physiologischen Sauerstoffpartialdruck von 38-43 mmHg (Welch et al. 2001, Lübbers und Baumgärtel 1997.). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Untersuchungen, die nachweisen, dass es bereits bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 30 mmHg zu einer Hemmung der ATP-Synthese kommt. Im Gegensatz dazu zeigten andere Experimente, dass isolierte proximale Tubuli des Kaninchens bei einem Sauerstoffpartialdruck von 10-12 mmHg vollständig oxygeniert sind (Balaban et al. 1980). Für diese Untersuchungen wurde der Redoxstatus der Cytochrome a, b und c in einer geschlossenen Kammer untersucht. Sie demonstrierten jedoch in erster Linie die Unterschiede im Sauerstoffbedarf von Gewebesschnitten und isolierten proximalen Tubuli und nicht den Einfluss verschiedener Schweregrade der Hypoxie. Zusätzlich sollte ein möglicher Unterschied im Sauerstoffbedarf proximaler Tubuli bei verschiedenen Tierspezies als Erklärung berücksichtigt werden.

Zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration kommt es erst bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 15 mmHg (vergleiche Abbildung 4.16.). Dieser Anstieg ist nach 10 Minuten signifikant. Ein höherer Sauerstoffpartialdruck veränderte die freie intrazelluläre Calciumkonzentration im Vergleich zur normoxischen Kontrolle nicht. Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit denen von Takano und Mitarbeiter (Takano et al. 1985) die zeigen konnten, dass die zelluläre Gesamtkonzentration von Calcium bei einer Verringerung der Sauerstoffkonzentration ansteigt. Hierbei wurde vermutet, dass das aufgenommene Calcium hauptsächlich in den Mitochondrien gespeichert wurde, da der Anstieg durch Ruthenium Rot, einen Hemmstoff des mitochondrialen Calcium-Transportes vollständig gehemmt werden konnte (Takano et al. 1985). Diese Studie wurde mit einer geschlossenen Kammer durchgeführt, und der Sauerstoffpartialdruck wurde nicht bestimmt. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist zu beachten, dass der entscheidende Parameter, die freie intrazelluläre Calciumkonzentration, durch die verwendeten Methoden nicht bestimmt werden konnte und modernere fluoreszenzspektroskopische Methoden wie die, die in den vorliegenden Untersuchungen verwendet wurden noch nicht zur Verfügung standen. Diese Untersuchung in Verbindung mit den teilweise widersprüchlichen Berichten in der Literatur, über einen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration bei Hypoxie (Peters et al. 1996, Rose et al. 1994, Rose et al. 1993, Jacobs et al. 1991, Weinberg et al. 1997, Kribben et al. 1994), führten aber zu der Theorie, dass der Schweregrad der Hypoxie ausschlaggebend für einen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration sein müsse.

Die Regulation der freien intrazellulären Calciumkonzentration ist generell von drei Komponenten abhängig, dem Calcium-Einstrom, dem Calcium-Austritt und der Speicherung von Calcium. Um eine konstante freie intrazelluläre Calciumkonzentration zu gewährleisten, müssen diese drei Komponenten von der Zelle ausbalanciert werden. Der nachgewiesene Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration wird wahrscheinlich durch eine Störung dieser Balance verursacht. Das heißt, dass der Calcium-Einstrom erhöht, der Calcium-Austritt verringert ist, oder die Calcium speichernden Systeme wie das Endoplasmatisches Retikulum oder die Mitochondrien ihre Fähigkeit zur Calcium-Speicherung eingebüßt haben, bzw. eine Kombination aus diesen drei Komponenten.

Der Eintritt von Calcium in die Zelle kann durch eine Vielzahl von spannungs- und ligandengesteuerten Ionenkanälen erfolgen. Ligandengesteuerte Kanäle sind im Gegensatz zu den spannungsgesteuerten Kanälen bei den hier diskutierten Ergebnissen von untergeordneter Bedeutung, da bis auf den Sauerstoffpartialdruck das extrazelluläre Milieu konstant gehalten wird. Die Aktivierung von spannungsabhängigen Kanälen erlaubt Calcium entsprechend dem elektrochemischen Gradienten den Eintritt in die Zelle. Obwohl die Existenz von

spannungsgesteuerten Calcium-Kanälen in proximalen Tubuluszellen der Ratte bis heute nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, ist ihre Existenz doch sehr wahrscheinlich (Zhang und O'Neil 1996, Amenta et al. 1995). Diese Kanäle unterscheiden sich jedoch wahrscheinlich grundlegend von denen, die im Reizleitungsgewebe lokalisiert sind (Peters et al. 1998b). Während einer Hypoxie kommt es durch die verminderte ATP-Produktion und der dadurch verursachten Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase (Wetzels et al. 1993a), sowie die Aktivierung ATP-abhängiger auswärtsgerichteter K^+ -Kanäle (Peters et al. 1995, Reeves und Shah 1994) zu einem massiven Verlust von zellulären Kalium (vergleiche Abbildung 4.6.). Die dadurch verursachte Depolarisation der Plasmamembrane führt wahrscheinlich zu einer Öffnung dieser postulierten spannungsabhängigen Calcium-Kanäle. In der Tat kommt es unter hypoxischen und anoxischen Bedingungen zu einem verstärkten Einstrom von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in proximale Tubuluszellen (Bunnachak et al. 1994, Almeida et al. 1992). Diese Messungen wurden möglicherweise durch eine verstärkte Assoziation von Calcium an die Plasmamembrane, ohne daß das Calcium zuvor in die Zelle eingetreten war, beeinflusst. Experimente mit individuellen proximalen Tubuli belegen, daß dieser Hypoxie-induzierte Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration durch Absenken der extrazellulären Calciumkonzentration auf $\approx 10 \mu\text{mol/l}$ vermieden werden kann (Peters et al. 1995). Somit wird der Hypoxie-induzierte Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration wahrscheinlich durch einen Eintritt von Calcium aus extrazellulären Kompartimenten verursacht. Diese These wird durch Experimente bei denen es in isolierten proximalen Tubuli der Ratte durch Hypoxie zu einer Verringerung des Calcium-Einstroms kam in Frage gestellt (Peters et al. 1998b). Jedoch wurde die Verringerung des Calcium-Einstroms in dieser Veröffentlichung als ein physiologischer Feedback, zur Erhaltung der Calcium-Homöostase während einer Hypoxie interpretiert.

Der Calcium-Ausstrom über die Plasmamembrane wird hauptsächlich durch die Wirkung der Ca^{2+} -ATPase und des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers verursacht. Dieser Transport ist direkt (Ca^{2+} -ATPase) und indirekt ($\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher) ATP-abhängig (Schatzmann 1966). Diese Transportsysteme sind in der Plasmamembrane und den Membranen der Calcium-speichernden Kompartimente wie Mitochondrien und Endoplasmatisches Retikulum lokalisiert. Eine Hypoxie-induzierte Hemmung dieser Transportsysteme ist sehr wahrscheinlich, da eine Hemmung der ATP-Synthese durch den NADH-assoziierten Anstieg der Autofluoreszenz direkt nachgewiesen wurde (vergleiche **Abb 4.15.**). Diese Hypoxie induzierte Hemmung des Calcium-Austrags würde ebenfalls zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration beitragen.

Die Calcium-speichernden Kompartimente, wie das Endoplasmatische Retikulum und die Mitochondrien sind in der Lage, die freie intrazelluläre Calciumkonzentration zu regulieren. Vor allem während einer Hypoxie kommt es in Mitochondrien zu einer Calcium-Ansammlung (Lotscher et al. 1980, Rossi und Lehninger 1964). Es wurde postuliert, daß die Größe der Calcium-Ansammlung in den Mitochondrien von Schweregrad der Hypoxie abhängt. Tatsächlich gibt es Untersuchungen über die Affinität der Ca^{2+} -ATPase in Calcium-speichernden Kompartimenten und der Plasmamembrane, die darauf hindeuten, daß die Affinität der Ca^{2+} -ATPase für ATP in Calcium-speichernden Kompartimenten ($K_{0,5}(\text{ATP}) 3 \mu\text{mol/l}$ in microsomalen Membranen des Gehirns) erheblich höher ist als die Affinität in der Plasmamembran ($K_{0,5}(\text{ATP}) 19\text{-}28 \mu\text{mol/l}$ in der Plasmamembrane des Gehirns) (Michaelis et al. 1983). Das heißt für die vorgestellten Untersuchungen, daß der Transport von Calcium in die Mitochondrien bei einem Sauerstoffpartialdruck über 15 mmHg sehr wahrscheinlich noch nicht gehemmt wird, gleichzeitig jedoch der Calcium-Transport über die Plasmamembrane bei einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 15 und 30 mmHg bereits stark eingeschränkt sein könnte. Dies würde zu einer verstärkten Calcium-Ansammlung in den

Mitochondrien bei einer konstanten freien intrazellulären Calciumkonzentration führen. Im Gegensatz dazu kann Hypoxie aber auch zu einer massiven Freisetzung von Calcium aus den Mitochondrien führen. Dafür sind sehr unterschiedliche Mechanismen, wie z.B die Öffnung der großen Transitions-pore als auch strukturelle Schädigungen oder auch Veränderungen des Membranzusammensetzung verantwortlich (für einen Überblick über die relevanten Mechanismen vergleiche: Zager et al. 2000, Weinberg et al. 2000a, Chakraborti et al. 1999), die jedoch in Verbindung mit einem verringerten Calcium-Ausstrom zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration führen.

Aus diesen Überlegungen können in Verbindung mit den hier vorgestellten Untersuchungen verschiedene Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Methodisch: Es kommt in Abhängigkeit vom Schweregrad der Hypoxie zu unterschiedlichen zellulären Veränderungen. Aus diesem Grund ist eine verlässliche Sauerstoffmessung auf jeden Fall erforderlich. Ein exemplarischer Nachweis, daß es zu einem Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz kommt, ist für Aussagen über Hypoxie induzierte Veränderungen unzureichend.
2. Inhaltlich: Es gibt wenigstens zwei verschiedene Stufen der Hypoxie, milde Hypoxie mit einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 30 und 15 mmHg und schwere Hypoxie mit einem Sauerstoffpartialdruck unter 15 mmHg.

Milde Hypoxie führt zu einem Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz, was auf eine Abnahme der der ATP-Synthese hinweist. Eine Folge sind strukturelle Zellschäden, die durch den Fluoreszenzfarbstoff PI nachgewiesen wurden. Es kommt jedoch nicht zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Wahrscheinlich kommt es jedoch zu einer Verringerung des Calcium-Ausstroms durch eine Hemmung der Ca^{2+} -ATPasen. Proximale Tubuli sind in der Lage dies durch eine verstärkte Ansammlung von Calcium vor allem in den Mitochondrien zu kompensieren. Als Folge wäre kein Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration nachweisbar. Dies erklärt zwanglos Veröffentlichungen, in denen Hypoxie nicht zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration geführt hat (Peters et al. 1996).

Schwere Hypoxie führt ebenfalls zu einem Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz und strukturellen Zellschäden wie bei milder Hypoxie. Zusätzlich kommt es zu einer erheblich stärkeren Störung der Calcium-Balance. Der Calcium-Ausstrom ist erheblich stärker gehemmt. Die Zellen des proximalen Tubulus sind nicht länger in der Lage, dies durch eine verstärkte Aufnahme von Calcium in die Mitochondrien und eine Verringerung des Calcium-Einstroms zu kompensieren. Die Mitochondrien verlieren ihre Fähigkeit Calcium anzusammeln und entlassen bei starker Schädigung ebenfalls Calcium ins Cytosol. Als Folge kommt es zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration, wie bereits mehrfach in der Vergangenheit dokumentiert (Kribben et al. 1994, Weinberg et al. 1997).

