

Toxikologische Relevanz des Vorkommens von Desmethyl- Varianten der Microcystine und des Nodularins in Gewässern und Nahrungsergänzungsmitteln

vom Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ genehmigte

Dissertation

(D386)

vorgelegt von

Diplom-Lebensmittelchemikerin

Helena Ufelmann

Betreuer der Arbeit: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Kaiserslautern 2012

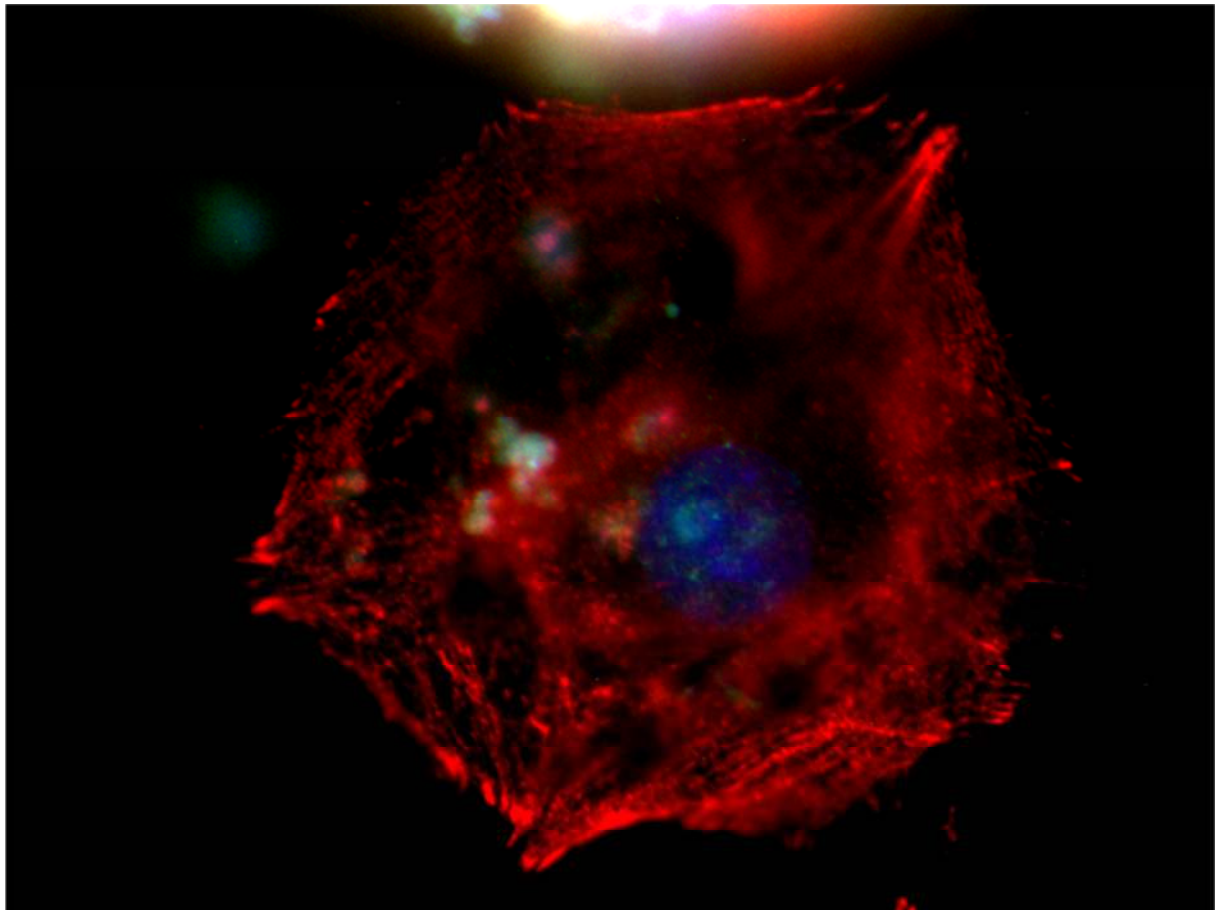
Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 7. Dezember 2012

Prüfungskommission:

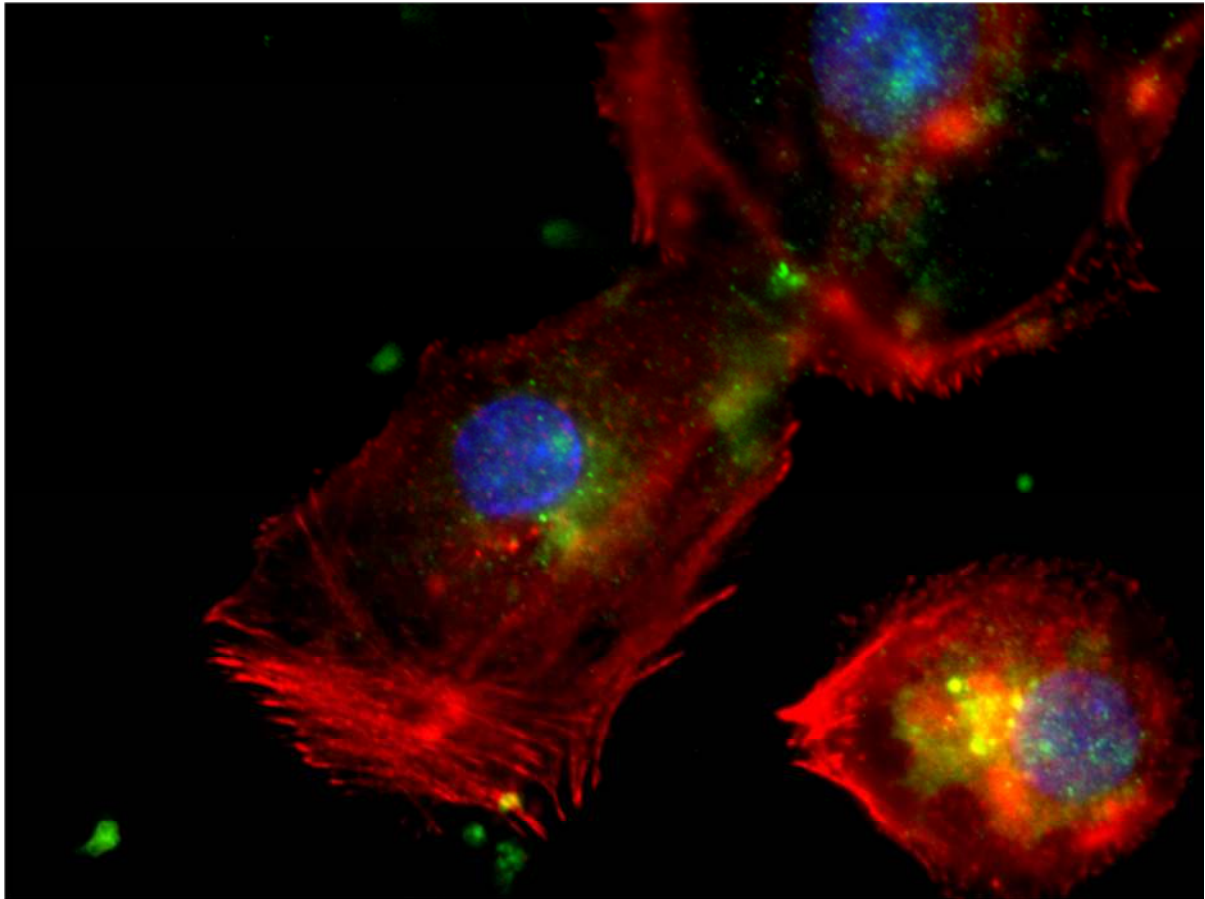
Vorsitzender: Prof. Dr. H. Sitzmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

2. Berichterstatterin: Junprof. Dr. M. Esselen



Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde zwischen November 2008 und Dezember 2011 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Dieter Schrenk durchgeführt.



Für meine Familie



*Die Neugierde steht immer an erster Stelle eines Problems,
was gelöst werden will.*

Galileo Galilei

Моей любимой бабушке.

Татьяна Михайловна Шуваева 29. Февраля 1923, † 3. Октября 2003*

Inhalt

Abbildungsverzeichnis.....	v
Tabellenverzeichnis.....	viii
Abkürzungsverzeichnis.....	x
1. Einleitung	1
2. Grundlagen	2
2.1. Mitogen aktivierter Proteinkinase (MAPK)-Signalweg.....	2
2.1.1. <i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i> (ERK1/2).....	4
2.1.2. p38 MAPK.....	5
2.1.3. JNK/SAPK.....	8
2.2. AKT (Proteinkinase B)-Weg	9
2.3. Serin/Threonin Proteinphosphatasen	11
2.3.1. PP1	12
2.3.2. PP2A.....	13
2.4. Cyanobakterien	14
2.4.1. Exposition	16
2.5. Microcystine und Nodularin	17
2.5.1. Produktion und Regulation	18
2.5.2. Chemische Eigenschaften.....	19
2.5.3. Biosynthese	22
2.5.4. Absorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion.....	24
2.5.5. Wirkmechanismus.....	26
2.5.6. Auswirkung auf das Zytoskelett.....	28
2.5.7. Apoptose.....	29
2.5.8. Akute und subakute Toxizität	32
2.5.9. Subchronische und chronische Toxizität	33
2.5.10. Tumorpromotion und Kanzerogenität	34
2.5.11. Analytik	35
3. Aufgabenstellung.....	37
4. Materialien und Methoden	38
4.1. Materialien und Chemikalien	38
4.2. Arbeiten mit primären Hepatozyten	38
4.2.1. Isolierung primärer Rattenhepatozyten.....	38
4.2.2. Kultivierung und Behandlung primärer Rattenhepatozyten	42
4.2.3. Kultivierung und Behandlung primärer humaner Hepatozyten.....	44
4.2.4. Resazurinreduktionstest.....	45

4.2.5.	LDH-Leakage-Test.....	47
4.2.6.	Proteinisolierung-Zelllysat	49
4.2.7.	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	50
4.2.8.	Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität	51
4.2.9.	Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	53
4.2.10.	DNS-Fragmentierungs-Analyse („DNA-laddering“).....	53
4.2.11.	Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
4.2.12.	Western Blot und Immunoblot	58
4.2.13.	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (LSM)	62
4.3.	Fluorometrische Bestimmung der Proteinphosphatase-Inhibierung	64
4.4.	Statistik.....	68
5.	Ergebnisse	69
5.1.	Zytotoxizität.....	69
5.1.1.	Resazurinreduktionstest und LDH-Leakage-Test in primären Rattenhepatozyten 70	
5.1.2.	Resazurinreduktionstest in primären Humanhepatozyten.....	80
5.2.	Caspase-Aktivitäten und Nukleäre Apoptose.....	86
5.2.1.	Caspase-Assay.....	87
5.2.2.	DAPI-Färbetest	91
5.2.3.	DNA-laddering.....	95
5.3.	Hemmung von Proteinphosphatasen	97
5.4.	AKT (Proteinkinase B)-Signalweg	105
5.5.	MAPKinase-Signalweg.....	108
5.5.1.	Status an Phospho-MEK1/2 und Phospho-ERK1/2	108
5.5.2.	Status an Phospho-p90RSK.....	119
5.5.3.	Status an Phospho-p85/p70 und Phospho-S6rP	126
5.5.4.	Status an Phospho-p38 MAPK und Phospho-MSK1/2	131
5.5.5.	Status an Bax, Bcl2 und Bcl-xL	133
6.	Diskussion.....	145
6.1.	Zytotoxizität und Hemmung von Proteinphosphatasen durch Microcystine und Nodularine	146
6.2.	Apoptose durch Microcystine und Nodularine.....	162
6.3.	Wirkmechanismus: MAPK-Signalweg.....	166
6.4.	Wirkmechanismus: AKT-Signalweg.....	176
7.	Zusammenfassende Diskussion.....	179
8.	Zusammenfassung und Ausblick.....	186

Literaturverzeichnis	188
Anhänge.....	i
Lebenslauf.....	ix
Eidesstattliche Erklärung	xii

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MAPK-Signalweg	3
Abbildung 2: Duale Phosphorylierung der MAPK-Enzyme	4
Abbildung 3: p38 MAPK- Signalweg	7
Abbildung 4: Akt- Signalweg	10
Abbildung 5: Struktur von PP1c (Cohen, 2002)	13
Abbildung 6: Wannsee (Berlin, 2005)	15
Abbildung 7: Morphologie von Microcystinen	17
Abbildung 8: <i>Nodularia spumigena</i> in der Ostsee	18
Abbildung 9: Grundstruktur von Microcystinen	20
Abbildung 10: Struktur von Nodularin	21
Abbildung 11: Modell der an der Biosynthese von Microcystinen und Nodularin beteiligten Domänen der Multienzyme	23
Abbildung 12: Biosynthese von MC-LR	24
Abbildung 13: Transport in Hepatozyten	25
Abbildung 14: Bindung von MC-LR an PP1	27
Abbildung 15: Nekrose vs. Apoptose (Kumar, 2012)	29
Abbildung 16: Apoptose-Wege	31
Abbildung 17: Primäre Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten	38
Abbildung 18: Umwandlung von Resazurin zu Resorufin unter NADH-Verbrauch	45
Abbildung 19: Aufbau einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur	59
Abbildung 20: Strahlengang in einem konfokalen LSM	63
Abbildung 21: Zytotoxizität für MC-LR-Varianten	71
Abbildung 22: Zytotoxizität für MC-RR-Varianten	74
Abbildung 23: Zytotoxizität für MC-YR-Varianten und MC-HtyR	75
Abbildung 24: Zytotoxizität für MC-LW, -WR, -LY, -LA, -LF	77
Abbildung 25: Zytotoxizität für NOD-Varianten	78
Abbildung 26: Linearer Fit der EC ₅₀ -Werte in primären Rattenhepatozyten	79
Abbildung 27: Zytotoxizität für MC-LR-Varianten	80
Abbildung 28: Zytotoxizität für MC-LW, -LY, -LA	82
Abbildung 29: Zytotoxizität für MC-WR und MC-HtyR	83
Abbildung 30: Zytotoxizität für NOD-Varianten	84
Abbildung 31: Linearer Fit der EC ₅₀ -Werte in primären Human- und Rattenhepatozyten	85
Abbildung 32: Caspase-Aktivität für MC-LR-Varianten	88
Abbildung 33: Caspase-Aktivität für MC-Varianten	89
Abbildung 34: Caspase-Aktivität für NOD-Varianten	90

Abbildung 35: DAPI-Färbung von Kontrollen	91
Abbildung 36: DAPI-Färbung mit MC-LR.....	92
Abbildung 37: Nukleäre Apoptose durch MC-LR	93
Abbildung 38: DAPI-Färbung mit NOD	94
Abbildung 39: Nukleäre Apoptose durch NOD.....	95
Abbildung 40: Nukleäre Apoptose durch MC-LR und NOD.....	96
Abbildung 41: Linearer Fit der IC ₅₀ -Werte von tierischen PPs.....	99
Abbildung 42: Linearer Fit der IC ₅₀ -Werte von humanen PPs	101
Abbildung 43: Linearer Fit der IC ₅₀ -Werte von PP	102
Abbildung 44: Linearer Fit der IC ₅₀ - und EC ₅₀ -Werte aus humanen Untersuchungen	104
Abbildung 45: Western Blot P-c-Raf für MC-LR.	106
Abbildung 46: Western Blot P-c-Raf und P-Akt für MC-LR.	106
Abbildung 47: Western Blot P-c-Raf für NOD.	107
Abbildung 48: Western Blot P-PDK1 und P-PTEN für NOD.....	107
Abbildung 49: Western Blot P-MEK1/2 für NOD.	110
Abbildung 50: Western Blot P-ERK1/2 für MC-LR.	112
Abbildung 51: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von DMSO und UVC-Licht.....	113
Abbildung 52: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von MC-LR.	115
Abbildung 53: Western Blot P-ERK1/2 für NOD.....	117
Abbildung 54: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von NOD.....	118
Abbildung 55: Western Blot P-p90RSK für Kontrollen.....	120
Abbildung 56: Western Blot P-p90RSK für MC-LR und MC-RR.....	121
Abbildung 57: Western Blot P-p90RSK für MC-LR und MC-RR.....	122
Abbildung 58: Western Blot P-p90RSK für NOD.....	124
Abbildung 59: Western Blot P-p90RSK für NOD.....	125
Abbildung 60: Western Blot P-p70S6 für MC-LR und MC-RR.....	127
Abbildung 61: Western Blot P-p85/p70S6 für NOD.....	129
Abbildung 62: Western Blot P-S6rP für NOD.....	130
Abbildung 63: Western Blot P-p38MAPK für NOD.....	132
Abbildung 64: Western Blot Bax für MC-LR und MC-RR.	134
Abbildung 65: Western Blot Bax für NOD.	135
Abbildung 66: Western Blot Bcl-2 für MC-LR und MC-RR.	136
Abbildung 67: Western Blot Bcl-2 für NOD.	137
Abbildung 68: Western Blot Bcl-xL für MC-LR und MC-RR.....	138
Abbildung 69: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollen.....	139
Abbildung 70: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von MC-LR.	140
Abbildung 71: Western Blot Bcl-xL für NOD.	142

Abbildung 72: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von NOD.....	143
Abbildung 73: Grundstruktur der MCs	150
Abbildung 74: Grundstruktur von NOD	151
Abbildung 75: Interaktion zwischen MC-LR und PP1	152
Abbildung 76: Zytotoxizität	153
Abbildung 77: PP-Inhibierung	154
Abbildung 78: : Apoptose-Wege	163
Abbildung 79: MAPK-Signalweg	167
Abbildung 80: MAPK-, Akt- und Apoptose-Signalwege.....	170
Abbildung 81: Akt- Signalweg.....	177
Abbildung 82: Rangfolge der Zytotoxizität	179
Abbildung 83: PP-Inhibierung (human).....	180
Abbildung 84 MAPK- und Apoptose-Signalwege.	182
Abbildung 85: PP-Aktivität für MC-LR- und NOD-Varianten.....	i
Abbildung 86: PP-Aktivität für MC-Varianten	ii
Abbildung 87: PP2A-Aktivität für MC-LA und MC-LF	iii
Abbildung 88: PP1 α -Aktivität für MC-LW, MC-WR und MC-LY.....	iii
Abbildung 89: PP-Aktivität für MC-LR-Varianten.....	iv
Abbildung 90: PP-Aktivität für MC-RR-Varianten	v
Abbildung 91: PP-Aktivität für MC-YR-Varianten	vi
Abbildung 92: PP-Aktivität für NOD-Varianten	vii
Abbildung 93: Western Blot p38MAPK für NOD.	viii
Abbildung 94: Primäre Rattenhepatozyten nach 6 h Inkubation mit NOD	viii

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toxingehalte in verschiedenen Produkten	16
Tabelle 2: Einbuchstabencode für Aminosäuren (Carmichael, et al., 1988).....	20
Tabelle 3: Perfusionslösungen	40
Tabelle 4: Nährmedium für Rattenhepatozyten	43
Tabelle 5: Substanzendkonzentrationen für Rattenhepatozyten	43
Tabelle 6: Nährmedium für humane Primärhepatozyten.....	44
Tabelle 7: Substanzendkonzentrationen für humane Hepatozyten	45
Tabelle 8: Lösungen für Resazurinreduktionstest.....	46
Tabelle 9: Lösungen für LDH-Assay	48
Tabelle 10: Lysispuffer für Western Blot	50
Tabelle 11: Kalibriergerade mit BSA.....	50
Tabelle 12: Caspasen.....	51
Tabelle 13: Caspase Lysis- und Reaktionspuffer.....	52
Tabelle 14: Pipettierschema für Caspase-Assay	52
Tabelle 15: DAPI-Färbelösung	53
Tabelle 16: TTE Puffer	54
Tabelle 17: TE-, Lade- und TAE-Puffer	55
Tabelle 18: Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE	57
Tabelle 19: 6x Ladepuffer für SDS-PAGE.....	58
Tabelle 20: 10x Elektrophorese-Puffer	58
Tabelle 21: Blotting Puffer	59
Tabelle 22: Blocking Puffer.....	60
Tabelle 23: TBS und TBS-T.....	60
Tabelle 24: Primärantikörper (Cell Signaling Technologies)	60
Tabelle 25: Chemilumineszenz-Detektionslösungen	61
Tabelle 26: Stripping Puffer	62
Tabelle 27: Blocker, Carrier, Antikörper.....	63
Tabelle 28: Kalibriergerade mit MUAcetat	65
Tabelle 29: Lösungen für PPIA.....	65
Tabelle 30: Substanzendkonzentrationen für mammalian PP	67
Tabelle 31: Substanzendkonzentrationen für human PP	67
Tabelle 32: EC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem Resazurinreduktionstest in primären Rattenhepatozyten nach 24 h.	72
Tabelle 33: EC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem LDH-Leakage-Test in primären Rattenhepatozyten nach 24 h.....	73

Tabelle 34: EC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus Resazurinreduktionstest in primären humanen Hepatozyten nach 24 h.....	81
Tabelle 35: EC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus Resazurinreduktionstest in primären Human- und Rattenhepatozyten nach 24 h im Vergleich.....	85
Tabelle 36: IC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α tierischen Ursprungs im Vergleich.....	98
Tabelle 37: IC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α humanen Ursprungs im Vergleich.....	100
Tabelle 38: EC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem Resazurinreduktionstest und LDH-Leakage-Test in primären Ratten- und Humanhepatozyten nach 24 h.....	148
Tabelle 39: IC ₅₀ -Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α tierischem und humanem Ursprung im Vergleich.....	149
Tabelle 40: IC ₅₀ -Werte aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α (Blom, et al., 2005)...	156

Abkürzungsverzeichnis

Adda	3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure
Afa	<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>
AP-1	Aktivatorprotein-1
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor-1</i>
ASK1/2	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1/2</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	bidestilliert
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i>
cGMP	<i>cyclic guanosine monophosphate</i>
D-Ala	D-Alanin
D-Asp	D-Asparat
DEN	Diethylnitrosamin
D-Glu	D-Glutamat
dm	desmethyliert
D-MeAsp	D-erythro- β -methy lasparaginsäure
DSP	<i>dual-specificity phosphatase</i>
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK1/2	<i>extracellular signal regulated kinases 1/2</i>
FADD	<i>fas-associated death domain</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
Gab	<i>Grb-associated binder</i>
GLUT4	<i>insulin regulated glucose transporter 4</i>
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GS	Gewebekulturschale
GSH	Glutathion
GSK3	Glykogensynthasekinase 3
HePTP	<i>haemopoietic tyrosine phosphatase</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
IARC	<i>International Agency of Research on Cancer</i>
I-1	Inhibitor-1

IL-1	Interleukin-1
ILK	<i>integrin-linked kinases</i>
i.p.	<i>intraperitoneal</i>
IRS-1	<i>insulin receptor substrate 1</i>
i.v.	<i>intravenous</i>
Jak1	<i>janus family of tyrosine kinases 1</i>
JNK1/2/3	<i>c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3</i>
KG	Körpergewicht
KSR	<i>kinase suppressor of ras</i>
LC ₅₀	Mittlere letale Konzentration
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
LDH	Laktat-Dehydrogenase
L-Ala	L-Alanin
L-Arg	L-Arginin
L-Har	L-Homoarginin
L-Leu	L-Leucin
L-Met	L-Methionin
LOAEL	<i>low observable adverse effect level</i>
L-Phe	L-Phenylalanin
LPS	Lipopolysaccharid
L-Tyr	L-Tyrosin
L-Val	L-Valin
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MC	Microcystin
MDRs	<i>multidrug resistance transporter</i>
Mdha	N-Methyl-dehydroalanin
MEK1/2	<i>MAPK extracellular signal regulated kinases 1/2</i>
MEKK1-4	<i>MAPK kinase kinases 1-4</i>
MLK2/3	<i>mixed lineage kinases 2/3</i>
MG	Massengewicht
MKK	<i>MAPK kinase</i>
MKP1	<i>MAPK phosphatase 1</i>
MMP	Mitochondriales Membranpotential
MRP	<i>multidrug resistance related protein</i>
MSK1/2	<i>mitogen- and stress-activated protein kinases 1/2</i>
MRP	<i>multidrug resistance related protein</i>
mSOS	<i>mammalian son-of-sevenless</i>

mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i>
MUAcetat	Methylumbelliferylacetat
MUP	Methylumbelliferylphosphat
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NOAEL	<i>no observable adverse effect level</i>
NOD	Nodularin
NRPS	nicht ribosomale Peptidsynthasen
OATP	<i>organic anion transporting polypeptide</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK1	<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase-1</i>
PH	Pleckstrin-homologe Domäne
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat
PKA	cAMP-abhängige Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PKS-1	Polyketidsynthase Typ 1
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2A
PP2B	Proteinphosphatase 2B (Calcineurin)
PPIA	Proteinphosphatase-Inhibitions-Assay
PTDI	<i>provisional tolerable daily intake</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTP1	Proteintyrosinphosphatase 1
PTP-SL	Proteintyrosinphosphatase SL
p38MAPK	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
p90RSK	<i>p90 kDa ribosomal S6 kinase</i>
p70RSK	<i>p70 kDa ribosomal S6 kinase</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
rpS6	<i>ribosomal protein S6</i>
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinasen
RG	Reaktionsgefäße
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RSK1-4	<i>p90 kDa ribosomal S6 kinase 1-4</i>
SAPK	<i>stress-activated protein kinase</i>

small t	<i>SV40 small tumor antigen</i>
TAK1	<i>TGF β-activated kinase 1</i>
TAO1/2	<i>thousand-and-one amino acid kinase 1/2</i>
Tpl2	<i>tumour progression loci 2</i>
TSC2	<i>tuberous sclerosis protein 2</i>
TEF	<i>toxic equivalency factor</i>
TNF- α	<i>Tumornekrosefaktor-α</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
WHO	<i>world health organisation</i>

1. Einleitung

Die Verwendung von Algen allgemein, aber auch von Cyanobakterien, hat in der asiatischen Küche eine lange Tradition. Außerdem wurden Cyanobakterien bereits bei den Azteken in Mexiko zu einer Art Brot, dem Tacuitlatl, verarbeitet (Hoeger, et al., 2005; Belay, et al., 1993).

Über Vergiftungen von Menschen und Tieren durch cyanobakterielle Toxine wird jahrhundertlang berichtet. Der älteste Fall sei aber möglicherweise schon Jahrtausende her: *„... und da wurde alles Wasser im Nil in Blut verwandelt. Und die Fische im Nil starben und der Nil wurde stinkend, so daß die Ägypter das Nilwasser nicht trinken konnten; ...“* (Exodus 7: 20-21). Die damalige Rotfärbung des Nils kann vermutlich auf das Cyanobakterium *Oscillatoria* zurückgeführt werden. Auch gegenwärtige Untersuchungen des Nilwassers, das in Ägypten zur Trinkwasserversorgung und auch zur Fischerei genutzt wird, zeigen das Vorhandensein von *Oscillatoria tenuis* (Brittain, et al., 2000).

Die meisten Fälle von Vergiftungen von Mensch und Tier durch Süß- und Brackwasser werden durch Cyanotoxine verursacht (Pitois, et al., 2001). Die ersten tödlichen Vergiftungen von Menschen wurden 1996 in Caruaru, Brasilien festgestellt. Während einer Dialysebehandlung starben 60 Patienten in einem Krankenhaus an Leberversagen. Sowohl in dem verwendeten Wasser des Krankenhauses, das aus einer Quelle außerhalb von Caruaru stammte, als auch in dem Blut der Patienten wurden hepatotoxische Cyanotoxine, in diesem Fall das Microcystin MC-LR, nachgewiesen (Dunn, 1996; Jochimsen, et al., 1998; Pouria, et al., 1998).

Die Hepatotoxine Microcystine und Nodularine werden von Cyanobakterien produziert und kommen weltweit vor allem in aquatischen aber auch terrestrischen Biotopen vor (Chorus, et al., 1999). Die toxische Wirkung beruht auf einem hemmenden Effekt von Proteinphosphatase-Enzymen, was mit verschiedenen Gastrointestinalerkrankungen einhergeht und in hohen Dosen zum Tode führt (Falconer, et al., 2005). Die Langzeitexposition mit Microcystinen und Nodularinen in geringeren Dosen wird mit Krebsentstehung in Verbindung gebracht (Yu, 1995).

2. Grundlagen

2.1. Mitogen aktivierter Proteinkinase (MAPK)-Signalweg

Die intrazelluläre Signalweiterleitung von extrazellulären Signalmolekülen wie Hormonen und Wachstumsfaktoren durch Rezeptoren an ihr intrazelluläres Ziel, wird durch ein komplexes Netzwerk miteinander gekoppelter Proteine vermittelt, was zur Regulierung zahlreicher zellulärer Prozesse führt. Mehrere Untersuchungen klärten einen dieser Mechanismen auf, der über eine Aktivierung membranständiger Rezeptoren einen Signalweg mit mehreren hintereinander geschalteten zytoplasmatischen und nukleären Effektorenzymen in Gang setzt (Seeger, et al., 1995; Graves, et al., 1995; Pearson, et al., 2001; Cohen, 1992). Diese mehrstufige Kaskade wird als *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Weg bezeichnet, kommt in allen Eukaryonten vor und ist an Proliferation, Differenzierung, Embryogenese und Apoptose beteiligt (Cobb, et al., 1996).

Der Signalweg (Abbildung 1) beginnt mit der Bindung eines Wachstumsfaktors wie EGF (*epidermal growth factor*) an einen membranständigen Rezeptor aus der Familie der Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTK), wodurch über das Adaptermolekül GRB2 (*growth factor receptor bound protein 2*) und einen Guaninnukleotid Austauschfaktor (mSOS: *mammalian son-of-sevenless*) eine Aktivierung von Ras (*rat sarcoma*, GTP-Bindungsprotein) verursacht wird. Aktiviertes Ras bewirkt seinerseits die Bindung der Proteinkinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma*) an die Zytoplasmamembran. Als Folge kommt es zu einer Stimulierung zytoplasmatischer Proteinkinasen, die in einer Phosphorylierungskaskade Transkriptionsfaktoren wie jun und fos aus der Familie des Aktivatorproteins-1 (AP-1) aktivieren. Diese wiederum binden als Heterodimer im Zellkern an die DNS und verursachen dadurch die Expression zahlreicher Gene zum Beispiel von Wachstumsfaktoren, Cyclinen und Zytokinen (Blumer, et al., 1994; Egan, et al., 1993; Ahn, 1993). Die Vielfalt an Signalen, die den MAPK-Weg aktivieren, deutet jedoch auch auf zahlreiche andere Ziele hin (Cobb, et al., 1996).

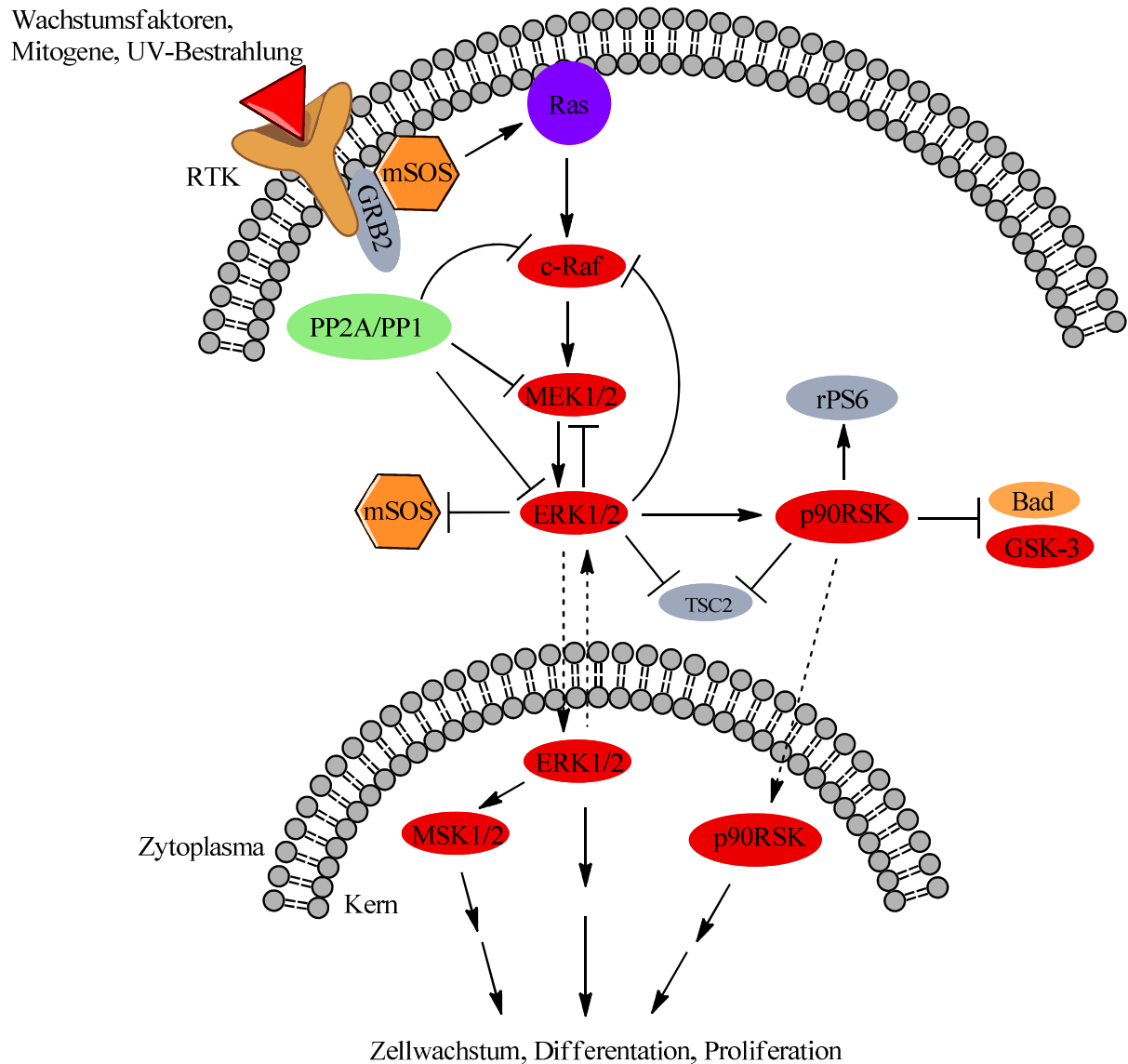


Abbildung 1: MAPK-Signalweg

rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, \rightarrow Stimulation, \dashv Inhibierung, $-\ - \rightarrow$ Translokation,
 $\rightarrow \rightarrow$ Stimulation über Zwischenschritte

RTK: Rezeptor Tyrosin Kinasen; **GRB2:** growth factor receptor bound protein 2; **mSOS:** mammalian son-of-sevenless; **Ras:** rat sarcoma; **PP2A/PP1:** Proteinphosphatase 2A/1; **c-Raf:** rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma; **MEK1/2:** MAPK extracellular signal regulated kinase; **ERK1/2:** extracellular signal regulated kinases 1/2; **TSC2:** tuberous sclerosis protein 2; **p90RSK:** p90 kDa ribosomal S6 kinase; **rPS6:** ribosomal protein S6; **GSK-3:** Glykogensynthasekinase 3; **MSK1/2:** mitogen- and stress-activated protein kinase

Klassische MAPK erfassen ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinases 1/2*), JNK1/2/3 (*c-Jun N-terminal kinases 1/2/3*), p38-Isoformen (α , β , γ , δ) und ERK5 (Chen Z, et al., 2001; Pearson, et al., 2001). Jede dieser Gruppen besteht aus drei miteinander verschalteten Serin/Threonin Proteinkinasen: MAPK, MAPK Kinase (MAPKK) und MAPK Kinase Kinase (MAPKKK). Die MAPKKK-Aktivierung führt zu einer Phosphorylierung von MAPKK, welches wiederum durch duale Phosphorylierung an der Thr-X-Tyr-Sequenz im aktiven Zentrum der

katalytischen Untereinheit der MAPK deren Aktivierung stimuliert (Abbildung 2) (Kyriakis, et al., 2001; Seger, et al., 1992; Crews, et al., 1992; Kosako, et al., 1992).

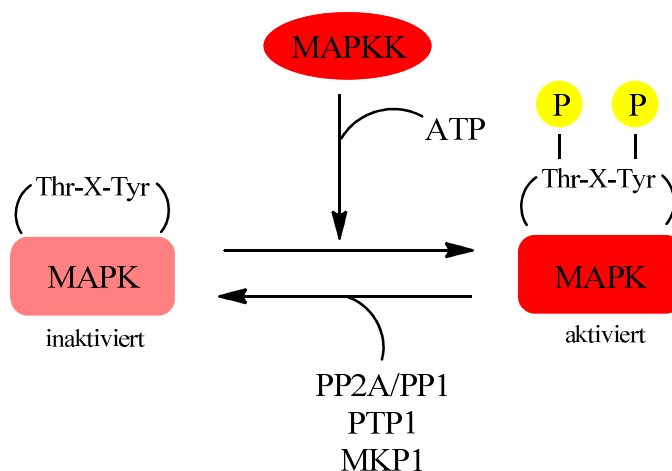


Abbildung 2: Duale Phosphorylierung der MAPK-Enzyme

Die Phosphorylierung nur einer dieser zwei Positionen (Thr oder Tyr) der MAPK fördert lediglich die zweite Phosphorylierung, führt jedoch nicht zur Aktivierung dieser Kinase. Einige Proteinphosphatasen wie PP2A (Proteinphosphatase 2A), PTP1 (Proteintyrosinphosphatase 1) und MKP1 (MAPK Phosphatase 1) sind durch Dephosphorylierung eines oder beider phosphorylierten Reste an der Herabregulierung der Kinasen beteiligt (Cargnello, et al., 2011; Cobb, et al., 1996). So dephosphoryliert und inaktiviert PP2A und PP1 *in vitro* Raf-1 (c-Raf), MAPKK, MAPK und p90RSK (p90 kDa *ribosomal S6 kinase*) (Kyriakis, et al., 1992; Dent, et al., 1992; Howe, et al., 1992; Force, et al., 1994; Fischer, et al., 1990). Bekannt ist auch, dass ein Anstieg des PKA (*cAMP-dependent protein kinase*)-vermittelten cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*)-Gehalts den durch verschiedene Faktoren stimulierten MAPK-Signalweg inhibiert (Graves, et al., 1993; Burgering, et al., 1993).

2.1.1. Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2)

ERK1 (*extracellular signal-regulated kinase 1*) und ERK2 stimmen zu 83 % in ihrer Aminosäuresequenz überein, werden in allen Geweben, mit besonders hohem Gehalt in Gehirn, Skelettmuskulatur, Thymus, Herz und Leber exprimiert und kommen in der ganzen Zelle vor. Die Aktivierung kann durch Wachstumsfaktoren wie PDGF (*platelet-derived growth factor*), EGF (*epidermal growth factor*), NGF (*nerve growth factor*) und HGF (*hepatocyte growth factor*) erfolgen. Weitere Stimulantien sind Insulin, Zytokine, osmotischer Stress und

mikrotubuläre Desorganisation (Boulton, et al., 1990; Raman, et al., 2007). Studien belegen, dass durch Wachstumsfaktoren und andere Liganden aktiviertes ERK1/2 in den Zellkern transloziert und die Expression zahlreicher Gene hervorgerufen wird (Adachi, et al., 2000).

Die durch Raf (MAPKKK) mittels dualer Phosphorylierung an Serin und Threonin aktivierte MAPKK MEK1/2 (MAPK *extracellular signal regulated kinase*) (Ashworth, et al., 1992) phosphoryliert ERK1/2 in der Aktivierungsschleife an Thr-Glu-Tyr (Wu, et al., 1993), welches wiederum zahlreiche Substrate unter anderem RSK1-4 (p90 kDa *ribosomal S6 kinase* 1-4) und MSK1/2 (*mitogen- and stress-activated protein kinase*) phosphoryliert (Frödin, et al., 1999) (Abbildung 1). Die Aktivierung von ERK1/2 ist beteiligt an zahlreichen Zellantworten wie Zellmotilität, Proliferation, Differenzierung und Überleben der Zellen (Raman, et al., 2007).

Die Regulierung der ERK1/2 MAPK Kaskade kann durch verschiedene Faktoren wie cAMP, KSR (*kinase suppressor of Ras*) und Proteinphosphatasen beeinflusst werden (Morrison, et al., 2003; Pearson, et al., 2006; Raman, et al., 2007). Alle drei Stufen MAPKs, MAPKKs und MAPKKKs des Signalwegs werden positiv oder negativ durch Phosphorylierung beeinflusst. Eine Dephosphorylierung des Threonin- oder Tyrosin-Rests in der Aktivierungsschleife von ERK1/2 führt zu einer erheblichen Aktivitätsabnahme dieser Kinase. Dieser Effekt kann z. B. durch DSPs (*dual-specificity phosphatase*), einer so genannten MAPK Phosphatase, PP2A und Calcineurin (PP2B) hervorgerufen werden (Zhang, et al., 2003; Zhou, et al., 2006; Dougherty, et al., 2005; Raman, et al., 2007). PP2A bindet auf Wachstumsfaktor-abhängige Weise an das KSR-Gerüst und dephosphoryliert an der Inhibierungsseite sowohl KSR als auch Raf1, wobei Raf1 durch Ras wieder aktiviert werden kann (Dougherty, et al., 2005).

2.1.2. p38 MAPK

Eine Zellantwort via p38 MAPK (Abbildung 3) erfolgt auf extrazellulären Stress wie UV-Bestrahlung, osmotischer Schock, Hypoxie, pro-inflammatorische Zytokine, LPS (Lipopolysaccharid), oxidativer Stress, Ischemia, Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und weniger oft auf Wachstumsfaktoren (Cuadrado, et al., 2010). Die Aktivierung wird von MKK3/6 (MAPKK) durch duale Phosphorylierung im Thr-Glu-Tyr-Motiv in deren Aktivierungsschleife hervorgerufen. Weiterhin kann eine Phosphorylierung durch MKK4 erfolgen. MKK3/6 werden von einer Fülle MAPKKKs wie MEKK1-4, MLK2/3, ASK1/2, Tpl2, TAK1 und TAO1/2 aktiviert (Cuadrado, et al., 2010). Die meisten Reize, die die p38 MAPK-Kaskade aktivieren, stimulieren ebenfalls den JNK/SAPK-Signalweg (Cargnello, et al., 2011; Enslin, et al., 1998; Doza, et al., 1995; Alonso, et al., 2000; Brancho, et al., 2003).

In nicht angeregten Zellen befinden sich die p38 Isoformen (α , β , γ , δ) im Zellkern und Zytoplasma und akkumulieren bei Stresseinwirkung im Zellkern (Raingeaud, et al., 1995). Aktivierte p38 Isoformen phosphorylieren wiederum eine große Menge an Substraten in zahlreichen Zellkompartimenten, einschließlich Zytoplasma (unter anderem Bax) und Zellkern (unter anderem p53 und MSK1/2) (Cuadrado, et al., 2010; Yuan, et al., 2003).

Die p38 MAPK spielt eine kritische Rolle in Zellproliferation und –überleben. Obwohl einige Studien p38 in Verbindung mit Funktionen für das Zellüberleben zeigen (Engel, et al., 2005; Nishida, et al., 2004; Yu, et al., 2007), assoziieren andere Untersuchungen p38 mit durch zellulären Stress verursachter Apoptose (Hanahan, et al., 2000; Dolado, et al., 2007; Wang, et al., 1998; Liao, et al., 2001). Diese Effekte können durch transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen, welche Todesrezeptoren und pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie beeinflussen, vermittelt werden (Cuenda, et al., 2007; Nebreda, et al., 2000; Shi, et al., 2002).

Eine Herabregulierung des p38-Signalwegs kann mittels einer Dephosphorylierung von Serin/Threonin-Resten durch PP2A, Calcineurin (PP2B) und PP2C oder von Tyrosin-Resten durch STEP (*sterial enriched tyrosine phosphatase*), HePTP (*haemopoietic tyrosine phosphatase*) und PTP-SL (Proteintyrosinphosphatase SL) und DSPs erfolgen (Zhang, et al., 2008; Zuluaga, et al., 2007).

Die aktivierte p38 MAPK ist in der Lage, einen Cross-Talk zwischen anderen Signalwegen herzustellen. So bewirkt p38 in gesunden Zellen eine Inaktivierung des ERK1/2-Wegs, indem es PP2A stimuliert und dieses wiederum MEK1/2 dephosphoryliert (Abbildung 3) (Cuadrado, et al., 2010; Junttila, et al., 2008).

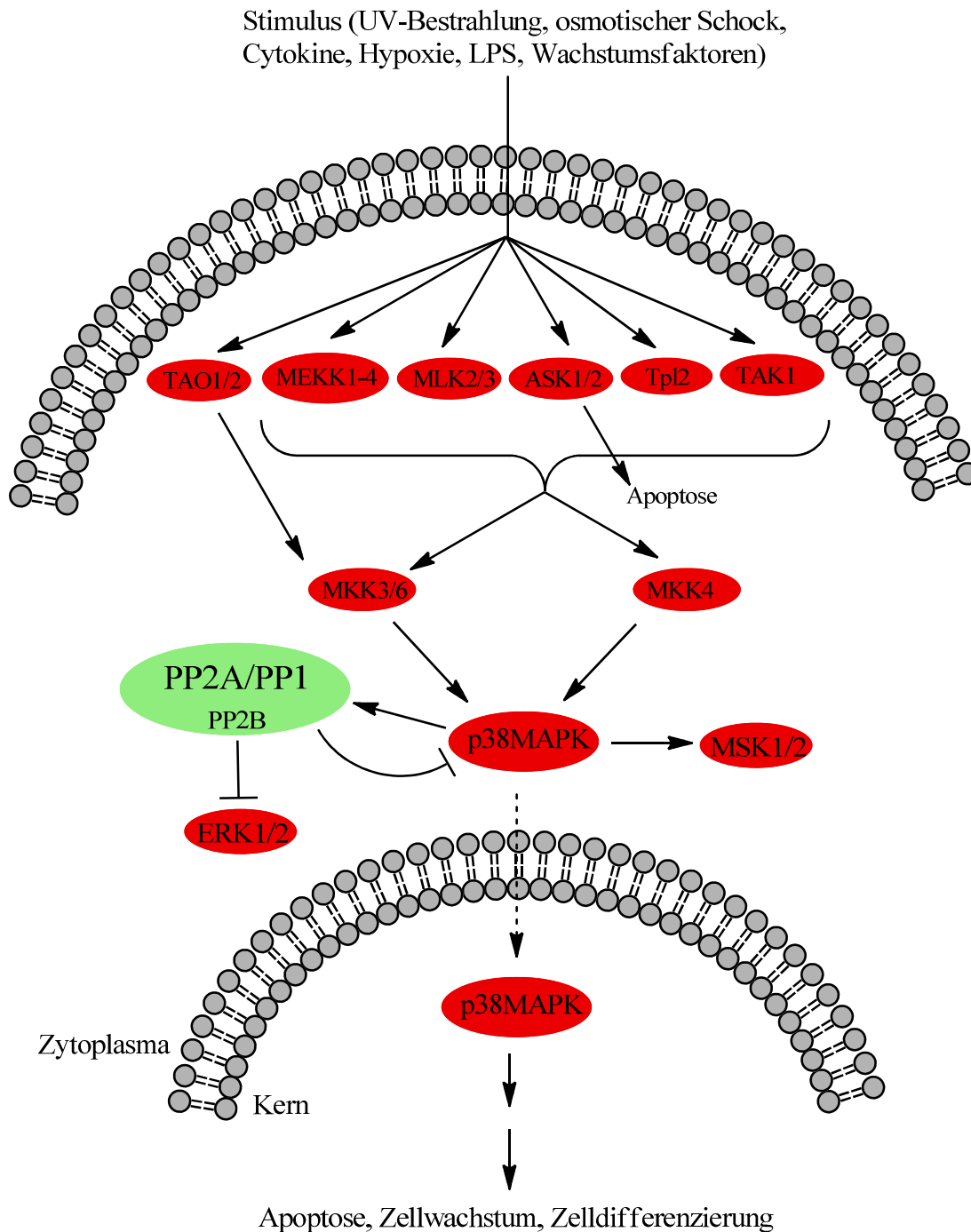


Abbildung 3: p38 MAPK- Signalweg

rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, \rightarrow Stimulation, \dashv Inhibierung, $-\ - \rightarrow$ Translokation,
 $\rightarrow \rightarrow$ Stimulation über Zwischenschritte

TAO1/2: thousand-and-one amino acid kinase 1/2; **MEKK1-4:** MAPK kinase kinase 1-4; **MLK2/3:** mixed lineage kinase 2/3; **ASK1/2:** apoptosis signal-regulating kinase 1/2; **Tpl2:** tumour progression loci 2; **TAK1:** TGF (transforming growth factor) β -activated kinase 1; **MKK3/6 und 4:** MAPK kinase 3/6 und 4; **p38MAPK:** p38 mitogen activated protein kinase; **MSK1/2:** mitogen- and stress-activated protein kinase; **PP2A/PP1:** Proteinphosphatase 2A/1; **ERK1/2:** extracellular signal regulated kinases 1/2

2.1.3. JNK/SAPK

JNK, auch bekannt als SAPK (*stress-activated protein kinase*), ist eine MAPKK, die wie die p38 MAPK durch zellulären Stress z. B. Hitzeschock, Ultraschall, oxidativen Stress, DNS-schädigende Agentien, Zytokine, UV-Bestrahlung, DNS- und Proteinsynthese Inhibitoren und weniger stark durch Wachstumsfaktoren und Serum aktiviert wird (Bogoyevitch, et al., 2010). Die Aktivierung von JNK erfolgt durch die MAPKKs MKK4 und MKK7 über eine duale Phosphorylierung von Thr und Tyr in der Aktivierungsschleife. Der JNK-Weg ist an der Zytokinproduktion, Stress-induzierten Apoptose, Aktinreorganisation, Zelltransformation und -metabolismus beteiligt (Cargnello, et al., 2011).

2.2. AKT (Proteinkinase B)-Weg

Der Serin/Threonin Kinase Akt-Signalweg, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB)-Signalweg, besitzt einen starken Einfluss auf die Homöostase der Zelle und ist an der Regulation von Überleben der Zellen, Apoptose, Proliferation und Stoffwechsel beteiligt (Manning, et al., 2007; Bellacosa, et al., 2005; Engelman, et al., 2006).

Es gibt drei Isoformen des Proto-Onkoproteins Akts Akt1/PKB α , Akt2/PKB β und Akt3/PKB γ , welche auf Grund ihrer Homologie zu den Kinasedomänen der Proteinkinasen A, G und C zu der AGC Kinasefamilie zählen, welche ebenfalls die mitogenstimulierenden Kinasen RSK und p70/p85S6K beinhaltet. (Cross, et al., 1995; Hers, et al., 2011).

Die Aktivierung der Kaskade an zwei kritischen Resten (Thr308 und Ser473) von Akt kann über RTK, Integrin, B- und T-Zellrezeptoren, Zytokinrezeptoren, G-Protein gekoppelte Rezeptoren (Ras) und andere Stimuli, die eine Produktion von Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat (PIP3) durch Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) induzieren, erfolgen (Abbildung 4). Dabei bindet PI3K an die Pleckstrin-homologe Domäne (PH) des membranständigen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) und phosphoryliert es zum PIP3, welches wiederum durch die Bindung an PH AKT und PDK1 (*3-phosphoinositide dependent protein kinase-1*) aktiviert (Meier, et al., 1999; Burgering, et al., 1995; Kohn, et al., 1995; Andjelković, et al., 1996; Walker, et al., 1998). PDK1 aktiviert durch Phosphorylierung in Anwesenheit von PIP2 und PIP3 PKB an Thr308 (Alessi, et al., 1997) und spielt eine wichtige Rolle bei Kinaseregulationen, da es ebenfalls p70/p85S6k phosphoryliert (Pullen, et al., 1998).

Eine Schlüsselrolle spielt Akt in der Regulierung der Glukoseaufnahme in Insulin gesteuertem Gewebe, indem es die Translokation von GLUT4 (*insulin regulated glucose transporter 4*) aus vesikulär intrazellulären Kompartimenten in die Plasmamembran vermittelt (Hers, et al., 2011).

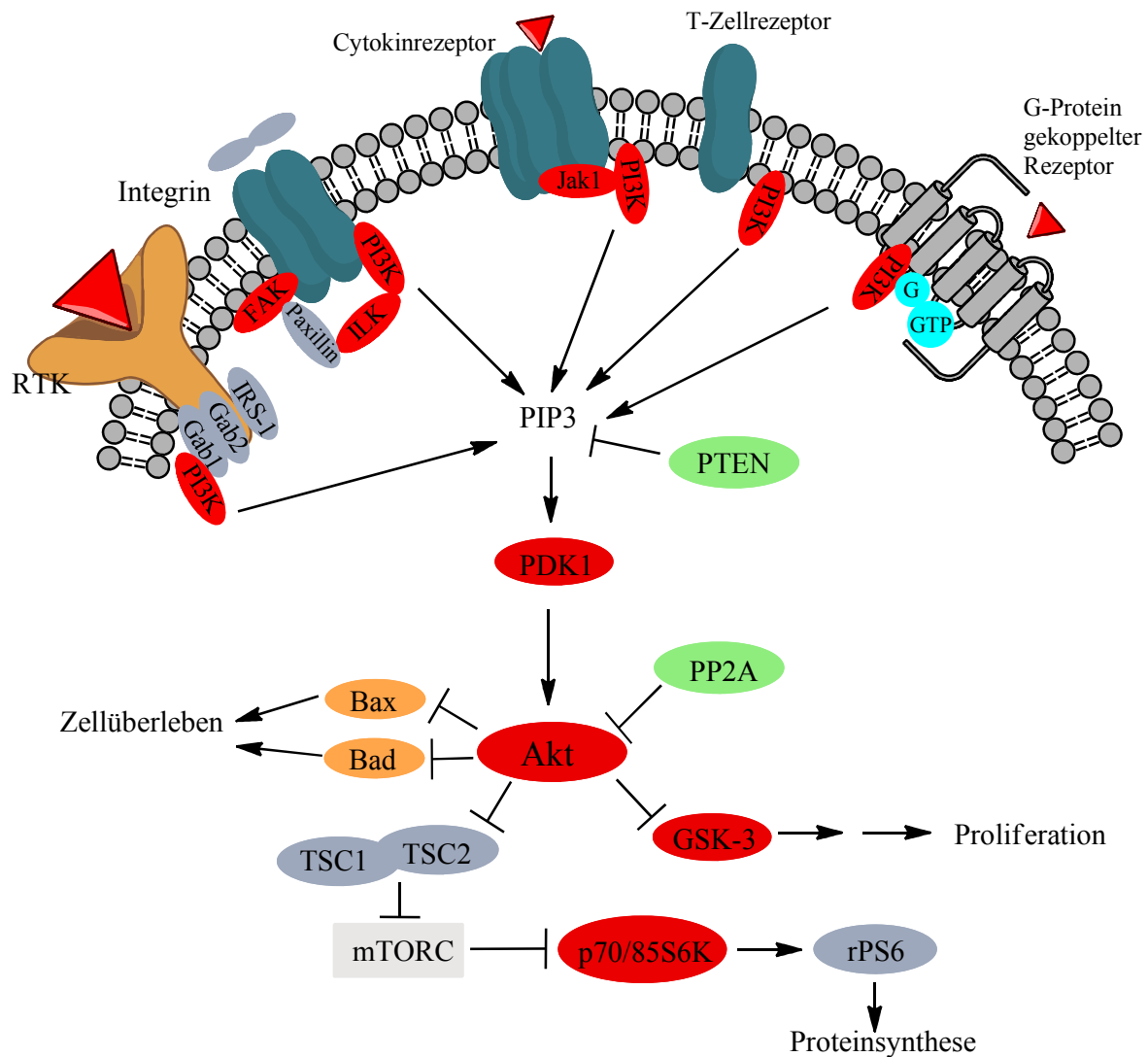


Abbildung 4: Akt- Signalweg

rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, → Stimulation, —| Inhibierung, - - - → Translokation, → → Stimulation über Zwischenschritte

RTK: Rezeptor Tyrosin Kinasen; **PI3K:** Phosphoinositid-3-Kinase; **Gab:** Grb-associated binder; **IRS-1:** insulin receptor substrate 1; **FAK:** focal adhesion kinase; **ILK:** integrin-linked kinases; **Jak1:** janus family of tyrosine kinases 1; **PTEN:** phosphatase and tensin homolog; **PDK1:** 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1; **PP2A:** Proteinphosphatase 2; **Akt:** Proteinkinase B; **GSK-3:** Glykogensynthasekinase 3; **TSC:** tuberous sclerosis protein; **p70/85S6K:** p70/85 kDa ribosomal S6 kinase; **rPS6:** ribosomal protein S6; **mTORC:** mammalian target of rapamycin complex

Bekannt ist Akt auch für seinen großen Einfluss auf das Zellüberleben, indem proapoptische Marker wie Bax, Bad und die Forkhead-Box-Proteine direkt inhibiert werden (Abbildung 4). Zum Beispiel phosphoryliert Akt Bad, welches die Dissoziation von Bcl-2/Bcl-xL begünstigt und durch die Aufrechterhaltung der Membranintegrität von Mitochondrien der Aktivierung der Caspasekaskade entgegengewirkt wird (Franke, et al., 1997; Datta, et al., 1997; Basu, et al., 2003). Eine indirekte Hemmung durch Phosphorylierung der Pro-Caspase 9 und die damit resultierende Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom c wirkt ebenfalls antiapoptotisch (Hers, et al., 2011). Ein weiteres

Substrat von Akt ist die Glykogensynthasekinase 3 (GSK3), welche nach Insulinstimulation durch Akt phosphoryliert und dadurch inaktiviert wird, was in einer Aktivierung der Glykogensynthese resultiert. Weitere Inhibitoren von GSK3 stellen p90RSK (eine MAP kinase-activated protein kinase-1) und p70/p85S6K dar (Cross, et al., 1995; Alessi, et al., 1996b). Auch die Regulierung des Zellwachstums durch Akt kann z. B. mittels Effekt auf mTOR (*mammalian target of rapamycin*) und den p70p85S6-Kinaseweg beeinflusst werden (Manning, et al., 2007; Vander Haar, et al., 2007; Zhang, et al., 2006).

Die Inaktivierung des Akt-Signalwegs wird durch den Gegenspieler von PI3K PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*), einem Tumorsuppressor, der PIP3 zu PIP2 dephosphoryliert und somit die Phosphorylierung an Ser473 inhibiert, vermittelt (Kong, et al., 2009). PTEN ist eine Lipid- und Proteinphosphatase, welche ebenfalls eine hemmende Wirkung auf den MAPK-Signalweg ausübt, indem sie die Ras-Aktivierung inhibiert (Hlobilková, et al., 2003). Auch die Proteinphosphatasen PP1 und PP2A sind in der Lage den Akt-Signalweg zu inhibieren, indem sie an Ser473 und Thr308 dephosphorylieren (Brazil, et al., 2004; Chen, et al., 2010; Millward, et al., 1999). Eine Dysregulierung des Akt-Signalwegs wird mit Erkrankungen wie Krebs, Diabetes *mellitus*, kardiovaskulären und neurologischen Erkrankungen in Verbindung gebracht (Hers, et al., 2011).

2.3. Serin/Threonin Proteinphosphatasen

Die reversible Phosphorylierung von Proteinen ist in Eukaryonten einer der wichtigsten Kontrollmechanismen intrazellulärer Signalübertragung (Cohen, 1989). Bei der enzymatischen Phosphorylierung von Proteinen wird reversibel eine Phosphatgruppe von ATP (Adenosintriphosphat) auf Hydroxygruppen von Serin-, Threonin- und Tyrosinseitenketten von Proteinen übertragen, wodurch ein Phosphorsäureester entsteht. Das bewirkt eine Konformationsänderung und eine damit einhergehende Aktivierung oder Inaktivierung von Proteinen. Eine Dephosphorylierung macht die Änderung rückgängig, das Protein ist somit wieder renaturiert (Burnett, et al., 1954; Barford, 1996).

Dabei gibt es unzählige Kinasen, welche durch *second messenger* wie cAMP (cAMP-abhängige Proteinkinasen), cGMP (cGMP-abhängige Proteinkinasen), Ca²⁺ (Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinasen) und Diacylglycerol (PKC: Proteinkinase C) beeinflusst werden (Hunter, 1987).

Im Gegensatz dazu werden die vier wichtigsten Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP1, PP2A, PP2B und PP2C in ihrer Wirkung auf Proteinkinasen und ihrer Sensitivität auf Aktivatoren und Inhibitoren unterschieden. Typ 1 Phosphatasen werden durch thermostabile

Proteininhibitoren 1 und 2 gehemmt und dephosphorylieren die β -Untereinheit von Phosphorylase Kinasen, wohingegen Typ 2 Phosphatasen sich den Inhibitoren 1 und 2 unwirksam zeigen und die α -Untereinheit bevorzugen (Ingebritsen, et al., 1983; Cohen, 1989; Cohen, et al., 1989b). Die Typ 2 Phosphatasen werden weiterhin eingeteilt in spontan aktive (PP2A), Ca^{2+} -abhängige (PP2B) und Mg^{2+} -abhängige (PP2C) (Wera, et al., 1995).

Der Tumorpromotor Okadasäure und das Lebertoxin MC-LR sind spezifische Inhibitoren von PP1 und PP2A und erleichtern so die Unterscheidung der einzelnen Klassen. Die katalytische Untereinheit von PP1 (PP1c) und PP2A (PP2Ac) stammt aus einer Genfamilie (PPP Genfamilie) (Bialojan, et al., 1988; Cohen, 1989; Cohen, et al., 1989b; Cohen, et al., 1990; MacKintoshl, et al., 1990).

Es gibt unzählige physiologische Prozesse wie Glykogenmetabolismus, Muskelkontraktibilität, Proteinsynthese, Apoptose, hepatische Metabolisierung, Cholesterolsynthese, Fettsäuresynthese, Kontrolle des Zellzyklus und der Genexpression, welche durch die PPP-Genfamilie Phosphatasen reguliert werden. So kann eine Inhibierung von Phosphatasen gravierende systemische Effekte hervorrufen (Cohen, 1989; Dawson, et al., 1999; Garcia, et al., 2003).

2.3.1. PP1

Die Serin/Threonin Protein Phosphatase 1 (PP1) ist sowohl in seiner Struktur als auch Funktion ein konserviertes eukaryontisches Protein und beschreibt drei Isoformen (α , γ , β/δ). Der Komplex besteht aus einer katalytischen PP1c und einer Vielzahl regulatorischer Untereinheiten, wobei PP1c aus zehn α -Helices und drei β -Faltblättern zusammengesetzt ist (Abbildung 5). Die aktive Seite liegt an einer Verzweigung der drei Substratbindungsstellen, der hydrophoben, der C-terminalen und der „sauren“ Bindungsstelle (Wang, et al., 2008).

Die katalytische Untereinheit PP1c kann an verschiedene Targetproteine binden, was eine große Rolle in der Regulierung der Aktivität des Enzyms spielt (Cohen, 1989; Hubbard, et al., 1989; Khatra, 1986; Chisholm, et al., 1988; Pato, et al., 1983; Yoshida, et al., 1986). Zum Beispiel liegt PP1 gebunden in der Skelettmuskulatur an Glykogen, im sarcoplasmatischen Retikulum an der Membran, in der glatten Muskulatur an Myosin vor, ist aber auch im Zellkern tierischer Zellen lokalisiert (Walter, et al., 1993). Diese große Vielfalt an Targetproteinen erklärt die Verteilung von PP1 im ganzen Körper und die regulatorische Rolle in zahlreichen zellulären Prozessen wie Zellzyklusprogression, Proteinsynthese, Muskelkontraktion, Kohlenhydratstoffwechsel, Transkription und neuronalem Signalweg (Kelker, et al., 2009).

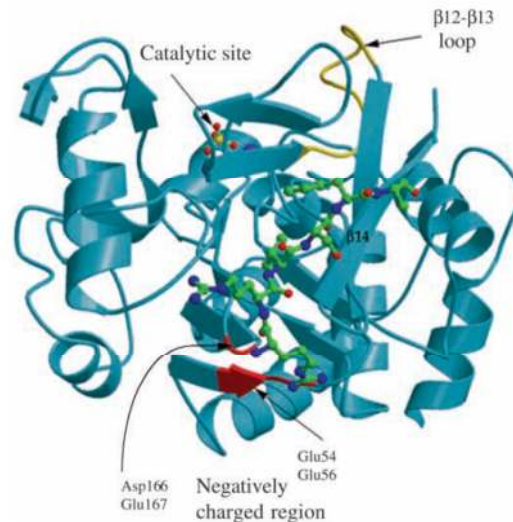


Abbildung 5: Struktur von PP1c (Cohen, 2002)

Die Aktivierung wird durch Hormone und Wachstumsfaktoren mittels endogener Inhibitoren und teilweise mittels regulatorischer Untereinheiten reguliert (Brautigan, et al., 1990).

PP1 wird durch Interaktion der katalytischen Untereinheit mit Inhibitor-1 (I-1) gehemmt (Endo, et al., 1996). Dadurch wird z. B. durch das Hormon Adrenalin in einem PKA-abhängigen Weg PP1 inhibiert und die Glykogensynthese auf Grund erhöhter Phosphorylierung inaktiviert (Poulter, et al., 1988; Nakielny, et al., 1991).

Weitere Inhibitoren von PP1 sind Okadasäure (Dounay, et al., 2002; Bialojan, et al., 1988), Microcystin-LR (Yoshizawa, et al., 1990) und Calyculin A (Swingle, et al., 2007), weniger stark untersucht sind bisher Nodularin (Ufelmann, et al., 2012), Tautomycin (Cheng, et al., 1987), Fostriecin (Walsh, et al., 1997) und Cantharidin (Honkanen, 1993). Eine Inhibierung von PP1 greift in verschiedene Signalwege ein. So stellen z. B. Raf, p70S6K und 90RSK Substrate von PP1 dar, welche Einfluss auf die MAPK-Kaskade ausüben (Walter, et al., 1993; Howe, et al., 1992; Morrison, 1990; Morrison, et al., 1989; Sturgill, et al., 1988).

2.3.2. PP2A

Die Serin/Threonin Proteinphosphatase 2A (PP2A) ist ein Trimer-Holoenzymkomplex mit verschiedenen regulatorischen B-Untereinheiten und einem Kerndimer. Der Kern des Enzyms besteht aus einer katalytischen Untereinheit PP2Ac komplexiert mit der regulatorischen Untereinheit PP2a/PR65 (Mayer-Jaekel, et al., 1994; Mumby, et al., 1993). Die katalytische Untereinheit kann *in vitro* an Tyr307 am C-Terminus durch Tyrosinkinase, epidermale Wachstumsfaktorrezeptoren und Insulinrezeptoren reversibel phosphoryliert und dadurch zu 90 % inhibiert werden (Chen, et al.). Interessanterweise konnte *in vivo* eine

Phosphorylierung der katalytischen Untereinheit keine eindeutige Aktivitätsänderung verursachen. Untersuchungen *in vitro* mit Wachstumsfaktoren und Insulin jedoch deuten auf eine transiente Inaktivierung von PP2A und dadurch hervorgerufene Proteinkinaseaktivierung hin (Strack, et al., 2004; Hartley, et al., 2002; Hupfeld, et al., 2005). Eine Untersuchung von Sontag et al. zeigte z. B., dass eine Inhibierung von PP2A durch SV40 *small tumor antigen* (*small t*) eine rezeptorunabhängige Aktivierung von ERK und MEK und dadurch die Zellproliferation ohne Raf Kinase Aktivierung verursacht (Sontag, et al., 1993). Die Zellzyklusregulation kann durch PP2A und PP1 negativ beeinflusst werden, indem der Übergang von der Entwicklung der G2-Phase in die Mitose-Phase verhindert wird (Goris, et al., 1989; Félix, et al., 1990). Der direkte Einfluss von PP2A und PP1 auf die pro- und anti-apoptischen Bcl-2-Familie Proteine führt durch Dephosphorylierung zu regulatorischen Eigenschaften auf das Zellüberleben (Ruvolo, et al., 2001). Die wichtigsten anti-apoptischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-xL schützen als Homodimer die mitochondriale Membranintegrität. Diese Aktivität kann jedoch durch eine Heterodimerisierung mit pro-apoptischen Mitgliedern wie Bax oder Bad inhibiert werden (Perez, et al., 2000; Garcia, et al., 2003).

2.4. Cyanobakterien

Fossile Funde aus dem Präkambrium belegen, dass Cyanobakterien zu den ältesten bekannten Organismen gehören (Schopf, et al., 1987). Sie sind gramnegative, oxygen photothrophe Prokaryonten, d. h. ohne membranumhüllten Zellkern oder andere Zellorganellen wie Chloroplasten und Mitochondrien. Cyanobakterien oder auch Cyanophyceen genannt besitzen das Pigment Chlorophyll a, sowie die Phycobiline Phycocyanin (blau) und Phycoerythrin (rot), wodurch charakteristische Färbungen auftreten (Palinska, et al., 2006; Henson, et al., 2004). Viele Cyanobakterien können Stickstoff fixieren, weshalb sie einen der größten Stickstofflieferanten der Umwelt darstellen. Außerdem gehen einige stickstofffixierende Cyanobakterien mit Pflanzen Symbiosen ein und liefern diesen aus den Heterozysten direkt reduzierten Stickstoff (Stal, et al., 2010; Berman-Frank, et al., 2003). Cyanobakterien zeigen eine breite ökologische Diversität. Sie wachsen auf der ganzen Welt in terrestrischen, aber vor allem in aquatischen Biotopen, sowohl in Brackwasser als auch in Salz- und Süßwasser wie Seen, Flüssen und Teichen. Sogar in Gebieten mit extremen Bedingungen, wie Thermalquellen, Erdkrusten in der Wüste und Gletscherspalten sind sie anzutreffen (Briand, et al., 2003; Msagati, et al., 2006; Helm, et al., 2000; Paerl, 1996).

Das Wachstum von Cyanobakterien wird durch hohe Temperaturen, einen hohen Nährstoffgehalt und intensive Sonnenbestrahlung gefördert, wodurch sich Algenteppiche bilden und sich das Wasser grün färben (siehe Abbildung 6) (van Apeldoorn, et al., 2007).



**Abbildung 6: Wannsee (Berlin, 2005)
(Dittmann, et al., 2006)**

Die Blütezeit der Cyanobakterien hängt von den klimatischen Bedingungen der Region ab. In gemäßigten Zonen liegt die Blütezeit zwischen Spätsommer und Anfang Herbst und kann zwei bis vier Monate andauern. In mediterranen und subtropischen Regionen fängt die Blütezeit früher an und endet später. In den tropischen und subtropischen Zonen von China, Brasilien und Australien kann die Blütezeit bei Trockenperioden sogar das ganze Jahr andauern (Chorus, et al., 1999).

In der Blütezeit produzieren Cyanobakterien Substanzen mit stark toxischer Wirkung. Diese Toxine können bezüglich ihrer chemischen Eigenschaften in drei Gruppen unterteilt werden: zyklische Peptide, die die Hepatotoxine Microcystine und Nodularine beinhalten, Alkaloide, zu denen das Hepatotoxin Cylindrospermopsin gehört, die Neurotoxine Anatoxin-A und Saxitoxin und die Reiztoxine Lyngbyatoxin a, Aplysiatoxine und Lipopolysaccharide (Chorus, et al., 1999; Duy, et al., 2000).

Die meisten Fälle von Vergiftungen von Mensch und Tier durch Süß- und Brackwasser werden durch Cyanotoxine verursacht. Seit dem ersten Bericht über Viehtod in Südaustralien 1878 wurden Vergiftungen von Rindern, Schweinen, Hunden und Fischen durch Cyanotoxine weltweit festgehalten (Pitois, et al., 2001). Die ersten tödlichen Vergiftungen von Menschen wurden 1996 in Caruaru, Brasilien festgestellt. Während einer Dialysebehandlung starben 60 Patienten in einem Krankenhaus an Leberversagen. (Dunn, 1996; Jochimsen, et al., 1998; Pouria, et al., 1998). In Europa wird das Trinkwasser regelmäßig auf Cyanotoxine überprüft und eine effiziente Eliminierung von Microcystinen mittels Ozonbehandlung des Rohwassers erzielt (Liu, et al., 2010; Hoeger, et al., 2005; Hoeger, et al., 2002).

2.4.1. Exposition

Cyanobakterien werden laut *World Health Organisation* (WHO) (1999) vor allem über das Trinkwasser aufgenommen. Algenprodukte als Nahrungsergänzungsmittel, Schwimmen in belasteten Gewässern, Konsum von Gemüse von bewässerten Feldern und von Fisch und Muscheln stellen zusätzliche Expositionsquellen für den Menschen dar (Stewart, et al., 2009; Gilroy, et al., 2000; Schaeffer, et al., 1999; Hoeger, et al., 2005; Hoeger, 2003).

Die WHO empfiehlt einen Trinkwasser-Richtwert von 1 µg MC-LR/l, wobei MC-LR stellvertretend für alle Microcystine und Nodularine steht (Chorus, et al., 1999). In einer Zusammenstellung weltweit gemessener MC-Konzentrationen in Trinkwasser lagen die Werte mit wenigen Ausnahmen bei 0,01-0,4 µg/l. Wie Tabelle 1 zu entnehmen ist, wurden auch deutlich höhere Werte ermittelt (Engli, 2005).

Tabelle 1: Toxingehalte in verschiedenen Produkten
(Engeli, 2005; Hoeger, et al., 2005; Ibelings, et al., 2007)

Produkt	Toxingehalt
Trinkwasser (Fluss und Quellen) China, Haimen City	1,9 µg MC/l
Trinkwasser Tschechien	7,8 µg MC/l
Trinkwasser USA, Florida	90 µg MC/l
AFA (<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>)-Algenprodukt	bis zu 33 µg MC-LR bzw. MC-LA/g
Fisch	bis zu 0,102 µg MC-LR/g
Muscheln	bis zu 2,5 µg MC-LR/g
Krebsfleisch	0,103 µg MC-LR/g
Shrimps	bis zu 0,205 µg MC-LR/g

Besonders der weltweite Konsum von *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA)-Algen, die auch grüne Spanalgen genannt werden, stellt eine Gefährdung der Gesundheit dar. Beim Konsum einer empfohlenen Menge von 2 g AFA-Algen/Tag, die 1 µg MC-LR/g enthalten, durch eine 60 kg schwere Person wird der PTDI (*Provisional Tolerable Daily Intake*) der WHO von 0,04 µg/kg KG/Tag, basierend auf dem NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) von 40 µg/kg KG/Tag aus der subchronischen oralen 13 Wochen Studie bei Mäusen, gerade ausgeschöpft (Fawell, et al., 1999). Da wie in Tabelle 1 dargestellt der MC-Gehalt viel höher sein kann und die Hersteller teilweise höhere Tagesdosen empfehlen, kann ein Konsum der

Nahrungsergänzungsmittel über einen längeren Zeitraum eine schädliche Wirkung auf den Menschen besitzen. Besonders Kinder sind wegen der höheren Aufnahme/kg KG gefährdet (Engeli, 2005).

Die restlichen Expositionswege wie Schwimmen in Badegewässern, Verzehr von Fisch, Meeresfrüchten und Gemüse von bewässerten Feldern spielen nach bisherigem Kenntnisstand keine nennenswerte Rolle bei der chronischen Microcystinaufnahme (Engeli, 2005).

2.5. Microcystine und Nodularin

Microcystine (MCs) sind zyklische Peptide, die von Cyanobakterien der Gattungen *Microcystis*, *Planktothrix* (*Oscillatoria*), *Anabaena*, *Nostoc*, *Anabaenopsis* und *Hapalosiphon* produziert werden (Msagati, et al., 2006; Sivonen, et al., 1992). Nodularin (NOD) ist ebenfalls ein zyklisches Peptid und wurde aus *Nodularia spumigena*, einem Brackwasser-Cyanobakterium, isoliert und nach diesem benannt (Sivonen, et al., 1989). Die Morphologie der Cyanobakterien ist sehr vielseitig, sie können sphärische, ovale und zylindrische Einzellspezien, multizelluläre Kolonien und filamentöse Formen einnehmen (siehe Abbildung 7 und Abbildung 8) (Briand, et al., 2003; Dittmann, et al., 2006).

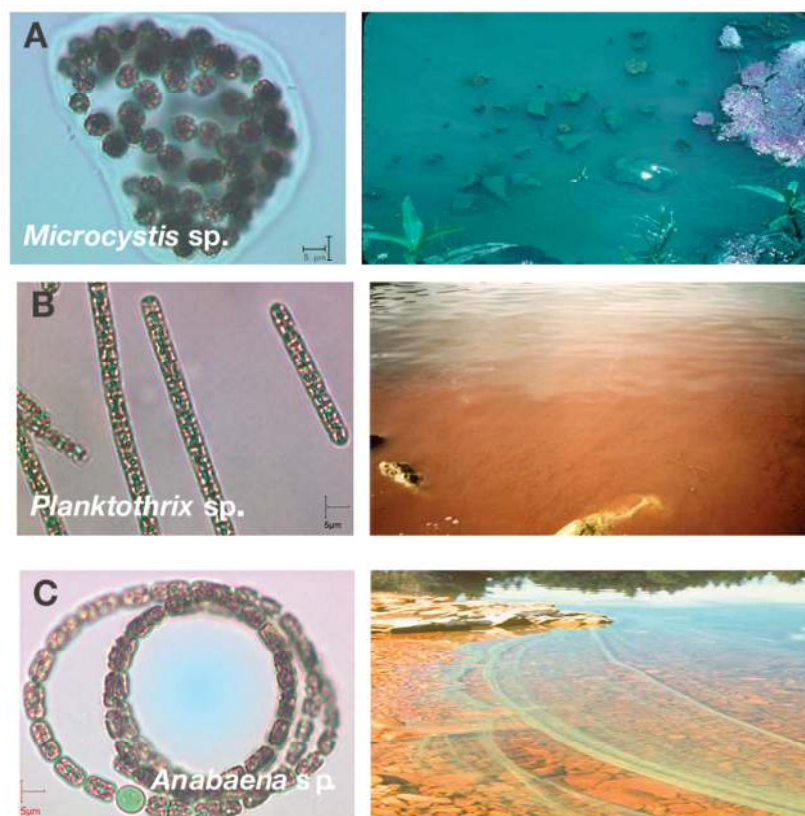


Abbildung 7: Morphologie von Microcystinen
(Briand, et al., 2003)



Abbildung 8: *Nodularia spumigena* in der Ostsee

2.5.1. Produktion und Regulation

Studien an Cyanobakterienstämmen haben gezeigt, dass Umweltfaktoren sowohl Einfluss auf die Toxinkonzentration als auch auf den Grad der Toxizität haben, jedoch nur in begrenztem Umfang. Dabei sind bei einer Charge das Alter der Kultur und die Temperatur die am häufigsten untersuchten Parameter, gefolgt von Licht, Nährstoffen, Salzgehalt, pH-Wert und der Konzentration an Spurenelementen. Bei günstigen Wachstumsbedingungen für die Cyanobakterien verbleiben MCs in den Zellen und es kommt zu einer vermehrten Produktion von Toxinen. Dabei nimmt die Konzentration der MCs während der logarithmischen Wachstumsphase der Bakterien zu und ist zur späten logarithmischen Phase während des verzögerten Wachstums am höchsten (Watanabe, et al., 1985; Chorus, et al., 1999; Rapala, et al., 1997; Krüger, et al., 2012).

Ein bestimmter Bakterienstamm produziert in einem relativ konstanten Bereich bestimmte Varianten verschiedener MCs, wobei sich die Verhältnisse zwischen den MCs mit der Zeit oder unter bestimmten Bedingungen wie unterschiedlicher Temperatur und Lichteinwirkung ändern können. So zeigt sich, dass die Gattung *Planktothrix* eine geringe Lichtintensität bevorzugt, während *Anabaena* für ein optimales Wachstum eher eine gemäßigte Lichtintensität benötigt. Das Temperaturoptimum liegt bei 18-25°C (Rapala, et al., 1998).

In einer Studie wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Toxinproduktion mittels eines Maus-Bioassays untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die Toxizität der Extrakte zunahm, wenn die Cyanobakterien bei einem hohen oder niedrigem pH-Wert kultiviert wurden (Chorus, et al., 1999). Der Nährstoffgehalt spielt für das Wachstum von Cyanobakterien und die Toxinbildung eine entscheidende Rolle. Eine hohe Phosphatkonzentration führt zu einem Anstieg der Produktion von hepatotoxischen Toxinen. Dabei variiert der Unterschied in der Toxinproduktion bei einer Erniedrigung oder Erhöhung der Phosphatkonzentration um den Faktor zwei bis vier. Diese Korrelation zwischen Phosphatgehalt und Hepatotoxinen wurde

anhand von MC-LR aus *Microcystis aeruginosa* belegt (Rapala, et al., 1997; Rapala, et al., 1998; Figueiredo, et al., 2004). Nicht-nitrifizierende Spezies wie *Microcystis* und *Oscillatoria* produzieren unter stickstoffreichen Bedingungen mehr Toxine, wohingegen die Toxinproduktion der nitrifizierenden Gattungen unabhängig vom Stickstoffgehalt abläuft (Chorus, et al., 1999; Rapala, et al., 1998; Figueiredo, et al., 2004).