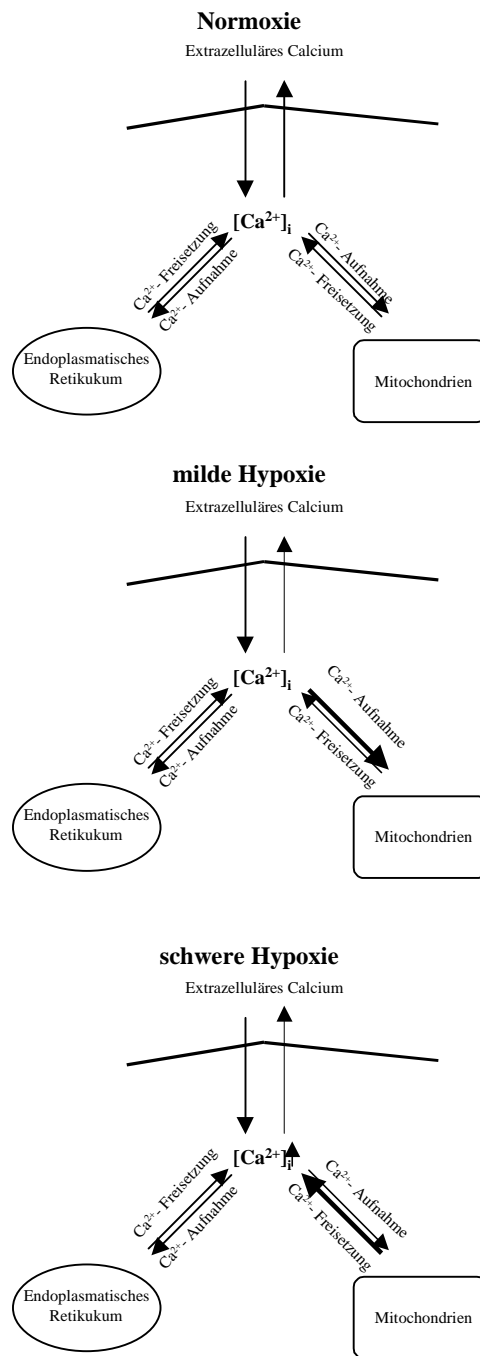


Abb. 5.1. Calcium-Regulation bei verschiedenen Schweregraden der Hypoxie

5.3. Die Wirkung protektiver Substanzen

5.3.1. Die Wirkung von ATP

Für die Regeneration des proximalen Tubulus ist die Anzahl intakter Zellen im Anschluß an die Hypoxie von entscheidender Bedeutung. Exogen zugegebenes ATP wirkt bei der hypoxischen Schädigung des proximalen Tubulus protektiv. ATP führt zu einer deutlichen Verringerung struktureller Schäden, hat jedoch keinen Einfluß auf den untersuchten funktionellen Schäden (vergleiche Abbildung 4.9.). Auch andere Untersuchungen belegen eine deutlich protektive Wirkung *in vivo* und *in vitro* in der Niere und in isolierten proximalen Tubuli des Kaninchens gegenüber der hypoxischen Schädigung (Mandel et al. 1988, Siegel et al. 1980). Obwohl die Autoren darüber spekulierten, ob für diese protektive Wirkung Abbauprodukte von ATP verantwortlich wären, wurde diese Hypothese bis jetzt nicht getestet.

In der in der Tubulussuspension kommt es, sowohl bei normoxischen wie auch bei hypoxischen Bedingungen, zu einem massiven Abbau von ATP. 20 Minuten nach Zugabe des exogenen ATP hat die ATP-Konzentration auf ein Zehntel abgenommen. Somit könnten die Abbauprodukte von ATP, ADP, AMP und Adenosin zu der protektiven Wirkung von ATP beitragen. Aus diesem Grund wurde die protektive Wirkung der Abbauprodukte von ATP, ADP und AMP auf strukturelle Zellschäden untersucht. ADP hatte zwar eine ähnlich starke Wirkung wie ATP, AMP hatte jedoch keinerlei Wirkung. Da davon ausgegangen werden kann, daß ATP vollständig abgebaut wird, kann eine eigenständige Wirkung der Abbauprodukte von ATP, außer ADP ausgeschlossen werden.

ATP könnte aber auch direkt den Energiemetabolismus der hypoxischen Tubuluszelle beeinflussen. Da der intrazelluläre Kalium-Gehalt direkt von der Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase abhängig ist, die unter hypoxischen Bedingungen durch ATP-Mangel gehemmt ist (Balaban et al. 1980, Kahng et al. 1978), und es durch die Aktivierung von ATP-abhängigen auswärtsgerichteten Kalium-Kanälen zusätzlich zu einem Verlust zellulären Kaliums kommt (Peters et al. 1995, Reeves und Shah 1994), würde bei einem direkten Einfluß von ATP auf den Energiemetabolismus der Zelle die Abnahme des zellulären Kalium-Gehaltes wenigstens verlangsamt sein. Die Untersuchungen über den intrazellulären Kalium-Gehalt (Abbildung 4.6.) belegen, daß dies nicht der Fall ist. Dieses Ergebnis befindet sich in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Weinberg und Humes (Weinberg und Humes 1986), bei denen exogen zugegebenes ATP auch beim Kaninchen den Hypoxie induzierten Verlust von zellulären Kalium nicht verhindern konnte.

ATP könnte auch unspezifisch z.B durch membranstabilisierende Eigenschaften wirken, wie es für die Wirkung von Glycin dokumentiert ist (Chen et al. 2001, Dong et al. 1998). ATP ist genau wie AMP ein sehr hydrophiles Molekül. Im Gegensatz zu ATP besitzt AMP jedoch keinerlei Wirksamkeit, so daß eine unspezifische Wirkung von ATP sehr unwahrscheinlich ist. Diese These wird durch die in Abbildung 4.12. gezeigten Ergebnisse unterstützt, da ATP im Modell der Protektion vor osmotischer Hämolyse keinerlei Wirkung besitzt.

Eine unspezifische Wirkung von ATP kann durch die bisher dargestellten Feststellungen weitgehend ausgeschlossen werden. Abbildung 4.20. zeigt einen reversiblen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration durch Zugabe von exogenem ATP. Die Registrierung dokumentiert den typischen Verlauf eines rezeptorvermittelten Prozesses. ATP ist ein Agonist purinergere Rezeptoren (Dubyak und El-Motassim 1993). Diese werden in zwei Hauptgruppen purinergere Rezeptoren unterteilt. Die P_1 - und die P_2 -Rezeptoren. P_1 -Rezeptoren haben eine höhere Affinität zu AMP als zu ATP. Im Gegensatz dazu haben P_2 -Rezeptoren eine

höhere Affinität zu ATP als zu AMP. Die Existenz funktionstüchtigen P₂-Rezeptoren ist für den renale Cortex von Ratten ebenfalls belegt (Nanoff et al. 1990). Da AMP in dieser Untersuchung keinerlei protektive Wirkung zeigte ist die Wirkung von ATP und ADP sehr wahrscheinlich nicht P₁-, sondern P₂-Rezeptor vermittelt. Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen wirkten AMP und Adenosin in einer Studie über die hypoxische Schädigung des proximalen Tubulus des Kaninchens protektiv (Mandel et al. 1988). In dieser Untersuchung wurde zur Erzeugung der Hypoxie eine geschlossene Kammer verwendet, in der die proximalen Tubuli auf den Boden sedimentieren konnten. Der daraus resultierende dichte Niederschlag am Boden der Kammer, wirkte möglicherweise durch die Erzeugung eines eher sauren pHs selbst protektiv (Almeida et al. 1992). Außerdem besteht die Möglichkeit, daß in proximale Tubuli des Kaninchens funktionstüchtige P₁-Rezeptoren exprimiert werden, in denen der Ratte jedoch nicht.

Der protektive Effekt von ATP spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des Hypoxie induzierten akuten Nierenversagens. Hypoxie führt in proximalen Tubuluszellen zu einer ATP-Depletion und massiven strukturellen Schäden. Trotzdem sind noch ≈20% des ursprünglichen ATP-Gehaltes nachweisbar (Wetzels et al. 1993a). Es ist denkbar, daß es durch strukturelle Zellschäden und durch Freisetzung von Nukleotiden aus den synaptischen Vesikeln adrenerger Nerven (Dubyak und El-Motassim 1993) zu einer Freisetzung von ATP in den Extrazellulärraum und dadurch zu einer Aktivierung von P₂-Rezeptoren kommt. Diese Aktivierung würde zu einer Erhöhung der freien intrazellulären Calciumkonzentration durch Entleerung zellulärer Calcium-Speicher führen (Cha et al. 1998). Eine protektive Wirkung einer Calcium-Speicher-Entleerung bei Hypoxie ist in proximalen Tubuli des Kaninchens nachgewiesen (Waters et al. 1997). Durch diese Entleerung wird eine pathologische Calcium-Ansammlung in den Zellen während der Hypoxie vermieden (Waters et al. 1997). Auf diese Weise könnten Zellen vor strukturellen Schäden geschützt und die Wiederherstellung eines funktionstüchtigen Epithels in der Erholung nach dem akuten Nierenversagen erleichtert werden (Toback 1992).

5.3.2. Die Wirkung von Quercetin

Quercetin verringert signifikant strukturelle Zellschäden in frisch isolierten proximalen Tubuli (vergleiche Abb. 4.10.). Quercetin ist ein Bioflavonoid mit antioxidativen Eigenschaften. In einer Untersuchung über Ischämie und Reperfusion in der Ratten Niere erwies sich Quercetin als protektiv (Shoskes 1998), ohne daß die potentielle Wirkungsweise weiter untersucht wurde. In kultivierten proximalen Tubuluszellen wirkt Quercetin protektiv gegenüber der H₂O₂ induzierten Schädigung (Kuhlmann et al. 1998). In dieser Studie wurde die Wirkung von Quercetin und strukturell verwandter Substanzen untersucht, wobei Quercetin die größte Potenz aufwies. Diese Untersuchungen belegten einen Zusammenhang zwischen der Membranaffinität dieser Substanzgruppe und einer Protektion gegenüber der Lipid Peroxidation (Kuhlmann et al. 1998). Reaktive Sauerstoffspezies sind als ubiquitäre Mediatoren der Hypoxie induzierten Zellschädigung bekannt (Weinberg 1991). Die Hauptquelle von reaktiven Sauerstoffspezies ist die mitochondriale Atmungskette. Ungefähr 2% des veratmeten Sauerstoffes resultiert in der Generierung des Superoxid Anions durch die Atmungskette (Nathan und Singer 1999). Aus dem Superoxid Anion können andere, reaktivere Sauerstoffspezies wie das Hydroxyl Radikal und Hydrogen Peroxid gebildet werden. Unter physiologischen Bedingungen besitzen Zellen ein wirksames antioxidatives System an dem Mangan Superoxid Dismutase, Glutathion Peroxidase, Glutathion Reduktase, NAD(P) Transhydrogenase und Komponenten wie Glutathion, NADPH, die Vitamine C und E beteiligt sind. Während einer Hypoxie kommt es zu Reaktionen zwischen molekularen

Sauerstoff und andern Elektronen Donatoren der Atmungskette, und damit zu einer verstärkten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (Nathan und Singer 1999). Dieser Prozess kommt erst bei Anoxie zum Erliegen. Zusätzlich kommt es zu einer Verringerung des antioxidativen Systems. Dieser oxidative Stress führt zu Veränderungen von (mitochondrialen) Membrankomponenten z.B. durch Lipidperoxidation und Protein Thiol Oxidation. Dadurch kommt es zu einer Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und Funktionsverlust der Mitochondrien durch Schwellung, Depolarisation der Membran und Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (Vercesi et al. 1997). Mitochondriale Schäden z.B. durch Calcium-Akkumulation verstärken die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies weiter. Somit kann davon ausgegangen werden, daß oxidative Schäden auch an der hypoxischen Schädigung des proximalen Tubulus beteiligt sind (vergleiche Abbildungen **4.10.** und **4.11.**, Granger 1988, McCord 1985). Die Wirkung von Quercetin auf strukturelle Zellschäden beruht wenigstens teilweise auf einer Hemmung der Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffspezies, da diese durch Zugabe von Quercetin nahezu vollständig gehemmt werden kann. Die Produktion der drei maßgeblichen reaktiven Sauerstoffspezies (Superoxid Anion, Hydrogen Peroxid und Hydroxyl Radikal) ist in hypoxischen Primärkulturen von Nierenepithelzellen der Ratte ebenfalls nachgewiesen (Paller und Neumann 1991). Eine unspezifische Wirkung von Quercetin auf strukturelle Zellschäden ist sehr unwahrscheinlich, da Quercetin nicht vor osmotischer Hämolyse schützt (Abbildung **4.12.**). Es wurde in der Vergangenheit diskutiert, ob eine Eisen-Chelation zu der antioxidativen Wirkung von Bioflavonoiden beiträgt (Santos et al. 1998). Da jedoch zwischen den Studien zur Wirksamkeit von Bioflavonoiden und ihrer Fähigkeit zur Eisen-Chelation keine Deckung zu erzielen ist (Kuhlmann et al. 1998, van Acker et al. 1998), ist ein Beitrag der Eisen-Chelation an der antioxidativen Wirkung von Bioflavonoiden zumindest unwahrscheinlich. Ein anderer Mechanismus, der in der Vergangenheit diskutiert wurde, ist eine direkte Hemmung der Xanthine Oxidase durch Quercetin (Zeng et al. 1997), so daß es zu einer verringerten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies käme.

Neben der Verminderung struktureller Schädigungen nach 20 Minuten (vergleiche Abbildung **4.10.**) verzögert Quercetin bei Hypoxie in frisch isolierten proximalen Tubuli die Ausbildung funktioneller Zellschäden nach 10 Minuten, (vergleiche Abbildung **4.10.**) und schützt vor oxidativer Schädigung (vergleiche Abbildung **4.11.**). Die Verringerung des intrazellulären Kalium-Gehaltes ist wie in Kapitel **5.1.** diskutiert eine Folge der Hemmung Na^+/K^+ -ATPase und der Aktivierung auswärtsgerichteter Kalium-Kanäle durch ATP-Mangel. Eine Interaktion von reaktiven Sauerstoffspezies mit Ionen-Transportsystemen ist in der Vergangenheit ebenfalls beschrieben worden (Kourie 1998), wobei Bioflavonoide insbesondere Quercetin die Na^+/K^+ -ATPase nicht stimuliert, sondern eher hemmt (Umarova et al. 1998, Hirano et al. 1989). Möglicherweise handelt es sich bei dieser Hemmung um einen Mechanismus, der den Energiebedarf der Zellen verringert, und somit den zellulären Kalium-Gehalt als Folge langsamer abnehmen läßt.

5.4. Die Regeneration kultivierter Tubuluszellen

Eine Erholung nach einer einstündigen ATP-Depletion führt in LLC-PK₁-Zellen zu einer signifikanten Aktivierung der MAP-Kinase (vergleiche Abbildung **4.22.**). Dieser Anstieg der MAP-Kinase Aktivität konnte durch den MEK1-Inhibitor PD 988959 blockiert werden. Dies belegt eine spezifische Aktivierung der MAP-Kinase während der Erholung im Anschluß an eine ATP-Depletion, da PD 988959 die Aktivierung der MAP-Kinase durch MEK1 blockiert (Kribben et al. 1997, Alessi et al. 1995). Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch die

Veränderung der Osmolarität des Kultur-Mediums, wie in der Vergangenheit beschrieben kann ebenfalls ausgeschlossen werden (Matsuda et al. 1995) (vergleiche 4.3.1.3.)

Eine Aktivierung der MAP-Kinase während der Erholung in Anschluß an eine intrazelluläre ATP-Depletion wurde für Primärkulturen von Hühner-Myocyten (ATP-Depletion auf 10% des Kontrollwertes), hypoxische Ratten-Myocyten (Yao et al. 1995) und in einem Ischämie Modell des Gerbilgehirns (Campos-Gonzales und Kindy 1992) nachgewiesen. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde der zelluläre ATP-Gehalt auf unter 2% des Kontrollwertes depletiert, dies entspricht einer stärkeren Form der zellulären ATP-Depletion. Nach der 15-minütigen Erholung war der ursprüngliche ATP-Gehalt wieder erreicht. Die einstündige intrazelluläre ATP-Depletion führte zu keinerlei nachweisbaren Zellschäden untersucht durch Trypanblau Färbung, LDH-Freisetzung und DNS-Fragmentierung (vergleiche Abbildung 4.23.). Diese Ergebnisse befinden sich in Übereinstimmung mit Untersuchungen von van Why und Mitarbeitern (van Why et al. 1999), in denen auch nach 2-stündiger schwerer zellulärer ATP-Depletion (unter 5% der Kontrolle) und anschließender 16 stündiger Erholung keine verstärkte Zellschädigung durch LDH-Freisetzung nachgewiesen werden konnte. In dieser Studie führte eine ATP-Depletion unter 50% zu einer Aktivierung von „Heat-Shock Transkriptions Faktoren“, wobei es bei stärkerer ATP-Depletion zu einer verstärkten Aktivierung kam (van Why et al. 1999). Eine verstärkte Expression des durch die MAP-Kinase stimulierten Transkriptionsfaktors c-fos (Ouellette et al. 1990) wurde in der Erholung im Anschluß an eine Ischämie in der Mäuseniere nachgewiesen. Pombo und Mitarbeiter wiesen einen geringen Anstieg von ERK-1,2 in der Rattenniere im Anschluß an Ischämie und einen stärkeren Anstieg in MDCK-Zellen während der Erholung nach einer zellulären ATP-Depletion nach (Pombo et al. 1994). Dieser geringere Anstieg der ERK-1,2 Aktivität in der Niere im Vergleich zu den MDCK-Zellen war sehr wahrscheinlich methodisch durch die Untersuchung der ganzen Niere bedingt (Pombo et al. 1994). MDCK-Zellen wurden ursprünglich aus epithelialen Zellen des distalen Tubulus oder des Sammelrohrs des Kaninchens entwickelt (Gstraunthaler et al. 1985). Der Anstieg der MAP-Kinase Aktivität ist sehr wahrscheinlich in Subpopulationen von Zellen der Niere größer, die bei Ischämie eine stärkere Wachstumsstimulation zeigen (Pombo et al. 1994). Im Gegensatz dazu zeigen LLC-PK₁-Zellen typische Eigenschaften des proximalen Tubulus, der bei Hypoxie erheblich empfindlicher als die Zellen des Sammelrohres reagiert (Bonventre et al. 1998, Nissenson 1998, Bonventre 1993). In LLC-PK₁-Zellen führt die Aktivierung von MEK1 zu einem verstärkten Wachstum, das durch die Verwendung von PD 98059 blockiert werden kann (Kinane et al. 1997). Entsprechend zeigen Kinase inaktive Mutanten von MEK1 keine Wachstumsfaktor stimulierte Mitogenese (Bonventre und Force 1998).

Neben dem MAP-Kinase Signaltransduktionsweg ist ein zweiter Signaltransduktionsweg für die Regulation des Zellwachstums von entscheidender Bedeutung, der SAPK Signaltransduktionsweg (Pombo et al. 1994). Der SAPK Signaltransduktionsweg wird durch zellulären Stress aktiviert und führt zu Wachstumshemmung und Apoptose (Nanoff et al. 1990). Der SAPK Signaltransduktionsweg wird in der Rattenniere und MDCK-Zellen während der Erholung im Anschluß an Ischämie bzw. zellulärer ATP-Depletion aktiviert (Pombo et al. 1994). Im Gegensatz zur kurzfristigen Aktivierung der MAP-Kinase (vergleiche Abbildung 4.25.) dauert die Aktivierung der SAPK viele Stunden länger. In PC 12-Zellen verhindert aktives MEK1 Apoptose, die durch den SAPK Signaltransduktionsweg induziert wurde. Diese Befunde weisen darauf hin, daß die Auslösung von Apoptose durch Hypoxie möglicherweise von der Balance zwischen anti-apoptotischen Signalen durch den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg und pro-apoptotischen Signalen durch den SAPK Signaltransduktionsweg abhängig ist.

In der vorliegenden Untersuchung führte exogenes ATP unter Kontrollbedingungen zu einer Zunahme der MAP-Kinase Aktivität (vergleiche Abbildung 4.22.). Funktionale ATP-Rezeptoren sind sowohl für LLC-PK₁-Zellen (Weinberg et al. 1998) als auch für frisch isolierte Zellen des renalen Cortex nachgewiesen (Nanoff et al. 1990, siehe auch Abbildung 4.20.). Eine Stimulation dieser Rezeptoren durch ATP führt in kultivierten tubulären Zellen und in isolierten proximalen Tubuli des Kaninchens als auch in proximalen Tubuluszellen der Ratte zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration (Yamada et al. 1996, Cejka et al. 1994, Mullin und McGinn 1988). Ein Anstieg der DNS-Synthese durch exogenes ATP ist in proximalen Tubuluszellenzellen ebenfalls nachgewiesen (Paller et al. 1998, Kartha und Toback 1985). Eine Aktivierung der MAP-Kinase durch den G-Protein gekoppelten P_{2Y}-Rezeptor unter Beteiligung der Protein Kinase C wurde für PC 12-Zellen beschrieben (Soltoff et al. 1998). Eine Wachstumsstimulation bei LLC-PK₁-Zellen durch eine Raf unabhängige Aktivierung von der MAP-Kinase durch G α_{i-2} ist in der Literatur ebenfalls dokumentiert (Kinane et al. 1997).

Nach einer einstündigen zellulären ATP-Depletion führte exogenes ATP nicht mehr zu einem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität (vergleiche Abbildung 4.22.). Es ist bis heute unbekannt bis zu welchen zellulären ATP-Konzentrationen stark ATP-depletierte Zellen noch in der Lage sind Kinasen zu phosphorylieren. Sehr wahrscheinlich sind bei den hier vorgestellten Untersuchungen die Zellen aufgrund des niedrigen zellulären ATP-Gehaltes nicht mehr in der Lage die MAP-Kinase zu phosphorylieren. Im Anschluß an die 15-minütige Erholung hat der zelluläre ATP-Gehalt wieder den Ursprungswert erreicht. Trotzdem führt exogenes ATP nicht zu einem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität, möglicherweise, weil sie zu diesem Zeitpunkt bereits maximal aktiviert war. Dies belegt, daß der protektive Effekt von ATP während oder im Anschluß an eine zelluläre ATP-Depletion sicher nicht auf einem verstärkten Wachstum durch eine verstärkte Aktivierung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges während der Hypoxie oder der Erholung beruht.

Eine weitere Folge der zellulären ATP-Depletion ist eine Entleerung zellulärer Calcium-Speicher. Die zu Beginn des Experimentes hohe basale freie intrazelluläre Calciumkonzentration erklärt sich durch eine bereits durch das Depletionsmedium gestörte Calciumregulation. Es ist denkbar, daß ATP durch die Entleerung der Calcium-Speicher protektiv wirkt, wie es für proximale Tubuli des Kaninchens bereits nachgewiesen wurde (Waters et al. 1997). Dadurch könnte die Calcium-abhängige Komponente der Aktivierung der MAP-Kinase durch ATP vermindert werden, und die Aktivierung der MAP-Kinase während der Erholung im Anschluß an die zelluläre ATP-Depletion blockiert oder zumindest vermindert werden. Somit würde dies einen weiteren Regulationsmechanismus innerhalb des Signaltransduktionsweges darstellen. Eine andere Wirkung könnte in der Hypoxie-induzierten Calcium-abhängigen Aktivierung von Calpain bestehen, wie es für proximale Tubuluszellen der Ratte beschrieben wurde (Tijssen et al. 1997), da Calpain in einigen Zellen unter anderem die zelluläre Proliferation und Differenzierung aktivieren kann (Sato und Kawashima 2001).