Als Hauptfaktor für die unterschiedliche Toxizitätsstärke einer Blüte derselben Spezies wird die Vielfalt des Genotyps zwischen den Bakterienstämmen verantwortlich gemacht. So sind einige Spezies besser an bestimmte Umweltbedingungen angepasst. Die Genotypen können sich durch ihr Wachstumsverhalten, ihre Plasmidmenge, ihr Verhalten zu Zooplankton, in ihrer Microcystinkonzentration und durch den Microcystin-Synthase-Genkomplex unterscheiden, wodurch unterschiedliche Toxinvarianten mit verschiedener Toxizität entstehen können (Rohrlack, et al., 2001; Kurmayer, et al., 2002; Mikalsen, et al., 2003).

Die intrazelluläre Nodularinkonzentration wird durch Erhöhung der Temperatur, der Phosphatkonzentration und der Bestrahlungsstärke gefördert. Eine Herabregulierung der Nodularinproduktion wird durch hohen und niedrigen Salzgehalt und einen unnatürlich hohen Nitratgehalt erreicht (Karjalainen, et al., 2007; Neilan, et al., 2012).

2.5.2. Chemische Eigenschaften

Microcystine sind monozyklische Heptapeptide, deren Massengewicht (MG) zwischen 500 und 4000 Da variiert. Sie bestehen aus fünf festen Aminosäuren D-Alanin (D-Ala), D-erythro- β -methylasparaginsäure (D-MeAsp), der β -Aminosäure 3-Amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure (Adda), D-Glutaminsäure (D-Glu) und N-Methyl-dehydroalanin (Mdha) und an den Positionen zwei und vier aus variablen L-Aminosäuren (L-X, L-Z) (Abbildung 9). Bis heute sind bis zu 80 Varianten bekannt, die sich durch die zwei variablen L-Aminosäuren und durch Methylierung/Desmethylierung von D-MeAsp, Mdha und Adda unterscheiden (Carmichael, et al., 1988; Dawson, 1998).

Die C20-Aminosäure Adda ist eine ungewöhnliche β -Aminosäure. Sie besitzt eine lange hydrophobe Seitenkette mit vier Stereozentren, zwei konjugierte Doppelbindungen, einen Phenylring und eine Methoxygruppe. Da die Seitenkette hydrophob ist, trägt sie maßgeblich zur Polarität bei. Weiterhin besitzt die Seitenkette ein Chromophor und gibt so die Möglichkeit zur UV-Detektion (238 nm) (Rinehart, et al., 1988).

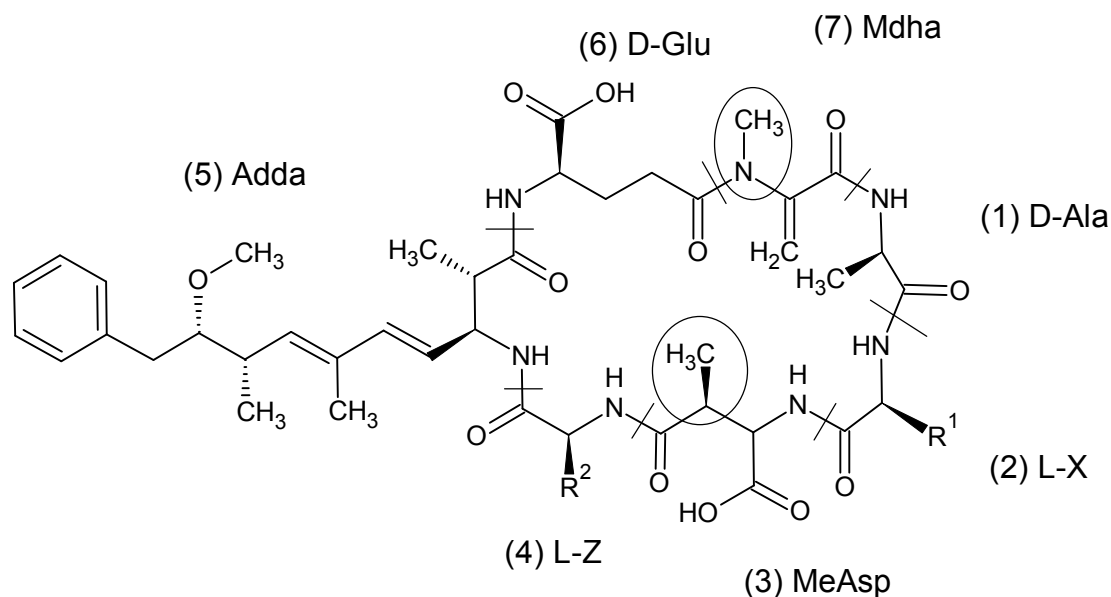


Abbildung 9: Grundstruktur von Microcystinen

Zur Kennzeichnung der variablen L-Aminosäuren der Positionen zwei und vier wurde ein Zweibuchstabencode, bestehend aus dem Einbuchstabencode für Aminosäuren (Tabelle 2), an die Bezeichnung MC für Microcystin angehängt. MC-LR, eins der bekanntesten Microcystine, enthält folglich L-Leucin (L) und L-Arginin (R) (Carmichael, et al., 1988).

Tabelle 2: Einbuchstabencode für Aminosäuren (Carmichael, et al., 1988)

L-Aminosäure	Einfachstabencode	Dreibuchstabencode
L-Leucin	L	L-Leu
L-Arginin	R	L-Arg
L-Alanin	A	L-Ala
L-Tyrosin	Y	L-Tyr
L-Homotyrosin	Hty	L-Htyr
L-Methionin	M	L-Met
L-Phenylalanin	F	L-Phe
L-Tryptophan	W	L-Trp

MCs sind in Wasser, Methanol und Ethanol löslich, in Chloroform, Aceton, Ether und Benzol dagegen unlöslich. Sie sind sowohl gegen chemische Hydrolyse, mehrstündiges Kochen als auch Oxidation bei niedrigen pH-Wert sehr stabil. MCs können nur von starken Oxidationsmitteln oxidiert werden. Eine effiziente Elimination aus Trinkwasser erreicht man

durch eine Ozonbehandlung des Rohwassers. Unter normaler Sonneneinstrahlung sind sie stabil, wohingegen UV-Licht um das Absorptionsmaximum von 238 nm von MC-LR und MC-RR zu einem raschen Abbau von MCs führt (Hitzfeld, et al., 2000; Tsuji, et al., 1995; Robinson, et al., 1989; Liu, et al., 2010).

NOD ist ein monozyklisches Pentapeptid (Abbildung 10) mit einem Molekulargewicht von 824 Da (van Apeldoorn, et al., 2006). Von den fünf Aminosäuren in NOD sind Adda, D-Glu und D-MeAsp identisch zu den Microcystinen, wohingegen Mdha durch *N*-Methyl-Dehydrobuttersäure (MeDhb) ersetzt ist. Die fünfte Aminosäure ist L-Arginin (Karlsson, et al., 2003).

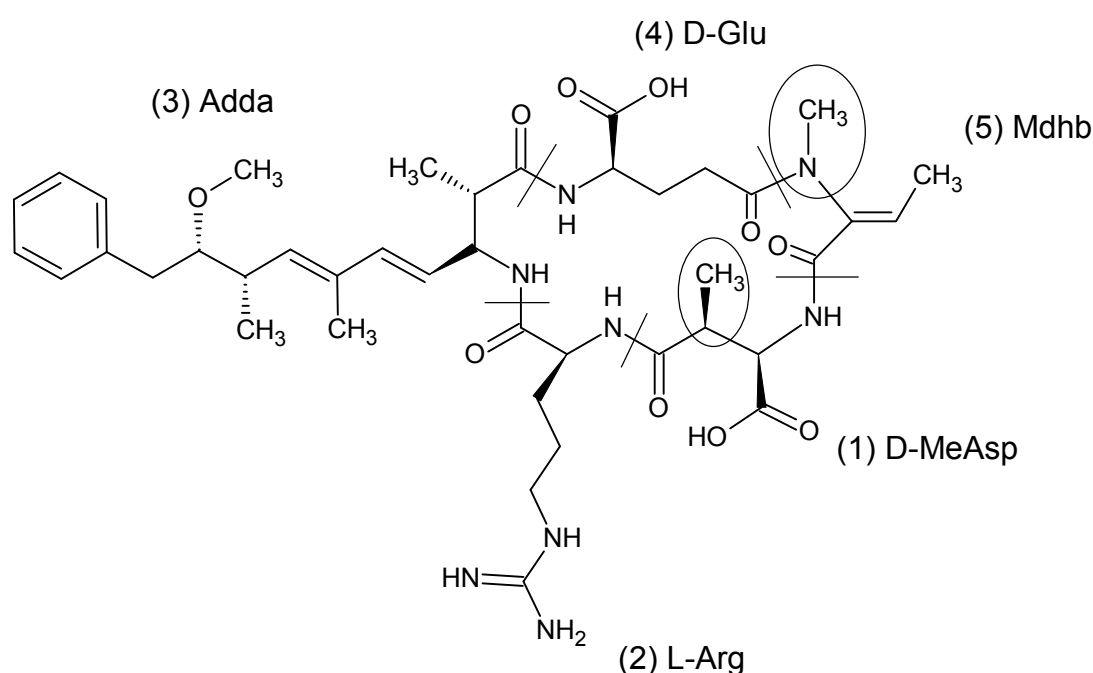


Abbildung 10: Struktur von Nodularin

Bisher sind acht NOD-Varianten bekannt, darunter zwei desmethylierte, eine mit D-Asp statt D-MeAsp und die andere mit dmAdda anstelle von Adda. Eine nicht toxische Variante beinhaltet das 6Z-Stereoisomer von Adda. Das Äquivalent 6Z-Adda-Stereoisomer von MCs ist ebenso nicht toxisch (Chorus, et al., 1999). Eine neue NOD-Variante NOD-Har wurde aus *Nodularia* von Saito et al. isoliert und identifiziert. Der Unterschied zu NOD ist, dass anstelle von L-Arg L-Homoarginin (L-Har) vorhanden ist (Saito, et al., 2001). Motuporin, ein NOD-Analog, wurde im marinen Schwamm *Theonella swinhoei* gefunden und stellt vermutlich ein cyanobakterielles Toxin dar, da der Schwamm eine Symbiose mit Cyanobakterien eingeht. Motuporin besitzt anstelle des polaren L-Arg das hydrophobe L-Valin (L-Val) (deSilva, et al., 1992).

2.5.3. Biosynthese

Die Biosynthese von MCs wurde anhand zweier Microcystinstämme aufgeklärt. Der mcy-Gencluster (eine Gruppe aus zwei oder mehr Genen, die zur gleichen Genfamilie gehören) in MCs verschlüsselt sechs Multienzyme, welche zur Familie der nichtribosomalen Peptidsynthasen (NRPS) beziehungsweise Typ 1 Polyketidsynthase (PKS-1) zugeordnet werden können. Die Synthese erfolgt unter ATP-Verbrauch (Kaebernick, et al., 2000; Figueiredo, et al., 2004; Tillett, et al., 2000). Die vielfältigen Strukturen der MCs werden durch NRPS/PKS-1-Templates, welche aus mehreren Modulen aufgebaut sind, erreicht. Ein Modul enthält mehrere Domänen, die in der Lage sind, eine Aminosäure oder eine Kohlenstoffeinheit zu aktivieren, zu modifizieren und zu verlängern. NRPS- und PKS-Enzyme akzeptieren eine breite Auswahl an Substraten, wodurch die Vielfalt der MCs in demselben Bakterienstamm erklärt werden kann. Bis heute sind bis zu 80 Isoformen von MCs bekannt, die sich in ihrer Toxizität unterscheiden. Die Identifizierung und Aufklärung der Biosynthese von MCs in den Gattungen *Planktothrix* und *Anabaena* durch die Enzyme führte ebenfalls zur Entdeckung der Nodularinbiosynthese in *Nodularia*. Wie erwartet spiegelt sich die Ähnlichkeit der Struktur zwischen MCs und NOD in einem vergleichbaren Mechanismus der Biosynthese wieder (siehe Abbildung 11) (Dittmann, et al., 1997; Tillett, et al., 2000; Nishizawa, et al., 2000; Tanabe, et al., 2004; Moffitt, et al., 2004).

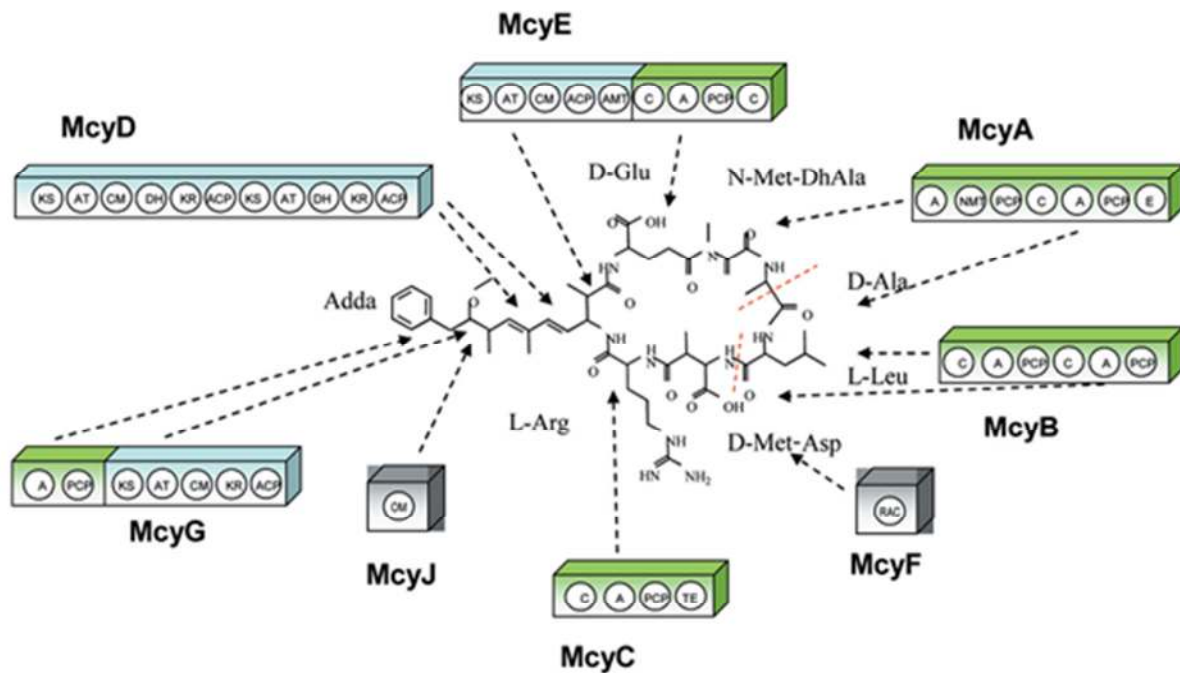


Abbildung 11: Modell der an der Biosynthese von Microcystinen und Nodularin beteiligten Domänen der Multienzyme (Dittmann, et al., 2006)

KS: β -Ketoacylsynthase; AT: Acyltransferase; ACP: Acylcarrierprotein; KR: Ketoacylreduktase; DH: Dehydratase; CM: C-Methyltransferase; OM: O-Methyltransferase; NMT: N-Methyltransferase; AMT: Aminotransferase; RAC: Racemase; A: Aminoacyl-Adenylation; C: Kondensation; PCP: Peptidylcarrierprotein; PKS: Polyketidsynthase (blau); NRPS: nonribosomale Peptidsynthetase (grün); Tailorproteine (grau); Die rot gestrichelten Linien grenzen die zwei Aminosäurereste ab, die in NOD fehlen.

Der Ursprung der Kohlenstoffatome in MCs (Moore, et al., 1991) und NOD wurde mittels ^{13}C -NMR bestimmt. Die Kohlenstoffatome C1-C8 von Adda in NOD stammen von Acetat, die restlichen C-Atome vermutlich von Phenylalanin. Die Methylgruppen an C2, C4, C6, C8 und die O-Methylgruppe an der Adda-Seitenkette kommen von Methionin (Abbildung 12). Die Kohlenstoffatome C4 und C5 von D-Glu und L-Arg sind Acetat-Derivate, C1 und C2 stammen von Glutamat. Methyldehydroalanin ist möglicherweise von Threonin abgeleitet, wobei dessen Methylgruppe von Methionin kommt. Die C-Atome drei und vier von β -Methylasparaginsäure entstehen aus der Kondensation von Brenztraubensäure und C1 und C2 aus der Kondensation von Acetyl-CoA (Choi, et al., 1993). Die Strukturstudien an NOD überschneiden sich mit geringen Abweichungen mit den Strukturuntersuchungen mittels ^{13}C -NMR durch Moore et al. an MC-LR, wie in Abbildung 12 zu sehen ist. In ihrer Studie zeigten sie, dass die zwei Aminosäuren L-Leu und D-Ala, die in der Nodularinstruktur fehlen, von Acetat stammen (Moore, et al., 1991). Eine weitere Abweichung wurde an den Dehydroaminosäuren festgestellt. In den MCs stammen sie wahrscheinlicher von Serin als von Threonin (Rinehart, et al., 1994; Moffitt, et al., 2004).

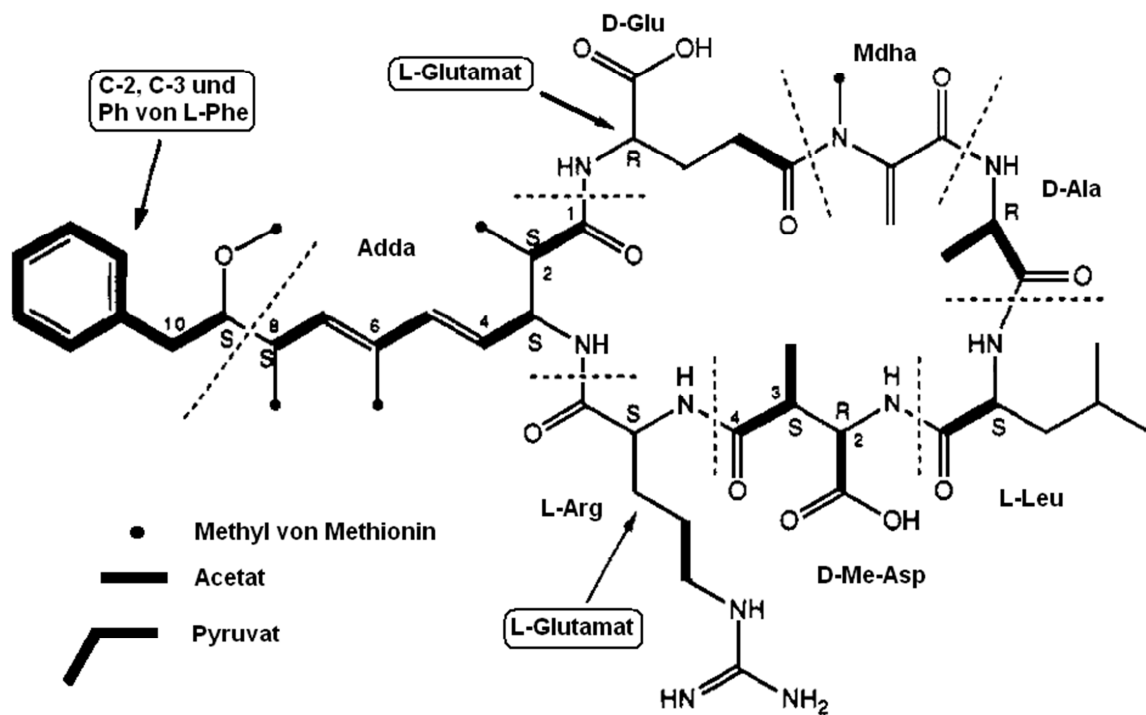


Abbildung 12: Biosynthese von MC-LR
 (Moore, et al., 1991)

2.5.4. Absorption, Verteilung, Metabolismus und Exkretion

Nach einer oralen Aufnahme von MC-LR oder NOD werden diese in Säugetieren vorwiegend im Dünndarm resorbiert und über den Blutkreislauf in die Zellen transportiert (Ito, et al., 1997a; Runnegar, et al., 1991). Da die meisten MCs und NODs hydrophil sind, können sie die Zellmembran von Säugetierzellen kaum passieren, weshalb spezifische Transporter erforderlich sind. Die Transportern sind Gallensäuretransporter (multispezifische organische Anionentransporter) oder auch OATPs (*organic anion transporting polypeptide*) (Lu, et al., 2008; Klassen, et al., 2008).

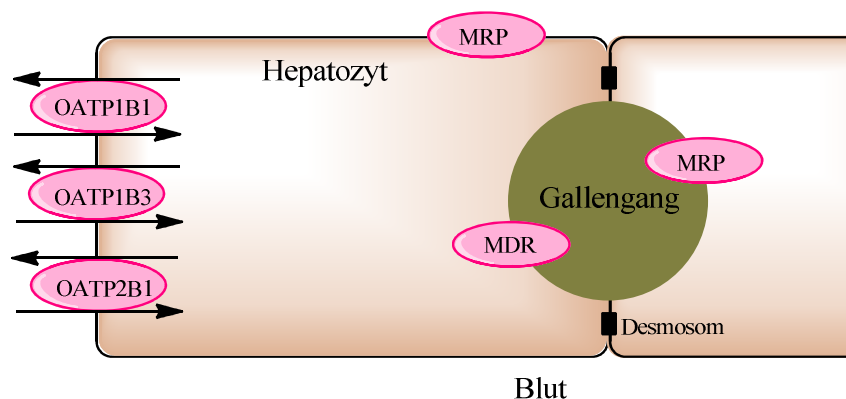


Abbildung 13: Transport in Hepatozyten

OATP: *organic anion transporting polypeptide*; **MRP:** *multidrug resistance related protein*; **MDR:** *multidrug resistance transporter*

Das Hauptzielorgan der MCs und der NODs ist die Leber, weshalb sie auch als Hepatotoxine bezeichnet werden. Andere betroffene Organe sind Niere, Lunge, Darm und Gehirn (Blut-Hirnschranke), wobei sich die Organspezifität hauptsächlich über die Expression der OATPs erklärt (Herfindal, et al., 2011; Fischer, et al., 2005). So konnte der Transport des ³H-markierten MC-LR durch Proteine der Superfamilie OATP (Abbildung 13) in der basolateralen Membran von Hepatozyten und in der Endothelzellmembran der Blut-Hirnschranke gezeigt werden (Fischer, et al., 2005; Eriksson, et al., 1990).

Im Allgemeinen vermitteln OATPs einen Na⁺-unabhängigen Transport amphiphiler, organischer Moleküle wie Gallensalze, organische Anionen, Steroidkonjugate, Schilddrüsenhormone, zahlreiche Peptide und Toxine. Weiterhin nutzen viele Medikamente unter anderen HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A)-Reduktase-Hemmer, Digitoxin und Rifampicin den Transport über OATPs (Seithel, et al., 2007; Hagenbuch, et al., 2004). Über MRPs (*multidrug resistance related protein*) und MDRs (*multidrug resistance transporter*) gelangen die MCs und NODs aus den Hepatozyten in den Gallengang und über MRPs in die Blutbahn (Roelofsen, et al., 1997).

Die Leber stellt nicht nur das Hauptorgan zur Aufnahme von MCs und NODs sondern auch zur Exkretion dar (Ito, et al., 2000; Falconer, et al., 1986; Robinson, et al., 1991). Nach einer intravenösen (*i.v.*) oder intraperitonealen (*i.p.*) Gabe von MC-LR an Maus und Ratte kommt es zu einer Verteilung von 50-70 % in der Leber, 7-10 % im Darm und 1-5 % in der Niere, der Rest ist über den ganzen Körper verteilt (Robinson, et al., 1991; Runnegar, et al., 1986; Ito, et al., 2000; Svircev, et al., 2010).

MCs und NODs sind resistent gegen enzymatische Hydrolyse und besitzen keinen Spaltungspunkt für eine Verdauung, somit sind sie stabil. Zum einen liegt dies an der zyklischen Struktur der Peptide und folglich dem Fehlen von N- oder C-terminalen Aminosäuren und zum anderen am Vorhandensein der nicht proteinogenen Aminosäuren

Adda, D-MeAsp, Mdha und Mdhb. Die Ausscheidung erfolgt über die Galle in ihrer Ausgangsform oder konjugiert. Die Metabolisierungsprodukte sind Glutathion- und Cysteinkonjugate an Mdha oder Konjugate mit oxidiertem Dien-Bindung von Adda (Bourne, et al., 1996; Pflugmacher, et al., 2001; Pflugmacher, et al., 1988; Kondo, et al., 1996; Takenaka, 2001).

Bei der Elimination der MCs spielen sowohl Struktur, Darreichungsform als auch die Spezies eine Rolle. Während in einer Studie die Halbwertszeit für ^{125}I -MC-YM im Blutplasma nach einer *i.v.*-Applikation an Ratten 42 min betrug, wurde für ^3H -MC-LR eine Halbwertszeit von 70 min detektiert. Im Gegensatz dazu wurde an Mäusen für ^3H -MC-LR eine Halbwertszeit von 6,9 min beobachtet (Falconer, et al., 1986; Robinson, et al., 1989; Robinson, et al., 1991). Dabei lief die Elimination aus dem Plasma nach einer *i.v.* Applikation in zwei Phasen ab, mit einer ersten Halbwertszeit von 0,8 min und einer zweiten von 6,9 min. Innerhalb von sechs Tagen nach Verabreichung wurden 9,2 % der Dosis über den Urin und 14,5 % über die Fäzes ausgeschieden (Robinson, et al., 1991).

2.5.5. Wirkmechanismus

Als möglicher Wirkmechanismus der Toxizität der Hepatotoxine MCs und NODs wurde sowohl *in vivo* an Ratten und Mäusen (Runnegar, et al., 1995; Solter, et al., 1998) als auch *in vitro* (Honkanen, et al., 1994; MacKintosh, et al., 1990) die Hemmung der isolierten Serin/Threonin Proteinphosphatasen 1 (PP1), 2A (PP2A), 2B (PP2B) verschiedener Spezies und möglicherweise weiterer Proteinphosphatasen (PP) identifiziert. Dabei binden Cys273 in PP1 bzw. Cys266 in PP2A in einer Michael-Addition kovalent durch einen nukleophilen Angriff an die Doppelbindung von Mdha der Toxine im Zytosol und im Zellkern der Hepatozyten (Abbildung 14). Es kommt zu Wechselwirkung des Toxins mit der aktiven Seite und dem $\beta 12$ - $\beta 13$ -Loop des Enzyms (Blom, et al., 2005; MacKintosh, et al., 1995; Runnegar, et al., 1995).

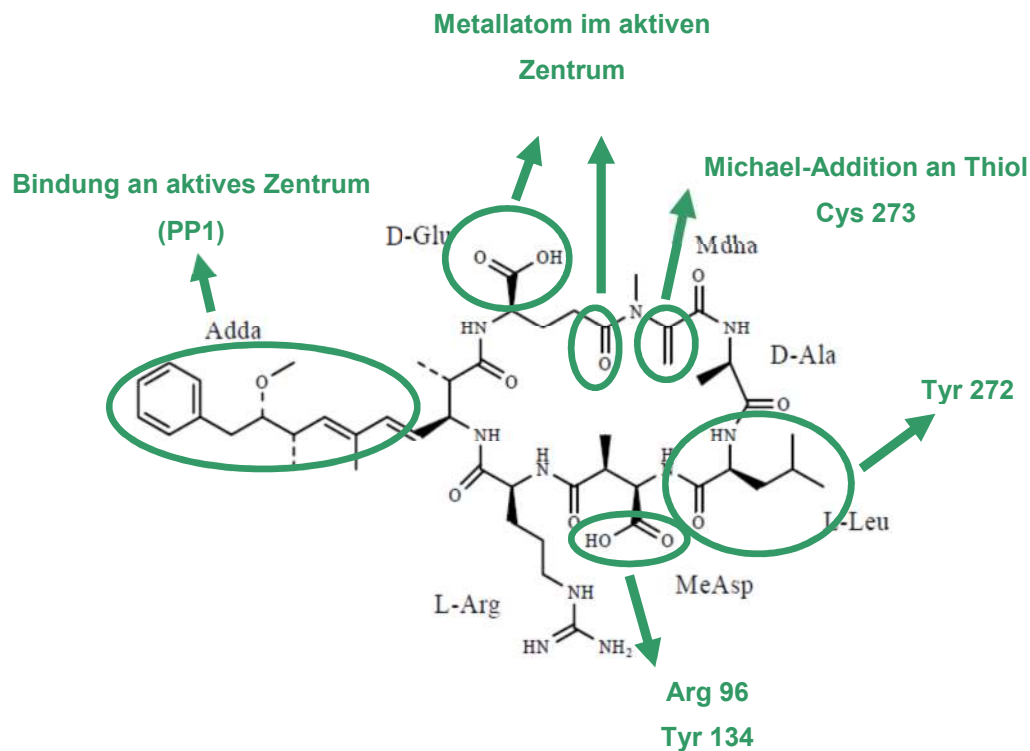


Abbildung 14: Bindung von MC-LR an PP1

Nodularin bindet durch Wasserstoffbrücken und nicht kovalent an die Enzyme, obwohl der Mdhb-Rest mit Cys273 eine Michael-Reaktion eingehen könnte (Maynes, et al., 2006). Weiterhin wird berichtet, dass die Adda-Seitenkette, die Carboxylgruppe von D-Glu und möglicherweise das planare Ringsystem der MCs in der Lage sind, die Proteinphosphatasen zu binden (Rudolph-Böhner, et al., 1994; Namikoshi, et al., 1989).

Folgende Interaktion zwischen Toxin und PP kann in allen Untersuchungen festgestellt werden. Der Adda-Rest bindet mit der hydrophoben Seite an PP. Dadurch kommt es zur Konformationsänderung des Enzyms. Der variable Rest L-Arg weist keinen Kontakt zu PP auf (Kelker, et al., 2009; MacKintosh, et al., 1995).

Die Affinität von MC-LR zu PP2B ist um den Faktor 1000 geringer als zu PP1, während zu PP2C, PKC und PKA *in vitro* keinerlei Interaktion festzustellen ist (Dawson, 1998; Gehring, 2004).

MC-LR und MC-LA sollen weiterhin in der Lage sein, *in vitro* die aus Rinderhirn isolierte PP3 in ähnlicher Potenz wie PP1 und PP2A zu inhibieren (Honkanen, et al., 1994). Mikhailov et al. beschreiben in ihrer Studie, dass MC-LR durch Bindung an die β -Untereinheit der ATP-Synthase deren Enzymaktivität hemmt, was zu Apoptoseinduzierung führt (Mikhailov, et al., 2003).

Mit dieser Inhibition kommt es zu einer Hyperphosphorylierung von Zytoskelettproteinen mit der eine Auflösung der Struktur der Hepatozyten, Schädigung der Sinusoide, Apoptose, Lebernekrose und Blutung der Leber einhergeht, was zum Tod durch hämorrhagischen Schock führt (Dittmann, et al., 2006; Batista, et al., 2003; Ding, et al., 2000a).

Die meisten Strukturvarianten von MC und NOD sind stark toxisch. Es sind nur wenige nicht toxische Varianten bekannt. Eine Modifikation der Adda-Glutamat-Region führt zu einem Verlust der Wirkung von MCs und NODs. Zu diesen Modifikationen zählen die Isomerisierung von 6E-Dien zu 6Z-Dien von Adda und die Alkylierung von D-Glu. Lineare MCs und NODs besitzen im Vergleich zu ihren zyklischen Verbindungen eine um etwa 100-mal schwächere Toxizität. Die linearen MCs sind vermutlich MC-Vorläufer oder bakterielle Abbauprodukte (Chorus, et al., 1999).

2.5.6. Auswirkung auf das Zytoskelett

Das Zytoskelett besteht aus drei Proteinkomponenten, den Mikrotubuli, Intermediär- und Mikrofilamenten. MC-LR ruft ab einer Konzentration von 1 μM zeit- und dosisabhängig eine Hyperphosphorylierung von Keratin 8 und 18, welche als Heterodimer die Grundstruktur der Keratin-Intermediärfilamente bilden, hervor. Außerdem kommt es in primären Rattenhepatozyten zu einer Schädigung von Desmoplakin I und II durch 1 μM MC-LR. Dies führt wiederum zum Zerfall von Desmosomen, welche die Verbindung zwischen benachbarten Zellen herstellen und über Desmoplakin I und II mit Keratinfilamenten in Epithelzellen verbunden sind, gefolgt von einer Umorganisation von Mikro- und Intermediärfilamenten, wobei sich die letzteren um einen Kern aus Aktin konzentrieren. Ursache dafür ist möglicherweise die Hemmung von PP1 und PP2A (Gehring, 2004; Ohta, et al., 1992; Toivola, et al., 1997). Für die Hyperphosphorylierung von Keratin 8 und 18 *in vivo* können die Proteinkinasen PKC, PKA und Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMKII) verantwortlich sein (Toivola, et al., 1997).

Eine erhöhte Phosphorylierung des zytoplasmatischen Dyneins in Hepatozyten resultiert in einer Beeinträchtigung der motorischen Funktion, begleitet von einer reduzierten Bildung von endosomalen und lysosomalen Membranen durch Mikrotubuli (Runnegar, et al., 1999). Weiterhin wird in Rattenhepatozyten zeit- und dosisabhängig durch ein Microcystinextrakt noch vor der Laktat-Dehydrogenase (LDH)-Leakage eine charakteristische Desorganisation der Mikrotubuli und Mikrofilamente erreicht, gefolgt von ihrer Aggregation in der Nähe des Zellzentrums und einem verstärkten Verlust an Mikrotubuli in einigen Zellen (Ding, et al., 2000a).

2.5.7. Apoptose

Der programmierte Zelltod, auch Apoptose genannt, ist ein fundamentaler biologischer Prozess für die Entwicklung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen. So spielt sie eine wichtige Rolle bei Embryogenese, Erkrankungen und im Immunsystem (Dasch, 2008). Dabei sterben Zellen kontrolliert durch eine Reihe verschiedener miteinander verschalteter Stimuli ab. Dies unterscheidet Apoptose von der Nekrose, bei der der Zelltod unkontrolliert abläuft und mit inflammatorischen Prozessen einhergeht (Majno, et al., 1995; Trump, et al., 1997).

Die Morphologie der untergehenden Zelle gibt Aufschluss über den Unterschied zwischen Apoptose und Nekrose (Abbildung 15). Bei der Nekrose bedingt der Ausfall von Ionenpumpen den Einstrom von Kalzium und Natrium, was zu einem Verlust der Membranintegrität und durch Osmose zum Platzen der Zelle führt. Das Auslaufen des Zellinhalts in die Peripherie löst dabei Entzündungsreaktionen aus (Vanlangenakker, et al., 2012). Dagegen kommt es bei der Apoptose zum Wasserverlust der Zelle, der damit einhergehenden Kondensation des Zytoplasmas und Schrumpfen der Zelle. Weiterhin kondensiert das Chromatin, Endonukleasen fragmentieren die DNS und es kommt zur Zerlegung des Zellkerns und Organellen. Diese werden in sogenannten apoptotischen Körperchen vom Rest der Zelle abgeschnürt und mit Phosphatidylserin, welches Makrophagen als Marker dient, auf der Zelloberfläche markiert (Budihardjo, et al., 1999; Elmore, 2007; Zhang, et al., 2000).

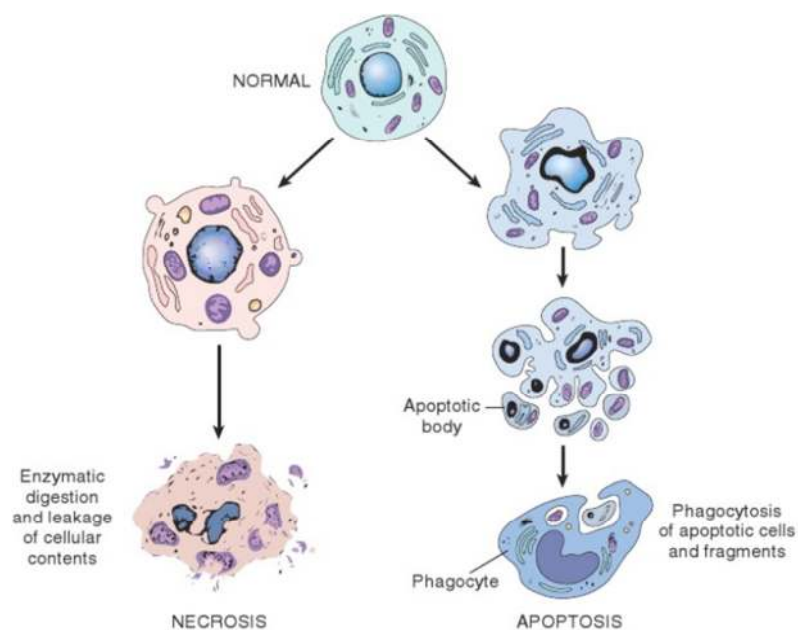


Abbildung 15: Nekrose vs. Apoptose (Kumar, 2012)

An der Auslösung der Apoptose sind Cystein-Proteinasen, sogenannte Caspasen, welche spezifisch nach Aspartat-Resten spalten, beteiligt. Dabei gibt es zwei Caspase-abhängige Wege, den intrinsischen über Mitochondrien, und den extrinsischen über Todesrezeptoren vermittelten Signalweg. Über beide Signalwege werden spezifische Initiator-Caspasen wie Procaspase 8 und 9 aktiviert, die wiederum Effektor-Caspasen, z. B. 3 und 7, durch proteolytische Spaltung aktivieren (Budihardjo, et al., 1999).

Beim intrinsischen Weg (Abbildung 16) spielt die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran eine entscheidende Rolle für die Regulierung pro- und anti-apoptotischer Vertreter der Bcl-2-Proteinfamilie wie Bcl-2, Bad, Bax oder Bid. Nach Auslösung des Apoptosesignals wird das Gleichgewicht auf die Seite pro-apoptotischer Vertreter verlagert, was zu Porenbildung der Mitochondrienmembran und dadurch zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren wie Cytochrom c ins Zytosol führt. Dieses wiederum bildet zusammen mit ATP, Procaspase 9 und *apoptosis protease activating factor-1* (Apaf-1) das Apoptosom, welches wiederum Procaspase 9 proteolytisch aktiviert (Narita, et al., 1998; Solary, et al., 2000; Zhou, et al., 2010).

Der extrinsische Signalweg (Abbildung 16) verläuft über Todesrezeptoren, wie Fas (CD95)- oder TNF (Tumor-Nekrose-Faktor)-Rezeptor. Diese werden durch den Fas-Ligand oder TNF- α induziert und aktivieren über das „Vermittlerprotein“ *fas-associated death domain* (FADD) die proteolytische Spaltung von Procaspase 8 (Vanlangenakker, et al., 2012; Budihardjo, et al., 1999). Untersuchungen in HepG2-Zellen zeigen, dass NOD (2,5-10 μ M) und MC-LR (5-30 μ M) in der Lage sind konzentrations- und zeitabhängig (6, 12, 24, 48 h) auf Protein- und mRNA-Ebene sowohl den Fas-Rezeptor als auch Fas-Liganden zu induzieren und somit Apoptose über den extrinsischen Weg hervorzurufen (Feng, et al., 2011; Feng, et al., 2011b).

Eine gestörte Proteinphosphorylierung durch Aktivierung von Proteinkinasen oder Proteinphosphatasen besitzt einen Einfluss auf Apoptoseinduktion (Anderson, 1997; Gjertsen, et al., 1995). Verschiedene Studien zeigen, dass eine Inhibierung von PP2A und PP1 in unterschiedlichen Zellen Apoptose induzieren (Bøe, et al., 1991; Kiguchi, et al., 1994; Yan, et al., 1997). Dabei kann NOD Caspase 3 sowohl durch proteolytische Spaltung als auch reversibel ohne Spaltung aktivieren (Buckley, et al., 1999).