In der vorliegenden Untersuchung führte die Zugabe von EGF unter Kontrollbedingungen zu einer Zunahme der MAP-Kinase Aktivität (vergleiche Abbildung 4.22.). Funktionale EGF-Rezeptoren die die zelluläre Proliferation regulieren sind für LLC-PK₁-Zellen beschrieben (Force und Bonventre 1998). Die Aktivierung der MAP-Kinase erfolgt durch die intrinsische Tyrosin-Kinase Aktivität des EGF-Rezeptors über den Ras-Raf-Signaltransduktionsweg (Campbell et al. 1995). Weder nach einer einstündigen ATP-Depletion noch nach einer 15-minütigen Erholung kam es zu einer verstärkten Aktivierung der MAP-Kinase durch EGF (vergleiche Abbildung 4.22.). Wahrscheinlich ist die MAP-Kinase zu diesem Zeitpunkt bereits maximal aktiviert. Dies zeigt, daß der protektive Effekt von EGF während oder im

Anschluß an eine zelluläre ATP-Depletion ebenfalls nicht auf einem erhöhtem Wachstums durch eine verstärkte Aktivierung des MAP-Kinase Signaltransduktionsweges während der Hypoxie oder der Erholung beruht.

Untersuchungen an hypoxischen Nierenprimärkulturen der Maus und kultivierten renalen Epithelzellen belegen, daß das Schicksal der durch Hypoxie geschädigten Zelle vom Schweregrad abhängig ist (Lieberthal et al. 1998, Wiegele et al. 1998). Bei schwacher Hypoxie sind möglicherweise nur schwache strukturelle Veränderungen apparent. Durch schwere Hypoxie kommt es zur Ablösung von Zellen von der tubulären Basalmembrane vor oder nach dem Zelltod durch Apoptose und Necrose (Lieberthal et al. 1998, Wiegele et al. 1998, Nori et al. 1995, Toback 1992). Liegt der Schweregrad in der Mitte, verlieren die nicht abgelösten Zellen ihre Funktionalität, aber überleben. Diese Zellen durchlaufen spezifische Reperaturmechanismen an denen parakrine Wachstumssignale, wie Adenin-Nukleotide einschließlich ATP und Wachstumsfaktoren einschließlich EGF beteiligt sind (Skena 1998). Diese Reperaturmechanismen sind bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Bonventre et al. 1998, Kartha und Toback 1985). In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde Hypoxie durch ATP-Depletion simuliert. Dadurch konnte der Einfluß von ATP und EGF während einer intrazellulären ATP-Depletion und Erholung systematisch in einer renalen epithelialen Zelllinie mit Eigenschaften des proximalen Tubulus untersucht werden. Der in der vorliegenden Untersuchung vorgestellte Mechanismus der MAP-Kinase Aktivierung durch Hypoxie stellt hierbei möglicherweise einen Signaltransduktionsweg dar, der die Regeneration der Zellen beim akuten Nierenversagen gewährleistet und dadurch die Funktion der Nieren wiederherstellt.

5.5. Der Einfluß von β -Adrenozeptoren auf die Proliferation proximaler Tubuluszellen

Die Proliferation überlebender Zellen ist für die Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen von Entscheidender Bedeutung. Die Aktivierung der MAP-Kinase durch Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosin-Aktivität, z.B. dem EGF-Rezeptor ist gut dokumentiert und kann unter Beteiligung der Aktivierung von ras, raf und MAP-Kinase Kinase vorkommen (Seger und Krebs 1995). Verschiedene Studien haben gezeigt, das G-Protein gekoppelte Rezeptoren, im speziellen G_s -, G_q - und G_i -ähnliche Proteine ebenfalls die MAP-Kinase Aktivität regulieren (Flordellis et al. 1995, van Biesen et al. 1995, Alblas et al. 1993). Diese Mechanismen der MAP-Kinase Aktivierung sind jedoch erheblich weniger gut verstanden, als die durch die klassischen Wachstumsfaktor Rezeptoren.

Die G_s -gekoppelte Rezeptoren, einschließlich β -Adrenozeptoren, verstärken die cAMP Bildung und stimulieren die cAMP-abhängige Protein Kinase. Während in PC12-Zellen die Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels und ein Anstieg der MAP-Kinase Aktivität durch Isobutylmethylxanthin, Cholera Toxin, Forskolin und cAMP Analoga (Frödin et al. 1994, Young et al. 1994), und in COS-7 -Zellen durch Forskolin und cAMP Analoga ebenfalls der Anstieg der MAP-Kinase Aktivität nachgewiesen ist (Faure et al. 1994), geschieht dies in den meisten anderen Zelltypen nicht (Li et al. 1995, Sadoshima et al. 1995, Bouloumie et al. 1994, Heasley et al. 1994). Entsprechend stimulierte die Adenylylzyklase-Stimulatoren Forskolin und das cAMP Analogon dB-cAMP die MAP-Kinase in der vorliegenden Untersuchung nicht. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Veröffentlichungen, bei denen die Erhöhung der cAMP-Konzentration eher inhibierend auf die ras-abhängige MAP-Kinase Aktivierung von raf-1 durch cAMP-abhängige Protein Kinase wirkt (Blumer und Johnson 1994, Li et al. 1995, Yamada et al. 1995).

Die G_q-gekoppelte Rezeptoren, einschließlich der M1 muskarinen Acetylcholin-, Thrombin-, Vasopressin- und Angiotensin 2-Rezeptoren stimulieren die Phospholipase C, erhöhen die freie intrazelluläre Calciumkonzentration und aktivieren die Proteinkinase C. Dies führt häufig zu einer MAP-Kinase Aktivierung (Heasley et al. 1994, Kribben et al. 1993, Pelech und Sanghera 1992). Entsprechend führte der die Proteinkinase C aktivierende Phorboläther PMA in der vorliegenden Studie ebenfalls zu einer Stimulation der MAP-Kinase (vergleiche Abbildung 4.27.).

Während G_i-gekoppelte Rezeptoren zu einer Aktivierung der MAP-Kinase führen (Seeger und Krebs 1995), ist der vorliegende Signaltransduktionsweg unklar. Das gegenwärtige Wissen über die Aktivierung der MAP-Kinase durch G_i-gekoppelte Rezeptoren ist hauptsächlich von Studien abgeleitet, die heterologe Überexpression klonierter Rezeptoren verwendeten (van Biesen et al. 1995, Flordellis et al. 1995, Anderson und Milligan 1994, Koch et al. 1994, Alblas et al. 1993). Aus diesen Studien kann der Schluß gezogen werden, daß α_2 -Adrenoceptor Subtypen möglicherweise mit unterschiedlicher Effizienz die MAP-Kinase Aktivierung stimulieren (Flordellis et al. 1995). G-Protein gekoppelte $\beta\gamma$ -Untereinheiten mögen an diesem Prozess beteiligt sein (van Biesen et al. 1995), da sowohl α - als auch $\beta\gamma$ -Untereinheiten von G-Proteinen möglicherweise an der Kopplung zur Adenylylzyklase beteiligt sind (Neer 1995, Faure et al. 1994). Dennoch bleibt es unklar, ob die α_2 -Adrenoceptor Stimulation der MAP-Kinase von der Inhibierung der cAMP-Akkumulation getrennt werden kann. Ob die Aktivierung der MAP-Kinase durch endogen exprimierte α_2 -Adrenoceptoren für eine verstärkte zelluläre Proliferation ausreicht ist ebenfalls ungeklärt.

Die vorgestellten Untersuchungen belegen, daß in OK-Zellen die MAP-Kinase Aktivität durch Adrenalin schnell (Spitze nach 5 Minuten), transient (Rückkehr zum Ursprungswert in 30 Minuten) und konzentrationsabhängig (EC₅₀ 10-100 nm) ansteigt (vergleiche Abbildung 4.25.). Die maximale Aktivität der MAP-Kinase ist ähnlich hoch wie bei der Stimulation durch hohe Konzentrationen von Serotonin und Phorboläther. Die Ergebnisse der Experimente mit den Antagonisten Phentolamin, Prazosin, Yohimbin und Pindolol und die Experimente mit den Agonisten UK14,302 zeigen, daß die MAP-Kinase Aktivierung durch α_2 -Adrenoceptoren vermittelt wird (vergleiche Abbildung 4.26.). Verschiedene Studien haben gezeigt, daß OK-Zellen ausschließlich den α_{2C} -Subtypen der α_2 -Adrenoceptoren exprimieren (Blaxall et al. 1994, Shreve et al. 1991). Deshalb wird die Adrenalin induzierte Stimulation der MAP-Kinase via α_{2C} -Adrenoceptoren geschehen. Dies steht im Widerspruch zu vorausgehenden Beobachtungen mit klonierten α_{2C} -Adrenoceptor überexprimierenden CHO-Zellen, bei denen es nicht zu einer verstärkten MAP-Kinase Aktivierung kam (Flordellis et al. 1995). Dieser Unterschied kann durch eine notwendige unterschiedliche zelluläre Ausstattung die die Kopplung von α_{2C} -Adrenoceptoren an den MAP-Kinase Signaltransduktionsweg erlaubt, erklärt werden. Deshalb können α_2 -Adrenoceptoren die Stimulation der MAP-Kinase Aktivität in einigen Zellen unter physiologischen Bedingungen medieren.

Die α_2 -Adrenoceptoren inhibieren die Adenylylzyklase über Pertussistoxin-sensitive G-Proteine (Limbird 1988). In der vorliegenden Untersuchung hemmte Pertussistoxin die Stimulation der MAP-Kinase Aktivität durch Adrenalin und UK14,302 (vergleiche Abbildung 4.27.). Diese Hemmung war nicht unspezifisch, da Pertussistoxin die PMA-induzierte Stimulation der MAP-Kinase Aktivität nicht beeinflusst. Obwohl die MAP-Kinase Aktivierung durch einen anderen Inhibitor der Adenylylzyklase, Serotonin nachgeahmt werden konnte führen zwei Argumentationslinien zu dem Schluß, daß der Adrenalin induzierte Anstieg der MAP-Kinase Aktivität nicht sekundär zur Adenylylzyklase Inhibierung

vorkommt. Erstens, Adrenalin führt zu einem Anstieg der MAP-Kinase Aktivität, obwohl es die cAMP-Akkumulation eher verstärkt als hemmt, möglicherweise als Folge einer gleichzeitigen β -Adrenoceptor Stimulation (vergleiche Abbildung 4.28.). Zweitens, das cAMP Analogon dB-cAMP beeinflusst den Adrenalin induzierten Anstieg der MAP-Kinase Aktivität nicht. Zusammengefaßt heißt das, daß α_2 -Adrenoceptoren über ein Pertussistoxin-sensitives G-Protein, aber unabhängig von der Adenylyzyklase Inhibition an die MAP-Kinase Aktivierung koppeln.

Da die Stimulation von α_2 -Adrenoceptoren in OK-Zellen die Proteinkinase C stimulieren kann (Wang et al. 1995) und da das Proteinkinase C aktivierende Phorbol Ester PMA in der vorliegenden Studie ebenfalls die MAP-Kinase Aktivität stimulierte, wurde untersucht, ob an den für Adrenalin beschriebenen Effekten eine Aktivierung der Proteinkinase C beteiligt ist. Eine Vorbehandlung der OK-Zellen für 20 Stunden mit einer hohen PMA Konzentrationen verringerte den Effekt einer akuter PMA Gabe auf die MAP-Kinase Aktivität deutlich, möglicherweise durch die Herunterregulation der Protein Kinase C, aber es verringerte nicht den Effekt der Stimulation der MAP-Kinase Aktivität durch Adrenalin (vergleiche Abbildung 4.27.). Die Beobachtung, daß der Anstieg der MAP-Kinase Aktivität bei gleichzeitiger Gabe von Adrenalin und PMA größer war, als bei Gabe von einer der beiden Substanzen unterstützt ebenfalls die These, daß Adrenalin an dieser Stelle unabhängig von der Proteinkinase C wirkt. Demzufolge kann eine Proteinkinase C Aktivierung in OK-Zellen vorkommen (Wang et al. 1994), diese ist aber nicht an der Aktivierung der MAP-Kinase beteiligt.

An der Aktivierung der MAP-Kinase ist eine duale Serin- und Tyrosin-Phosphorylierung beteiligt, welche durch eine dualspezifische Proteinkinase, die MAP-Kinase Kinase katalysiert wird. Die MAP-Kinase Kinase der ERK Formen der MAP-Kinase ist MEK1 (Bokemeyer et al. 1996). PD 98059 ist ein spezifischer Inhibitor von MEK1 (Alessi et al. 1995). Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, daß Adrenalin, Serotonin und PMA die MAP-Kinase in Gegenwart von PD 98059 nicht aktivieren. Dies demonstriert, daß die MAP-Kinase in OK-Zellen durch Adrenalin, Serotonin und PMA über MEK1 aktiviert wird.

Es stellt sich die Frage, ob ein transienter Anstieg der MAP-Kinase Aktivität ausreicht, um die zelluläre Proliferation zu verstärken (vergleiche Abbildung 4.29.). Aus diesem Grund wurde der Effekt von Adrenalin, Serotonin und PMA auf den [3 H]-Thymidin-Einbau als Index für die Zellproliferation von OK-Zellen untersucht. Alle drei Agonisten verstärken den [3 H]-Thymidin-Einbau. Der ähnliche Effekt von UK14,304 zeigt, daß Adrenalin tatsächlich über α_2 -Adrenoceptoren wirkt. Zusätzlich verringerte PD 98059 merklich die Stimulation des [3 H]-Thymidin-Einbaus durch Adrenalin, Serotonin und PMA. Demzufolge leistet der Anstieg der MAP-Kinase Aktivität einen wesentlichen Beitrag zur verstärkten Proliferation, obwohl die Beteiligung anderer Faktoren nicht vollständig ausgeschlossen werden kann.

Zusammengefaßt heißt das, daß Adrenalin die MAP-Kinase Aktivität in OK-Zellen über einen α_2 -Adrenoceptor mittels Pertussistoxin-sensitive G-Proteine stimuliert. Dies geschieht unabhängig von einem Abfall des cAMP-Spiegels und Proteinkinase C, aber unter Beteiligung der MEK1 Form der MAP-Kinase. In physiologischen Studien werden OK-Zellen häufig als Modell für proximale Tubulus Zellen verwendet (Blaxall et al. 1994, Toutain und Morin 1992, Murphy und Bylund 1989). Proximale Tubuluszellen werden beim akutem Nierenversagen am schwersten geschädigt, und die Regeneration und Proliferation dieser Zellen ist der entscheidende Schritt für die Erholung nach dem akutem Nierenversagen (Toback 1992). Der stimulierende Effekt von Adrenalin auf die zelluläre Proliferation von OK-Zellen in der vorliegenden Studie weist darauf hin, daß Katecholamine, die während des

akuten Nierenversagens ausgeschüttet werden möglicherweise an der tubulären Regeneration beteiligt sind. Entsprechend könnte chronische Hypoxie in einem Organismus zu einer dauerhaften Stimulation dieses Signaltransduktionsweges führen, und damit an der Entwicklung von Hyperplasie und Hypertrophie des proximalen Tubulus beteiligt sein.

6. Zusammenfassung

Das akute Nierenversagen ist charakterisiert durch eine rasche Reduktion der Nierenfunktion, die zu einer Retention harnpflichtiger Substanzen einschließlich Harnstoff und Kreatinin führt. Trotz großer Fortschritte in der Behandlung sterben noch immer ungefähr 50% aller Betroffenen. Die bei weitem häufigste Ursache des akuten Nierenversagens ist der durch unzureichende Perfusion der Niere (Ischämie) hervorgerufene Sauerstoffmangel (Hypoxie). Hierbei wird der proximale Tubulus am schwersten geschädigt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Funktionseinschränkung und dem Verlauf der Erkrankung. Dadurch wird die Regeneration des proximalen Tubulus beim akuten Nierenversagen zum entscheidenden Schritt zur Wiederherstellung der Nierenfunktion und damit zum Überleben des Patienten. Diese Regeneration ist von verschiedenen Faktoren abhängig:

1. Vom Schweregrad der Hypoxie,
2. von der Anzahl intakter Zellen nach der Hypoxie,
3. von der Regeneration sublethal geschädigter Zellen, und
4. der Proliferation der überlebenden Zellen um die irreversibel geschädigten oder abgelösten Zellen zu ersetzen. Alle diese Faktoren wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht!

zu 1. Eine zentrale Bedeutung für die hypoxische Schädigung des proximalen Tubulus wird dem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration zugeschrieben. Jedoch war in der Vergangenheit unklar, unter welchen Bedingungen es bei Hypoxie zu einem frühen reversiblen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration kommt. In der vorliegenden Arbeit wurde die freie intrazelluläre Calciumkonzentration durch ein digitales Bildverarbeitungssystem mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzindikator Fura-2 bestimmt. Als Maß für die Hypoxie-induzierten funktionellen Änderungen wurde der Anstieg der Nicotinamidnucleotid (NADH)-assoziierten-Autofluoreszenz bestimmt. Strukturelle Schädigungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Propidium-Jodid nachgewiesen. Dazu wurden im Vorfeld eine Reihe methodischer Entwicklungen durchgeführt: Erstens die Konstruktion einer Perfusionskammer, die eine schnelle Variation des Sauerstoffpartialdruckes bei gleichbleibender Metabolitenkonzentration erlaubte und die Integration eines Sauerstoffmeßsystems in diese Kammer. Zweitens die Konstruktion eines geeigneten digitalen Bildverarbeitungssystems, das durch Integration eines motorisierten Mikroskopisches in der Lage ist, eine aussagefähige Anzahl proximaler Tubuli zu untersuchen. Die vorliegende Untersuchung charakterisiert in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck zwei verschiedene Schweregrade der Hypoxie. Bei einem Sauerstoffpartialdruck zwischen 30 und 15 mmHg kommt es zu funktionellen, d.h. Anstieg der NADH-assoziierten Autofluoreszenz und strukturellen Schädigungen, nicht jedoch zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration. Im Gegensatz dazu kommt es bei einem Sauerstoffpartialdruck unter 15 mmHg zusätzlich zu einem Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration.

zu 2. Eine möglichst große Anzahl überlebender Zellen kann durch die Verwendung protektiver Substanzen erreicht werden. Untersucht wurde der Einfluß von Adenosin-Triphosphat (ATP) und Quercetin auf frisch isolierte proximale Tubuli. Beide Substanzen wiesen in der Vergangenheit eine protektive Wirkung auf, ohne daß der Wirkmechanismus weiter aufgeklärt wurde. Hierfür wurde die Laktatdehydrogenase- (LDH) Freisetzung, der zelluläre Kalium-Gehalt und die Malondialdehyd-Bildung bei Hypoxie untersucht. ATP wirkt sowohl in vivo als auch in vitro protektiv gegenüber der Hypoxie induzierten Zellschädigung. Hierfür wurde in der Vergangenheit die These aufgestellt, daß Abbauprodukte des ATP wie

ADP und AMP für die protektive Wirkung verantwortlich sind. Da AMP in der vorliegenden Untersuchung keinerlei protektive Wirkung aufwies, ATP jedoch zu einem Rezeptor-typischen Anstieg der freien intrazellulären Calciumkonzentration führte kann der Schluß gezogen werden, daß die protektive Wirkung von ATP Rezeptor-vermittelt ist. Quercetin ist eine Bioflavonoid mit antioxidativen Eigenschaften, das sich in der Vergangenheit bei Ischämie und Reperfusion in der Rattenniere als protektiv erwies. Untersuchungen an kultivierten Nierenzellen wiesen auf einen Zusammenhang der protektiven Wirkung von Quercetin mit einer Hemmung der Lipidperoxydation hin. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß die Wirkung von Quercetin zumindest teilweise auf einer Hemmung der bei einer Hypoxie vorkommenden Lipidperoxydation beruht.

zu 3. Die Regeneration proximaler Tubuluszellen im Anschluß an eine hypoxische Schädigung wurden in kultivierten proximalen Tubuluszellen (LLC-PK₁-Zellen) anhand des Schlüsselenzyms der Wachstumsregulation, der Mitogen-aktivierten Kinase (MAP-Kinase) untersucht. Hypoxie wurde durch eine ATP-Depletion durch Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und die Erholung durch Substrat-Substitution simuliert. Untersucht wurde der Einfluß des Epidermalen-Wachstums-Faktors (EGF) und ATP. Sowohl EGF als auch ATP haben in der Vergangenheit zu einer beschleunigten Regeneration im Anschluß an eine hypoxische Schädigung geführt. Dies führte zu der These, daß die regenerative Wirkung von EGF und ATP auf einer verstärkten Proliferation im Anschluß an eine Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges beruhen könnte. Diese These kann durch die vorliegenden Untersuchungen nicht bestätigt werden. Tatsächlich führt die Erholung im Anschluß an eine ATP-Depletion alleine zu einer Aktivierung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges. Diese Aktivierung läßt sich weder durch EGF noch durch ATP verstärken.

zu 4. Die Proliferation proximaler Tubuluszellen beim akuten Nierenversagen wurde an kultivierten proximalen Tubuluszellen (OK-Zellen) anhand der MAP-Kinase, der c-AMP-Akkumulation und des [³H]-Thymidin-Einbaus untersucht. Während die Aktivierung der MAP-Kinase durch klassische Wachstumsfaktoren wie EGF gut untersucht ist, ist der Einfluß anderer Faktoren wie Katecholamine, die beim akuten Nierenversagen ausgeschüttet werden, sowie ihr Einfluß auf die Proliferation proximaler Tubuluszellen weniger gut bekannt. Die vorliegenden Untersuchungen belegen, daß Adrenalin die MAP-Kinase in OK-Zellen durch α_2 -Adrenoceptoren über Pertussistoxin-sensitive-G-Proteine stimuliert. Hierbei kommt es zu einem Abfall des cyklischen-Adenosin Monophosphat (cAMP) und der Proteinkinase C. Als Folge kommt es zu einer verstärkten zellulären Proliferation. Dies weist darauf hin, daß Katecholamine, die während des akuten Nierenversagens ausgeschüttet werden, an der tubulären Regeneration beteiligt sein können.

7. Literatur

Alblas J, van Corven EJ, Hordijk PL, Milligan G, Moolenaar WH (1993): Gi-mediated activation of the p21ras-mitogen-activated protein kinase pathway by alpha 2-adrenergic receptors expressed in fibroblasts. *J Biol Chem* 268: 22235-22238.

Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995): PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494.

Alkhunaizi AM, Schrier PW (1996): Management of acute renal failure: New perspectives. *Am J Kidney Dis* 28: 315-328.

Almeida ARP, Bunnachak D, Burnier M, Wetzels JF, Burke TJ, Schrier RW (1992): Time-dependent protective effects of calcium channel blockers on anoxia- and hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Pharmacol Exp Ther* 260: 526-531.

Amenta F, Liu A, Sabbatini M (1995): Pharmacological characterisation and autoradiographic localization of dihydropyridine-type calcium channels in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physio* 22: S232-S233.

Anderson NG, Milligan G (1994): Regulation of p42 and p44 MAP kinase isoforms in Rat-1 fibroblasts stably transfected with alpha 2C10 adrenoceptors. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 1529-1535.