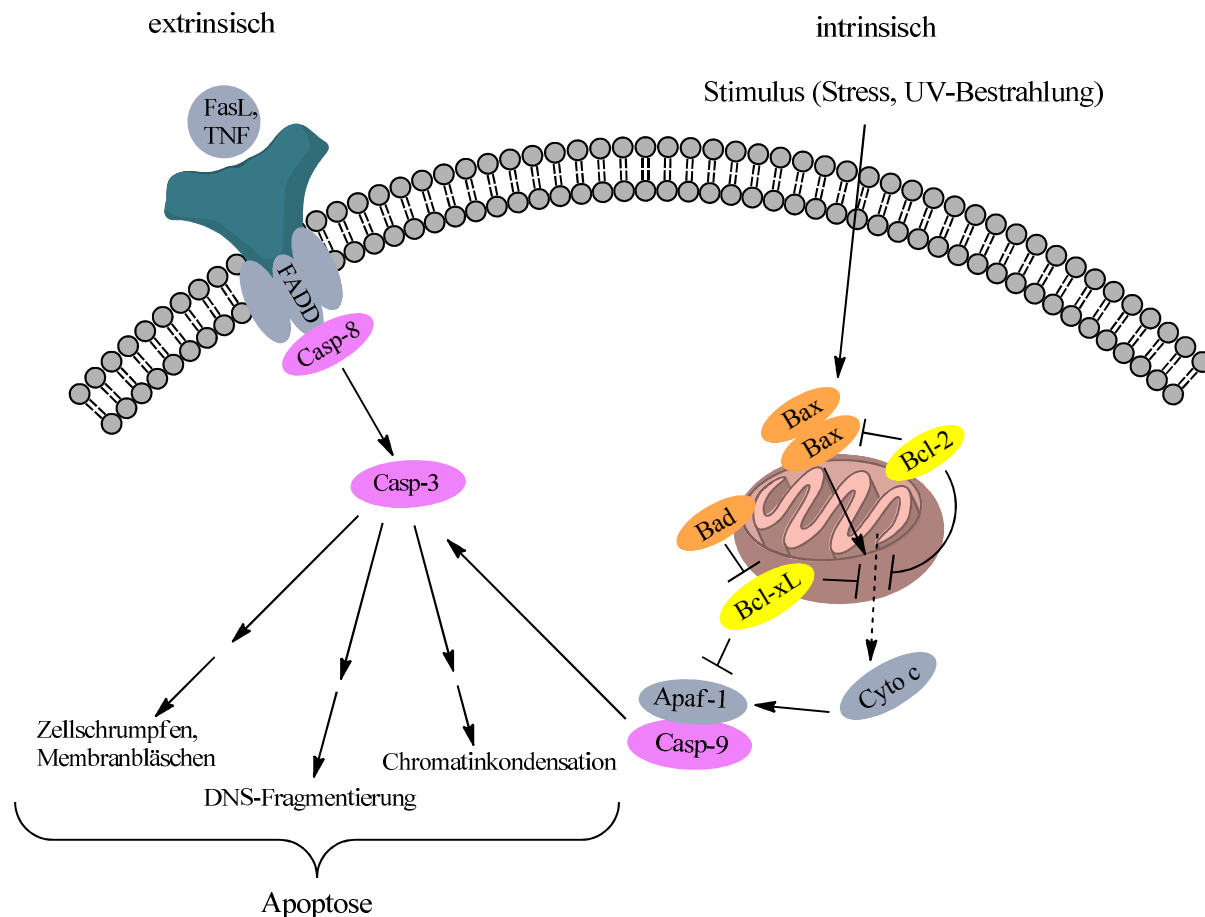


Abbildung 16: Apoptose-Wege

rosa: Caspasen, gelb: anti-apoptotisch, orange; pro-apoptotisch, \rightarrow Stimulation, \dashv Inhibierung, $-\ - \rightarrow$ Translokation, \rightarrow \rightarrow Stimulation über Zwischenschritte
 TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; FADD: fas-associated death domain; Casp: Caspase; Apaf-1: apoptosis protease activating factor-1; Cyto c: Cytochrom c

Hohe Dosen im Bereich von 20-100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG bei *i.p.* Behandlung mit MCs und NOD induzieren *in vivo* an Mäusen und Ratten und *in vitro* in Rattenhepatozyten im Konzentrationsbereich zwischen 0,5 und 10 μM , in humanen Lymphozyten und anderen Säugerzellen innerhalb weniger Minuten Apoptosen (Fladmark, et al., 1999; Fladmark, et al., 2002; Krakstad, et al., 2006). Bei verschiedenen *in vivo* Studien wurden in der Leber, in denen Addukte von MC-LR mit PP1 und PP2A charakterisiert wurden, ebenfalls Hämorrhagien und apoptotische Zellen festgestellt (Guzman, et al., 1999).

Zahlreiche *in vitro* Untersuchungen belegen typische apoptotische Effekte mit Knospung der Zelloberfläche, Zellschrumpfung, Organellenumverteilung, Kondensation von Chromatin im Zellkern und teilweise Fragmentierung des Zellkerns, intakte Mitochondrien in apoptotischen Bläschen bzw. an einem Pol der Zelle und Abrundung der Zellen. Dabei ist die Wirkung der MCs und des NODs auf die verschiedenen Zellen unterschiedlich stark. So reicht für Rattenhepatozyten bereits eine Konzentration von 0,8 μM MC-LR, um Effekte innerhalb von

weniger als 15 min aufzuzeigen. Nicht-Leberzellen wie humane Fibroblasten, Endothelzellen und Promyelozyten, die keinen aktiven Aufnahmemechanismus für Microcystine aufweisen, benötigen für Effekte 100 µM MC-LR und sechs bis acht Stunden (Fladmark, et al., 1999; McDermott, et al., 1998). Die Apoptose wird dabei durch die Inhibierung von PP1 und PP2A in einem CaMKII-abhängigen Prozess ausgelöst, was zu vermehrter Phosphorylierung von Proteinen führt (Fladmark, et al., 2002).

Für primäre humane Hepatozyten wurde nach einer sechsstündigen Exposition ein EC_{50} -Wert (*effective concentration*) auf die Zellvitalität von 25 nM und für Rattenhepatozyten von 50 nM ermittelt (Batista, et al., 2003).

2.5.8. Akute und subakute Toxizität

Der LD_{50} -Wert nach *i.p.* Verabreichung variiert für Mäuse zwischen 25-150 µg MC-LR/kg KG/Tag. Andere MCs wie MC-LA, MC-YR und MC-YM besitzen einen ähnlichen *i.p.* LD_{50} -Wert, wohingegen MC-RR einen zehnmal höheren Wert aufweist (Chorus, et al., 1999). Bei Ratten beträgt der *i.p.* LD_{50} -Wert eines *Microcystis aeruginosa*-Extrakts 15800 µg lyophilisierte Algenzellen/kg KG. Die Tiere starben innerhalb von zwei bis sechs Stunden nach einer Verabreichung der ein- oder zweifachen LD_{50} -Dosis. Davor zeigten sie Anzeichen von Sedation, Bewegungsstörungen, Spasmen, Spreizung der Hinterextremitäten und starke Krämpfe, außerdem war die Leber vergrößert und mit Blut gefüllt (Engeli, 2005; Rao, et al., 1995).

Für NOD wurde ein *i.p.* LD_{50} -Wert von 30-50 µg/kg KG und für NOD-Har von 70 µg/kg KG für Mäuse ermittelt (Chorus, et al., 2000; Saito, et al., 2001).

Nach oraler Verabreichung liegt der LD_{50} -Wert für MC-LR bei Mäusen Stamm-abhängig bei 5000-10900 µg/kg KG und bei Ratten bei über 5000 µg/kg (Fawell, et al., 1999).

Weiterhin wurde in einer Studie von Ito et al. gezeigt, dass MCs eine altersabhängige Toxizität aufweisen. In der Studie wurden bei 5 und 32 Wochen alten Mäusen 2-19 Stunden nach einmaliger oraler Verabreichung von 500 µg MC-LR/kg KG Leberbiopsien histologisch untersucht. Während bei jungen Mäusen kein Effekt festzustellen war, zeigten 62 % der älteren Mäuse Leberveränderungen wie Blutung und Auflösung vieler Hepatozyten über die ganze Leber verteilt und in der zentrilobulären Region und Nekrosen in der zentrilobulären Region. Der vermutete Grund für diese altersabhängige Toxizität war die mit steigendem Alter zunehmende Degeneration von Zellen der Darmmukosa und des Dünndarmepithels. Dies führt bei älteren Tieren möglicherweise zu einer erhöhten Microcystinaufnahme aus dem Darm und zu einer entsprechend ausgeprägten Lebertoxizität (Ito, et al., 1997a).

Basierend auf dem akuten LD_{50} -Wert nach *i.p.* Gabe an Mäuse haben Wolf und Franks einen *Toxic Equivalency Factor* (TEF)-Wert für MCs abgeleitet. Dabei soll MC-LR als

Referenzsubstanz dienen und der TEF_{MC-LR} somit 1 betragen. Die anderen TEF-Werte werden wie folgt berechnet:

$$TEF_{Toxin X} = LD_{50(MC-LR)} / LD_{50(Toxin X)}$$

So ergibt sich für MC-LA, MC-YR und MC-YM ein TEF-Wert von 1, für [Asp³, Dhb⁷]MC-RR von 0,2 und für MC-RR von 0,1 (Wolf, et al., 2002).

2.5.9. Subchronische und chronische Toxizität

Um mögliche chronische Effekte auf den Menschen abschätzen zu können, werden Studien an Tieren herangezogen, die eine wiederholte orale Verabreichung der Substanzen verschiedener Konzentrationen beinhalten.

Guzman und Solter behandelten in einer Studie während 28 Tagen drei männliche Sprague-Dawley-Ratten/Dosisgruppe *i.p.* mit 0, 16, 32 oder 48 µg MC-LR/kg KG/Tag. Ab der Konzentration 32 µg MC-LR/kg KG/Tag konnten dosisabhängige Leberentzündungen mit Infiltration von Lymphozyten, Makrophagen und Neutrophilen, zentrilobuläre Fibrose, Apoptose und Leberverfettung beobachtet werden. Aus den histologischen und biochemischen Befunden wurde gefolgert, dass oxidativer Stress eine signifikante Rolle bei der chronischen Toxizität von MC-LR spielen könnte (Guzman, et al., 1999).

In einer anderen Studie wurden fünf männliche Schweine/Dosisgruppe über das Trinkwasser 44 Tage mit *Microcystis aeruginosa*-Extrakt behandelt. Mittels *i.p.* Maus-Bioassay wurden vorher für die Untersuchung Dosen von 280, 800 und 1310 µg MC/kg KG/Tag abgeschätzt. Der Extrakt enthielt dabei mindestens sieben verschiedene MCs, wobei als Hauptkomponente MC-YR vermutet wurde. Ab der Dosis 800 µg/kg KG/Tag wurden dosisabhängige histopathologische Leberveränderungen wie zytoplasmatische Degeneration, Nekrosen einzelner Hepatozyten, periazinäre Degeneration, verstopfte Gallengänge und Kupferzell-Proliferation beobachtet. Außerdem war bei dieser Dosis im Serum die Albuminkonzentration erniedrigt und die Aktivitäten der γ -Glutamyl-Transpeptidase, der alkalischen Phosphatase und der Bilirubingehalt erhöht. Ein LOAEL von 280 µg/kg KG/Tag wurde ermittelt. Schätzungen der Autoren zufolge entspricht das einem LOAEL von 100 µg MC-LR-Äquivalenten/kg KG/Tag (Falconer, et al., 1994).

2.5.10. Tumorpromotion und Kanzerogenität

Durch einen mehrstufigen Prozess bestehend aus Tumorinitiation, Tumorpromotion und Tumorprogression transformieren normale Zellen über neoplastische Zellen zu Tumorzellen (Farber, 1968). Bei der Initiation kommt es zu einer DNS-Schädigung, welche im Normalfall durch Reparaturenzyme erkannt und behoben wird. Nicht reparierte Zellen geben diese Mutation vor allem von Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen, welche Wachstums- und Differenzierungsprozesse kontrollieren, bei der Zellteilung weiter. Während der Tumorpromotion wird die Vermehrung neoplastischer Zellen gefördert. Diese Zellen sind meist dedifferenziert, proliferieren unkontrolliert und unterscheiden sich in ihrer Morphologie und Funktion von den Nachbarzellen des betroffenen Gewebes. Die Tumorzellen entwickeln sich während der Tumorprogression zu einem makroskopisch sichtbaren Tumor. Dabei wachsen Tumore autonom, weisen Angiogenese auf und sind resistent gegenüber Apoptose. Durch Kollagenasen wird das umliegende Gewebe aufgelockert und es kommt zur Bildung von Metastasen (Pitot, et al., 1989; Pitot, et al., 1996; Dragan, et al., 1993).

MCs und NOD gelten *in vivo* und *in vitro* als starke Protein-Phosphatase (PP)-Inhibitoren. Eine PP-Inhibierung resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung von Targetproteinen wie Tumorsuppressoren, was zu Zellproliferation, Zelltransformation und Tumorpromotion führen kann (Chorus, et al., 1999).

Eine tumorpromovierende Wirkung durch MCs und NODs wird durch zahlreiche Studien belegt (Hu, et al., 2002; Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992; Carmichael, 1992; IARC, 2006). Außerdem gibt es Hinweise, dass MCs und NODs auch tumorinitiierende Effekte aufweisen (Yu, et al., 2001; Ito, et al., 1997b; Ding, et al., 1999; Abdel-Hamid, 2009; Zegura, et al., 2008).

So zeigte eine Studie an Mäusen, dass nach einer Behandlung mit MC-LR neoplastische Knötchen von bis zu 5 mm Durchmesser in der Leber auftraten. Dabei wurde den Tieren *i.p.* 20 µg MC-LR/kg KG 100-mal über 28 Tage verabreicht. Die Neoplasien bildeten sich ohne vorherige Gabe eines Tumorinitiators und waren noch zwei Monate nach der letzten Behandlung vorhanden. In der gleichen Studie wurde nach Verabreichung von 80 µg MC-LR/kg KG über eine Schlundsonde 100-mal während 28 Tagen bei den Mäusen weder eine Knötchenbildung noch Leberschädigungen beobachtet. Das weist möglicherweise auf eine schlechte Aufnahme von MCs über den Gastrointestinaltrakt hin (Ito, et al., 1997b).

Untersuchungen auf Hepatokanzerogenese mit Diethylnitrosamin (DEN), einem Lebertumorinitiator, zeigten *in vivo* mit Ratten, dass sich NOD eindeutig als Tumorpromotor erweist (Song, et al., 1999; Lim, et al., 1999; Lim, 2002).

Gleiche Ergebnisse lieferten Nishiwaki-Matsushima et al. für MC-LR. Sie behandelten Ratten ebenfalls *i.p.* mit DEN gleicher Konzentration und mit 10 µg MC-LR/kg KG zweimal pro Woche acht Wochen lang und stellten ab der dritten Woche eine starke tumorpromovierende Wirkung auf die Leber fest. Der *i.p.* NOAEL lag dabei bei 1 µg/kg KG (Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992). Weiterhin war NOD in der Lage, einige Proto-Onkogene der fos- und jun-Familie und den TNF-α zu aktivieren, von welchen vermutet wird, dass sie in der Tumorpromotion eine Rolle spielen (Ohta, et al., 1992; Ohta, et al., 1994).

Auch Ohta et al. zeigten, dass sowohl MC-LR als auch NOD eine tumorpromovierende Wirkung auf die Leber aufweisen. Bei ihrer Studie wurde Ratten während zehn Wochen zweimal pro Woche *i.p.* 25 µg MC-LR oder NOD/kg KG verabreicht. Bei den Tieren, die vorher einmalig *i.p.* mit 200 mg DEN behandelt wurden, waren Flächen und Anzahl der Leberzellfoci (*Glutathion S-Transferase placental-form positive liver cell foci*) bei NOD 20 % stärker erhöht als bei MC-LR. NOD allein zeigte die gleiche Zunahme der Foci wie die Gabe von DEN allein. MC-LR hingegen induzierte ohne Tumorinitiation durch DEN keine Leberzellfoci. Daraus schlossen die Autoren, dass MC-LR ein Tumorpromotor sei und NOD als ein komplettes Kanzerogen angesehen werden kann.

Weiterhin wird einen Zusammenhang zwischen mit MCs belastetem Wasser und HCC (*Hepatocellular carcinoma*) in China festgestellt (Yu, 1995). Dabei werden vor allem die Überaktivierung des MAPK-Signalwegs und eine Desregulierung der Apoptose als Ursache gesehen (Min, et al., 2011; Fabregat, 2009). Die IARC (*International Agency of Research on Cancer*) hat MC-LR als möglich karzinogen für Menschen (Gruppe 2B) eingestuft (Grosse, et al., 2006).

2.5.11. Analytik

Zur Erfassung der hohen Diversität von MCs und NODs stehen flüssigkeitschromatographische Verfahren wie LC und HPLC, mit oder ohne zusätzliche Kopplung an nachgeschaltete Detektoren wie MS bzw. MS/MS und UV-Vis zur Verfügung (Sangolkar, et al., 2006).

Krüger et al. entwickelten eine Methode zur Auftrennung und exakten Strukturaufklärung verschiedener MCs und desmethylierter MCs (dmMCs). Eine Trennung zweier Varianten von dmNOD, sowie der Microcystine MC-LR, MC-RR und MC-YR und ihrer einfach desmethylierten Kongenere kann durch stationäre perfluorierter Phenylphasen (Pentafluorphenyl- und Pentafluorphenylpropyl-Phasen) erreicht werden. Ein Formiat-Puffer/Wasser-Acetonitril-Gemisch dient als mobile Phase, wobei ein Massendetektor nachgeschaltet wird. Zur Bestimmung der chemischen Struktur konnten nach einer

Peptidhydrolyse mittels semipräparativer HPLC die Aminosäuren und daraus resultierende Ketosäuren stereospezifisch detektiert (Krüger, et al., 2009; Hoeger, et al., 2007).

Als Beispiel für MCs sind für dmMC-RR die Strukturvarianten [³Asp]MC-RR, [⁷Dha]MC-RR, [³Asp, ⁷Dhb]MC-RR und [⁶dmAdda]MC-RR möglich. Nach einer Peptidhydrolyse kann bei einer Desmethylierung an Position drei anstelle von *D-erythro-β*-Methylasparaginsäure (*D*-MeAsp) die *D*-Asparaginsäure (*D*-Asp) erfasst werden, an Position sieben ist statt *N*-Methyldehydroalanin (Mdha) und Dehydrobutyrin (Dhb) Dehydroalanin zu detektieren. Bei einer Desmethylierung an Adda an Position fünf liegt 3-Amino-9-oxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyl-4,6-decadiensäure (⁶dmAdda) vor. Beim desmethylierten Kongener von NOD sind [¹Asp]NOD, [⁸dmAdda] und [⁵Dhb]NOD möglich. Bei einer Desmethylierung an Position eins ist *D*-MeAsp durch *D*-Asp, an Position drei dmAdda anstelle von Adda und an Position fünf Dhb statt Methyldehydrobutyrin (Mdhb) substituiert (Krüger, et al., 2010; Yu, et al., 2009).

Alternative Methoden zur Erfassung, jedoch nicht zur Auftrennung, von MCs sind Bioassays wie Mouse Bioassay, Enzym-linked immunosorbent Assay (ELISA) und Protein-Phosphatase-Inhibitions-Assay (PPIA) (McElhiney, et al., 2005; Msagati, et al., 2006; Sangolkar, et al., 2006)

3. Aufgabenstellung

Kontaminationen von Wasser, Nahrungsmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln durch verschiedene Gattungen von Cyanobakterien stellen weltweit ein ernstes gesundheitliches Problem für Mensch und Tier dar. Vor allem die zyklischen Hepatotoxine Microcystine (MCs) und Nodularine (NODs) werden für die toxischen Effekte verantwortlich gemacht. Bis heute sind bis zu 90 MC- und acht NOD-Varianten bekannt, die sich durch strukturelle Modifikationen unterscheiden (Chorus, et al., 1999). Bisher erfolgt die Überwachung von Gewässern auf die rechtlich relevanten Microcystine MC-LR, MC-RR und MC-YR mit einer HPLC-UV-Vis-Messmethode gemäß der Norm ISO 20179. Jedoch werden hierbei die anderen MCs, NODs und die entsprechenden Desmethyl-Varianten, über deren Struktur-Wirkungsbeziehung wenig bekannt ist, nicht voneinander getrennt und gemeinsam miterfasst (ISO 20179, 2005).

Im Rahmen dieses Projektes sollten deshalb Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und toxikologischer Relevanz der hepatotoxischen MCs und NOD sowie ihrer desmethylierten Strukturvarianten aufgeklärt werden. Die Basis hierfür bildeten toxikologische Testungen der reinen Substanzen aus Kulturen von *Microcystis aeruginosa* und *Nodularia spumigena*.

Es sollten vergleichende Untersuchungen zur Zytotoxizität und zu Wirkmechanismen der Toxizität von Microcystinen und Nodularin sowie ihrer desmethylierten Kongenere durchgeführt werden, um auf der Grundlage toxikologischer Daten eine Einschätzung der Gefährdung für Mensch und Tier mit diesen Toxinen vornehmen zu können. MCs wie MC-LR zeigen ihre Wirkung durch Hemmung von Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2A, was zu einer Hyperphosphorylierung von zellulären Proteinen führt. Dieser Wirkmechanismus durch MCs und NOD könnte für die Langzeit Tumorpromotion in der Leber *in vivo* verantwortlich sein.

Zunächst sollte die Zytotoxizität verschiedener MCs, NOD und desmethylierter Kongenere in Ratten- und Humanhepatozyten in Primärkultur quantitativ erfasst und mit der Hemmwirkung auf die Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2 humanem und tierischen Ursprungs verglichen werden.

Da die Auslösung von Apoptose einen relevanten Wirkmechanismus von MCs und NOD darstellt, wurde mit Hilfe verschiedener molekularbiologischer Methoden auf apoptotische Merkmale analysiert.

Abschließend wurde zeit- und konzentrationsabhängig die Wirkung der Hemmung von PPs auf deren zellulären Regulationsmechanismen untersucht, wodurch ein möglicher Zusammenhang zwischen veränderter zellulärer Signalkette und Tumorpromotion in der Leber gewonnen werden soll.

4. Materialien und Methoden

4.1. Materialien und Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien und Reagenzien stammen von gängigen Firmen wie Applichem (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Merck, (Darmstadt) und Roth (Karsruhe), die Nährmedien von PAA (Cölbe) und alle Verbrauchsmaterialien von Greiner (Frickenhausen), sofern nicht anders angegeben.

Alle Testsubstanzen zur Behandlung der Zellen stammen von der Firma Enzo Life Sciences (Plymouth Meeting, PA, USA) und Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz). Alle nicht kommerziell erhältlichen Microcystine und Nodularine wurden durch die Arbeitsgruppe der Universität Jena aus Cyanobakterienblüten aus *Microcystis aeruginosa* (Senftenberger See, Brandenburg 2005) und aus *Nodularia spumigena* (Ostsee) gewonnen (Ufelmann, et al., 2012). Die Testsubstanzen wurden in DMSO als Lösungsmittel aufgenommen.

4.2. Arbeiten mit primären Hepatozyten

4.2.1. Isolierung primärer Rattenhepatozyten

Die verwendete Wistar-Linie Crl:WI ist ein Auszucht-Rattenstamm, das vom Wistar-Institut in Philadelphia, USA 1947 an die Scientific Products Farm abgegeben wurde. 1975 kam die Rattenlinie von CRUK (*Charles River United Kingdom*) zu Charles River.

Zur Gewinnung primärer Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten (Abbildung 17) mit einem Gewicht von 150-220 g wird eine zweistufige *in situ* Perfusion nach einer von Seglen entwickelten Methode (Seglen, 1976), welche von Vetter und Schmitz modifiziert wurde (Schmitz, 1994), unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

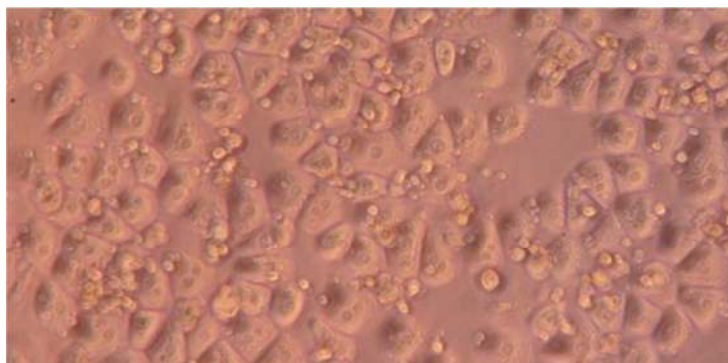


Abbildung 17: Primäre Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten
(Vergrößerung 100x)

Um diese sterilen Bedingungen einzuhalten, werden die verwendeten Glasgeräte, das Präparierbesteck, sowie die Silikonschläuche autoklaviert und die verwendeten Lösungen einer Sterilfiltration unterzogen. Die Perfusionslösungen 1 und 2 werden in einem Wasserbad auf 42 °C, der Waschpuffer auf 37 °C temperiert. Nachdem die Ratte mit 300 µl Pentobarbitallösung/100 g Körpergewicht (entspricht 100 mg/kg KG) *i.p.* anästhesiert wurde, erfolgt die Leberperfusion (Tabelle 3). Die Narkose wird mit dem Bauchmuskelreflextest überprüft. Dabei wird die Schwanzwurzel zusammengedrückt. Wenn die Bauchmuskulatur kontrahiert, ist die Narkose noch nicht wirksam.

Nach vollständiger Narkotisierung wird durch Öffnen des Abdomens bis zum Sternum die Leber freigelegt. Danach werden zwei lose Ligaturen gelegt, eine etwa 1 cm unterhalb der Leberpforte und der *Vena porta* und die zweite um die *Vena cava inferior* oberhalb des Abgangs der rechten *Vena renalis*. Nun wird in die untere Hohlvene (*vena cava inferior*) das Antikoagulans Heparin injiziert, um eine Blutgerinnung zu vermeiden. Die Perfusionslösungen werden in eine Kanüle eingeleitet, mit welcher der Einstich in die Pfortader erfolgt. Danach wird die Ligatur festgezogen und fixiert. Die anschließende Durchtrennung der Hohlvene ermöglicht das Abfließen des Perfusats aus der Leber in den Bauchraum. Dann wird die EGTA-haltige Perfusionslösung 1 mit einer Durchflussrate von 3,6 ml/min hindurchgeleitet, wodurch die Leber entblutet. Anschließend wird noch 10 min mit einer Durchflussrate von 40 ml/min gespült, wodurch dem Gewebe Calciumionen entzogen werden, was zum Auflösen der Desmosomen führt. Eine weitere Venenkanüle, die durch eine zusätzliche Ligatur fixiert wird, wird in das Atrium eingeführt, wodurch nun der Austrag nicht mehr über die *Vena cava inferior*, sondern über die *Vena cava superior* erfolgt. So kann das Perfusat recycelt werden. Während des Perfusionsschrittes wird das Zwerchfell geöffnet, wodurch die Lunge kollabiert und das Tier stirbt.

Danach wird die entblutete Leber mit Perfusionslösung 2 mit Collagenase, welche das Auflösen der extrazellulären Matrix bewirkt, 10 min mit einer Durchflussrate von 20 ml/min gespült. Nun wird die Leber, die eine netzartige Struktur aufweist, herausgenommen, die Leberkapsel unter sterilen Bedingungen über einem Nylontuch der Maschenweite 250 µm mit Hilfe einer Pinzette geöffnet und in ein Becherglas unter Zugabe von 200 ml Waschpuffer filtriert. Der Vorgang wird mit einem feinmaschigen Nylonnetz der Maschenweite 100 µm wiederholt, die erhaltenen Primärhepatozyten werden auf vier 50 ml Falcons verteilt und ca. 5 min bei 21 g und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Danach wird die Waschlösung vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 20-25 ml frischem Waschpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach erneutem Absaugen der Waschlösung werden die Zellen mit je 7-8 ml Waschpuffer resuspendiert und in einem Falcon vereinigt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Perfusionslösungen

Perfusionslösung 1	NaCl (0,1 mM)	31,5 g
	KCl (4 mM)	1,6 g
	MgSO ₄ x 7H ₂ O (1 mM)	1,35 g
	KH ₂ PO ₄ x H ₂ O (1 mM)	0,75 g
	NaHCO ₃ (20 mM)	9,05 g
	HEPES (15 mM)	17,9 g
	Glucose (8 mM)	7,5 g
	EGTA (0,1 mM)	0,19 g
	bidest. H ₂ O	ad 5 l
	pH 7,4	
Sterilfiltration und Sterilkontrolle		
Lagerung bei 4 °C		
Perfusionslösung 2	HEPES (10 mM)	5 ml einer 1 mM-Lösung (pH 7,4)
	DMEM/Ham's F12 (1:1)	ad 500 ml
	Lagerung bei 4 °C, Sterilkontrolle	
	Kollagenase 100 CDU kurz vor Gebrauch zufügen	Einwaage ist für jede Charge zu berechnen
Waschpuffer 1	20 % FKS	100 ml
	HEPES (10 mM)	5 ml einer 1 mM-Lösung (pH 7,4)
	100 U Penicillin/0,1 mg/l Streptomycin	5 ml einer 10000 U Penicillin/10 mg/l Streptomycin-Lösung
	DMEM/Ham's F12 (1:1)	ad 500 ml
	Lagerung bei 4 °C, Sterilkontrolle	
Heparin	1000 U/ml in 0,9 % NaCl	
	Lagerung bei 4 °C, Sterilfiltration	

Pentobarbitallösung	Pentobarbital	33 mg
	bidest. H ₂ O	ad 1 ml
	kurz vor Gebrauch ansetzen	
HEPES	HEPES (1 M)	23,83 g
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 7,4; Sterilfiltration	

4.2.1.1. Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Die Zellzahl der Primärhepatozyten wird lichtmikroskopisch in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer bei einer Vergrößerung von 10x bestimmt. Die Zählkammer besteht aus 4x4 Großquadraten, von denen jedes einen Flächeninhalt von 1 mm² besitzt. Die Kammer hat eine Tiefe von 0,2 mm, wodurch sich das Einschlussvolumen von 0,2 µl für jedes der Großquadrate ergibt.

Es werden 10 µl Zellsuspension mit 990 µl Waschpuffer versetzt (1:100 Verdünnung) und die Kammer bestückt. Unter dem Mikroskop werden drei Großquadrate ausgezählt. Der Mittelwert wird mit dem Verdünnungsfaktor 100 und mit dem Kammerfaktor 8000, der vom Einschlussvolumen auf 1 ml umrechnet, multipliziert und durch den Kammerfaktor 16 dividiert. Das Ergebnis ist die Zellzahl pro ml.

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{Z * 8000 * 100}{16}$$

Z: Gesamtzahl der ausgezählten Zellen

8000; 16: Kammerfaktoren

100: Verdünnungsfaktor

Um die Vitalität zu bestimmen, wird die Kammer mit einer Lösung befüllt, die aus 150 µl Zellsuspension der 1:100-Verdünnung und 150 µl Trypanblau besteht. Das Trypanblau dringt in die Zellen mit geschädigter Membran ein und färbt sie an. Das Verhältnis von lebenden zu toten Zellen gibt Auskunft über die Vitalität. Die Anzahl der lebenden Zellen wird durch die Gesamtzahl dividiert und mit 100 multipliziert, da die Vitalität in Prozent angegeben wird.

Bei den Versuchen betrug die Vitalität mindestens 86%.

4.2.2. Kultivierung und Behandlung primärer Rattenhepatozyten

Um ein optimales Anwachsen primärer Hepatozyten zu gewährleisten, werden die verwendeten Kulturgefäße mit einer dünnen Kollagenschicht überzogen. Dabei wird der Boden der Kulturgefäße mit einer Kollagenlösung (0,5 mg/ml) versetzt und wieder abgenommen, so dass eine hauchdünne Schicht entsteht. Diese Kulturgefäße werden über Nacht in der Sterilbank unter Einwirkung von UV-Licht sowohl getrocknet als auch sterilisiert.

Herstellung einer Kollagenlösung: Um etwa 2 g Kollagenfasern zu erhalten, werden 20 Rattenschwänze gebraucht. Diese werden mit 70 %-igem Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank gehäutet. Die von der Schwanzspitze her herausgezogenen Kollagenfasern werden über Nacht unter Einfluss von UV-Licht getrocknet. Danach werden sie in kleine Stücke geschnitten, durch Reiben zwischen den Fingern aufgespalten und über Nacht in vorgewogenen 90 mm Gewebekulturschalen (GS) unter UV-Licht getrocknet. In diesem Zustand können die Kollagenfasern gut verschlossen bei -20 °C gelagert werden.

Um 500 ml Stocklösung zu erhalten, werden ca. 2 g Kollagenfasern unter sterilen Bedingungen in einen Erlenmeyerkolben überführt und mit bidest. H₂O etwa eine Stunde unter Rühren gewaschen. Die gereinigten Fasern werden für 24 h in 500 ml steril filtrierter 0,1 %-iger Essigsäure unter Rühren gelöst und danach durch eine Zentrifugation bei 3700 rpm für drei Stunden von den nicht gelösten Fasern abgetrennt. Zum Schluss wird der Proteingehalt bestimmt, wobei ungefähr 3 mg/ml zu erwarten sind, und die Arbeitslösung auf einen Proteingehalt von 0,5 mg/ml mit steril filtrierter 0,1 %-iger Essigsäure eingestellt. Die Lösungen werden bei 4 °C gelagert und sind für mindestens sechs Monaten haltbar.

Die Rattenhepatozyten werden entweder in 24-well Platten, 60 mm oder 90 mm GS in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Low glucose (1 g/l) mit L-Glutamin unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin im Brutschrank bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert (Tabelle 4). Für die 24 well Platten werden 1 ml/well, für die 60 mm GS 5 ml/GS und für die 90 mm GS 8 ml/GS Zellsuspension mit 0,1 Mio./cm² ausgesät. Um die Menge an benötigter Suspension pro Platte zu erhalten, wird die Anzahl der wells bzw. GS mit der gewünschten Zellzahl/well bzw. GS multipliziert und durch die Zellzahl/ml dividiert.

$$ml/well \text{ bzw. } PS = \frac{1 * \text{gewünschte Zellzahl}}{\text{vitale Zellzahl/ml}}$$

Tabelle 4: Nährmedium für Rattenhepatozyten

Primärhepatozyten der Ratte	FKS	10 %
	Penicillin/Streptomycin	1 %
	DMEM low glucose	89 %
	Lagerung bei 4 °C	

Nach 2-3 h wird das Medium abgesaugt und durch 1 ml für die 24-well Platten und 2 bzw. 6 ml für die GS frisches Medium ersetzt.

Jeder Versuchsansatz enthält Blankwerte sowie eine Positiv-, Negativ- und Mediumkontrolle und wird unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Weiterhin werden die Zellen mit Applikationssubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt, wobei die Endkonzentration des DMSO im Medium bei 0,1 % (V/V) gehalten wird (Tabelle 5).

Die behandelten Zellen werden für 24 h im Brutschrank bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 5: Substanzkonzentrationen für Rattenhepatozyten

Substanz	[nM]
MC-LR	0,1; 1; 10; 50; 100; 150; 200
³ Asp]MC-LR	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
[⁷ Dha]MC-LR	0,1; 1; 10; 50; 100
MC-RR	0,1; 1; 10; 100
[³ Asp]MC-RR	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
[⁷ Dha]MC-RR	0,1; 1; 10; 100
MC-YR	0,1; 1; 10; 50; 100
dmMC-YR	0,1; 1; 10; 50; 100
MC-HtyR	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
MC-LW	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
MC-WR	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
MC.LY	0,1; 1; 5; 10; 30; 50; 100
MC-LA	0,1; 1; 5; 10; 100
MC-LF	0,1; 1; 5; 10
NOD	0,1; 1; 10; 50; 100; 150; 200
[¹ Asp]NOD:[⁵ Dhb]NOD>10:1	0,1; 1; 10; 50; 100
[¹ Asp]NOD	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 150; 200

4.2.3. Kultivierung und Behandlung primärer humaner Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten in kollagenbeschichteten 96-well Platten wurden von Lonza (Köln) bezogen. Die Zellen werden aus herausgeschnittenen Leberstücken von Patienten, die via PCR negativ auf HIV 1, HCV und HBV getestet wurden, isoliert. Die Vitalität sollte nach Angaben der Firma 80-90 % betragen. Die genauen Spenderdaten und Produktbeschreibung wurden mit jeder Lieferung dokumentiert.

Nach der Lieferung werden frische humane Hepatozyten bei 37 °C, 95 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO₂ in mitgeliefertem phenolrothaltigem Medium inkubiert. Nach 2-3 h wird das Medium abgesaugt und durch 200 µl mit HCM Bullet Kit supplementiertem HBM Basal Medium mit Applikationssubstanzen ersetzt (Tabelle 6 und Tabelle 7).

Tabelle 6: Nährmedium für humane Primärhepatozyten

Humane Primärhepatozyten	HCM™ BulletKit bestehend aus HBM™ und HCM™ SingleQuots Lagerung bei 4 °C	
	HBM™ Medium	Basalmedium ohne Wachstumsfaktoren
	HCM™ SingleQuots	Zusätze und Wachstumsfaktoren (Ascorbinsäure, BSA-FAF, Transferin, Insulin, hEGF, GA-1000) Lagerung bei 4 °C

Jeder Versuchsansatz enthält eine Positiv-, Negativ- und Mediumkontrolle und wird unter gleichen Bedingungen in einer Viererbestimmung durchgeführt. Zur Positivkontrolle wird Saponin mit einer Endkonzentration von 0,1 % verwendet. Als Negativkontrolle dienen Zellen, die anstelle von Saponin mit DMSO 0,1; 0,3 und 0,5 % (V/V) behandelt werden. Weiterhin werden die Zellen mit Applikationssubstanzen verschiedener Konzentrationen versetzt, wobei die Endkonzentration des DMSO im Medium bei 0,1; 0,3 und 0,5 % (V/V) gehalten wird (Tabelle 7).

Die behandelten Zellen werden für 24 h im Brutschrank bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Tabelle 7: Substanzkonzentrationen für humane Hepatozyten

Substanz	[nM]
MC-LR	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600
[³ Asp]MC-LR	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600
[⁷ Dha]MC-LR	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600
MC-HtyR	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 300; 500
MC-LW	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 300; 500
MC-WR	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 300; 500
MC.LY	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 300; 500
MC-LA	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600
NOD	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600
[¹ Asp]NOD	0,1; 1; 5; 10; 50; 100; 200; 400; 600

4.2.4. Resazurinreduktionstest

Mit dem Resazurinreduktionstest kann die Zellvitalität bestimmt werden. Die grundlegende Reaktion, die in Abbildung 18 zu sehen ist, beruht auf der Umwandlung von nichtfluoreszierendem Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin, die in lebenden Zellen in den Mitochondrien und im Zytoplasma unter NADH-Verbrauch stattfindet.

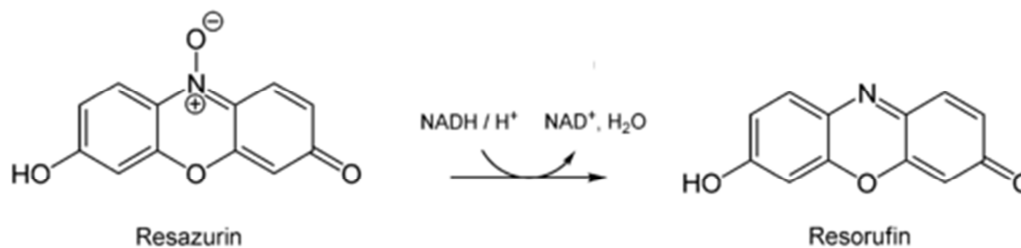


Abbildung 18: Umwandlung von Resazurin zu Resorufin unter NADH-Verbrauch

Zur Messung des Resorufins, das ein Exzitationsmaximum bei 544 nm und ein Emissionsmaximum bei 590 nm besitzt, wurde ein Fluoroscan Ascent Plattenreader (Labsystem) benutzt (O'Brien, et al., 2000).

Unmittelbar vor Gebrauch wird die Resazurin-Arbeitslösung lichtgeschützt hergestellt (Tabelle 8). Das Inkubationsmedium der behandelten primären Human- und Rattenhepatozyten wird nach 24 h abgesaugt und der Zellrasen mit vorgewärmtem PBS⁻ (Tabelle 9) gewaschen. Dann wird 1 ml in 24-well Platten (primäre Rattenhepatozyten) bzw. 200 µl/well in 96-well Platten (primäre Humanhepatozyten) Resazurin-Arbeitslösung

hinzugegeben und für 90 min bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum Schluss werden die 24- bzw. 96-well Platten in den Plattenreader gestellt und bei einer Anregungswellenlänge von 544 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm bei 37 °C vermessen.