Aust SD (1985): Lipid peroxidation. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research., Herausgegeben von Greenwald RA, CRC Boca Raton*: 203-207.

Bacallao R, Garfinkel A, Monke S, Zampighi G, Mandel LJ (1994): ATP depletion: A novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 107:3301-3313.

Bagnasco S, Good D, Balaban R, Burg M (1985): Lactat production in isolated segments of the rat nephron. *Am J Physiol* 248: F522-F526.

Balaban RS, Soltoff, Mandel LJ, StoryJM (1980): Coupling of active ion transport and aerobic respiratory rate in isolated renal tubules. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 447-451.

Balaban RS, Dennis VW, Mandel LJ (1981): Microfluorometric monitoring of NAD redox state in isolated perfused renal tubules. *Am J Physiol* 240: F337-F342.

Beckman JS, Koppenol WH (1996): Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-C1437.

Beutler E, Mathai CK (1967): A comparison of normal red cell ATP levels as measured by the firefly system and hexokinase system. *Blood* 30: 311-320.

Binswanger U (1997): Acute renal failure: Changing causes? *Kidney Blood Press Res* 20: 163.

Blaxall HS, Cerutis DR, Hass NA, Iversen LJ, Bylund DB (1994): Cloning and expression of the alpha 2C-adrenergic receptor from the OK cell line. *Mol Pharmacol* 45: 176-181.

Blumer KJ, Johnson GL (1994): Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *Trends Biochem Sci* 19: 236-420.

- Bokemeyer D, Sorokin A, Dunn MJ (1996):
Multiple intracellular MAP kinase signaling cascades. *Kidney Int* 49: 1187-1198.
- Bonventre JV (1993):
Mechanisms of ischemic acute renal failure. *Kidney Int* 43: 1160-1178.
- Bonventre JV, Brezis M, Siegel N, Rosen S, Portilla D, Venkatachalam M (1998):
Acute renal failure. I. Relative importance of proximal vs. distal tubular injury. *Am J Physiol* 275: F623-F632.
- Bonventre JV, Force T (1998):
Mitogen-activated protein kinases and transcriptional responses in renal injury and repair. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 7: 425-433.
- Bors W, Heller W, Michel C, Saran M (1990)
Flavonoids as antioxidants: determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology* 186: 343-355.
- Bouloumie A, Planat V, Devedjian JC, Valet P, Saulnier-Blache JS, Record M, Lafontan M (1994):
Alpha 2-adrenergic stimulation promotes preadipocyte proliferation. Involvement of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 269: 30254-30259.
- Bradford MM (1976):
A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principals of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.
- Brezis M, Rosen S (1995):
Hypoxia of the renal medulla: its implications for disease. *N Engl J Med* 332: 647-655.
- Bunnachak D, Almeida ARP, Wetzels JFM, Gengaro P, Nemenoff RA, Burke TJ, Schrier RW (1994):
Ca²⁺ uptake, fatty acid, and LDH release during proximal tubule hypoxia: effects of mepacrine and dibucaine. *Am J Physiol* 266: F196-F201.
- Burke TJ, Arnold PE, Gordon JA, Bulger RE, Dobyan DC, Schrier RW (1984):
Protective effect of intrarenal calcium membrane blockers before or after renal ischemia. Functional, morphological, and mitochondrial studies. *J Clin Invest* 74: 1830-1841.
- Burnier M, van Putten VJ, Schieppati A, Schrier RW (1988):
Effect of extracellular acidosis on ⁴⁵Ca uptake in isolated hypoxic proximal tubules. *Am J Physiol* 254: C839-C846.
- Bush KT, Sakurai H, Tsukamoto T, Nigam SK (1999):
Acute renal failure: Cellular features of injury and repair. *Atlas of the Kidney, Herausgegeben von Schrier RW, Blackwell Science*.
- Campbell JS, Seger R, Graves JD, Graves LM, Jensen AM, Krebs EG (1995):
The MAP kinase cascade. *Recent Prog Horm Res* 50: 131-158.
- Campos-Gonzalez R, Kindy MS (1992):
Tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase after transient ischemia in the gerbil brain. *J Neurochem* 59: 1955-1958.
- Canfield PE, Geerdes AM, Molitoris BA (1991):
Effect of reversible ATP depletion on tight-junction integrity in LLC-PK₁ cells. *Am J Physiol* 30: F1083-F1045.
- Cejka JC, Le Maut S, Bidet M, Tauc M, Poujeol P (1994):
Activation of calcium influx by ATP and store depletion in primary cultures of renal proximal cells. *Pflügers Arch- Europ J Physiol* 427: 33-41.
- Cha SH, Sekine T, Endou H (1998):
P2 purinoreceptor localization along rat nephron and evidence suggesting existence of subtype P2Y₁ and P2Y₂. *Am J Physiol* 274: F1006-F1014.

- Chakraborti T, Das S, Mondal M, Roychoudhury S, Chakraborti S (1999): Oxidant, Mitochondria and Calcium: An overview. *Cell Signal* 11: 77-85.
- Chen J, Liu X, Mandel LJ, Schnellmann RG (2001): Progressive disruption of the plasma membrane during renal proximal tubule cellular injury. *Toxicol Appl Pharmacol* 171: 1-11
- Chen Y, Morimoto S, Kitano S, Koh E, Fukoko K, Jiang B, Chen S, Yasuda O, Hirohara A, Ogihara T (1995): Lysophatidylcholin causes calcium influx, enhanced DNA synthesis and cytotoxicity in cultured vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis* 112: 69-76.
- Chertow GM, Lazarus JM, Paganini EP, Allgren RL, Laffayette RA, Sayegh MH (1998): Predictors of mortality and the provision of dialysis in patients with acute tubular necrosis. The Auriculin Anaritide Acute renal failure study group. *J Am Soc Nephrol* 9: 692-698.
- Conger JD (1997): Hemodynamic factors in acute renal failure. *Adv Renal Rep Therap* 4: 25-37.
- Conger JD, Robinette JB, Schrier RW (1988): Smooth muscle calcium and endothelium-derived relaxing factor in the abnormal vascular response of acute renal failure. *J Clin Invest* 82: 532-537.
- Corwine HL, Bonventre JV (1988): Acute renal failure in the intensive care unit. *Intensive Care Med* 14: 10-16.
- di Mari JF, Davis R, Safirstein RL (1999): MAPK activation determines renal epithelial survival during oxidative injury. *Am J Physiol* 277: F195-F203.
- Dong Z, Patel Y, Saikamura P, Weinberg JM, Venkatachalam MA (1998): Development of porous defects in plasma membranes of adenosin triphosphate-depleted Madine-Darby canine kidney cells and its inhibition by glycine. *Lab Invest* 78: 657-668.
- Dubyak GR, El-Moatassim C (1993): Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-C606.
- Edelstein C, Schrier RW (1995): The role of calcium in cell injury. *Acute renal failure: New concepts and therapeutic strategies, Herausgegeben von Goligorsky MS, Stein JH*. Churchill Livingstone New York.
- Edelstein CL, Wieder ED, Yaqoob MM, Gengaro PE, Dobyas DC, Schrier RW (1995): The role of cysteine proteases in hypoxia-induced rat renal proximal tubular injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 7662-7666.
- Edelstein CL, Ling H, Schrier RW (1997): The nature of renal cell injury. *Kidney Int* 51: 1314-1351.
- Faure M, Voino-Yasenetskaya TA, Bourne HR (1994): cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells. *J Biol Chem* 269: 7851-7854.
- Flordellis CS, Berguerand M, Gouache P, Barbu V, Gavras H, Handy DE, Bereziat G, Masliah J (1995): Alpha 2 adrenergic receptor subtypes expressed in Chinese hamster ovary cells activate differentially mitogen-activated protein kinase by a p21ras independent pathway. *J Biol Chem* 270: 3491-3494.
- Force T, Bonventre JV (1998): Growth factors and mitogen-activated protein kinases. *Hypertension* 31: 152-161.
- Frödin M, Peraldi P, van Obberghen E (1994): Cyclic AMP activates the mitogen-activated protein kinase cascade in PC12 cells. *J Biol Chem* 269: 6207-6214.

- Gmaj P, Murer H, Kinner R (1979):
Calcium ion transport across plasma membranes isolated from rat kidney. *Biochem J* 178: 549-557.
- Gobe G, Willgoss D, Hong N, Schoch E, Endre Z (1999):
Cell survival or death in renal tubular epithelium after ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int* 56: 1299-1304.
- Goligorsky MS, Lieberthal (1999):
Pathophysiology of ischemic acute renal failure. *Atlas of Kidney the Kidney, Herausgegeben von Schrier RW, Blackwell Science*.
- Goligorsky MS, Noiri E (1999):
Duality of nitric oxide in acute renal failure. *Semin Nephrol* 19: 263-271.
- Granger DN (1988):
Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 255: H1269-H1275.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985):
A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* 260: 3440-3450.
- Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P (1985):
Biochemical characterization of renal epithelial cell cultures (LLC-PK1 and MDCK). *Am J Physiol* 248: F536-F544.
- Guder WG, Ross BD (1984):
Enzyme distribution along the nephron. *Kidney Int* 26: 101-111.
- Hirano T, Oka, K, Akiba M (1998):
Effects of synthetic and naturally occurring flavonoids on Na^+ , K^+ -ATPase: aspects of the structure-activity relationship and action mechanism. *Life Sci*. 45:1111-1117.
- Hirschberg R, Kopple J, Lipsett P, Benjamin E, Minei J, Albertson T et al. (1999):
Multicenter clinical trial of recombinant human insulin-like growth factor I in patients with acute renal failure. *Kidney Int* 55: 2423-2432.
- Heasley LE, Senkfor SI, Winitz S, Strasheim A, Teitelbaum I, Berl T (1994):
Hormonal regulation of MAP kinase in cultured rat inner medullary collecting tubule cells. *Am J Physiol* 267: F366-F373.
- Hodgkin AL, Kynes RD (1955):
Active transport of cations in giant axons from Sepia and Loligo. *J Physiol (Lond)* 128: 28-60.
- Jacobs WR, Sgambati M, Gomez G (1991):
Role of cytosolic Ca^{2+} in renal tubule damage induced by anoxia. *Am J Physiol* 260: 581-590.
- Kahng MW, Berezesky IK, Trump BF (1978):
Metabolic and ultrastructural response of rat kidney cortex to *in vivo* ischemia. *Exp Mol Pathol* 29: 183-198.
- Kartha S, Toback FG (1985):
Purine nucleotides stimulate DNA synthesis in kidney epithelial cells in culture. *Am J Physiol* 249: F967-F972.
- Kelly KJ, Molitoris BA (2000):
Acute renal failure in the new millenium: Time to consider combination therapy. *Semin Nephrol* 20: 4-19.
- Kinane TB, Kang I, Chu A, Chin SH, Ecolani L (1997):
 $G\alpha_{i-2}$ mediates renal LLC-PK₁ growth by a Raf-independent activation of p42/44 MAP kinase. *Am J Physiol* 272: F273-F282.
- Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ (1994):
Direct evidence that G_i -coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by $G_{\beta\gamma}$ activation of p21ras. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 12706-12710.

- Kourie JI (1998):
Interaction of reactive oxygen species with ion transport mechanisms. *Am J Physiol* 275: C1-C24.
- Krauss G: (1997):
Intrazelluläre Signalübertragung: die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH: 351-357.
- Krauss S, Brand MD (2000):
Quantitation of signal transduction. *FASEB J* 14: 2581-2588.
- Kribben A, Wieder ED, Li X, van Putten V, Granot Y, Schrier RW, Nemenoff RA (1993a):
AVP-induced activation of MAP kinase in vascular smooth muscle cells is mediated through protein kinase C. *Am J Physiol* 265: C939-C945.
- Kribben A, Wetzels JFM, Wieder ED, Burke TJ, Schrier RW (1993b):
New technique to assesses hypoxia-induced cell injury in individual isolated renal tubules. *Kidney Int* 43: 464-469.
- Kribben A, Wieder ED, Wetzels JFM, Yu L, Gengaro PE, Burke TJ, Schrier RW (1994):
Evidence for the role of cytosolic free calcium in hypoxia-induced proximal tubule injury. *J Clin Invest* 93: 1922-1929.
- Kribben A, Philipp Th (1997):
Diagnostik des akuten Nierenversagens. *Medizinische Klinik* 92: 327-328.
- Kribben A, Herget-Rosenthal S, Lange B, Philipp T, Erdbrügger W, Michel MC (1997):
 α_2 -adrenoceptors in opossum kidney cells couple to stimulation of mitogen-activated protein kinase independently of adenylyl cyclase inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 356: 225-232.
- Kribben A, Herget-Rosenthal S, Lange B, Michel MC, Philipp T (1998):
Stimulation of mitogen activated protein kinase and cellular proliferation in renal proximal tubular cells. *Renal Failure* 20: 229-234.
- Kribben A, Edelstein CL, Schrier RW (1999):
Pathophysiology of acute renal failure. *J Nephrol* 12: S142-S151.
- Kuhlmann, MK, Burkhardt G, Horsch E, Wagner M, Köhler H (1998):
Inhibition of oxidant induced lipid peroxidation in cultured renal tubular epithelial cells (LLC-PK₁) by quercetin. *Free Radic Res* 29:451-460.
- Kwon O, Nelson WJ, Sibley R, Huie P, Scandling JD, Dafoe D, Alfrey E, Myers BD (1998):
Backleak, tight junctions, and cell-cell adhesion in postischemic injury to the renal allograft. *J Clin Invest* 101: 2054-2064.
- Lameire N, Vanholder (2001):
Pathophysiological features and prevention of human and experimental acute tubular necrosis. *J Am Soc Nephrol* 12: S20-S32.
- Leichtweiss H-P, Lubbers DW, Weiss C, Baumgartl H, Reschke W (1969):
The oxygen supply of the rat kidney: Measurement of the intra-renal pO₂. *Pflügers Arch- Europ J Physiol* 309: 328-349.
- Levy EM, Viscoli CM, Horwitz RI (1996):
The effect of acute renal failure on mortality. *JAMA* 275: 1489-1494.
- Li X, Zarinetchi F, Schrier RW, Nemenoff RA (1995):
Inhibition of MAP kinase by prostaglandin E₂ and forskolin in rat renal mesangial cells. *Am J Physiol* 269: C986-C991.
- Liano F, Pascual J and the Madrid acute renal failure study group (1996):
Epidemiology of acute renal failure: A prospective, multicenter, community-based study. *Kidney Int* 50: 811-818.

- Liano F, Pascual J (1999):
Acute renal failure: Causes and Prognosis. *Atlas of Kidney the Kidney, Herausgegeben von Schrier RW, Blackwell Science.*
- Lieberthal W, Koh JS, Levine JS (1998):
Necrosis and apoptosis in acute renal failure. *Semin Nephrol* 18: 505-518.
- Lieberthal W, Nigam S (2000):
Acute renal failure. II. Experimental models of acute renal failure: imperfect but indispensable. *Am J Physiol Renal Physiol* 278: F1-F12.
- Limbird LE (1988):
Receptors linked to inhibition of adenylate cyclase: additional signaling mechanisms. *FASEB J* 2: 2686-2695.
- Lotscher HR, Winterhalter KH, Carafoli E, Richter (1980):
The energy-state of mitochondria during the transport of Ca^{2+} . *Europ J Biochem* 110: 211-216.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Fair AL, Randall RJ (1951):
Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.
- Lübbers DW, Baumgärtl H (1997):
Heterogeneities and profiles of oxygen pressure in brain and kidney as examples of the pO_2 distribution in living tissue. *Kidney Int* 51: 372-380.
- Mallozzi C, Stasi AMM, Minetti M (1997):
Peroxynitrite modulates tyrosin dependent signal transductions pathway of human erythrocyte band 3. *FASEB J* 11: 1281-1290.
- Mandel LJ, Takano T, Soltoff SP, Murdaugh S (1988):
Mechanisms whereby exogenous adenine nucleotides improve rabbit renal proximal function during and after anoxia. *J Clin Invest* 81: 1255-1264.
- Mason J, Beck F, Dorge A, Rick R, Thurau K (1981):
Intracellular electrolyte composition of renal tubules following renal ischemia. *Kidney Int* 20: 61-70.
- Matsuda S, Kawasaki H, Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E (1995):
Activation of protein kinase cascades by osmotic shock. *J Biol Chem* 270: 12781-12786.
- Matthys EY, Patel Y, Kreisberg J, Stewart JH, Venkatachalam M (1984):
Lipid alterations induced by ischemia: Pathogenic factors in membrane damage. *Kidney Int* 26: 153-161.
- McCord JM (1985):
Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312:159.
- Metzen E, Wolf M, Fandrey J, Jelkmann W (1995):
Pericellular PO_2 and O_2 consumption in monolayer cell cultures. *Respir Physiol*: 101-106.
- Michaelis EK, Michaelis ML, Chang HH, Kito TE (1983):
High affinity Ca^{2+} -stimulated Mg^{2+} -dependent ATPase in rat brain synaptosomes, synaptic membranes, and microsomes. *J Biol Chem* 258: 6101-6108.
- Molitoris, BA, Bacallo R (1999):
Pathophysiology of ischemic acute renal failure: Cytoskeletal aspects. *Atlas of Kidney the Kidney, Herausgegeben von Schrier RW, Blackwell Science.*
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991):
Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Mullin JM, McGinn MT (1988):
Epidermal growth factor induced mitogenesis in kidney epithelial cells (LLC-PK₁). *Cancer Res* 48: 4886-4891.

- Murphy TJ, Bylund DB (1989):
Characterization of serotonin-1B receptors negatively coupled to adenylate cyclase in OK cells, a renal epithelial cell line from the opossum. *J Pharmacol Exp Ther* 249: 535-543.
- Nanoff C, Freissmuth M, Tuisl E, Schütz W (1990):
P₂-, but not P₁-purinoceptors mediate formation of 1,4,5,-inositol trisphosphate and its metabolites via a pertussis toxin-insensitive pathway in the rat renal cortex. *Br J Pharmacol* 100: 63-68.
- Nathan AT, Singer M (1999):
The oxygene trail. *British Medical Bulletin* 55: 96-108.
- Neary JT (1997):
MAPK cascades in cell growth and death. *News Physiol Sci* 12: 286-293.
- Neer EJ (1995):
Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257.
- Neumayer HH, Schreiber M, Wagner K (1989):
Prevention of delayed graft function in cadaveric kidney transplants by calcium antagonists diltazem and the prostacyclin-analogue iloprost-outcome of a prospective randomized clinical trial. *Prog Clin Biol Res* 301: 289-295.
- Nissenson AR (1998):
Acute renal failure: Definition and pathogenesis. *Kidney Int* 53: S7-S10.
- Nori E, Romanov V, Forest T, Gailit J, Dibona GF, Miller F, Som P, Oster ZH, Gologorsky MS (1995):
Pathophysiology of renal obstruction: Therapeutic role of synthetic RGD peptides in ARF. *Kidney Int* 48: 1375-1385.
- Ouellette AJ, Malt RA, Sukhatme VP, Bonventre JV (1990):
Expression of two "immediate early" genes Egr-1 and c-fos, in response to renal ischemia and during compensatory renal hypertrophy in mice. *J Clin Invest* 85: 766-771.
- Paller MS, Neumann TV (1991):
Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kidney Int* 40:1041-1049.
- Paller MS, Schnaith EJ, Rosenberg ME (1998):
Purinergetic receptors mediate cell proliferation and enhanced recovery from renal ischemia by adenosine triphosphate. *J Lab Clin Med* 131: 174-183.
- Pelech SL, Sanghera JS (1992):
MAP kinases: charting the regulatory pathways. *Science* 257: 1355-1356.
- Peters SMA, Tijssen MJH, van Os CH, Wetzels JFM (1995):
Protection against hypoxic injury of rat proximal tubules by feldipine via a calcium independent mechanism. *Pflügers Arch-Europ J Physiol* 431: 20-27.
- Peters SMA, Tijssen MJH, Bindels RJM, van Os CH (1996):
Rise in cytosolic Ca²⁺ and collapse of mitochondrial potential in anoxic, but not hypoxic rat proximal tubules. *J Am Soc Nephrol* 7: 2348-2356.
- Peters SMA, de Jong MD, Bindels RJM, van Os CH, Wetzels JFM (1998a):
Effect of renal cytoprotective agents on erythrocyte membrane stability. *Life Sci* 63: 975-983.
- Peters SMA, Tijssen MJH, van Os CH, Wetzels JFM, Bindels RJM (1998b):
Hypoxia decreases calcium influx into rat proximal tubules. *Kidney Int* 53: 703-708.
- Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis JM, Force T (1994):
The stress activated protein kinases are mayor c-Jun amino-terminal kinase activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 269: 26546-26551.

- Reeves WB, Shah SV (1994):
Activation of K⁺ channels contributes to hypoxic injury in proximal tubules. *J Clin Invest* 94: 2289-2294.
- Rose UM, Bindels RJM, Vis A, Jansen JWCM Van Os CH (1993):
The effect of L-type Ca²⁺ channel blockers on anoxia-induced increase in intracellular Ca²⁺ concentration in rabbit proximal tubule cells in primary culture. *Pflügers Arch- Europ J Physiol* 423: 378-386.
- Rose UM, Bindels RJM, Jansen JWCM Van Os CH (1994):
Effects of Ca²⁺ channel blockers, low Ca²⁺ medium and glycine on cell Ca²⁺ and injury in anoxic rabbit proximal tubules. *Kidney Int* 46: 223-229.
- Rossi CS, Lehninger AL (1964):
Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 239: 3971-3980.
- Sadoshima J, Qiu Z, Morgan JP, Izumo S (1995):
Angiotensin II and other hypertrophic stimuli mediated by G protein-coupled receptors activate tyrosine kinase, mitogen-activated protein kinase, and 90-kD S6 kinase in cardiac myocytes. The critical role of Ca²⁺-dependent signaling. *Circ Res* 76: 1-15.
- Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K (1994):
Calpain: New perspectives in molecular diversity and physiological and pathophysiological involvement. *FASEB J* 8: 814-822.
- Santos AC, Uyemura SA, Lopes JLC, Bazon JN, Mingatto FE, Curti C (1998):
Effect of naturally occurring flavonoids on lipid peroxidation and membrane permeability transition in mitochondria. *Free Radical Biol Med* 24: 1455-1461.
- Sato K, Kawashima S (2001):
Calpain function in the modulation of signal transduction molecules. *Biol Chem* 382: 743-751.
- Schatzman HJ (1966):
ATP-dependent Ca²⁺-extrusion from human red cells. *Experientia* 22: 364-365.
- Schena FP (1998):
Role of growth factors in acute renal failure. *Kidney Int* 53: S11-S15.
- Schrier RW, Arnold PE, van Putten VJ, Burke TJ (1987):
Cellular calcium in ischemic acute renal failure: a role of calcium entry blockers. *Kidney Int* 32: 313-321.
- Schwertschlag U, Schrier RW, Wilson P (1986):
Beneficial effects of calcium channel blockers and calmodulin binding drugs on in vitro cell anoxia. *J Pharmacol Exp Ther* 238: 119-124.
- Seeger R, Krebs E (1995):
The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735.
- Shoskes DA (1998):
Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury. *Transplantation* 66: 147-152.
- Shreve PE, Toews ML, Bylund DB (1991):
Alpha 2A- and alpha 2C-adrenoceptor subtypes are differentially down-regulated by norepinephrine. *Eur J Pharmacol* 207: 275-276.
- Siegel NJ, Glazier WB, Chaudry IH, Gaudio KM, Lytton B, Baue AE, Kashgarin M (1980):
Enhanced recovery from acute renal failure by the postischemic infusion of adenine nucleotides and magnesium chloride in rats. *Kidney Int* 17: 338-349.
- Snowdowne KW, Borle AB (1985):
Effects of low extracellular sodium on cytosolic ionized calcium: Na⁺-Ca²⁺ exchanger as a major influx pathway in kidney cells. *J Biol Chem* 260: 14998-15007.