Die Vitalität der Zellen wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{M_{B-L}}{M_{K-L}} * 100$$

M_{B-L}: Messwert der behandelten Zellen minus den Blankwert

M_{K-L}: Messwert der Lösungsmittelkontrolle minus den Blankwert

Tabelle 8: Lösungen für Resazurinreduktionstest

PBS⁻ (phosphate buffered saline) calcium and magnesium free	NaCl (137 mM)	8,006 g
	KCl (2,7 mM)	0,201 g
	NaH ₂ PO ₄ (6,5 mM)	0,923 g
	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)	0,204 g
	bidest. H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,4	
	Lagerung bei RT bzw. 4 °C	
Resazurin-Stammlösung	Resazurin	110,5 mg
	Dimethylformamid	1 ml
	Lagerung bei 4 °C; 7 Tage; dunkel	
NaCl/Pi-Puffer	KH ₂ PO ₄	144 mg
	NaCl	9 g
	Na ₂ HPO ₄	528 mg
	bidest. H ₂ O	ad 1 l
	Lagerung bei 4 °C	
Resazurin-NaCl/Pi-Lösung	Resazurin-Stammlösung	
	NaCl/Pi-Puffer	1:1000
	Lagerung bei 4 °C; 4 Wochen; dunkel	

Resazurin-Arbeitslösung

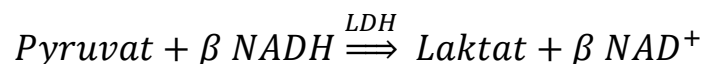
Primäre Rattenhepatozyten	Resazurin-NaCl/Pi-Lösung	
	DMEM low glucose	1:10
	unmittelbar vor Gebrauch; dunkel	

Resazurin-Arbeitslösung

Primäre Humanhepatozyten	Resazurin-NaCl/Pi-Lösung	
	HBM™ Medium	1:10
	unmittelbar vor Gebrauch; dunkel	

4.2.5. LDH-Leakage-Test

Die Abgabe des Enzyms Laktat-Dehydrogenase (LDH) durch Zellen aus ihrem Zytoplasma ist eine sichere Methode zur Bestimmung einer gestörten Membranintegrität. Der LDH-Assay wurde 1963 von Bergmeyer und Bernt entwickelt. Die grundlegende Reaktion beruht auf der Oxidation von β -NADH zu β -NAD⁺ bei der Reduktion von Pyruvat zu Laktat durch das Enzym LDH. Der Rückgang an β -NADH kann durch die Abnahme der Absorption bei 340 nm gemessen werden und steht für die Abgabe an LDH durch die Zellen. Der prozentuale Zelltod berechnet sich durch die LDH-Aktivität im Medium in Bezug auf die Aktivität in allen Zellen. Die Messung erfolgt am Fluoroscan Ascent (Labsystem) bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm (Moran, et al., 1996).



Die Zellernte der primären Rattenhepatozyten erfolgt nach 24 h. Dabei wird 1 ml des Inkubationsmediums in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß (RG) überführt und auf Eis gestellt. Das Inkubationsmedium enthält die Menge an LDH, die durch tote Zellen abgesondert wurde. Das Medium wird bei 1000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert, der Mediumüberstand in ein vorgekühltes RG überführt und bei -20 °C zwischengelagert. Das restliche Inkubationsmedium wird von den GS abgegossen und dreimal mit 4 °C kaltem PBS⁻ gewaschen. Danach werden 800 µl eiskaltes PBS⁻ auf den Zellrasen gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein vorgekühltes RG überführt. Die Zellen werden für 10 min bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wird verworfen, das

Pellet in 400 µl eiskaltem PBS⁻ aufgenommen und für 3-5 Sekunden mit einer Ultraschallsonde (Labsonic, Braun) homogenisiert. Zum Schluss wird bei 4 °C und 9000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand, der nun die Gesamtmenge an LDH der Zellen aufweist, in ein vorgekühltes RG überführt. Beim Überstand handelt es sich um die S9-Fraktion. Alle Proben können bis zur Messung bei -80 °C gelagert werden.

Die bei -80 °C gelagerten Proben werden auf Eis aufgetaut, die benötigten Mengen an β-NADH-Lösung und Pyruvat-Lösung kurz vor Gebrauch hergestellt, die β-NADH-Lösung lichtgeschützt auf Eis gestellt und die Pyruvat-Lösung lichtgeschützt bei RT belassen (Tabelle 9). Von jeder aufgetauten und geschüttelten Probe wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Sowohl von den Mediumüberständen (MÜ) als auch den S9-Fraktionen werden 40 µl/well in eine auf Eis gestellte 96-well Platte pipettiert. Zu den Proben werden 140 µl/well Pyruvat-LDH-Phosphat-Lösung dispensiert, dann wird die Platte geschüttelt und 20 µl/well β-NADH-Lösung dispensiert. Die Messung erfolgt bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm über einen Zeitraum von 3 min im Abstand von 20 Sekunden.

Für jedes well werden zehn Messpunkte generiert, die in einer negativen Steigung die Abnahme an β-NADH beschreiben. Die Steigung wird mit den entsprechenden Verdünnungsfaktoren multipliziert und die LDH-Leakage [%] anhand folgender Formel berechnet. Die Verdünnungsfaktoren betragen für den MÜ 250 und für die S9-Fraktion 50.

$$LDH - Leakage [\%] = \left(\frac{LDH(MÜ)}{LDH(MÜ) + LDH(S9)} \right) * 100$$

Aus der LDH-Leakage wird die Vitalität bezogen auf die Negativkontrolle (Lösungsmittelkontrolle DMSO 0,1 % V/V) berechnet und in Prozent angegeben.

Tabelle 9: Lösungen für LDH-Assay

LDH-Phosphat-Puffer	K ₂ HPO ₄ (50 mM)	4,355 g
	KH ₂ PO ₄ (8 mM)	0,544 g
	bidest. H ₂ O	ad 500 ml
	pH 7,4	
	Lagerung bei 4 °C; 1 Monat	
Pyruvat-Lösung	Pyruvat (48 mM)	52,8 mg
	LDH-Pi-Puffer	ad 10 ml
	unmittelbar vor Gebrauch; auf Eis	

β-NADH-Lösung	β-NADH (3 mM)	21,27 mg
	LDH-Pi-Puffer	ad 10 ml
	unmittelbar vor Gebrauch; auf Eis; dunkel	
Pyruvat-LDH-Pi-Lösung	LDH-Pi-Puffer	
	Pyruvat-Lösung	8:6
	unmittelbar vor Gebrauch; auf Eis	
PBS⁻ (phosphate buffered saline) calcium and magnesium free	NaCl (137 mM)	8,006 g
	KCl (2,7 mM)	0,201 g
	NaH ₂ PO ₄ (6,5 mM)	0,923 g
	KH ₂ PO ₄ (1,5 mM)	0,204 g
	bidest. H ₂ O	ad 1 l
	pH 7,4	
	Lagerung bei RT bzw. 4 °C	

4.2.6. Proteinisolierung-Zelllysat

Die Zellernte primärer Rattenhepatozyten mit Inkubationsmedium in 60 mm GS erfolgt nach 24 h inkubation. Dabei werden die Zellen bei 1000 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert und anschließend zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen. Das Pellet wird mit 200 µl Lysispuffer versetzt (Tabelle 10), resuspendiert, an einer Ultraschallsonde lysiert und für 10 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugiert. Der Überstand wird zur Proteinbestimmung nach Bradford eingesetzt.

Tabelle 10: Lysispuffer für Western Blot

Lysispuffer		
	Tris/HCl (50 mM)	606 mg
	EDTA (15 mM)	558 mg
	NaCl (150 mM)	876 mg
	Triton X-100	100 µl
kurz vor Gebrauch	PMSF (1 mM)	17,4 mg
	Na ₃ VO ₄	18,4 mg
	Protease Inhibitions Cocktail (PIC: 0,5 %)	500 µl
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 8,0	
	Lagerung bei 4 °C	

4.2.7. Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgt mittels unspezifischer Komplexbindung kationischer und nichtpolarer, hydrophober Seitenketten von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brillantblau G 250. Dies bewirkt im sauren Milieu eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm (Bradford, 1976).

Zur Quantifizierung des Proteingehalts wird in einer 96-well Platte eine Kalibriergerade mit je 20 µl BSA (Bovine Serum Albumin) in Triplikaten pipettiert (Tabelle 11).

Tabelle 11: Kalibriergerade mit BSA

Well	µg BSA/well	BSA [mg/ml]
A	10	0,5
B	8	0,4
C	6	0,3
D	4	0,2
E	2	0,1
F	1	0,05
G	0	0

Die Zelllysate werden mit bidest. H₂O 1:20 verdünnt und in Triplikaten je 20 µl/well in eine 96-well Platte pipettiert. Weiterhin wird in jedes well 200 µl einer 1:5 mit bidest. H₂O verdünnten Protein Dye-Lösung (Bio-Rad, München) zupipettiert. Nach 10 min

Inkubationszeit wird die Platte bei 595 nm photometrisch in einem Plattenlesegerät vermessen. Durch die Kalibriergerade mittels Erstellung einer Geradengleichung kann der Proteingehalt errechnet werden.

4.2.8. Fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität

Die Enzymaktivität von Caspasen kann als Marker für Apoptose herangezogen werden (siehe 2.5.7). Dabei wird die Aktivität mittels Spaltung spezifischer Peptidsubstrate, an deren C-terminalen Aspartat-Rest ein Fluorophor gekoppelt ist, analysiert. Die verwendeten Caspasen (Tabelle 12) spalten spezifisch in primären Rattenhepatozyten das Fluorophor 7-Amido-4-trifluormethylcoumarin (AFC) ab (Wudtiwai, et al., 2011; Kottke, et al., 2002). Die erfasste Fluoreszenz der Probe bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm ist somit proportional zur Caspaseaktivität, welche in pmol AFC/min*mg Protein angegeben wird. Der Proteingehalt wird nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) bestimmt.

Tabelle 12: Caspasen

Substrat	Caspase
Ac-IETD-AFC	Caspase 8 (extrinsischer Signalweg; Biomol, Hamburg)
Ac-LEHD-AFC	Caspase 9 (intrinsischer Signalweg; Biomol, Hamburg)
Ac-DEVD-AFC	Caspase 3/7 (Effektor-Caspase; Enzo Life Sciences, Lörrach)

Primäre Rattenhepatozyten in 90 mm GS werden nach 24 h Inkubation mit dem Inkubationsmedium geerntet und für 5 min bei 400 g und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wird in eiskaltem PBS⁻ resuspendiert und erneut zentrifugiert. Zur Aufbereitung werden die Zellen in 500 µl Lysis Puffer (Tabelle 13) aufgenommen, gut gevortext und vier Gefrier-Auftau-Zyklen mit flüssigem Stickstoff und 37 °C warmen Wasser unterzogen. Danach erfolgt eine Zentrifugation für 30 min bei 14000 g und 4 °C. Das Zelllysat wird zu je 80 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert, wobei eines zur Proteinbestimmung verwendet wird. Unter Anwesenheit entsprechender Caspasen in Caspase Reaktionspuffer (Tabelle 13) wird in 96-well Platten bei Em=510-540, Ex=390-400 nm eine Kinetik über 90 min in Intervallen von 5 min bei 37 °C aufgenommen.

Tabelle 13: Caspase Lysis- und Reaktionspuffer

Lysispuffer	HEPES (10 mM)	119,2 mg
	CHAPS (0,1 %)	5 mg
	EDTA (5 mM)	29,2 mg
	bidest. H ₂ O	ad 50 ml
	pH 7,4	
	sterilfiltriert; Lagerung bei -20 °C	
kurz vor Gebrauch	DTT (5 mM)	77 mg/100 ml
	PIC	0,1 %
10x Caspase Reaktionspuffer	PIPES (250 mM)	1,512 g
	CHAPS (2,5 %)	500 mg
	EDTA (50 mM)	292 mg
	bidest. H ₂ O	ad 50 ml
	pH 7,4	
	sterilfiltriert; Lagerung bei -20 °C	
kurz vor Gebrauch	DTT (50 mM)	770 mg/100 ml

Es wird eine AFC-Kalibriergerade mitvermessen, auf die die Caspaseaktivität bezogen wird. Die Substrate werden in einer Konzentration von 1 mM eingesetzt und ein Blank mitgeführt.

Tabelle 14: Pipettierschema für Caspase-Assay

Blank	bidest. H ₂ O	170 µl
	10x Caspase Reaktionspuffer	20 µl
	Substrat in DMSO (1 mM)	10 µl
Probe	bidest. H ₂ O	140 µl
	10x Caspase Reaktionspuffer	20 µl
	Substrat in DMSO (1 mM)	10 µl
	Lysat	30 µl
Kalibriergerade	bidest. H ₂ O	170 µl
	10x Caspase Reaktionspuffer	20 µl
	AFC Standard	10 µl

4.2.9. Chromatinfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)

Bei der Apoptose kondensiert das Chromatin und wird fragmentiert. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI, welches sich in doppelsträngige DNS einlagert, lassen sich Zellkerne fixierter Zellen selektiv anfärben. Apoptotische Zellkerne erscheinen stark kondensiert, halbmond-förmig oder fragmentiert (Hotz, et al., 1994).

Primäre Rattenhepatozyten werden in 60 mm GS ausgesät, nach 24 h das Inkubationsmedium abgekippt und der Zellrasen zweimal mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit Methanol für 15 min bei RT. Nach Abkippen des Methanols werden die Zellen mit DAPI-Färbelösung (Tabelle 15) für 5 min inkubiert. Dabei dient Triton-X 100 der Permeabilisierung der Zellmembran, wodurch der Farbstoff in die Zelle gelangt. Im Anschluss wird zweimal für 5 min mit Methanol gewaschen, an der Luft getrocknet und bis zur Auszählung an einem Fluoreszenzmikroskop im Dunkeln gelagert. Es erfolgt für jede Behandlung eine Doppelbestimmung, es werden 1000 Kerne ausgezählt und der Prozentsatz apoptotischer Zellen als *apoptotic index* berechnet.

Tabelle 15: DAPI-Färbelösung

DAPI-Färbelösung	PBS ⁻ (50 %)	50 ml
	Methanol (50 %)	50 ml
	DAPI	5 µg/ml
	Triton-X 100 (0,1 %)	100 µl
	Lagerung bei 4 °C	

4.2.10. DNS-Fragmentierungs-Analyse („DNA-laddering“)

DNS-Fragmentierung, die während der Apoptose zur Spaltung des Chromatins zwischen den Nukleosomen durch spezifische Nukleasen führt, kann im Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dabei entsteht ein charakteristisches Banden-Muster (*DNA-laddering*) mit Banden von jeweils 200 bp Abstand. Zur Sichtbarmachung der DNS-Leiter wird dem Agarose-Gel Ethidiumbromid, welches mit heteroaromatischen Ringen der Nukleobasen in Wechselwirkung tritt, zugeführt (Zhang, et al., 2000; Huang, et al., 1992).

Zur Isolierung der DNS werden primäre Rattenhepatozyten in 90 mm GS ausgesät und für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienen Zellen, die mit UVC-Licht (50 J/m²) bestrahlt

wurden, und als Negativkontrolle wurden mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 % V/V) behandelte Zellen verwendet.

Das Zellpellet wird in 400 µl TTE Puffer mit 8 µl RNase A-Lösung (50 mg/ml in TTE Puffer) und 8 µl Proteinase K-Lösung (50 mg/ml in TTE Puffer) aufgenommen und gevortext (Tabelle 16). Die Zellsuspension wird für 2-3 h im Wasserbad bei 55°C gestellt, wodurch Proteine und RNS verdaut werden und die DNS vom Chromatin gelöst wird.

Nachdem das Lysat klar ist, wird die DNS einmal mit Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und einmal mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Dabei wird das Lysat mit 400 µl Extraktionslösung versetzt, gründlich gevortext, bei RT für 15 min und 12000 g zentrifugiert und die obere wässrige Phase ohne Interphase in ein RG überführt. Nach Beenden der Extraktion wird die wässrige Phase mit 1 ml -20 °C kaltem 100 %igem Ethanol versetzt und das RG solange über Kopf geschwenkt, bis die DNS ausfällt. Daraufhin wird für 15 min bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet mit 500 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach dem Waschschrift wird das Ethanol restlos entfernt und die DNS an der Luft getrocknet.

Tabelle 16: TTE Puffer

TTE Puffer	Tris (10 mM)	121,1 mg
	Na ₄ EDTA (10 mM)	186 mg
	NaCl (25 mM)	73 mg
	Triton-X 100 (0,2 %)	200 µl
	SDS (20 %ig; 1 %)	5 ml
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 8,0	

Die DNS wird in 30 µl bidest. H₂O über Nacht bei 4 °C gelöst, mit Hilfe des NanoDrops (ND-1000, Peqlab) wird der DNS-Gehalt bestimmt und mit bidest. H₂O auf 500 ng/µl DNS verdünnt. Es werden 10 µl der Lösung mit 5 µl Ladepuffer versetzt und in einem 1,5 %igen Agarose-Gel in TAE-Puffer mit 0,02 % Ethidiumbromid für 2 h bei 90 V elektrophoretisch aufgetrennt (Tabelle 17). Die Detektion der Gele erfolgt durch Anregung mit UV-Licht am Strategene-Eagle-Eye.

Tabelle 17: TE-, Lade- und TAE-Puffer

TE Puffer	Tris (10 mM)	121,1 mg
	Na ₄ EDTA (10 mM)	186 mg
	NaCl (25 mM)	73 mg
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 8,0	
Ladepuffer	Glycerol (30 %) in TE Puffer	
TAE Puffer	Tris (40 mM)	4,844 g
	Na ₄ EDTA (1 mM)	186 mg
	Essigsäure (20 mM)	1,144 ml
	bidest. H ₂ O	ad 1 l
	pH 8,3	

4.2.11. Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der Gelelektrophorese erfolgt eine Auftrennung geladener Teilchen (hier von Proteinen) im elektrischen Feld. Dabei liegen multimere Proteine durch reduktive Aufspaltung der Disulfidbindungen mit dem Thiolalkohol β -Mercaptoethanol als Monomere vor. Durch das Zufügen des anionischen Detergenz SDS wird durch die Bildung von SDS-Polypeptid-Mizellen die Eigenladung der Proteine maskiert, wodurch ein konstantes Masse/Ladeverhältnis entsteht und die Proteine dadurch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Durch das Mitführen von Markerproteinen kann das Molekulargewicht der unbekannt Proteine zugeordnet werden.

Die Verwendung einer diskontinuierlichen Gelelektrophorese ermöglicht im Vergleich zu einer kontinuierlichen Elektrophorese eine höhere Bandenschärfe. Dabei wird die Diskontinuität durch unterschiedliche pH-Werte sowie Porengröße zwischen Sammel- und Trenngel erreicht. Das weitporige Sammelgel weist einen pH-Wert von 6,8 auf, wodurch das vorhandene Glycin als ungeladenes Zwitterion vorliegt. Dieses wandert im Gegensatz zu vorhandenen Chlorid-Ionen langsamer, wodurch sich zwischen den beiden Lauffronten eine Potentialdifferenz bildet. Es entstehen Proteinstapel, die mit gleicher Geschwindigkeit wandern. Erreicht Glycin das engporige Trenngel mit einem pH-Wert von 8,8 bekommt es eine negative Ladung und wandert deshalb schneller. Die engen Poren des Trenngels

bewirken ein Verdichten der Proteinstapel, wodurch diese nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis aufgetrennt werden.

Die Lösung für das Trenngel (Tabelle 18) wird zusammenpipettiert und rasch zwischen zwei Glasplatten in einer vertikalen Gießstandvorrichtung gegossen. Das Trenngel wird mit 70 %igem Isopropanol beschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erhalten. Nach Auspolymerisieren des Gels (ca. 30 min) wird das Isopropanol mit Filterpapier entfernt. Das Trenngel wird mit dem Sammelgel (Tabelle 18) beschichtet und mit einem 10er Probenkamm, welcher die Geltaschen formt, versehen. Nach einem erneuten Auspolymerisieren (ca. 30 min) wird der Kamm wieder entfernt.

Die Proteinproben werden mit bidest. H₂O so verdünnt, dass ein konstanter Proteingehalt vorliegt. Dabei werden 100 µl Probe mit 50 µl 6x Ladepuffer (Tabelle 19) versetzt, für 5 min bei 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und abzentrifugiert.

Tabelle 18: Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Trenngel 12 %	bidest. H ₂ O	1,75 ml
	Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)	1,25 ml
	Acrylamid (30 %)	2 ml
	SDS (10 %)	50 µl
	Ammoniumperoxiddisulfat (APS) (10 %)	50 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2,5 µl
Trenngel 10 %	bidest. H ₂ O	2 ml
	Tris/HCl (1,5 M; pH 8,8)	1,25 ml
	Acrylamid (30 %)	1,65 ml
	SDS (10 %)	50 µl
	Ammoniumperoxiddisulfat (APS) (10 %)	50 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2,5 µl
Sammelgel 5 %	bidest. H ₂ O	1,09 ml
	Tris/HCl (1 M; pH 6,8)	0,5 ml
	Acrylamid (30 %)	0,333 ml
	SDS (10 %)	20 µl
	Ammoniumperoxiddisulfat (APS) (10 %)	20 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2 µl
Sammelgel 4 %	bidest. H ₂ O	1,2 ml
	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	0,5 ml
	Acrylamid (30 %)	0,25 ml
	SDS (10 %)	20 µl
	Ammoniumperoxiddisulfat (APS) (10 %)	20 µl
	Tetramethylethyldiamin (TEMED)	2 µl

Tabelle 19: 6x Ladepuffer für SDS-PAGE

6x Ladepuffer	Tris/HCl (0,5 M; pH 6,8)	50 ml
	SDS	1,244 g
	Glycerin	40 ml
	Bromphenolblau	0,16 g
	β-Mercaptoethanol	5 ml
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	Lagerung bei -20 °C	

Je zwei Gele werden in eine vertikale Kammervorrichtung (Mini Protean III Apparatus, Bio-Rad) eingespannt und mit 1x SDS-Elektrophoresepuffer (Tabelle 20) überschichtet. Es werden 18 µl Probe/Tasche und 5 µl Molekulargewichtsmarker in eine Tasche (Bio-Rad) pipettiert. Zunächst wird eine konstante Spannung von 80 V eingestellt. Nachdem die Lauffront das Trenngel erreicht (ca. 15 min), wird die Spannung auf 100 V erhöht. Nach ca. 2 h, wenn die Lauffront am unteren Ende des Gels ankommt, kann die Elektrophorese beendet werden.

Tabelle 20: 10x Elektrophorese-Puffer

10x Elektrophoresepuffer	Glycin (2 M)	720 g
	Tris (250 mM)	150 g
	SDS (20 %-Lösung)	1 % (V/V) (250 ml)
	bidest. H ₂ O	ad 5 l
	Lagerung bei RT	

4.2.12. Western Blot und Immunoblot

Im Anschluss an die SDS-PAGE erfolgt der Western Blot. Dabei werden die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran in einer Semi-Dry-Apparatur (Hoefer, San Francisco, CA, USA) übertragen.

Die hydrophobe PVDF-Membran (Bio-Rad) mit einer Größe von 6,5 x 9 cm wird in Methanol aktiviert und zuerst in bidest. H₂O und danach in Anodenpuffer II (Tabelle 21) equilibriert. Die Gele werden für 15 min in Kathodenpuffer (Tabelle 21) equilibriert. Weiterhin werden Filterpapiere der Größe 7 x 9,5 cm in entsprechenden Puffern getränkt und nach Abbildung 19 eine Semi-Dry-Blot bestehend aus Filterpapieren, Gel, Membran aufgebaut. Der Blot erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² (45 mA/Membran) für 75 min.

Tabelle 21: Blotting Puffer

Anodenpuffer I	Tris (300 mM)	36,3 g
	Methanol	100 ml
	bidest. H ₂ O	ad. 1 l
	pH-Wert 10,4	
	Lagerung bei RT	
Anodenpuffer II	Tris (25 mM)	3 g
	Methanol	100 ml
	bidest. H ₂ O	ad. 1 l
	pH-Wert 10,4	
	Lagerung bei RT	
Kathodenpuffer	Glycin (40 mM)	3 g
	Tris (25 mM)	3 g
	Methanol	200 ml
	SDS (20 %-Lösung)	250 µl
	bidest. H ₂ O	ad. 1 l
	pH-Wert 9,4	
	Lagerung bei RT	

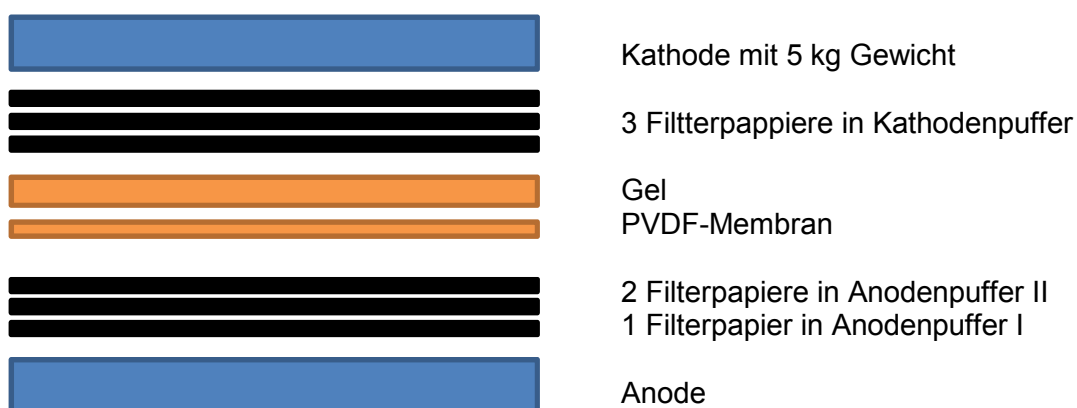


Abbildung 19: Aufbau einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur

Die Membran wird nach dem Blotvorgang für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in einem Blocking Puffer (Tabelle 22) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Im

Anschluss erfolgt ein Immunoblot. Dabei wird zunächst die Membran in ein 50 ml Röhrchen überführt und dreimal 5 min mit TBS-T (*tris buffered saline* mit 0,1 % Tween20) gewaschen (Tabelle 23). Danach wird mit einer Primärantikörperlösung (Tabelle 24) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert, erneut dreimal 5 min mit TBS-T gewaschen und mit einer Sekundärantikörperlösung (goat-anti-rabbit-Meerrettich-Peroxidase (*horse radish peroxidase* (HRP)) oder goat-anti-mouse-HRP 1:5000 in 0,1 % TBS-T) für 1 h bei RT inkubiert. Nach drei weiteren Waschvorgängen mit TBS-T wird mit TBS (Tabelle 23) gewaschen und in TBS bis zur Chemilumineszenz-Detektion aufbewahrt.

Tabelle 22: Blocking Puffer

Blocking Puffer		
TBS		100 ml
Tween-20		100 µl
Milchpulver		5 g

Tabelle 23: TBS und TBS-T

20x TBS		
NaCl (2,6 M)		304 g
Tris (0,4 M)		97 g
bidest. H ₂ O		ad 2 l
pH 7,4 (HCl)		

0,1 % TBS-T		
1x TBS		2 l
Tween-20		2 ml

Tabelle 24: Primärantikörper (Cell Signaling Technologies)

Primärantikörper	Konzentration	Lösung	Dauer
rabbit-anti-β-Aktin	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-p44/42	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-p44/42 (Thr202/Tyr204)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-MEK1/2	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-MEK1/2 (Ser221)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-PathScan Multiplex Western Cocktail II	1:200		
P-p90RSK (Ser380), P-p53 (Ser15), P-p38 (Thr180/Tyr182), P-S6 rP (Ser235/236), eIF4E			
rabbit-anti-p38	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht

Primärantikörper	Konzentration	Lösung	Dauer
rabbit-anti-P-MSK1 (Ser376)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-MSK1 (Ser360) (abcam)	1:5000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-p70 S6 (Thr389)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-p90RSK Sampler Kit P-p90RSK (Ser380), P-p90RSK (Thr359/Ser363) P-p90RSK (Thr573), RSK1/2/3	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-Bax	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-Bcl-2	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-Bcl-xL	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-c-Raf (Ser259)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-Akt (Ser473)	1:1000	0,1 % TBS-T	2 h
rabbit-anti-P-PDK1 (Ser241)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht
rabbit-anti-P-PTEN (Ser380)	1:1000	0,1 % TBS-T	über Nacht

Die Membran wird für ca. 1 min in der Detektionslösung inkubiert (Tabelle 25). Dabei besitzt der Sekundärantikörper das Enzym HRP, welches die Reaktion zwischen Luminol und Wasserstoffperoxid katalysiert. Es entsteht angeregtes 3-Aminophthalat, welches beim Zurückfallen in den Grundzustand Licht emittiert. Dieses Licht kann von einer CCD-Kamera im Lumi-Imager (Roche) registriert werden. Idealerweise werden nur Banden aufgenommen, wo sich ein Protein befindet. Mittels Lumi Analyst von Roche wird eine densitometrische Auswertung möglich.

Tabelle 25: Chemilumineszenz-Detektionslösungen

0,1 M Tris/HCl	Tris (0,1 M)	2,428 g
	bidest. H ₂ O	ad 200 ml
	pH 8,6	
Solution A	Luminol	50 mg
	Tris 0,1 M	200 ml
	Lagerung dunkel bei 4 °C	
Solution B	p-Coumarinsäure	22 mg
	DMSO	20 ml
	Lagerung dunkel bei RT	

kurz vor Gebrauch 10 ml Solution A mit 1 ml Solution B
und 100 µl (1,5 %) H₂O₂

Nach einer Detektion können die vorhandenen Antikörper im Stripping Puffer (Tabelle 26) für 20 min bei 50 °C im Wasserbad abgewaschen werden, wodurch weitere Proteine auf derselben Membran erfasst werden können. Danach wird die Membran sechsmal 5 min mit 0,1 % TBS-T gewaschen, die unspezifischen Bindungsstellen mit Blocking Puffer geblockt und ein weiterer Immunoblot durchgeführt.

Tabelle 26: Stripping Puffer

Stripping Puffer	Tris (62,5 mM)	757 mg
	SDS (20 %ige Lsg.)	2 % (10 ml)
	β-Mercaptoethanol (100 mM)	700 µl
	bidest. H ₂ O	100 ml
	pH 6,7	

4.2.13. Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie (LSM)

Mit der konfokalen Laser Scanning Mikroskopie (LSM) ist es möglich, dass von einer Probe reflektierte oder emittierte Licht aus einer einzigen Ebene zu sammeln. Dabei sorgt eine zur Fokusebene konjugiert angeordnete konfokale Lochblende (Pinhole) dafür, dass sämtliches nicht aus der gewünschten Ebene stammende Licht ausgeblendet wird und somit vom Detektor nicht erfasst wird (Abbildung 20). Dadurch ist die Untersuchung "dicker" Präparate wie biologische Zellen in ihrem Gewebeverbund ermöglicht. Weiterhin gelingt bei Mehrfachfärbungen eine simultane Aufnahme und Darstellung der einzelnen Kanäle bei hinreichender Kanaltrennung. Durch punkt- und zeilenweise Abtasten mit einem Laserstrahl in x-, y- und z-Richtung entsteht ein hochaufgelöstes Abbild der Probe. So lassen sich durch schrittweises Abtasten der Fokusebenen die aufgenommenen Bilder zu einem dreidimensionalen Bildstapel zusammensetzen und anschließend digital verarbeiten (Wilhelm, et al., 2012).

Mit Hilfe der Fluoreszenzfarbstoffe Rhodamin-Phalloidin (565 nm; rot), welches das Aktinnetzwerk anfärbt, und AlexaFluor 488 (488 nm, grün), der als sekundärer Antikörper an primäre Antikörper bindet, wurde eine simultane Erfassung möglich.

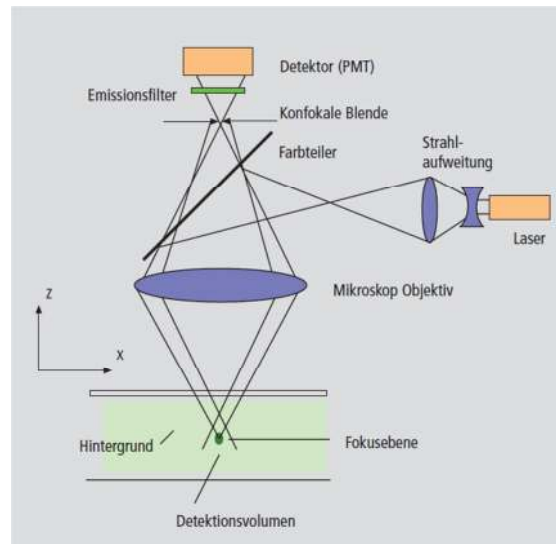


Abbildung 20: Strahlengang in einem konfokalen LSM (Wilhelm, et al., 2012)

Primäre Rattenhepatozyten werden auf kollagenierten Deckgläschen in 24-well Platten ausgesät und für 24 h behandelt. Das Inkubationsmedium wird abgenommen, die Zellen werden mit para-Formaldehyd (4 %ig) für 10 min fixiert und anschließend zweimal mit PBS⁻ gewaschen. Die folgenden Arbeiten werden unter Lichtausschluss durchgeführt. Die Zellen werden zunächst in Blocking Puffer für 1 h und danach mit primärem Antikörper in Carrier Puffer über Nacht bei 4 °C inkubiert (Tabelle 27). Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁻ für je 5 min erfolgen die Behandlung mit sekundärem Antikörper (Tabelle 27) und eine Gegenfärbung des F-Aktins mit Rhodamin-Phalloidin (Invitrogen, 1:1000) in Carrier Puffer für 1 h bei RT. Nach weiteren drei Waschstufen mit PBS⁻ werden die Deckgläschen mit Hilfe einer Kanüle und Pinzette aus den wells herausgehoben und mit selbsthärtendem Eindeckmedium (mit DABCO) auf Objektträger eingedeckelt. Nach einer Stunde bei 4 °C werden die Deckgläschen mit klarem Nagellack am Rand fixiert und bei 4 °C dunkel gelagert.

Tabelle 27: Blocker, Carrier, Antikörper

Blocker	BSA (2,5 % W/V)	2,5 g
	NGS (<i>normal goat serum</i> , 10,5 %)	10,5 ml
	Triton-X 100 (0,3 %)	300 µl
	PBS ⁻	ad. 100 ml

Carrier	BSA (1 % W/V)	1 g
	NGS (1 %)	1 ml
	Triton-X 100 (0,3 %)	300 µl
	PBS ⁻	ad. 100 ml
Primäre Antikörper (Cell Signaling)	anti-rabbit-P-p44/42 (Erk1/2)	1:200
	anti-rabbit-Bcl-xL	1:200
Sekundärer Antikörper (Cell Signaling)	anti-rabbit-AlexaFluor488	1:1000

4.3. Fluorometrische Bestimmung der Proteinphosphatase-Inhibierung

Die Hepatotoxine Microcystine und Nodularine und die DSP (diarrhetic shellfish poisoning)-Toxine wie Okadasäure entfalten ihre toxische Wirkung über die Hemmung der eukaryontischen Proteinphosphatasen, wie PP2A und PP1. Das Prinzip dieses Tests beruht darauf, dass PP2A oder PP1 die Phosphatgruppe eines nichtfluoreszierenden Substrats, in diesem Fall Methylumbelliferylphosphat (MUP), entfernt. Dadurch entsteht das fluoreszierende Methylumbelliferylacetat (MUAacetat), welches nun bei einer Anregungswellenlänge von 355 nm und einer Emissionswellenlänge von 460 nm gemessen werden kann (Mountfort, et al., 1999).

Alle Arbeiten erfolgen lichtgeschützt. In einer 96-well Platte wird eine Kalibriergerade in Triplikaten, wie in Tabelle 28 dargestellt, pipettiert.

Tabelle 28: Kalibriergerade mit MUAcetat

Well	[μ M]	[μ l]
A	100	200
B	80	200
C	50	200
D	30	200
E	10	200
F	5	200
G	1	200
H	0	200 Substratpuffer

Die Wells A4-H12 stehen für die Proben zur Verfügung, wobei eine Aktivitätskontrolle, die 20 μ l Enzym und 180 μ l Substrat (1 mM) enthält und ein Blank mit 20 μ l Enzympuffer und 180 μ l Substrat (1 mM) mitzuführen sind (Tabelle 29). Es werden 1 μ l/well Okadasäure (OA 0,4 μ M) als Positivkontrolle bzw. 1 μ l Applikationssubstanz (Tabelle 30 und Tabelle 31) verschiedener Konzentrationen mit 20 μ l Enzym (0,05 U/well) für 5 min und 30 °C unter Lichtausschluss präinkubiert. Danach werden 179 μ l/well Substrat (1 mM) hinzugefügt, für 1,5 h bei 30 °C lichtgeschützt inkubiert und das entstandene MUAcetat gemessen.

Die Protein-Phosphatase-Aktivität wird in pmol MUAcetat/(mg Protein*min) angegeben.

$$\text{Protein Phosphatase Aktivität [pmol/mg * min]} = \frac{\text{pmol MUAcetat/well}}{\text{mg Protein * 90 min}}$$

Tabelle 29: Lösungen für PPIA

Substratpuffer	Tris/HCl (50 mM)	606 mg
	MnCl ₂ * 4 H ₂ O (0,2 mM)	3,9 mg
	MgCl ₂ * 6H ₂ O (20 mM)	406 mg
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 8,1	
	Lagerung 1 Woche bei 4 °C	
Enzympuffer	Tris/HCl (50 mM)	606 mg
	β -Mercaptoethanol (14 mM)	10 μ l
	Benzamidin-Hydrochlorid (1 mM)	22,8 mg

	PMSF (0,1 mM)	1,7 mg
	EDTA (1 mM)	29,2 mg
	Glycerin 50 % (V/V)	
	bidest. H ₂ O	ad 100 ml
	pH 7	
	Lagerung bei 4 °C	
Methylumbelliferylphosphat (MUP, 6 mM)	MUP* 3H ₂ O	2,1 mg
	Substratpuffer	ad 1 ml
	Lagerung lichtgeschützt und auf Eis	
	kurz vor Gebrauch	
Methylumbelliferylacetat (MUAcetat)	MUAcetat (1 mM)	2,6 mg
	Substratpuffer	ad 12 ml
	Lagerung lichtgeschützt und auf Eis	
	kurz vor Gebrauch	
PP2A (Rinderniere)	0,05 U/well	Biozol (Eching)
PP2A (humane Erythrozyten)	0,05 U/well	Millipore (Schwalbach)
PP1α (Kaninchenmuskel)	0,05 U/well	Calbiochem (Darmstadt)
PP1α (human, rekombinant)	0,05 U/well	Millipore (Schwalbach)

Tabelle 30: Substanzendkonzentrationen für mammalian PP

Substanz	[nM]
MC-LR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
[⁷ Dha]MC-LR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
MC-RR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
[⁷ Dha]MC-RR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
MC-YR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
dmMC-YR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
NOD	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
[¹ Asp]NOD:[⁵ Dhb]NOD	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10
>10:1	

Tabelle 31: Substanzendkonzentrationen für human PP

Substanz	[nM]
MC-LR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
[³ Asp]MC-LR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
[⁷ Dha]MC-LR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
MC-RR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
[³ Asp]MC-RR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
[⁷ Dha]MC-RR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
MC-YR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50
dmMC-YR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
MC-HtyR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
MC-LW	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
MC-WR	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
MC.LY	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100; 200
NOD	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100
[¹ Asp]NOD:[⁵ Dhb]NOD	
>10:1	0,001; 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100

4.4. Statistik

Die Ergebnisse werden mit dem Test nach Nalimov auf Ausreißer untersucht (Gottwald, 2001). Weiterhin wird mit dem GraphPad InStat Programm 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) die statistische Auswertung durchgeführt. Es wurden jeweils mindestens drei unabhängige Messreihen durchgeführt und die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzen der Assays werden mittels *one-way ANOVA (analysis of variance)* gefolgt von einem *Dunnett's post* Test berechnet. Die Ergebnisse, die signifikant von der Kontrolle abweichen ($p \leq 0,05$), sind mit einem Stern (*), diejenigen, die stark abweichen ($p \leq 0,01$), mit zwei Sternen (**) gekennzeichnet. Die *one-way ANOVA* kann ab drei Gruppen herangezogen werden und eignet sich zur statistischen Berechnung einer Signifikanz bei konzentrations- und zeitabhängigen Messungen. Bei der Verwendung des *Dunnett's post* Tests werden die behandelten Gruppen auf eine Kontrollgruppe bezogen. Lineare und sigmoidale Kurven aus mindestens drei unabhängigen Messreihen werden mit Origin 7.5 Software (OriginLab, Northampton, MA, USA) gefittet. Die EC_{50} - und IC_{50} -Werte \pm 95 % Konfidenzintervalle werden aus sigmoidalen Kurvenfitts ermittelt.

5. Ergebnisse

Microcystine und Nodularin vermitteln ihre Toxizität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch eine Hemmung von Serin/Threonin Proteinphosphatasen (PP), indem sie eine kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum des Enzyms eingehen. Eine PP-Inhibierung resultiert in einer erhöhten Phosphorylierung von Targetproteinen, was letztendlich zur Tumorpromotion führen kann (Chorus, et al., 1999).

Zur Bestimmung der strukturabhängigen Zytotoxizität verschiedener MCs, NOD und deren desmethylierter Varianten wurden zwei verschiedene Zytotoxizitätstests herangezogen.

Weiterhin wurden Messmethoden durchgeführt, die die Auslösung apoptotischer Merkmale zeigen.

Mit Hilfe des Proteinphosphatase-Inhibitions-Assays konnte die Hemmwirkung verschiedener MCs, NOD und der desmethylierten Kongenere auf PP1 und PP2A humanem und tierischen Ursprungs untersucht und in Korrelation zu den Zytotoxizitätsdaten gesetzt werden.

Abschließend wurde für MC-LR und NOD konzentrations- und zeitabhängig die Hyperphosphorylierung zellulärer Proteine untersucht, welche auf der Hemmung von PPs beruht. Dadurch soll ein möglicher Zusammenhang zwischen veränderter zellulärer Signalkette und Tumorpromotion in der Leber verdeutlicht werden.

5.1. Zytotoxizität

Um die konzentrationsabhängige zytotoxische Struktur-Wirkungs-Beziehung verschiedener MCs, NOD und der Desmethyl-Varianten auf primäre Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurden der Resazurinreduktionstest und der LDH-Leakagetest, die auf unterschiedlichen Wirkmechanismen beruhen, durchgeführt. Weitere Untersuchungen mittels Resazurinreduktionstest an primären humanen Hepatozyten sollten Aufschluss über die Speziesabhängigkeit geben. Lichtbildaufnahmen der Zellen verdeutlichen die erhaltenen Ergebnisse.

5.1.1. Resazurinreduktionstest und LDH-Leakage-Test in primären Rattenhepatozyten

Primäre Hepatozyten männlicher Wistar-Ratten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen verschiedener MCs, NOD und der desmethylierten Kongeneren für 24 h inkubiert und auf Zytotoxizität geprüft.

Abbildung 21 zeigt in primären Rattenhepatozyten eine statistisch hoch signifikante zytotoxische Wirkung (Tabelle 32) von MC-LR ab 10 nM und [³Asp]MC-LR ab 1 nM und einen statistisch signifikanten Effekt von [⁷Dha]MC-LR ab 10 nM bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %; im Diagramm nicht gezeigt). Eine Inkubation mit 0,1 % Saponin diente für beide Zytotoxizitätstests als Positivkontrolle für eine vollständige zytotoxische Wirkung.

Im Resazurinreduktionstest (A) zeigt die Desmethyl-Variante [⁷Dha]MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 18,9 ± 4,8 nM eine etwa dreifach höhere und [³Asp]MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 2,7 ± 0,4 nM eine mindestens zwanzigfach höhere zytotoxische Wirkung als MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 53,6 ± 11,7 nM (Tabelle 32). Das gleiche Bild ist im LDH-Leakage-Test (B) zu sehen. [³Asp]MC-LR weist mit einem EC₅₀-Wert von 6,8 ± 0,5 nM im Vergleich zu seinen zwei Strukturvarianten die zytotoxischste Wirkung auf. Das Kongener [⁷Dha]MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 36,3 ± 13,2 nM wirkt stärker als MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 90,3 ± 6,3 nM (Tabelle 33). Zusammenfassend betrachtet zeigt sich der Resazurinreduktionstest auf Grund der niedrigeren EC₅₀-Werte sensitiver als der LDH-Leakage-Test (Tabelle 32 und Tabelle 33).

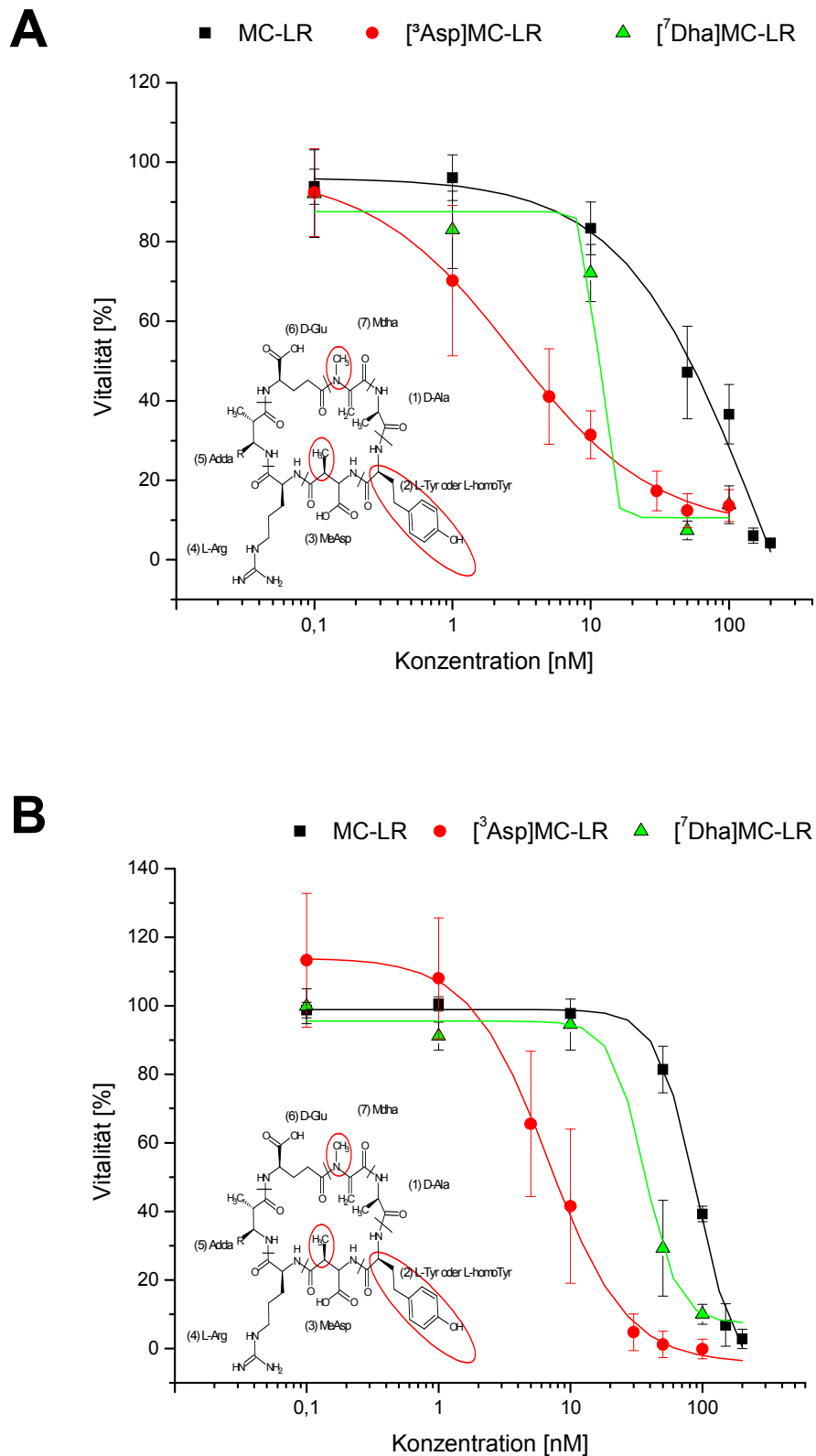


Abbildung 21: Zytotoxizität für MC-LR-Varianten

Zytotoxizität in primären Rattenhepatozyten von MC-LR, [³Asp]MC-LR und [⁷Dha]MC-LR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest (A) und LDH-Leakage-Test (B). MW ± SD; n ≥ 3.

Tabelle 32: EC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem Resazurinreduktionstest in primären Rattenhepatozyten nach 24 h.

Behandlung	EC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall	Konzentrationsabhängige statistisch signifikante Effekte ¹
MC-LR	53,6 ± 11,7	**≥ 10 nM
[³ Asp]MC-LR	2,7 ± 0,4	**≥ 1 nM
[⁷ Dha]MC-LR	18,9 ± 4,8	*1 nM; **≥ 10 nM
MC-RR	> 100	keine Signifikanz
[³ Asp]MC-RR	> 100	keine Signifikanz
[⁷ Dha]MC-RR	> 100	keine Signifikanz
MC-YR	10,1 ± 3,8	**≥ 10 nM
dmMC-YR	10,2 ± 0,8	**≥ 10 nM
MC-HtyR	37,2 ± 5	**≥ 30 nM
MC-LW	1,8 ± 0,3	**≥ 0,1 nM
MC-WR	14,4 ± 2,4	*1 nM; **≥ 30 nM
MC-LY	9,2 ± 1,4	**≥ 10 nM
MC-LA	3,3 ± 0,1	**≥ 1 nM
MC-LF	> 5	**≥ 5 nM
NOD	31,2 ± 7,3	**≥ 50 nM
[¹ Asp]NOD: [⁵ Dhb]NOD > 10 : 1	19,2 ± 9,1	*1 und 5 nM; **≥ 10 nM
[¹ Asp]NOD	> 50	**≥ 10 nM

¹one-way ANOVA und Dunnett's post test,

*signifikant (p ≤ 0,05), **hoch signifikant (p ≤ 0,01)

Tabelle 33: EC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem LDH-Leakage-Test in primären Rattenhepatozyten nach 24 h.

Behandlung	EC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall	Konzentrationsabhängige statistisch signifikante Effekte ¹
MC-LR	90,3 ± 6,3	**≥ 50 nM
[³ Asp]MC-LR	6,8 ± 0,5	**≥ 10 nM
[⁷ Dha]MC-LR	36,3 ± 13,2	**≥ 50 nM
MC-RR	> 100	keine Signifikanz
[³ Asp]MC-RR	> 100	keine Signifikanz
[⁷ Dha]MC-RR	> 100	keine Signifikanz
MC-YR	9,7 ± 2,9	*10 nM; **≥ 50 nM
dmMC-YR	21,4 ± 0,7	**≥ 50 nM
MC-HtyR	> 100	**100 nM
MC-LW	1,6 ± 0,07	**≥ 5 nM
MC-WR	29,8 ± 2,2	**≥ 30 nM
MC-LY	30,1 ± 4,1	**≥ 30 nM
MC-LA	7,3 ± 2,1	**100 nM
MC-LF	> 10	keine Signifikanz
NOD	67,5 ± 2,9	**≥ 50 nM
[¹ Asp]NOD: [⁵ Dhb]NOD > 10 : 1	40,6 ± 1,2	**≥ 50 nM
[¹ Asp]NOD	130,4 ± 69,4	**≥ 50 nM

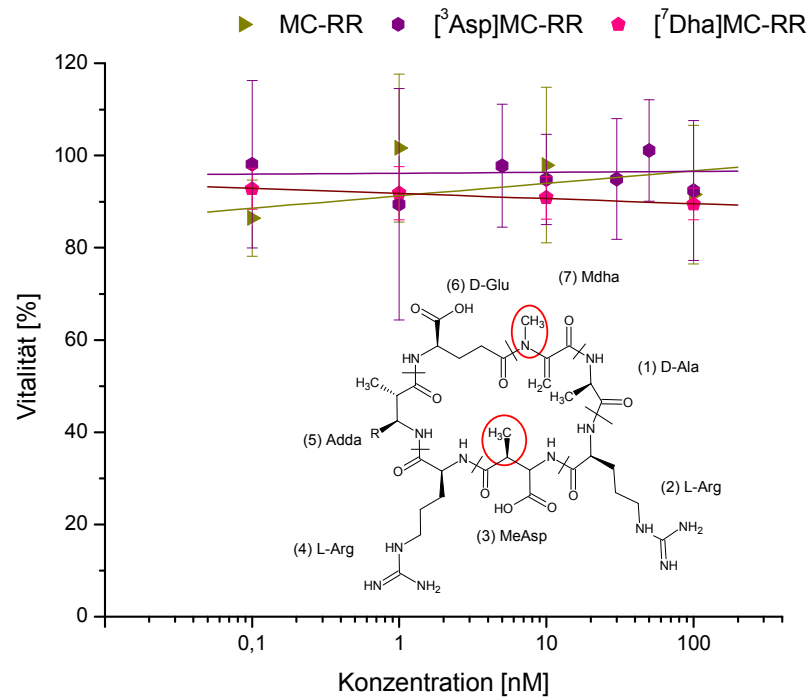
¹one-way ANOVA und Dunnett's post test,

*signifikant (p ≤ 0,05), **hoch signifikant (p ≤ 0,01)

Betrachtet man in Abbildung 22 das Microcystin MC-RR, kann festgestellt werden, dass weder im Resazurinreduktionstest (A), noch im LDH-Leakage-Test (B) nach 24-stündiger Inkubation mit allen drei MC-RR-Kongeneren MC-RR, [³Asp]MC-RR und [⁷Dha]MC-RR ein zytotoxischer Effekt auf primäre Rattenhepatozyten zu sehen ist.

Die Microcystine MC-YR, dmMC-YR, bei welchem die Position der Desmethylierung nicht festgestellt werden konnte (Krüger, et al., 2009; Krüger, et al., 2010), und MC-HtyR besitzen in primären Rattenhepatozyten im Gegensatz zu MC-RR eine zytotoxische Wirkung (Abbildung 23).

A



B

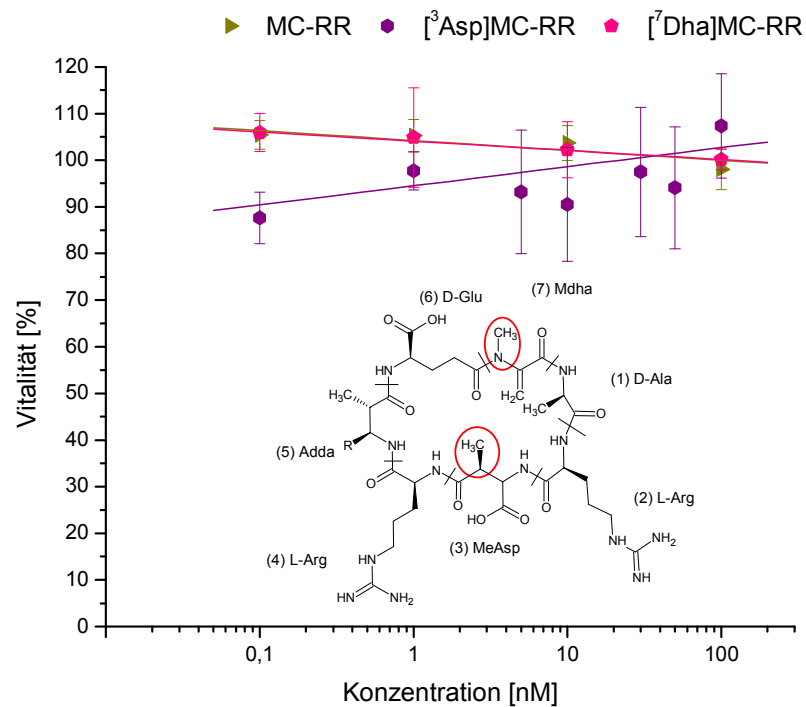


Abbildung 22: Zytotoxizität für MC-RR-Varianten

Zytotoxizität in primären Rattenhepatozyten von MC-RR, $[^3\text{Asp}]$ MC-RR und $[^7\text{Dha}]$ MC-RR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest (A) und LDH-Leakage-Test (B). MW \pm SD; n \geq 3.

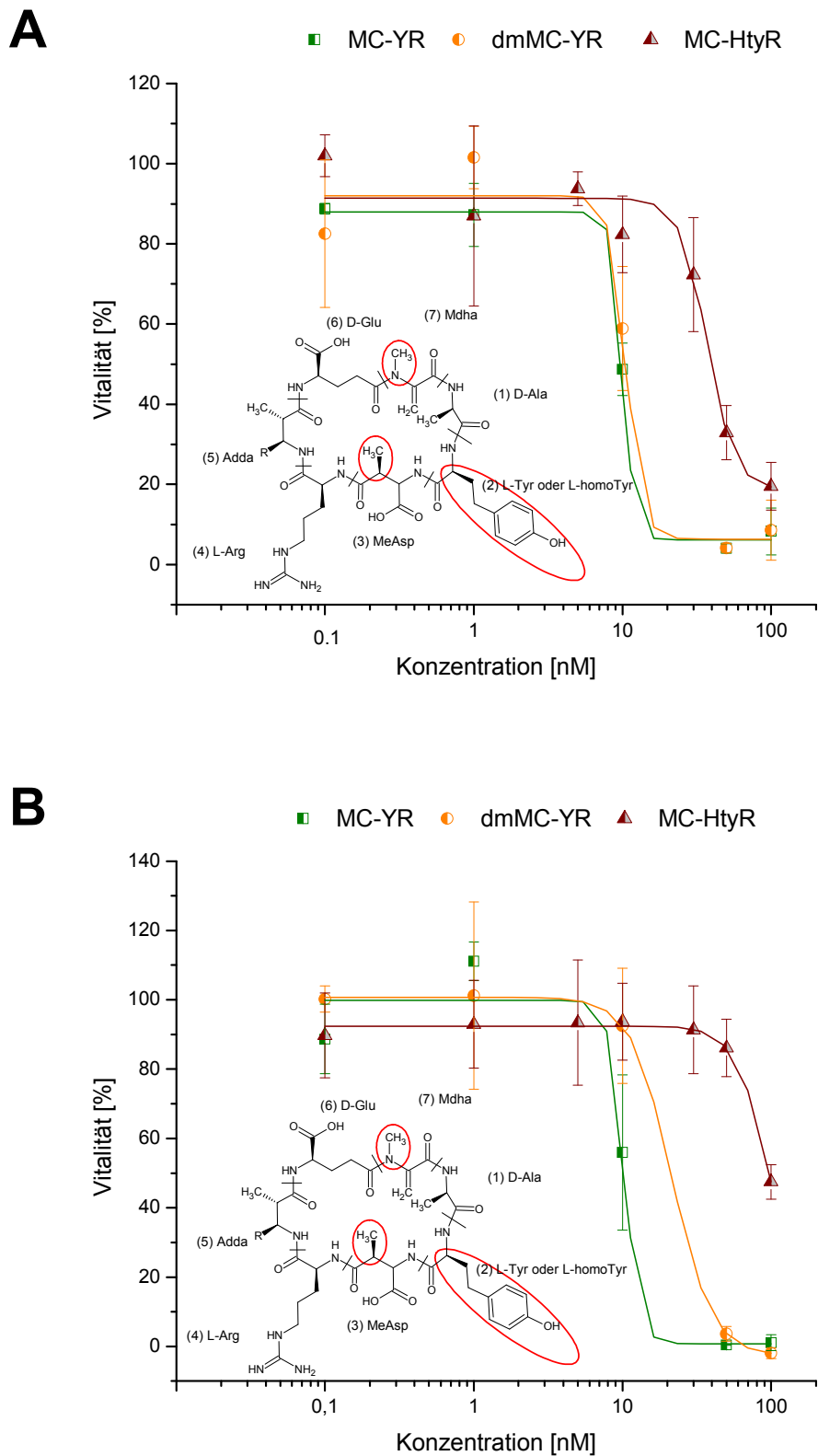


Abbildung 23: Zytotoxizität für MC-YR-Varianten und MC-HtyR
 Zytotoxizität in primären Rattenhepatozyten von MC-YR, dmMC-YR und MC-HtyR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest (A) und LDH-Leakage-Test (B). MW \pm SD; n \geq 3.

Dabei zeigt MC-YR, welches an der zweiten variablen Stelle einer Microcystinstruktur L-Tyrosin aufweist, im Resazurinreduktionstest (A) mit einem EC_{50} -Wert von $10,1 \pm 3,8$ nM eine fünffach höhere Toxizität auf als MC-LR ($53,6 \pm 11,7$ nM) (Tabelle 32). Der LDH-Leakage-Test (B) liefert Ergebnisse, die in die gleiche Richtung gehen. Auch hier erweist sich MC-YR bereits ab einer Konzentration von 10 nM als statistisch signifikant und ab 50 nM als statistisch hoch signifikant zytotoxisch (Tabelle 33). Die Desmethylvariante dmMC-YR, welche [3 Asp]MC-YR, [7 Dha]MC-YR oder [3 Asp, 7 Dhb]MC-YR sein kann (Krüger, et al., 2010; Krüger, et al., 2009), besitzt im Resazurinreduktionstest (A) einen ähnlichen EC_{50} -Wert ($10,2 \pm 0,8$ nM) wie MC-YR ($10,1 \pm 3,8$ nM), im LDH-Leakage-Test (B) weicht dieser leicht ab ($21,4 \pm 0,7$ nM) (Tabelle 32 und Tabelle 33). Bei MC-HtyR steht an der zweiten Position im Microcystinmolekül anstelle von L-Tyrosin L-Homotyrosin. Dieser Austausch der L-Aminosäure führt im Vergleich zu MC-YR zu einer mindestens dreifachen Abnahme der zytotoxischen Wirkung auf primäre Rattenhepatozyten (Tabelle 32 und Tabelle 33).

Betrachtet man in Abbildung 24 weitere Microcystine MC-LW, MC-LY, MC-LA und MC-LF, die an zweiter Position L-Leucin aufweisen und sich durch die L-Aminosäuren an vierter Position unterscheiden, stellt man auch hier unterschiedliche zytotoxische Effekte fest. Sowohl aus den ermittelten EC_{50} -Werten im Resazurinreduktionstest (A) als auch LDH-Leakage-Test (B) kann die Rangfolge MC-LW > MC-LA > MC-LF > MC-LY > MC-LR für die zytotoxische Potenz abgeleitet werden (Tabelle 32 und Tabelle 33).

Die letzte Microcystin-Variante MC-WR (Abbildung 24), welche an zweiter Position im Vergleich zu MC-LR statt L-Leucin und zu MC-RR statt L-Arginin L-Tryptophan aufweist, zeigt im Resazurinreduktionstest (A) bereits ab einer Konzentration von 1 nM einen statistisch signifikanten und bei beiden Tests (A und B) ab 30 nM einen statistisch hoch signifikanten toxischen Effekt auf. Alle in Abbildung 24 getesteten Microcystine sind hinsichtlich der ermittelten EC_{50} -Werte zytotoxischer als MC-LR (Tabelle 32 und Tabelle 33).

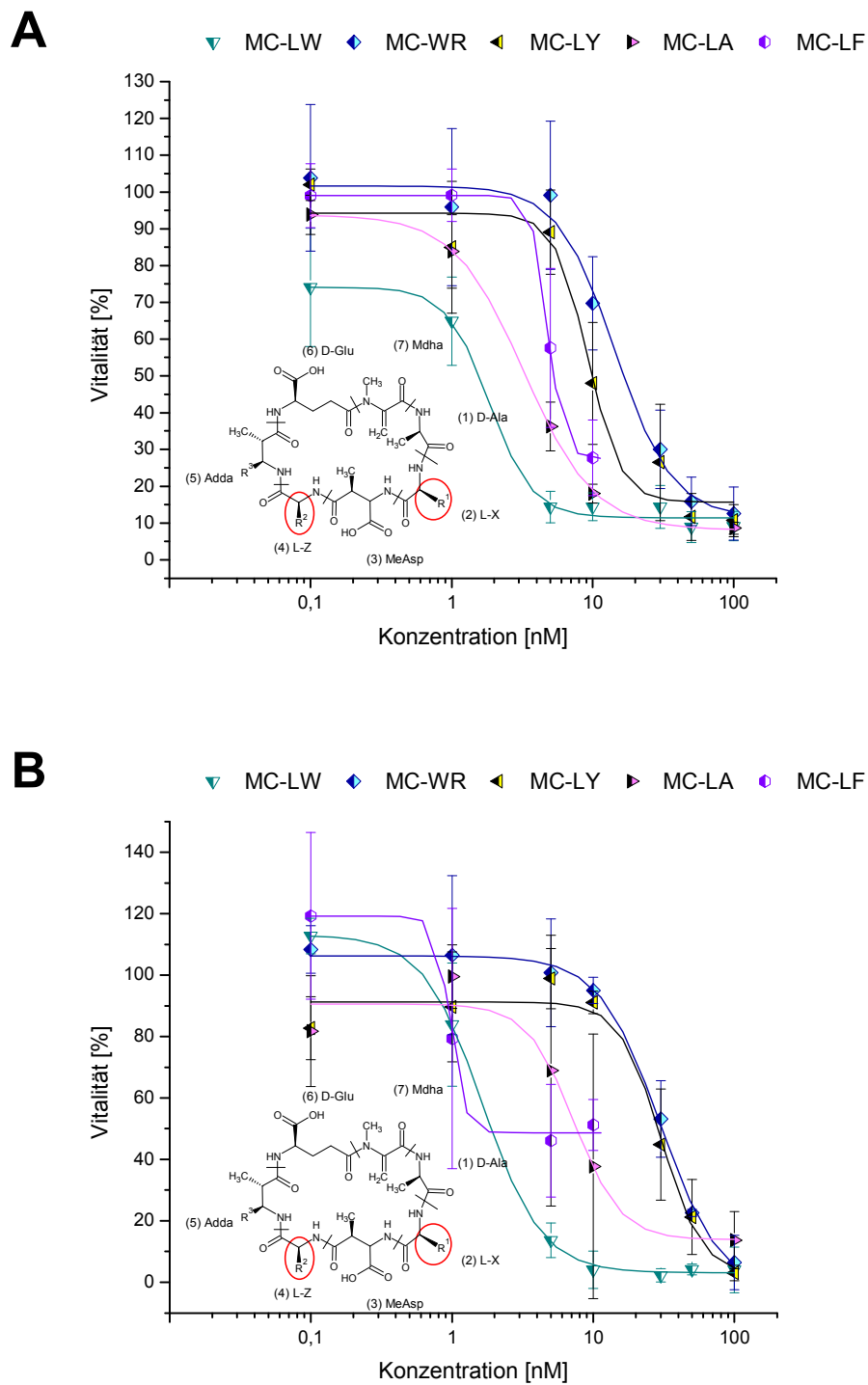


Abbildung 24: Zytotoxizität für MC-LW, -WR, -LY, -LA, -LF
 Zytotoxizität in primären Rattenhepatozyten von MC-LW, MC-WR, MC-LY, MC-LA und MC-LF
 verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V)
 im Resazurinreduktionstest (A) und LDH-Leakage-Test (B). MW \pm SD; n \geq 3.

Abbildung 25 zeigt die Zytotoxizität von NOD und der desmethylierten Varianten
 $[^1\text{Asp}]\text{NOD} : [^5\text{Dhb}]\text{NOD} > 1 : 10$, welches als Gemisch anfänglich auf Zytotoxizität getestet

wurde, und [¹Asp]NOD, das nach dessen Isolierung (AG Luckas, T. Krüger, Jena) für weitere Versuche diente.

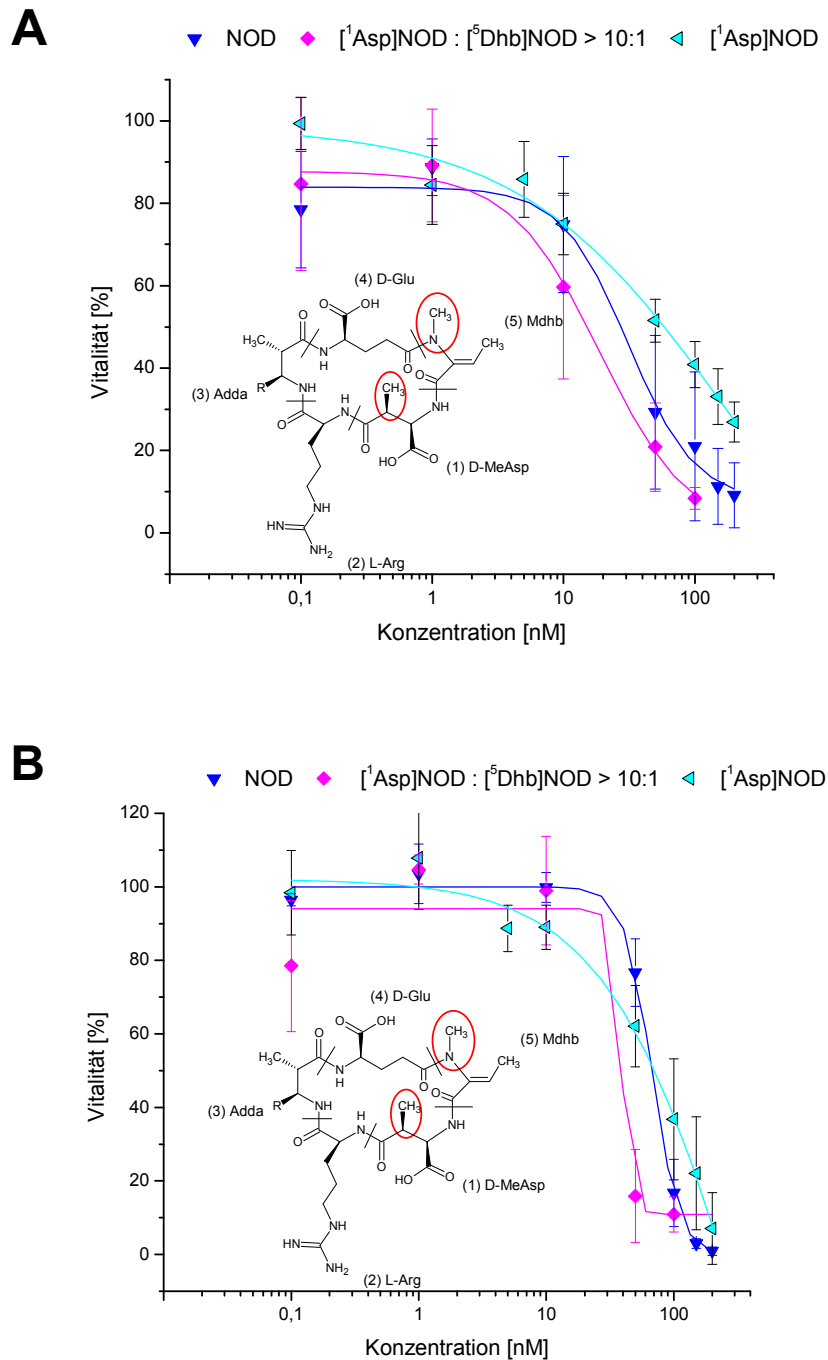


Abbildung 25: Zytotoxizität für NOD-Varianten

Zytotoxizität in primären Rattenhepatozyten von NOD, [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 1 : 10 und [¹Asp]NOD verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest (A) und LDH-Leakage-Test (B). MW ± SD; n ≥ 3.

Dabei erweist sich das Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 1 : 10 sowohl im Resazurinreduktionstest (A) mit einem EC₅₀-Wert von 19,2 ± 9,1 nM als auch im LDH-

Leakage-Test (B) mit einem EC_{50} -Wert von $40,6 \pm 1,2$ nM als zytotoxischste NOD-Variante. Interessanterweise wirkte das rein isolierte Kongener $[^1\text{Asp}]\text{NOD}$ mit einem EC_{50} -Wert von >50 nM (A) und $130,4 \pm 69,4$ nM (B) auf die Vitalität der primären Rattenhepatozyten am schwächsten. Vergleicht man NOD mit MC-LR, zeigen beide ab einer Konzentration von 50 nM eine statistisch hoch signifikante toxische Wirkung auf primäre Rattenhepatozyten, NOD verhält sich aber anhand der ermittelten EC_{50} -Werte in beiden Zytotoxizitätstests (A und B) marginal wirksamer (Tabelle 32 und Tabelle 33).

In Abbildung 26 ist eine lineare Korrelationsanalyse zwischen EC_{50} -Werten aus dem LDH-Leakage-Test und Resazurinreduktionstest in primären Rattenhepatozyten dargestellt. Dadurch kann die zytotoxische Wirkung anhand zwei unabhängiger Tests gezeigt werden.

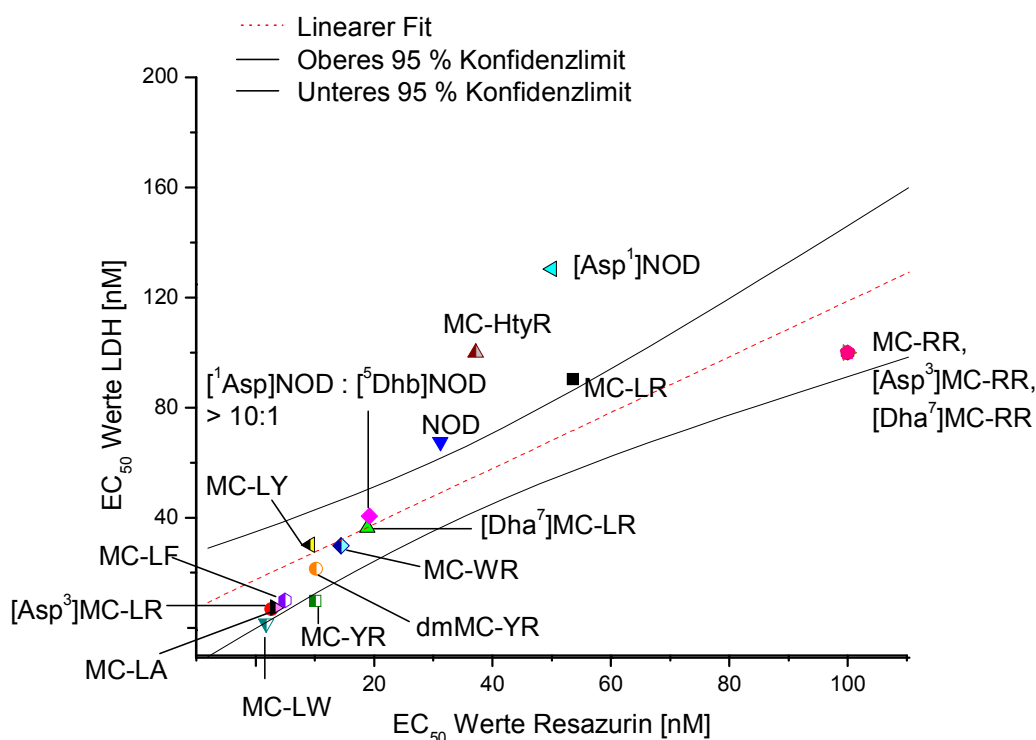


Abbildung 26: Linearer Fit der EC_{50} -Werte in primären Rattenhepatozyten
Lineare Korrelationsanalyse zwischen EC_{50} -Werten aus dem LDH-Test und Resazurinreduktionstest mit 95 % Konfidenzlimit.

Dabei zeigt ein Vergleich der EC_{50} -Werte beider Zytotoxizitätstests (Abbildung 26) für nahezu alle getesteten MCs eine lineare Abhängigkeit mit einem schmalen Konfidenzintervall. Eine leichte Abweichung zeigen MC-YR, MC-LR und NOD. Da MC-HtyR und $[^1\text{Asp}]\text{NOD}$ im Resazurinreduktionstest mit EC_{50} -Werten von $37,2 \pm 5$ nM und > 50 nM in hohem Maß zytotoxischer wirken als im LDH-Leakagetest mit EC_{50} -Werten von > 100 nM und

130,4 ± 69,4 nM weichen diese sehr stark vom linearen Bereich ab. Eine eindeutige Aussage bezüglich der Zytotoxizität von MC-HtyR und [¹Asp]NOD bis zu einer getesteten Konzentration von 200 nM kann demnach nicht getroffen werden.

5.1.2. Resazurinreduktionstest in primären Humanhepatozyten

In primären Humanhepatozyten können ähnliche Schlüsse in Bezug auf die Verteilung der zytotoxischen Wirkung durch MC-LR-Varianten gezogen werden. Abbildung 27 zeigt, dass die desmethylierte Variante [³Asp]MC-LR, die bei den Konzentrationen 5 und 10 nM statistisch signifikant und ab einer Konzentration von 50 nM statistisch hoch signifikant die Vitalität der Humanhepatozyten verringert, mindestens 50fach zytotoxischer ist als MC-LR (Tabelle 34). Dagegen erweist sich [⁷Dha]MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 159,8 ± 11,9 nM als etwas geringer toxisch als MC-LR mit einem EC₅₀-Wert von 119,1 ± 14,6 nM.

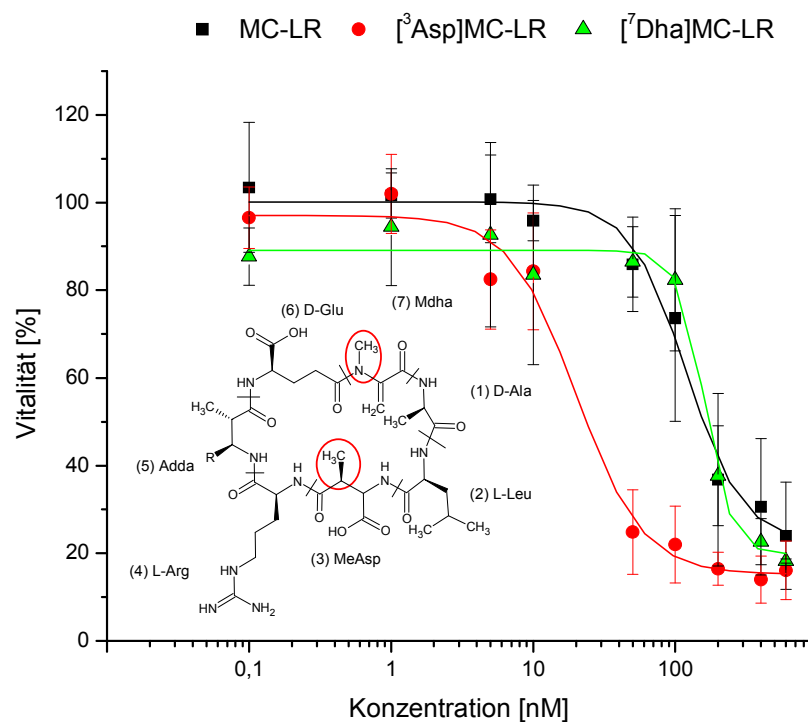


Abbildung 27: Zytotoxizität für MC-LR-Varianten
Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten von MC-LR, [³Asp]MC-LR und [⁷Dha]MC-LR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest, MW ± SD; n ≥ 3.

Tabelle 34: EC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus Resazurinreduktionstest in primären humanen Hepatozyten nach 24 h.

Behandlung	EC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall	Konzentrationsabhängige statistisch signifikante Effekte ¹
MC-LR	119,1 ± 14,6	*100 nM; **≥ 200 nM
[³ Asp]MC-LR	20,1 ± 4,2	*5 und 10 nM; **≥ 50 nM
[⁷ Dha]MC-LR	159,8 ± 11,9	**≥ 200 nM
MC-LW	5,3 ± 0,6	**≥ 1 nM
MC-LY	106,2 ± 9,6	**≥ 50 nM
MC-LA	16,8 ± 2,2	*1 nM; **≥ 5 nM
MC-WR	> 500	**≥ 100 nM
MC-HtyR	> 500	**≥ 200 nM
NOD	77,2 ± 2,2	**≥ 50 nM
[¹ Asp]NOD	> 600	**≥ 600 nM

¹one-way ANOVA und *Dunnett's post test*,

*signifikant (p ≤ 0,05), **hoch signifikant (p ≤ 0,01)

In Abbildung 28 sind drei Microcystin-Kongenere, die sich in der variablen L-Aminosäure an Position vier unterscheiden, dargestellt (Abbildung 9). Dabei kann auf Grund der ermittelten EC₅₀-Werte die gleiche Rangfolge des zytotoxischen Effekts für MC-LW > MC-LA > MC-LY ≥ MC-LR auf Humanhepatozyten wie auf Rattenhepatozyten im Resazurinreduktionstest abgeleitet werden (Tabelle 34).