- Soltoff SP, Avraham H, Avraham S, Cantley LC (1998)
Activation of P2_{Y2} Receptors by UTP and ATP stimulates mitogen-activated kinase activity through a pathway that involves related adhesion focal tyrosine kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* 273: 2653-2660.
- Sural S, Sharma RK, Singhal M, Sharma AP, Kher V, Arora P, Gupta A, Gulati S (2000):
Etiology, Prognosis, and outcome of post-operative acute renal failure. *Renal Failure* 22: 87-97.
- Takano T, Soltoff SP, Murdaugh S, Mandel LJ (1985):
Intracellular respiratory dysfunction and cell injury in short-term anoxia of rabbit renal proximal tubules. *J Clin Invest* 76: 2377-2384.
- Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV (1996):
Acute renal failure. *N England J Med* 334: 1448-1460.
- Tibbles LA, Woodgett (1999):
The stress-activated protein kinase pathways. *CMLS* 55: 1230-1254.
- Tijssen MJ, Peters SM, Bindels RJ, van Os CH, Wetzels JF (1997):
Glycine protection against hypoxic injury in isolated rat proximal tubules: the role of proteases. *Nephrol Dial Transplant* 12: 2549-2556.
- Toback FG (1992):
Regeneration after acute tubular necrosis. *Kidney Int* 41: 226-246.
- Toutain H, Morin JM (1992):
Renal proximal tubule cell cultures for studying drug-induced nephrotoxicity and modulation of phenotype expression by medium components. *Renal Failure* 14: 371-383.
- Umarova FT, Kushbactova ZA, Batirov EH (1998):
Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase by flavonoids and their inotropic effect. Investigation of the structure-activity relationship. *Membr Cell Biol* 12: 27-40.
- van Acker SA, van Balen GP, van den Berg DJ, Bast A, van der Vijgh WJ (1998):
Influence of iron chelation on the antioxidant activity of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 56: 935-943.
- van Biesen T, Hawes BE, Luttrell DK, Krueger KM, Touhara K, Porfiri E, Sakaue M, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (1995):
Receptor-tyrosine-kinase- and G beta gamma-mediated MAP kinase activation by a common signalling pathway. *Nature* 376: 781-784.
- van Why SK, Kim S, Geibel J, Seebach FA, Kashgarian M, Siegel NJ (1999):
Thresholds for cellular disruption and activation of the stress response in renal epithelia. *Am J Physiol* 277: F227-F234.
- Vercesi AE, Grijalba MT, Meinicke AR, Catilho RF (1997):
The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep* 17: 43-52.
- Wang TT, Chen M, Lachance S, Delalandre A, Carriere S, Chan JS (1994):
Isoproterenol and 8-bromo-cyclic adenosine monophosphate stimulate the expression of the angiotensinogen gene in opossum kidney cells. *Kidney Int* 46: 703-10.
- Waters SL, Wong JK, Schnellmann RG (1997):
Depletion of endoplasmic reticulum calcium stores protects against hypoxia- and mitochondrial inhibitor-induced cellular injury and death. *Biochem Biophys Res Com* 240:57-60.
- Weinberg JM (1985):
Oxygen deprivation-induced injury to isolated rabbit kidney tubules. *J Clin Invest* 76: 1193-1208.
- Weinberg JM, Humes HD (1986):
Increase of cell ATP produced by exogenous adenine nucleotides in isolated rabbit kidney tubules. *Am J Physiol* 250: F720-F733.

- Weinberg JM, Davis JA, Abarzua M, Kiani T (1989): Relationship between cell adenosin triphosphate and glutathione content and protection by glycine against hypoxic proximal tubule injury. *J Lab Clin Med* 111: 612-622.
- Weinberg JM (1991): The cell biology of ischemic acute renal injury. *Kidney Int* 39: 476-500.
- Weinberg JM, Davis JA, Venkatachalam MA (1997): Cytosolic-free calcium increases to greater than 100 micromolar in ATP-depleted proximal tubules. *J Clin Invest* 100: 713-722.
- Weinberg JM, Davis JA, Shayman JA, Knight PR (1998): Alterations of cytosolic calcium in LLC-PK₁ cells induced by vasopressin and exogenous purines. *Am J Physiol* 256: C967-C976.
- Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Nissim I (2000a): Mitochondrial dysfunction during hypoxia/reoxygenation and its correction by anaerobic metabolism of citric acid cycle intermediates. *PNAS* 97: 2826-2831.
- Weinberg JM, Venkatachalam MA, Roeser NF, Saikamuar P, Dong Z, Senter RA, Nissim I (2000b): Anaerobic and aerobic pathways for salvage of proximal tubules from hypoxia-induced mitochondrial injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 279: F927-F943.
- Welch WJ, Baumgärtl H, Lübbers D, Wilcox CS (2001): Nephron pO₂ and renal oxygen usage in the hypertensive rat kidney. *Kidney Int* 59: 230-237.
- Wetzels JFM, Kribben A, Burke TJ, Schrier RW (1991): Evaluation of a closed perfusion chamber for single cell fluorescence measurements. *Immunol Methods* 141: 289-291.
- Wetzels JFM, Yu I, Wang X, Kribben A, Burke TJ, Schrier (1993a): Calcium modulation and cell injury in isolated rat proximal tubules. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 176-180.
- Wetzels JFM, Wang X, Gengaro PE, Nemenoff RA, Burke TJ, Schrier RW (1993b): Glycine protection against hypoxic but not phospholipase A₂-induced injury in rat proximal tubules. *Am J Physiol* 264: F94-F99.
- Wiegele G, Brandis M, Zimmerhackl LB (1998): Apoptosis and necrosis during ischemia in renal tubular cells (LLC-PK₁ and MDCK). *Nephrol Dial Transplant* 13: 1158-1167.
- Wilkinson MG, Millar JBA (2000): Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14: 2147-2157.
- Wilson PD, Schrier RW (1986): Nephron segment and calcium determinants of anoxic cell death in primary renal cell cultures. *Kidney Int* 29: 1172-1179.
- Witzgal R, Brown D, Schwarz C, Bonventre JV (1995): Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-fos, and clusterin in the postischemic kidney. *J Clin Invest* 93: 2175-2188.
- Yamada H, Seki G, Taniguchi S, Uwatoko S, Suzuki K, Kurokawa K (1996): Mechanism of [Ca²⁺] increase by extracellular ATP in isolated rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol* 270: C1096-C1104.
- Yamada T, Terada Y, Homma MK, Nonoguchi H, Sasaki S, Yuasa Y, Tomita K, Marumo F (1995): AVP inhibits EGF-stimulated MAP kinase cascade in Madin-Darby canine kidney cells. *Kidney Int* 48: 745-752.

- Yao A, Takahashi T, Aoyagi T, Kinugawa A, Kohmoto O, Sugiura S, Serizawa T (1995): Immediate-early gene induction and MAP kinase activation during recovery from metabolic inhibition in cultured cardiac myocytes. *J Clin Invest* 96: 69-77.
- Yaqoob M, Edelstein C, Weider E, Alkunaizi A, Gengaro P, Nemenoff R, Schrier R (1996): Nitric oxide kinetics during hypoxia in proximal tubules cells. Effects of acidosis and glycin. *Kidney Int* 49: 1314-1319.
- Young SW, Dickens M, Tavare JM (1994): Differentiation of PC12 cells in response to a cAMP analogue is accompanied by sustained activation of mitogen-activated protein kinase. Comparison with the effects of insulin, growth factors and phorbol esters. *FEBS Lett* 338: 212-216.
- Zager RA, Burkhart KM, Conrad DS, Gmur DJ, Iwata M (1996): Phospholipase A₂-induced cytoprotection of proximal tubules: Potential determinants and specificity for ATP depletion mediated injury. *J Am Soc Nephrol* 7: 64-72.
- Zager RA, with the technical assistance of Johnson A, Anderson K (2000): Plasma membrane cholesterol: A critical determinant of cellular energetics and tubular resistance of attack. *Kidney Int* 58: 193-205.
- Zeng LH, Wu J, Fung B, Tong JH, Mickle D, Wu TW (1997): Comparative protection against oxyradicals by three flavonoids on cultured endothelial cells. *Biochem. Cell Biol* 75: 717-720.
- Zhang MI, O'Neil RG (1996): Regulated calcium channel in apical membranes of renal proximal tubule cells. *Am J Phys* 271: C1757-C1764.

8. Lebenslauf

Dipl. Biol. Bettina Lange
Zweibachegge 16
45279 Essen

Geboren am	10.09.68
in	Essen verheiratet
1975-1979	Grundschule in Essen
1979-1988	Gymnasium mit Abitur in Essen
1988-1994	Studium der Biologie, an der Ruhr-Universität Bochum. Abschluss: Diplom
seit 1995	Promotion an der Universität Essen
seit 2000	Mitarbeiterin der Sangui BioTech und der Gluko MediTech, Alfred-Herrhausen-Straße 44, 58455 Witten, zuständig für die Planung und Durchführung der präklinischen Studien beider Unternehmen.

9. Danksagungen

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Andreas Kribben für die Anregung zu dieser Arbeit, sowie seine intensive Betreuung und wirklich ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. H. de Groot, Direktor des Instituts für Physiologische Chemie des Universitätsklinikums der Universität Essen danke ich für so manchen wertvollen Hinweis und die Möglichkeit, verschiedene Messungen in seiner Abteilung durchzuführen.

Dem Direktor der Abteilung für Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Zentrum für Innere Medizin des Universitätsklinikums der Universität Essen, Herrn Prof. Dr. med. Th. Philipp, danke ich an dieser Stelle für die Möglichkeit die vorliegenden Untersuchungen in seiner Abteilung durchzuführen.

Frau Simone Blaschke danke ich für hervorragende technische Assistenz und eine freundschaftliche Zusammenarbeit. Frau Wagner-Mahler danke ich ebenfalls für ihre technische Assistenz.

Den Herren Arzt im Praktikum Thorsten Feldkamp, Dr. Stephan Herget-Rosenthal, cand. med. Markus Hörbelt, Dr. med. Frank Pietruck und Dr. med. Christopher Plogmann (in alphabetischer Reihenfolge) danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. M. Michel danke für die Zusammenarbeit bei der Untersuchung der β -Adrenoceptor Stimulation proximaler Tubuluszellen.

Den Herren Priv.-Doz. Dr. M. Kuhlmann und Prof. H. Köhler danke ich für die Kooperation bei der Untersuchung der oxidativen Schädigung des proximalen Tubulus.

Allen Mitarbeiter des Nephrologischen Labors, die durch die angenehme Arbeitsatmosphäre nicht unwesentlich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben, sei ebenfalls gedankt.

Allen Mitarbeitern der Feinmechanischen Werkstatt und des Zentralen Tierlabors des Universitätsklinikums Essen danke ich für ihre Hilfe.

Meinem Ehemann Thomas der mich in den Höhen und Tiefen der Promotionszeit geduldig ertragen hat sei an dieser Stelle gedankt.

Meinen Eltern gilt mein uneingeschränkter Dank für ihre jahrelange Unterstützung. Diese weit über das Materielle hinausgehende Förderung hat die vorliegende Arbeit erst ermöglicht.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Hypoxische Schädigung proximaler Nierentubuli: Zelluläre Mechanismen, Protektion und Regeneration“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Frau Dipl. Biol. Bettina Lange befürworte.

Essen, den

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, den

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine andere Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, den