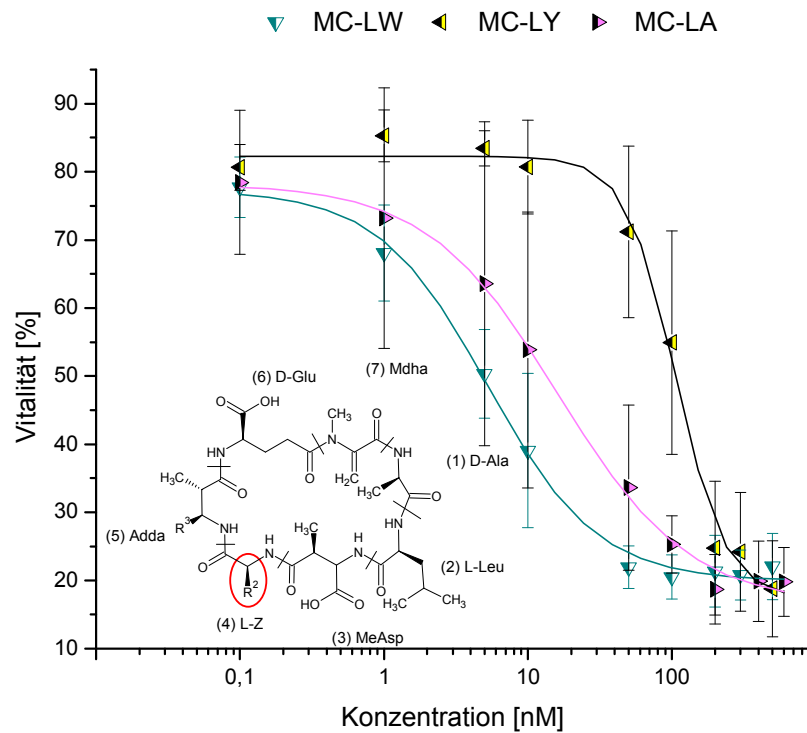


Abbildung 28: Zytotoxizität für MC-LW, -LY, -LA
 Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten von MC-LW, MC-LY und MC-LA verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest, MW \pm SD; n \geq 3.

Für die zwei Microcystine MC-WR und MC-HtyR (Abbildung 29), welche sich von MC-LR durch die variablen L-Aminosäuren an Position zwei unterscheiden, konnten für die Behandlung primärer Humanhepatozyten im Resazurinreduktionstest wegen fehlenden hohen Konzentrationen kein EC_{50} -Werte abgeleitet werden, weshalb dieser als > 500 nM angezeigt wird. Eine statistisch hoch signifikante Minderung der Vitalität wurde für MC-WR ab 100 nM und für MC-HtyR ab 200 nM erreicht (Tabelle 34).

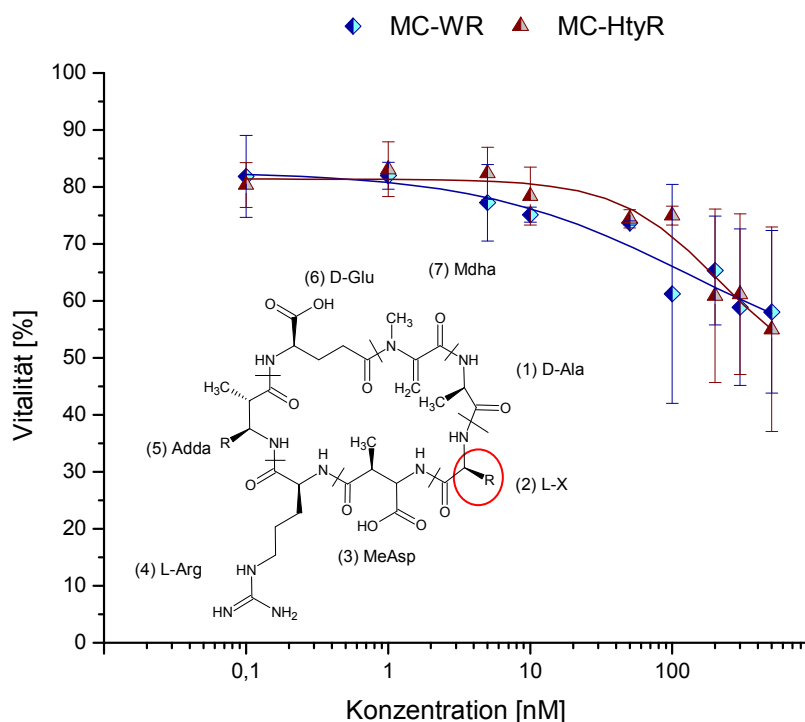


Abbildung 29: Zytotoxizität für MC-WR und MC-HtyR

Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten von MC-WR und MC-HtyR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest, MW \pm SD; $n \geq 3$.

In Abbildung 30 ist für primäre humane Hepatozyten im Resazurinreduktionstest NOD und die desmethylierte Variante [¹Asp]NOD dargestellt. Das Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 1 : 10 war in den benötigten Konzentrationen nicht mehr vorhanden, weshalb es bei den Testungen in humanen Hepatozyten wegfiel. Für NOD wurde ein EC₅₀-Wert von 77,2 \pm 2,2 nM und eine statistisch hohe Signifikanz der Vitalitätsabnahme ab 50 nM ermittelt. [¹Asp]NOD zeigte erst in der höchst getesteten Konzentration von 600 nM einen statistisch hoch signifikanten Effekt, weshalb auch der EC₅₀-Wert auf > 600 nM festgesetzt wurde (Tabelle 34).

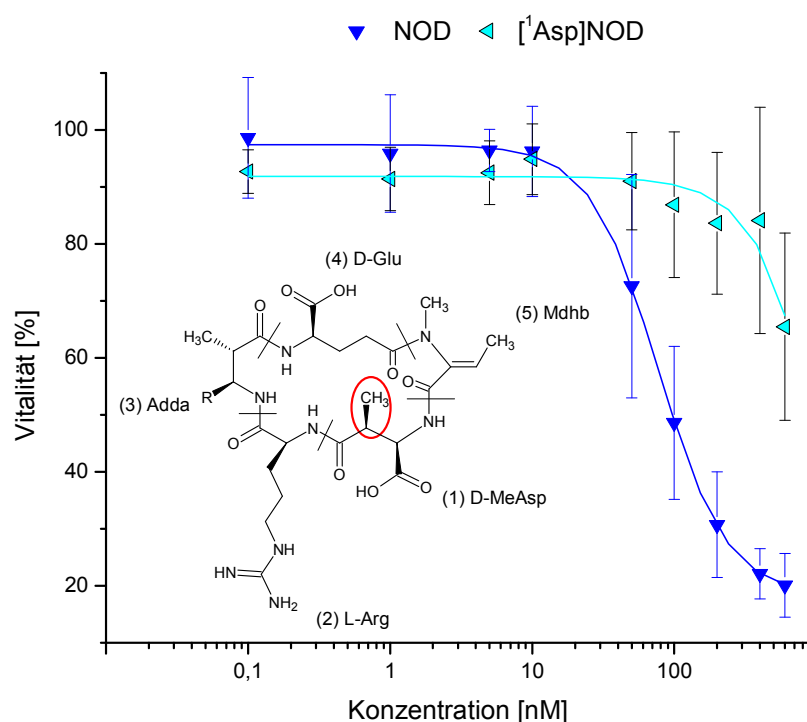


Abbildung 30: Zytotoxizität für NOD-Varianten

Zytotoxizität in primären humanen Hepatozyten von NOD und [¹Asp]NOD verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) im Resazurinreduktionstest, MW ± SD; n ≥ 3.

In primären humanen Hepatozyten ist die Zytotoxizität im Resazurinreduktionstest hinsichtlich der höheren EC₅₀-Werte geringer als in primären Rattenhepatozyten. Während MC-LR in Humanhepatozyten einen EC₅₀-Wert von 119,1 ± 14,6 nM aufweist, hat es in Rattenhepatozyten einen EC₅₀-Wert von 53,6 ± 11,7 nM. Trotzdem zeigt MC-LR einen statistisch signifikanten zytotoxischen Effekt bei einer Konzentration von 100 nM und eine statistisch hoch signifikante Wirkung ab 200 nM (Tabelle 34). Diese Feststellung der geringeren Sensitivität der Humanhepatozyten bleibt für alle getesteten MCs und NODs konsistent (Tabelle 35).

Trägt man die EC₅₀-Werte für primäre Human- und Rattenhepatozyten aus dem Resazurinreduktionstest linear auf (Abbildung 31), zeigt sich ein relativ breites Konfidenzintervall. Dabei liegen [³Asp]MC-LR, [⁷Dha]MC-LR, MC-LA, MC-LW und MC-LY nahe dem linearen Bereich und wirken demnach im Resazurinreduktionstest konsistent zytotoxisch. Eine starke Abweichung zeigen MC-HtyR, [¹Asp]NOD und MC-WR, da diese in Rattenhepatozyten in Relation stärker zytotoxisch wirken als in humanen Hepatozyten. MC-LR und NOD weichen ebenfalls stark vom linearen Bereich ab, interessanterweise zeigen diese in Relation einen stärkeren zytotoxischen Effekt in humanen Hepatozyten.

Tabelle 35: EC_{50} -Werte ($MW \pm SD$ aus $n \geq 3$) aus Resazurinreduktionstest in primären Human- und Rattenhepatozyten nach 24 h im Vergleich.

Behandlung	EC_{50} (nM) \pm 95 % Konfidenzintervall in primären humanen Hepatozyten	EC_{50} (nM) \pm 95 % Konfidenzintervall in primären Rattenhepatozyten
MC-LR	119,1 \pm 14,6	53,6 \pm 11,7
[³ Asp]MC-LR	20,1 \pm 4,2	2,7 \pm 0,4
[⁷ Dha]MC-LR	159,8 \pm 11,9	18,9 \pm 4,8
MC-LW	5,3 \pm 0,6	1,8 \pm 0,3
MC-LY	106,2 \pm 9,6	9,2 \pm 1,4
MC-LA	16,8 \pm 2,2	3,3 \pm 0,1
MC-WR	58 \pm 15,7	14,4 \pm 2,4
MC-HtyR	> 500	37,2 \pm 5
NOD	98,2 \pm 1,2	31,2 \pm 7,3
[¹ Asp]NOD	> 600	> 50

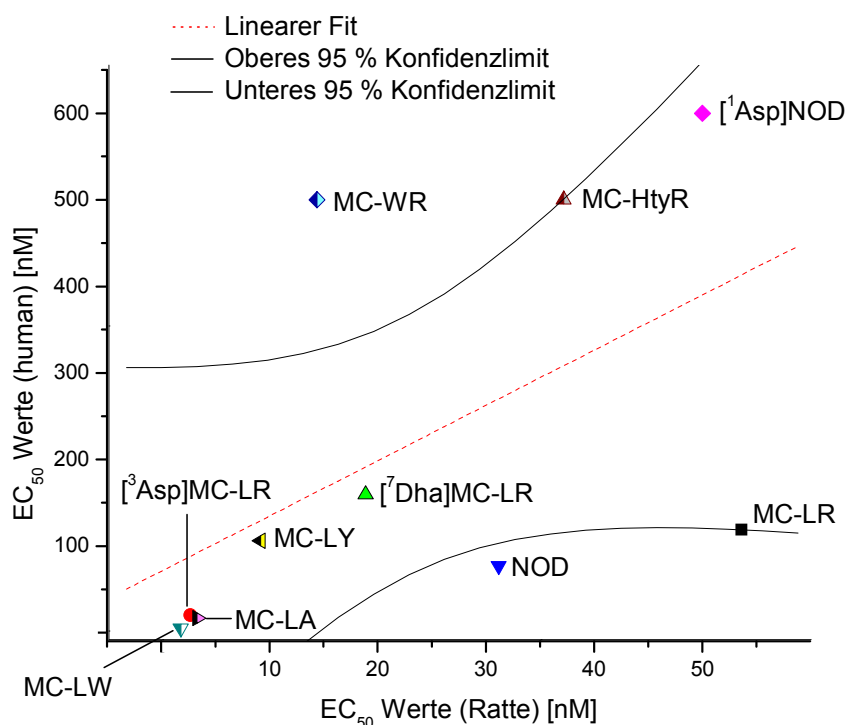


Abbildung 31: Linearer Fit der EC_{50} -Werte in primären Human- und Rattenhepatozyten
Lineare Korrelationsanalyse zwischen EC_{50} -Werten aus dem Resazurinreduktionstest mit 95 %
Konfidenzlimit.

5.2. Caspase-Aktivitäten und Nukleäre Apoptose

Die Auslösung von Apoptosen durch MCs und NOD ist ein relevanter Wirkmechanismus. Durch die Inhibierung von Proteinphosphatasen 1 und 2A in einem CaMKII-abhängigen Prozess kommt es zu vermehrter Phosphorylierung von Proteinen und dadurch zu Apoptosen (Fladmark, et al., 1999). Während der Apoptose werden so genannte Caspasen, Cystein-abhängigen Proteasen, proteolytisch aktiviert und lösen so Caspase-Kaskaden aus, die zum Untergang der Zelle führen. Dabei gibt es zwei Wege: Der Extrinsische führt über Aktivierung von Todesrezeptoren zur Aktivierung von Caspase 8, der Intrinsische beruht auf einer Störung der Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und damit verbundenen Freisetzung von Cytochrom c, wodurch die Caspase 9 aktiviert wird. Diese Initiator-Caspasen aktivieren wiederum proteolytisch die Effektor-Caspasen 3 und 7 (Budihardjo, et al., 1999). Durch Auslösung der Apoptose kommt es letztendlich zur Aktivierung verschiedener Nukleasen, welche zunächst zu typischen Merkmalen wie Zellschrumpfung, Verlust an Zell-Zell-Kontakt, Knospung der Zelloberfläche und Kondensation des Chromatins führt. Danach wird die nukleare DNS in mono- und oligonukleosomale DNS-Fragmente der Größe 200 bp und Vielfaches davon gespalten (Kanzler, et al., 2000; Zhang, et al., 2000).

Um in primären Rattenhepatozyten durch MC-LR und NOD konzentrationsabhängig nach 24 h ausgelöste Apoptosen zu verdeutlichen, wurden drei Untersuchungen herangezogen. Die Aktivität der Caspasen 9, 8 und 3/7 wurde dabei fluorometrisch bestimmt. Zelllysate wurden mit für die unterschiedlichen Caspasen spezifischen Tetrapeptid-Substraten inkubiert, an denen ein Fluorophor (AFC) gekoppelt ist, welches proteolytisch durch aktivierte Caspasen abgespalten wird. Die Menge an freigesetztem AFC ist ein Maß für die Aktivität der entsprechenden Caspasen. Für Caspase 8 wurde das Substrat Ac-IETD-AFC, für Caspase 9 Ac-LEHD-AFC und für die Effektor-Caspasen 3/7 Ac-DEVD-AFC verwendet.

Nukleäre Apoptose wurde zum einen mit einer Chromatinfärbung mittels DAPI untersucht, zum anderen wurde ein sogenanntes *DNA-laddering* gezeigt. Als Positivkontrolle diente 50 J/m² UVC-Licht (100-259 nm), da es in verschiedenen Zelltypen über verschiedene Signalwege dosisabhängig Apoptose induziert. DNS weist ein Absorptionsmaximum von 260 nm auf und liegt somit im Bereich der UVC-Strahlung. Aus diesem Grund dient UVC-Strahlung als Mittel für Untersuchungen von zellulären Antworten auf DNS-Schädigung (Batista, et al., 2009).

5.2.1. Caspase-Assay

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit MC- und NOD-Varianten in den Konzentrationen 0,1 - 200 nM für 24 h behandelt und im Anschluss die Caspase-Aktivitäten fluorometrisch bestimmt. Als Negativkontrolle wurde für 24 h mit DMSO 0,1 % und als Positivkontrolle (in Abbildungen nicht dargestellt) mit UVC-Licht (50 J/m²) inkubiert. Dabei wurden für die UVC-Bestrahlung für Caspase 9 ein Wert von ca. 40 pmol AFC/min*mg Protein, für Caspase 8 ein Wert von ca. 20 pmol AFC/min*mg Protein und für Caspase 3/7 ein Wert von ca. 300 pmol AFC/min*mg Protein erreicht (in Abbildungen nicht dargestellt).

In Abbildung 32 ist für alle drei untersuchten Caspasen eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Aktivitäten bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) zu sehen. MC-LR (A) bewirkt bei der Initiator-Caspase 9 eine statistisch hoch signifikante oder signifikante Aktivitätssteigerung um etwa das Dreifache ab einer Konzentration von 50 nM, auch die Caspase 8 zeigt einen gleichen Trend, der jedoch keine statistische Signifikanz aufweist. Die ausführenden Caspasen 3 und 7 weisen eine etwa zehnfach höhere basale Aktivität auf als die Initiator-Caspasen und für MC-LR (A) eine Erhöhung ab 10 nM auf, welche bei 200 nM statistisch signifikant ist. Für die desmethylierte Variante [⁷Dha]MC-LR (B) ist ein ähnlicher Trend festzustellen, der jedoch nicht so ausgeprägt ist wie bei MC-LR. Die Untersuchung zweier weiterer desmethylierter MC-Varianten (Abbildung 33) [⁷Dha]MC-RR (A) und dmMC-YR (B) zeigte keine statistisch signifikanten Anstieg der Caspase-Aktivitäten, wobei für dmMC-YR ein schwacher Aktivitätsanstieg der Caspasen 8 und 3/7 zu beobachten ist, der bei einer Konzentration von 50 nM ausgeprägter wird. Die Untersuchung höherer Konzentrationen konnte auf Grund mangelnder Substanzmenge nicht durchgeführt werden.

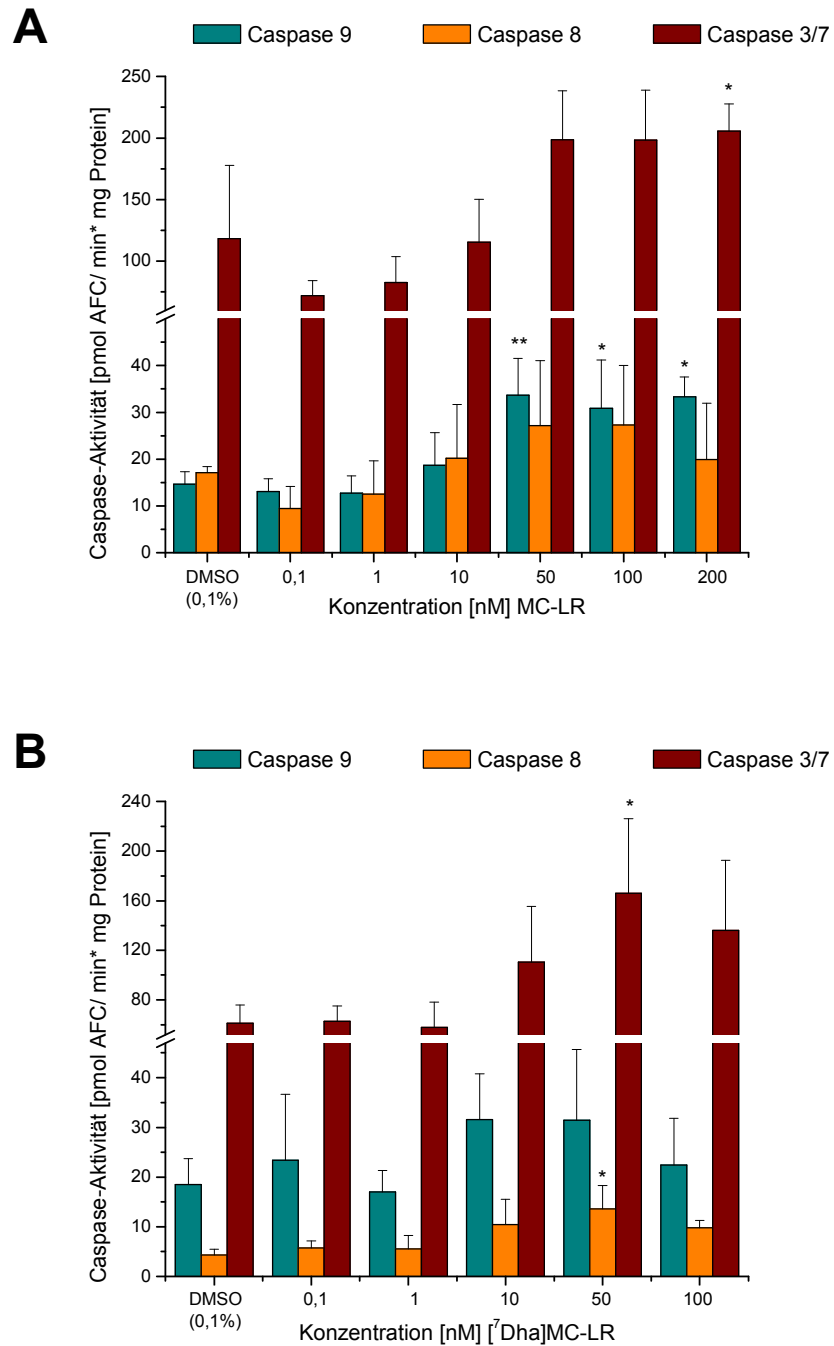


Abbildung 32: Caspase-Aktivität für MC-LR-Varianten
 Relative Caspase-Aktivitäten in primären Rattenhepatozyten von MC-LR (A) und [⁷Dha]MC-LR (B) verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). MW ± SD aus n=4. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01.

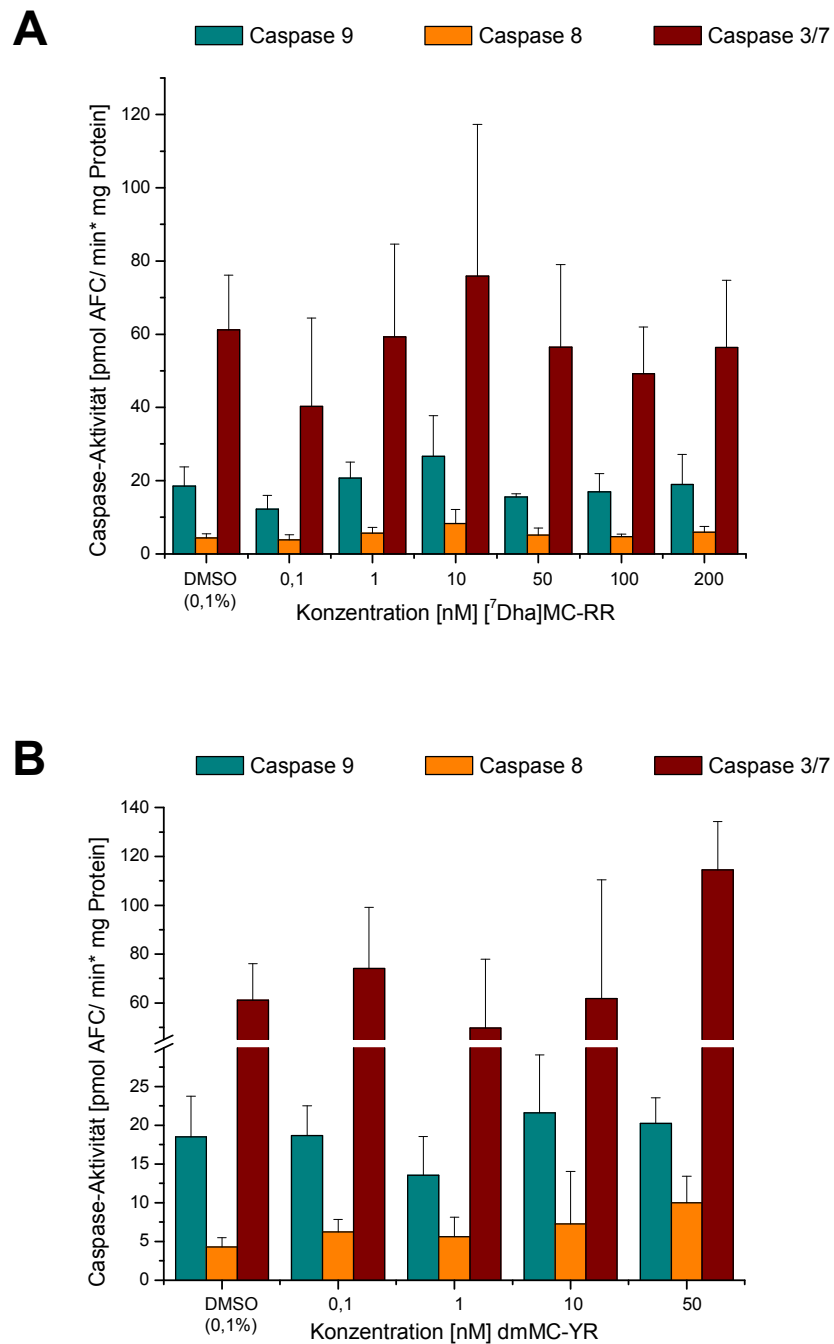


Abbildung 33: Caspase-Aktivität für MC-Varianten
 Relative Caspase-Aktivitäten in primären Rattenhepatozyten von [7Dha]MC-RR (A) und dm]MC-YR (B) verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). MW \pm SD aus n=4. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

Weiterhin wurde der Versuch mit NOD (A) und dem Gemisch [1Asp]NOD : [5Dhb]NOD > 10 : 1 (B) durchgeführt (Abbildung 34).

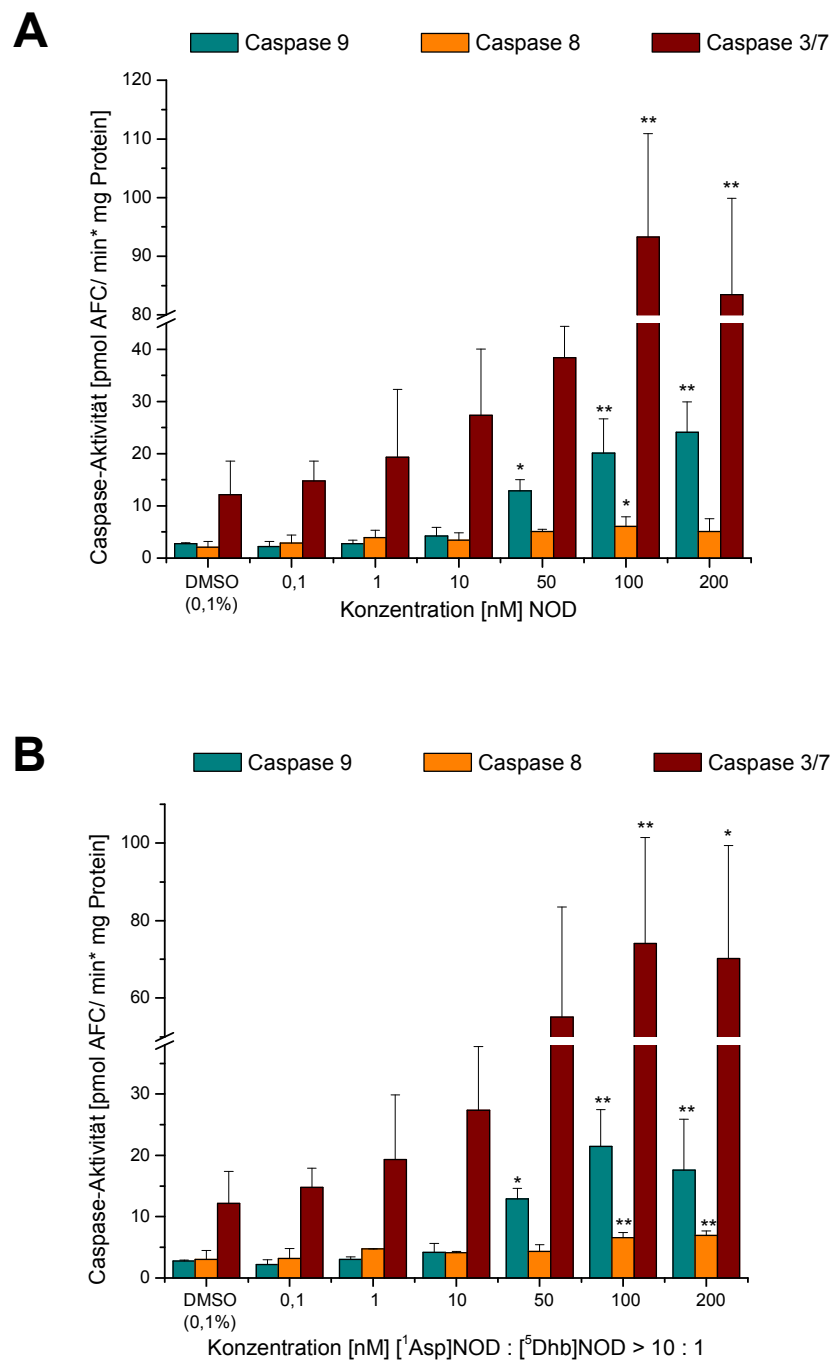


Abbildung 34: Caspase-Aktivität für NOD-Varianten
Relative Caspase-Aktivitäten in primären Rattenhepatozyten von NOD (A) und [1Asp]NOD : [5Dhb]NOD > 10 : 1 (B) verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). MW \pm SD aus n=4. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

Beide Substanzen zeigen zu MC-LR eine ähnlich starke Wirkung auf die Induktion der Caspasen. Für alle drei Caspasen wird eine Erhöhung der Aktivitäten beobachtet, wobei in diesem Fall Caspase 8 die schwächste Induktion erfährt, die ab 100 nM statistisch signifikant

(A) oder hoch signifikant (B) ist. Die Caspase 9-Aktivität, die um das Drei- bis Vierfache höher ist als die der Caspase 8, zeigt für beide untersuchten NODs eine fünf- bis sechsfache statistisch signifikante Erhöhung bei 50 nM und eine statistisch hoch signifikante bei 100 nM. Der Anstieg der Effektor-Caspasen 3 und 7 kann bereits ab einer Konzentration von 1 nM verdeutlicht werden, wobei dieser ab 100 nM statistisch hoch signifikant wird.

Vergleicht man die Potenz von MC-LR (Abbildung 32, A) mit NOD (Abbildung 34, B), kann festgehalten werden, dass für die Effektor-Caspasen 3 und 7 in Bezug auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %) eine etwa gleich hohe Induktion zu sehen ist. Der Unterschied liegt in den Aktivitäten der Caspase 8 und 9. Während für MC-LR bezogen auf DMSO (0,1 %) beide Caspasen ähnlich stark auf das Doppelte induziert werden, kommt es bei NOD zu einer Verdreifachung der Aktivität von Caspase 8 und einer zehnfach höheren Induktion für Caspase 9.

5.2.2. DAPI-Färbetest

Der Einfluss auf die durch MC-LR und NOD induzierte Apoptose in primären Rattenhepatozyten nach 24 h wurde anhand einer Chromatinfärbung mittels DAPI untersucht, bei der der Prozentsatz apoptotischer, d. h. stark kondensierter, fragmentierter oder halbmondförmiger, Zellkerne erfasst wird. Im ersten Bild in Abbildung 35 sind runde Zellkerne der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) mit Eu- und Heterochromatin zu sehen. Die Apoptoserate lag dabei um 1 %. Im zweiten Bild nach Bestrahlung der primären Rattenhepatozyten mit UVC-Licht (50 J/m^2) zeigen rote Pfeile mehrere charakteristische apoptotische Zellkerne.

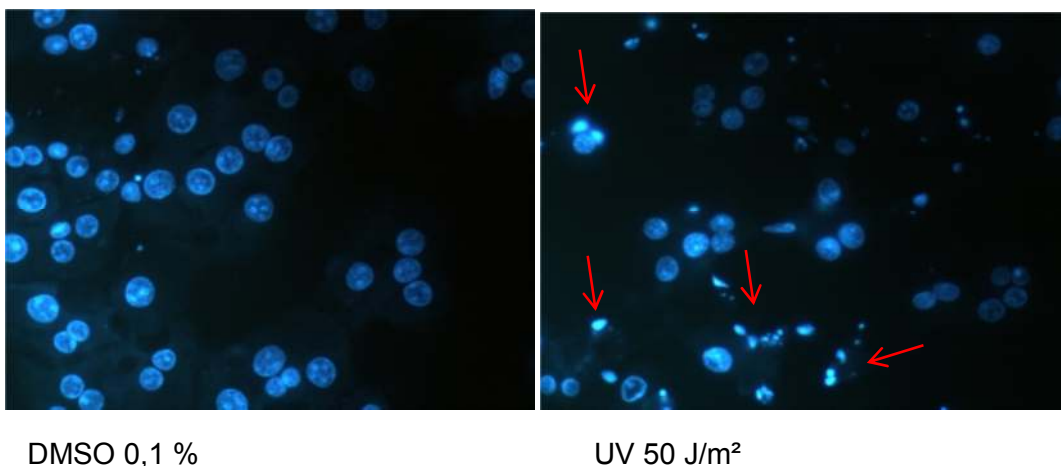


Abbildung 35: DAPI-Färbung von Kontrollen

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chromatinfärbung unbehandelter Zellen (DMSO 0,1 % V/V) und mit UVC-Licht (50 J/m^2) bestrahlter Zellen nach 24 h. Rote Pfeile zeigen apoptotische Zellkerne. (400x).

Die 24-stündige Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit MC-LR zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme einer nukleären Apoptose (Abbildung 36 und Abbildung 37), welche ab einer Konzentration von 100 nM statistisch signifikant wird.

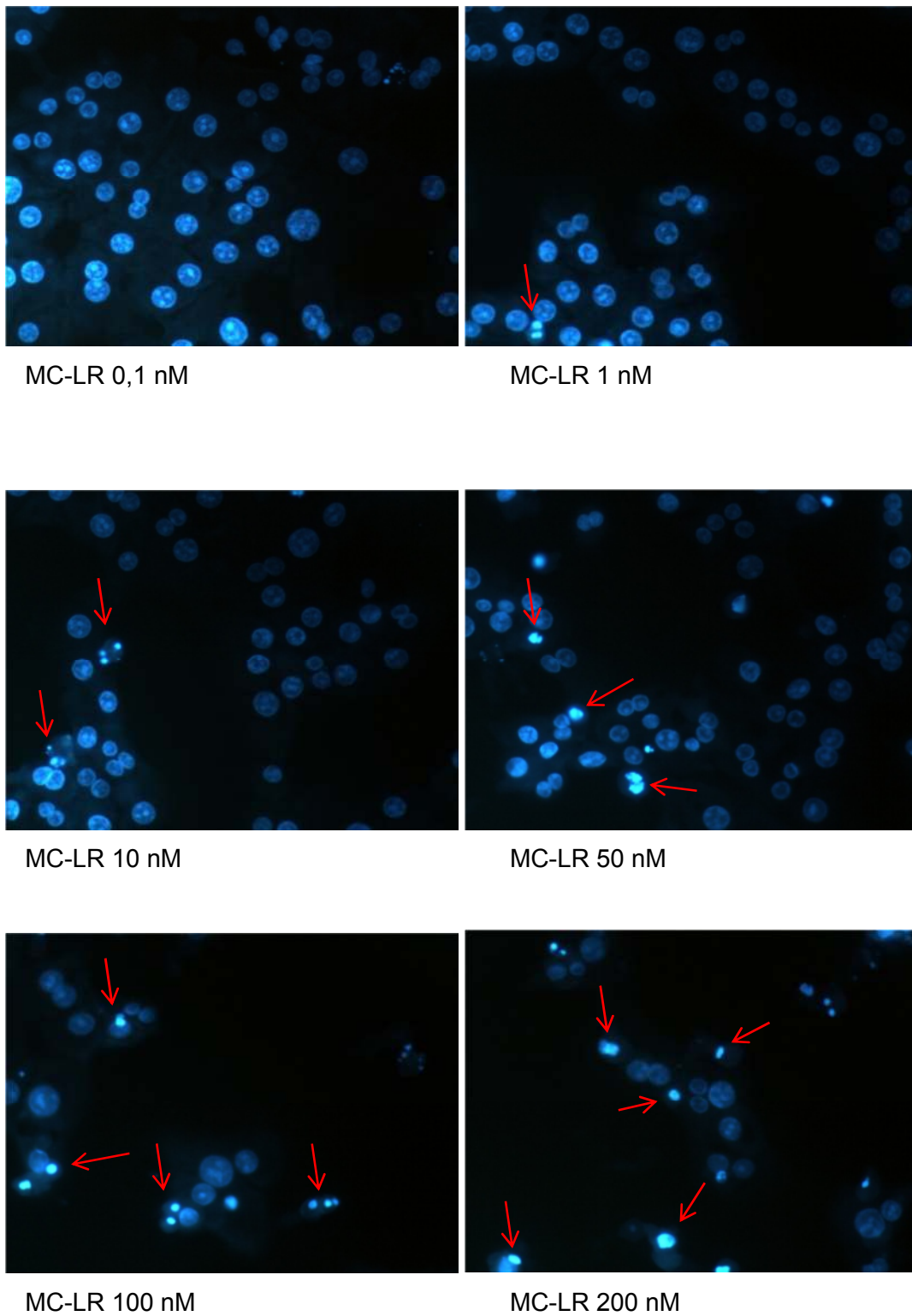


Abbildung 36: DAPI-Färbung mit MC-LR
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chromatinfärbung von mit MC-LR verschiedener Konzentrationen inkubierter Zellen nach 24 h. Rote Pfeile zeigen apoptotische Zellkerne. (400x).

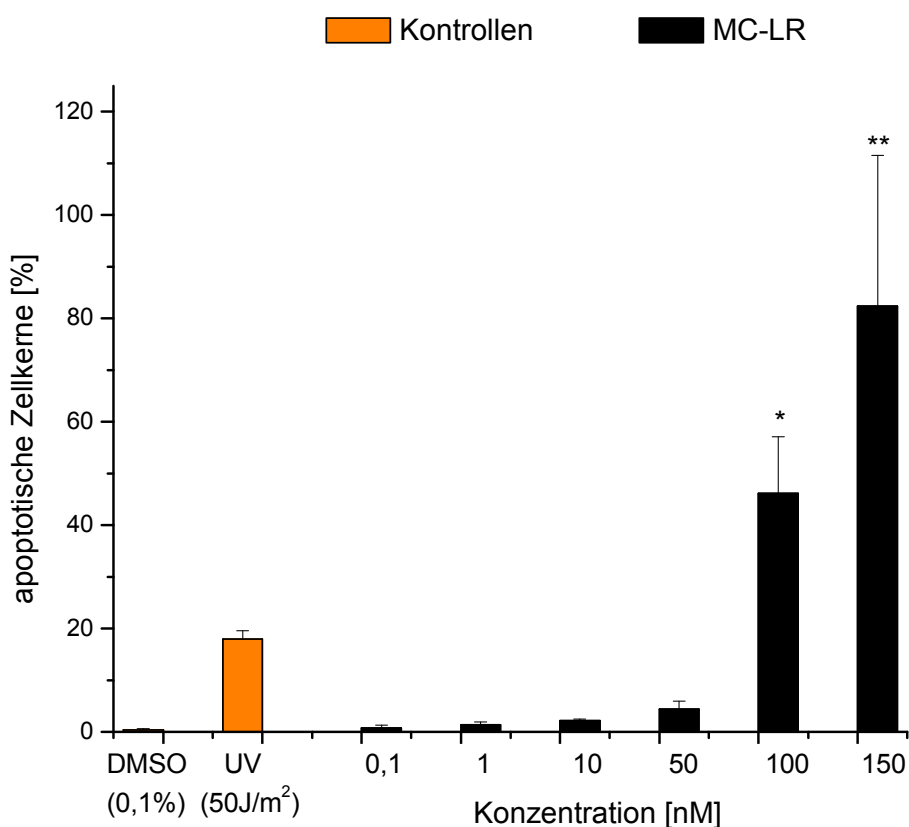


Abbildung 37: Nukleäre Apoptose durch MC-LR

Prozentuale Anzahl apoptotischer Zellkerne in primären Rattenhepatozyten von MC-LR verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). MW \pm SD aus n=3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

Eine Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit NOD verschiedener Konzentrationen zeigt im DAPI-Färbetest (Abbildung 38 und Abbildung 39) bereits ab 10 nM eine ausgeprägte nukleäre Apoptose, die ab 100 nM statistisch hoch signifikant ist. Bei 200 nM NOD werden nahezu nur apoptotische Zellkerne ausgezählt. Im Vergleich zu MC-LR ist NOD ein vergleichbarer Apoptoseinduktor, was bereits beim Caspase-Aktivitätstest festgestellt werden konnte.

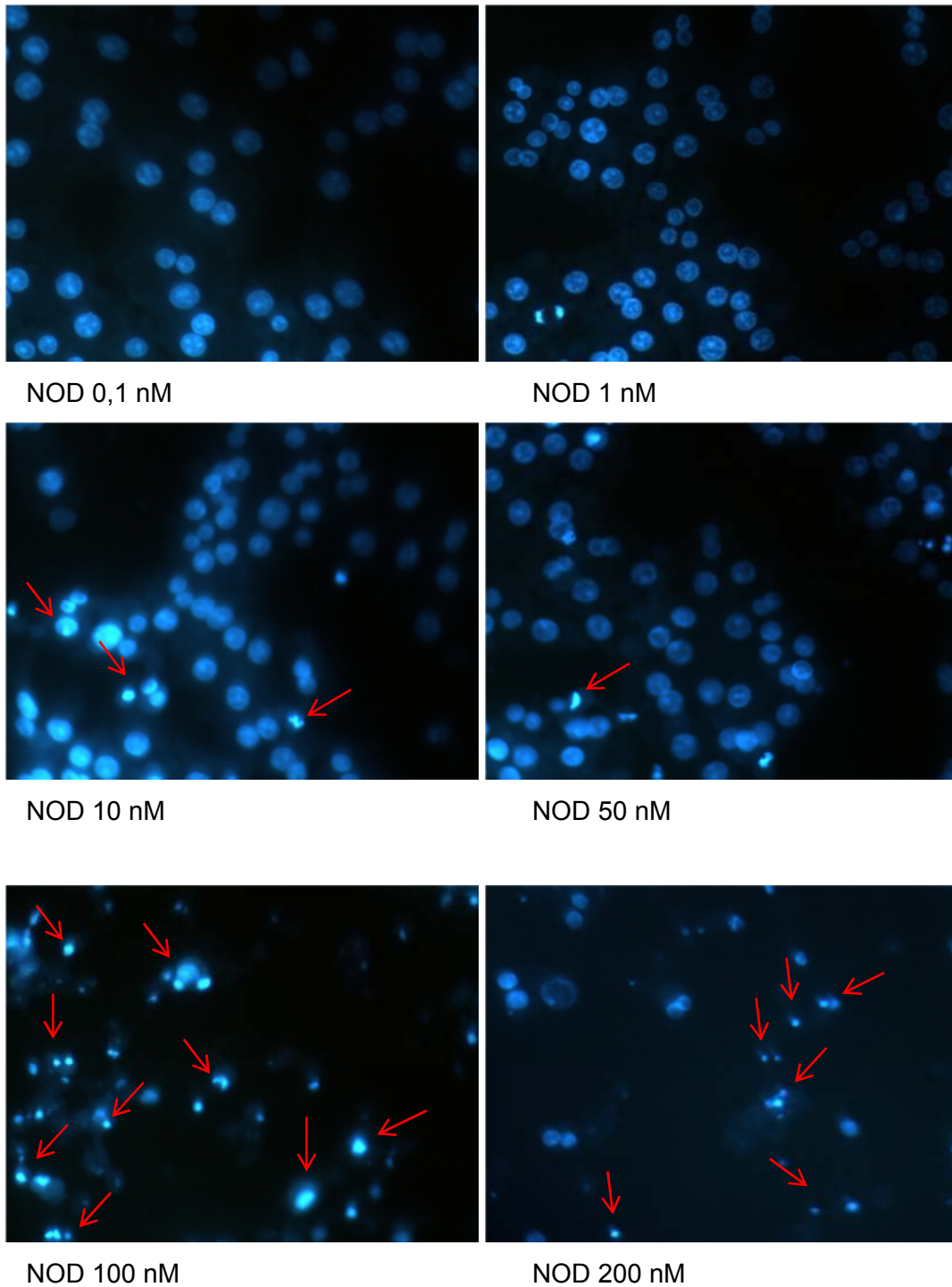


Abbildung 38: DAPI-Färbung mit NOD
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chromatinfärbung von mit NOD verschiedener Konzentrationen inkubierter Zellen nach 24 h. Rote Pfeile zeigen apoptotische Kerne. (400x).

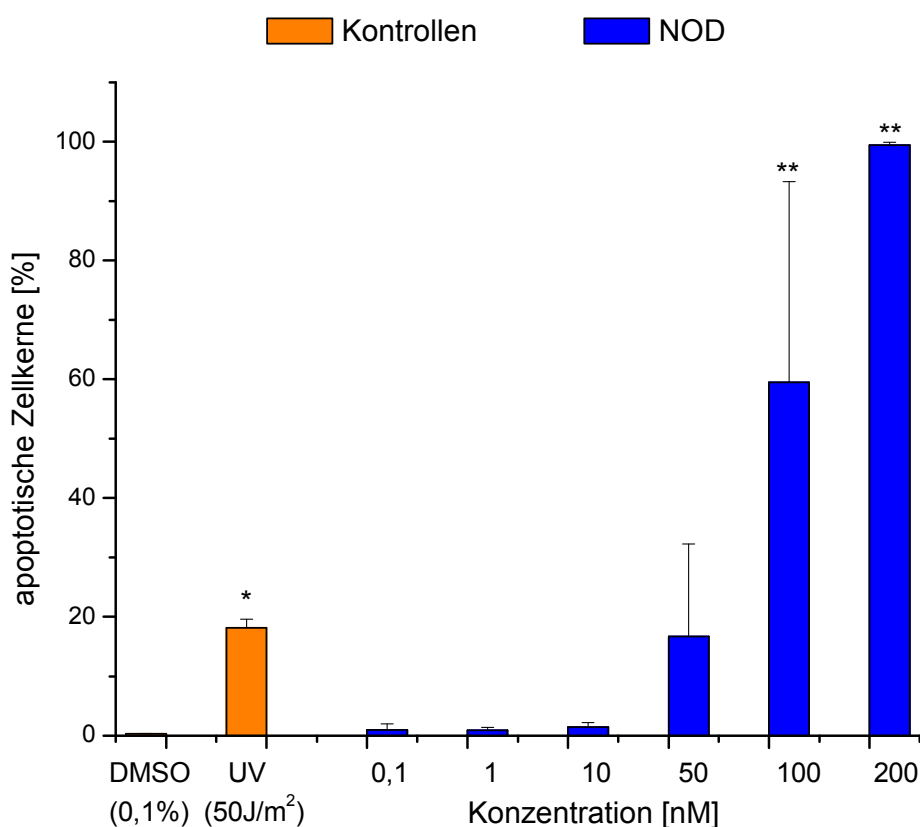


Abbildung 39: Nukleäre Apoptose durch NOD

Prozentuale Anzahl apoptotischer Zellen in primären Rattenhepatozyten von NOD verschiedener Konzentrationen nach 24 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). MW \pm SD aus n=3. DMSO vs. Behandlung, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

5.2.3. DNA-laddering

Zur weiteren Veranschaulichung nukleärer Apoptose wurden 5 μ g DNS apoptotischer Zellen für die DNS-Fragmentierung im Agarose-Gel in Anwesenheit von Ethidiumbromid elektrophoretisch aufgetrennt, wobei ein sogenanntes *DNA-laddering* mit Banden im Abstand von 200 bp charakteristisch ist, welches mit UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. In Abbildung 40 können die Beobachtungen der DAPI-Färbung bestätigt werden. Es zeigt sich für eine 24 h Behandlung keine DNS-Fragmentierung für die Lösungsmittelkontrolle, eine ausgeprägte für die Zellen, die mit UVC-Licht bestrahlt wurden, und ein eindeutiges *DNA-laddering* für eine Inkubation mit MC-LR mit den Konzentrationen 100 und 200 nM. Die Behandlung von primären Rattenhepatozyten mit NOD verschiedener Konzentrationen für 24 h zeigt ebenfalls eine eindeutige DNS-Fragmentierung bei 100 und 200 nM (Abbildung 40).

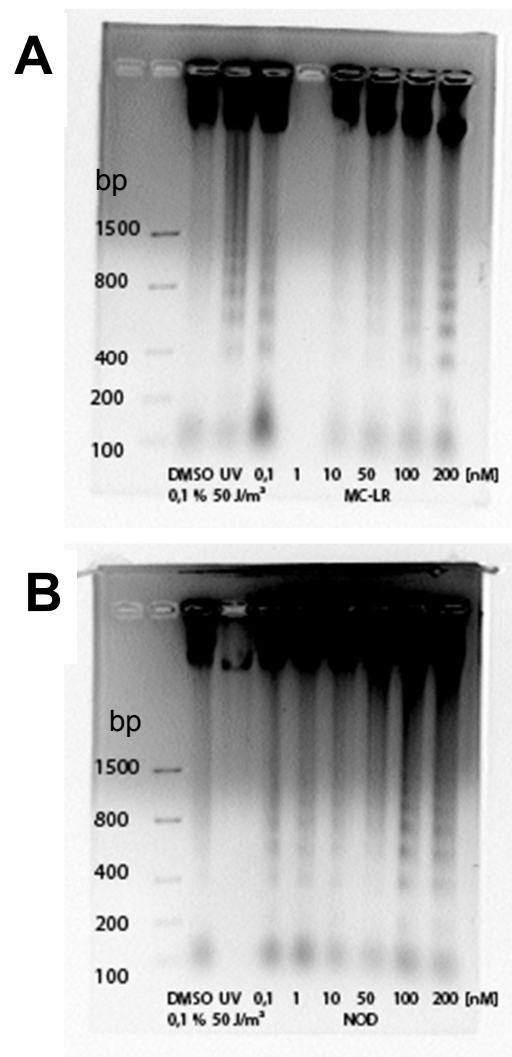


Abbildung 40: Nukleäre Apoptose durch MC-LR und NOD
Agarose-Gel für DNS-Fragmentierung einer Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit DMSO 0,1 % V/V (Lösungsmittelkontrolle), UVC-Licht 50 J/m², MC-LR (A) und NOD (B) verschiedener Konzentrationen nach 24 h.

5.3. Hemmung von Proteinphosphatasen

Wie das DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*)-Toxin Okadasäure zeigen MCs und NODs ebenfalls ihre toxische Wirkung über eine Hemmung durch eine kovalente Bindung eukaryontischer Proteinphosphatasen (PP) wie PP1 und PP2A, was zu Hyperphosphorylierung von Proteinen führt und so verschiedene Signalwege beeinflusst (Mountfort, et al., 1999). In einem fluorometrischen PP-Inhibierungstest wurde die konzentrationsabhängige Struktur-Hemmwirkung verschiedener MCs, NOD und der desmethylierten Kongenere auf PP1 und PP2A humanen und tierischen Ursprungs untersucht und in Korrelation zu den Zytotoxizitätsdaten gesetzt.

Zunächst wurden isolierte Proteinphosphatasen PP1 und PP2A tierischen Ursprungs mit MCs oder NOD für 1,5 h inkubiert und die Menge des aus Methylumbelliferylphosphat (MUP) entstandenen fluoreszierenden Methylumbelliferylacetats (MUAcetat) gemessen. Dabei entsteht umso mehr MUAcetat, je schwächer die Hemmung der PPs ist. Als Aktivitätskontrollen dienten pure PPs und DMSO (0,5 %, V/V) und als Positivkontrolle Okadasäure (0,4 μ M).

In Tabelle 36 sind die ermittelten IC_{50} -Werte für PP2A aus Rinderniere und PP1 α aus Kaninchenmuskel dargestellt. Alle getesteten Microcystine und Nodularine mit Ausnahme von MC-RR-Varianten zeigten sich mit IC_{50} -Werten zwischen 0,1 und 1,6 nM untereinander als ähnlich starke Inhibitoren der PPs.

Tabelle 36: IC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α tierischen Ursprungs im Vergleich.

Behandlung	IC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP2A aus Rinderniere	IC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP1α aus Kaninchenmuskel
MC-LR	0,21 ± 0,12	1,1 ± 0,4
[³ Asp]MC-LR	n.d.	n.d.
[⁷ Dha]MC-LR	0,11 ± 0,04	0,54 ± 0,12
MC-RR	10,3 ± 2,0	7,7 ± 1,2
[³ Asp]MC-RR	n.d.	n.d.
[⁷ Dha]MC-RR	3,7 ± 1,3	8,3 ± 0,8
MC-YR	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01
dmMC-YR	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,09
MC-LA	0,02 ± 0,0007	n.d.
MC-LF	0,09 ± 0,02	n.d.
NOD	0,61 ± 0,42	0,97 ± 0,18
[¹ Asp]NOD: [⁵ Dhb]NOD > 10 : 1	0,29 ± 0,08	1,6 ± 0,9

n.d. = nicht detektiert

Setzt man die IC₅₀-Werte von PP1α (Kaninchen) und PP2A (Rind) in Korrelation (Abbildung 41), so entsteht eine lineare Abhängigkeit mit einem schmalen Vertrauensbereich für alle untersuchten MC- und NOD-Varianten, außer für MC-RR und [⁷Dha]MC-RR. Das bedeutet, dass die MCs und NODs zwar PP-abhängig, jedoch in Relation gesehen konsistent hemmen.

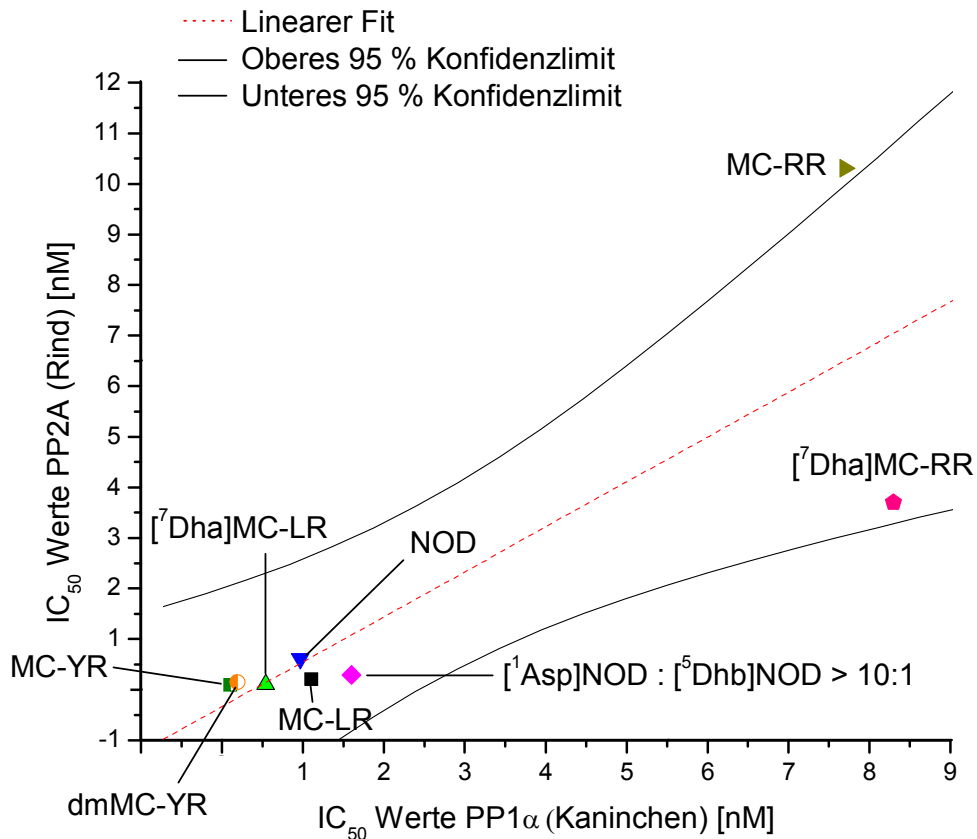


Abbildung 41: Linearer Fit der IC₅₀-Werte von tierischen PPs
 Lineare Korrelationsanalyse zwischen IC₅₀-Werten aus dem PP-Inhibierungstest für PP2A (Rinderniere) und PP1 α (Kaninchenmuskel) mit 95 % Konfidenzlimit.

Weiterhin wurde die hemmende Wirkung der MCs und NODs auf humane PPs untersucht. Es zeigte sich kein Unterschied in der Hemmstärke, da sowohl für PP1 α als auch für PP2A IC₅₀-Werte in gleicher Größenordnung ermittelt wurden (Tabelle 37). Dabei waren die MC-RR-Kongenerne wiederum die schwächsten Inhibitoren.

Tabelle 37: IC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α humanen Ursprungs im Vergleich.

Behandlung	IC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP2A humaner Erythrozyten	IC ₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in humaner PP1α (rekombinant)
MC-LR	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
[³ Asp]MC-LR	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02
[⁷ Dha]MC-LR	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,01
MC-RR	5,9 ± 1,2	3,2 ± 0,8
[³ Asp]MC-RR	11,5 ± 2,6	5,4 ± 2,5
[⁷ Dha]MC-RR	6,6 ± 2,4	0,8 ± 0,08
MC-YR	0,30 ± 0,02	0,13 ± 0,01
dmMC-YR	2,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1
MC-HtyR	0,48 ± 0,09	1,3 ± 0,2
MC-LW	0,06 ± 0,006	0,14 ± 0,03
MC-WR	0,42 ± 0,05	0,22 ± 0,03
MC-LY	0,37 ± 0,06	1,2 ± 0,01
NOD	0,17 ± 0,04	0,37 ± 0,04
[¹ Asp]NOD: [⁵ Dhb]NOD	0,48 ± 0,09	0,87 ± 0,16
> 10 : 1		

Werden die IC₅₀-Werte von humanem PP1α und PP2A in Korrelation gesetzt (Abbildung 42), kann eine konsistente lineare Abhängigkeit mit einem schmalen Konfidenzintervall für die untersuchten MCs und NODs abgelesen werden. Ausnahme bilden dabei dmMC-YR, MC-HtyR und MC-LY, die unterhalb des Vertrauensbereichs liegen, und [⁷Dha]MC-RR, welches oberhalb liegt.

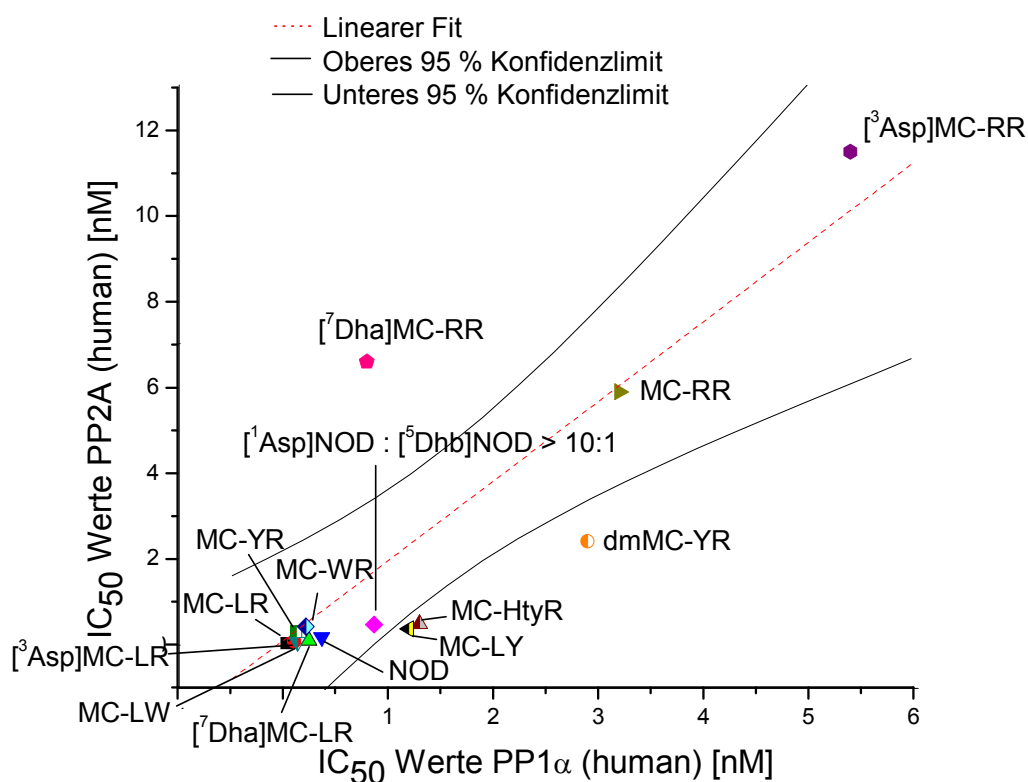


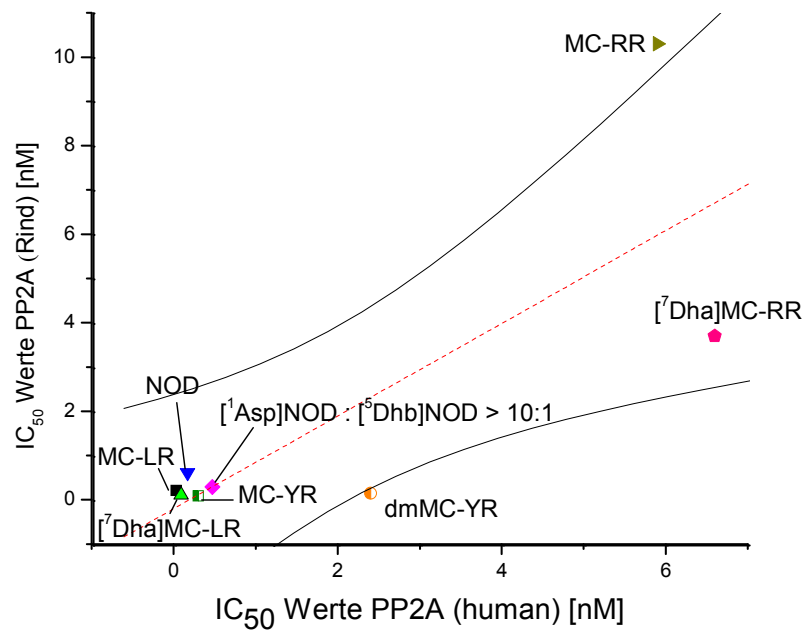
Abbildung 42: Linearer Fit der IC_{50} -Werte von humanen PPs
 Lineare Korrelationsanalyse zwischen IC_{50} -Werten aus dem PP-Inhibierungstest für humane PP2A und PP1 α mit 95 % Konfidenzlimit.

Betrachtet man in Abbildung 43 die IC_{50} -Werte für PP2A (A) aus Rinderniere und humaner Erythrozyten, so kann keine ausgeprägte Speziesabhängigkeit festgestellt werden. Die untersuchten MC- und NOD-Varianten hemmen PP2A im gleichen Maße. Ausnahme bilden dabei dmMC-YR, welches mit einem IC_{50} -Wert von $0,15 \pm 0,03$ nM die tierische PP2A stärker hemmt als die humane PP2A mit einem IC_{50} -Wert von $2,4 \pm 0,4$ nM und MC-RR, welches eine zweifach stärkere Inhibierung der humanen PP2A bewirkt (Tabelle 36 und Tabelle 37). Beide MCs liegen außerhalb des ermittelten Vertrauensbereichs.

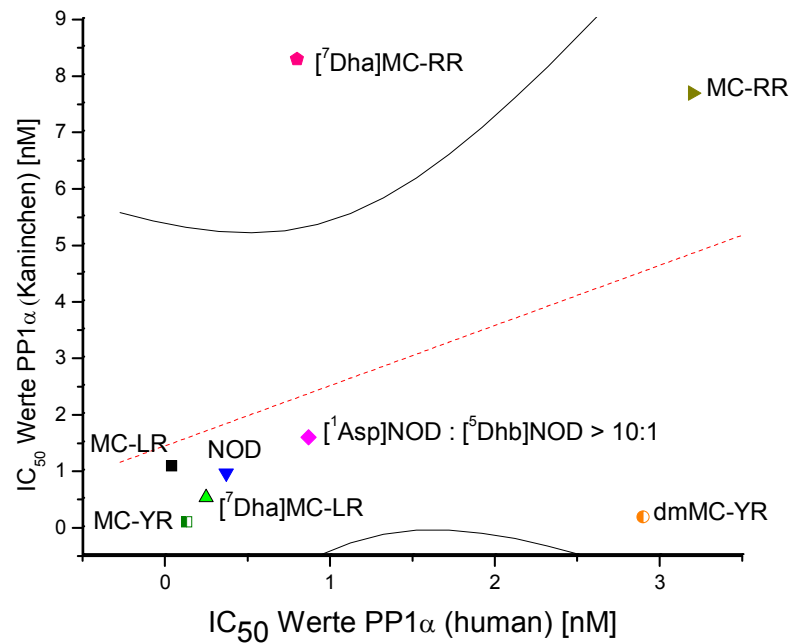
Eine ähnliche Beobachtung (Abbildung 43) kann für PP1 α (B) gemacht werden. Zwar liegt eine leichte Tendenz in Richtung der stärkeren Hemmwirkung der humanen PP1 α vor, jedoch ist diese nicht für alle untersuchten MC- und NOD-Kongenere konsistent. Es kann demnach auch für PP1 α nicht von einer Speziesabhängigkeit ausgegangen werden. Das breite Konfidenzintervall ist darauf zurückzuführen, dass die MCs dmMC-YR, MC-RR und [7Dha]MC-RR wieder stark vom linearen Bereich abweichen.

Festzuhalten ist, dass weder ein ausgeprägter Unterschied in der Inhibierungspotenz der MC- und NOD-Varianten auf PP2A und PP1 α besteht noch eine Speziesabhängigkeit beobachtet werden konnte.

A



A

Abbildung 43: Linearer Fit der IC_{50} -Werte von PP

Lineare Korrelationsanalyse zwischen IC_{50} -Werten aus dem PP-Inhibierungstest für tierische und humane PP2A (A) und PP1 α (B) mit 95 % Konfidenzlimit.

Eine lineare Korrelationsanalyse zwischen dem zytotoxischen Effekt verschiedener MCs und NODs auf primäre Humanhepatozyten und der Hemmwirkung auf PP2A und PP1 α humanen Ursprungs ist in Abbildung 44 dargestellt. Dabei zeigt die lineare Abhängigkeit der PP2A-Inhibierung (A) von der Zytotoxizität einen schmaleren Vertrauensbereich an als die der PP1 α -Hemmung (B). In beiden Auftragungen weicht MC-LY stark vom linearen Fit ab, weshalb keine eindeutige Aussage bezüglich Zytotoxizität, PP-Hemmung und somit auch Struktur-Wirkungsbeziehung gezogen werden kann. Die MCs MC-HtyR und MC-WR liegen in Graph A sehr nahe dem linearen Bereich, wohingegen in Graph B sie sich gerade so im Konfidenzintervall befinden, welches jedoch sehr breit ist. MC-LR und die desmethylierte Variante [⁷Dha]MC-LR zeigen interessanterweise sowohl für PP2A (A) als auch PP1 α (B) eine höhere Inhibierungsstärke als einen zytotoxischen Effekt. Da das Konfidenzintervall für die IC₅₀-Werte von PP2A (A) einen schmaleren Vertrauensbereich aufweist als für die IC₅₀-Werte von PP1 α (B) und für die meisten untersuchten MCs und NODs eine lineare Abhängigkeit vorliegt, korreliert die Hemmung von PP2A besser mit dem zytotoxischen Effekt als die von PP1 α .

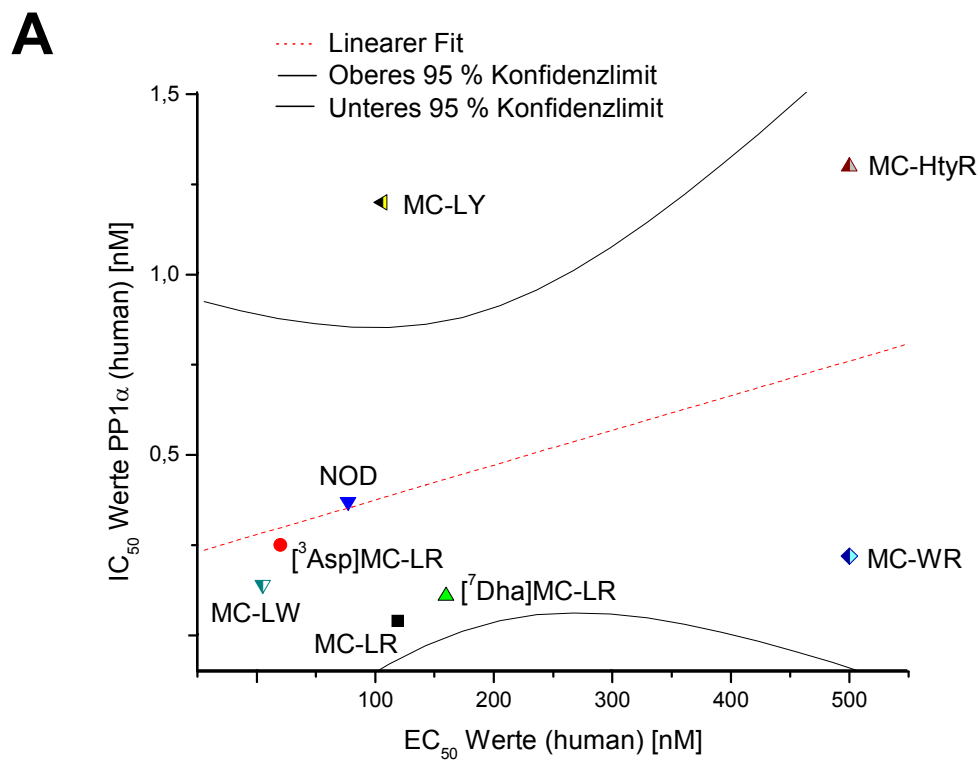
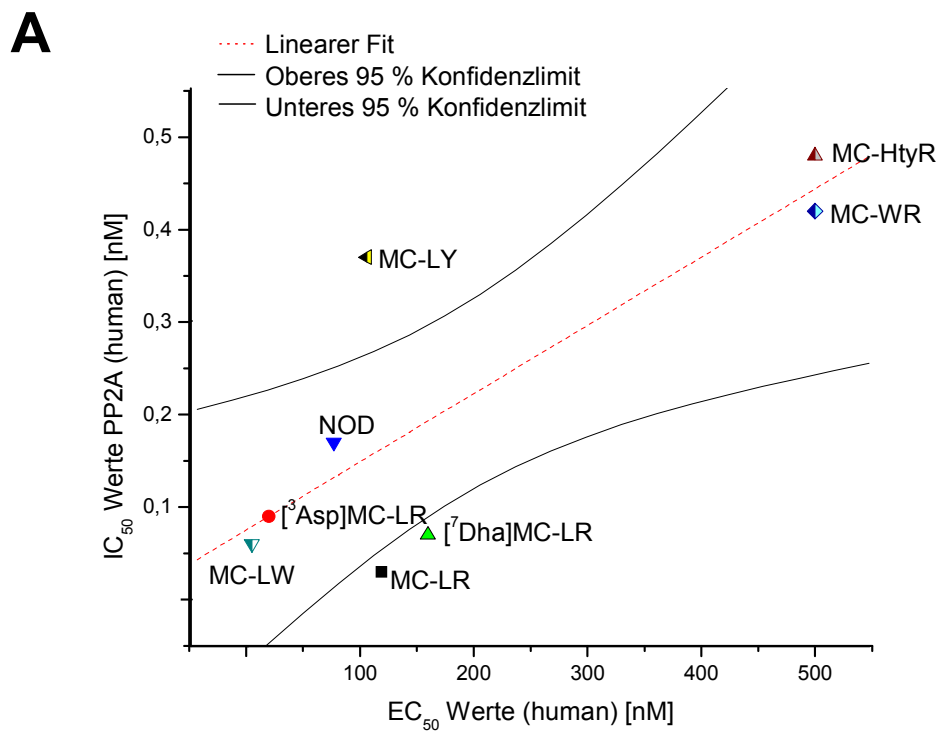


Abbildung 44: Linearer Fit der IC_{50} - und EC_{50} -Werte aus humanen Untersuchungen
Lineare Korrelationsanalyse zwischen IC_{50} -Werten aus den PP-Inhibierungstests für humane PP2A (A) und PP1 α (B) und EC_{50} -Werten aus Resazurinreduktionstest für primäre Humanhepatozyten mit 95 % Konfidenzlimit.

5.4. AKT (Proteinkinase B)-Signalweg

Proteinkinase B (Akt), welches PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) nachgeschaltet ist, spielt eine kritische Rolle bei Zellproliferation durch Unterdrückung von Apoptose. Diese Inhibierung erfolgt durch Phosphorylierung und Inaktivierung verschiedener Targets, wie Bad, c-Raf und Caspase-9 (Zimmermann, 1999). Eine durch MC-LR und NOD verursachte Hemmung der Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP2A und PP1 kann eine Aktivierung der Akt-Kaskade hervorrufen, welche einen möglichen Signalweg der Leberschädigung darstellt (Franke, et al., 1997; Zhu, et al., 2005). Eine Aktivierung von Akt erfolgt durch Phosphorylierung an Ser473 und Thr308 durch PDK1/2 (Alessi, et al., 1996). Dies wiederum führt durch Phosphorylierung zu Inaktivierung von GSK-3 β und über einen TSC2 (*tuberous sclerosis protein 2*) und mTOR-Weg zur Aktivierung von p70S6, wodurch die Proteinsynthese in Gang gesetzt wird (Manning, et al., 2007; Manning, et al., 2002).

Um den konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss von MC-LR und NOD auf den Akt-Signalweg in primären Rattenhepatozyten zu untersuchen, wurde mittels Western Blot ein Phospho-Akt Pathway Sampler Kit verwendet. Dieser beinhaltet Antikörper gegen P-Akt (Ser473), P-Akt (Thr308), Akt (pan), P-c-Raf (Ser259), P-GSK-3 β (Ser9), P-PTEN (Ser380) und P-PDK 1 (Ser241). Bei allen Untersuchungen dient β -Aktin als Ladungskontrolle. In Abbildung 45 ist für die Lösungsmittelkontrolle (DMSO), UVC-Bestrahlung und MC-LR 10, 50, 100 nM der Phosphorylierungsstatus von P-c-Raf (Ser259) über einen Zeitraum von 1,5, 3, 6, 9 und 24 h dargestellt. Dabei zeigen die mit DMSO behandelten Zellen bis 9 h einen konstanten P-Proteingehalt an, welcher bei 24 h abfällt. Nach einer UVC-Bestrahlung zeigt sich dagegen über den gesamten Untersuchungszeitraum ein gleichmäßiger P-Proteingehalt. Die Behandlung mit MC-LR weist keinen Einfluss auf den P-c-Raf (Ser259)-Status auf und verhält sich nahezu wie die Lösungsmittelkontrolle. Um zu erfassen, ob eine Phosphorylierung für c-Raf zu einem früheren Zeitpunkt erfolgt, wurden primäre Rattenhepatozyten mit Insulin 60 nM (eine weitere Positivkontrolle) und MC-LR 50 nM für 20, 40, 60, 90, 120 min behandelt (Abbildung 46). Jedoch konnte wiederum bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle kein deutlicher Effekt gezeigt werden. Gleichzeitig wurde der Phosphorylierungsstatus für P-Akt (Ser473) erfasst, wobei eine deutliche jedoch zeitunabhängige Erhöhung durch Insulin 60 nM zu sehen ist (Abbildung 46). Die Behandlung mit NOD 10 nM weist bei den Zeitpunkten 3, 4, 6 und 7 h eine Erhöhung des P-c-Raf (Ser259) auf, NOD 50 nM bei 1 und 2 h und NOD 100 nM eine leichte Erhöhung bei 8 h. Bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle kann von keiner konsistenten zeit- oder konzentrationsabhängigen Wirkung auf P-c-Raf (Ser259) ausgegangen werden (Abbildung 47). Der Proteinstatus der Ladungskontrolle β -Aktin bleibt in allen Untersuchungen konstant (Abbildung 45 und Abbildung 46).

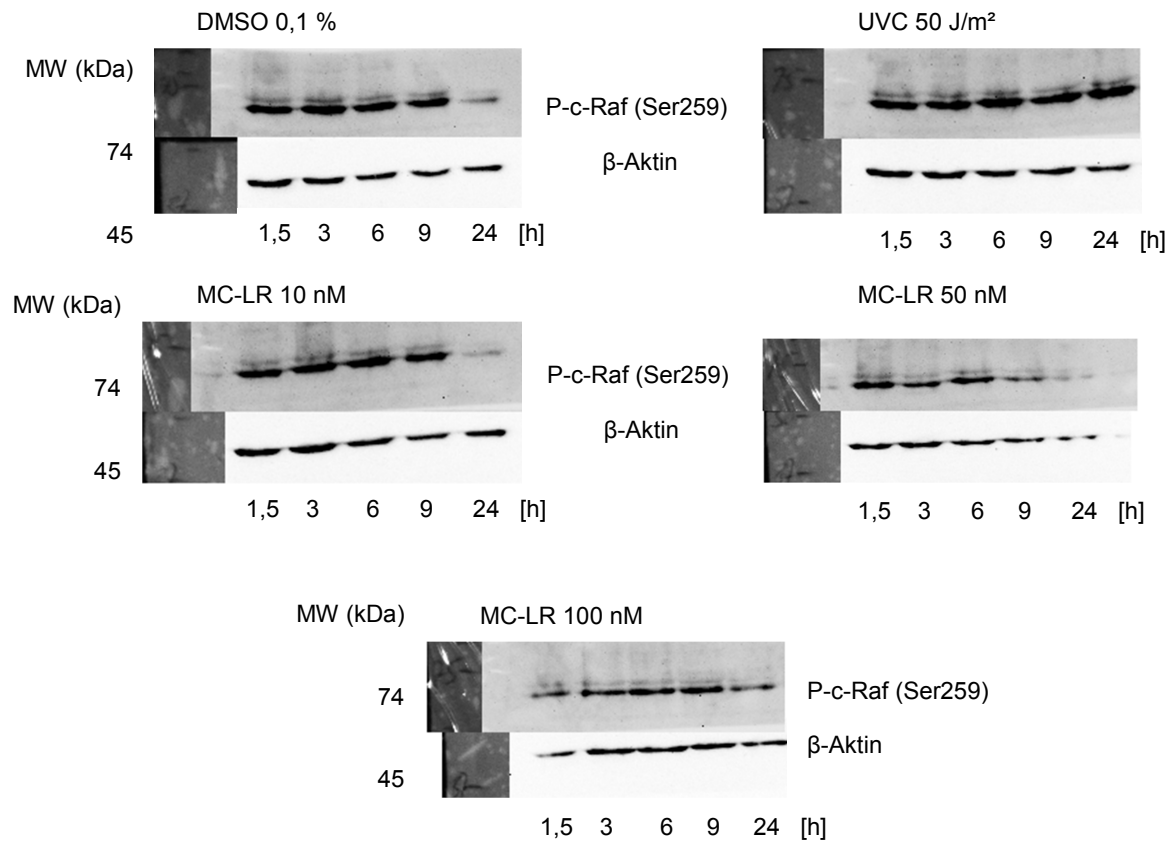


Abbildung 45: Western Blot P-c-Raf für MC-LR.
 Status an P-c-Raf (Ser259) in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1%), UVC-Licht (50 J/m²) und MC-LR 10, 50, 100 nM nach 1, 3, 5, 6, 9, 24 h. Repräsentative Western Blots.

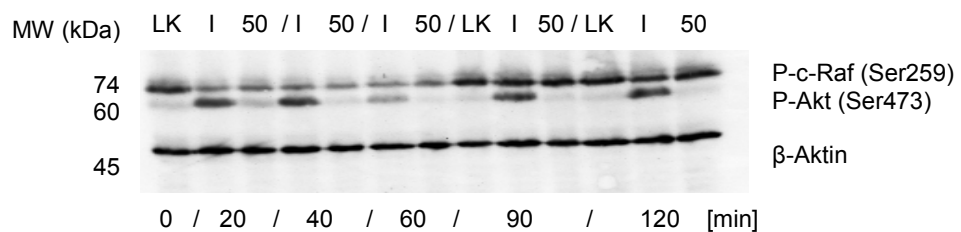


Abbildung 46: Western Blot P-c-Raf und P-Akt für MC-LR.
 Status an P-c-Raf (Ser259) und P-Akt (Ser473) in primären Rattenhepatozyten von LK (DMSO 0,1%), I (Insulin 60 nM), und 50 (MC-LR 50 nM) nach 20, 40, 60, 90 und 120 min. Repräsentativer Western Blot.

In Abbildung 48 ist der Status an P-PDK1 (Ser241) und P-PTEN (Ser380) für eine zeitabhängige Inkubation mit DMSO 0,1%, UVC-Licht 50 J/m² und NOD 10, 50, 100 nM dargestellt. Dabei bleiben für die Lösungsmittelkontrolle beide Gehalte konstant, für UVC kann eine zeitabhängige Erhöhung für P-PDK1 (Ser241) festgestellt werden und eine unveränderte Menge an P-PTEN (Ser380). NOD zeigt für alle Konzentrationen keinen Einfluss auf P-PDK1 (Ser241) und P-PTEN (Ser380). Auch weitere Untersuchungen bezüglich des Akt-Signalweges ergaben keine verwendbaren Resultate.

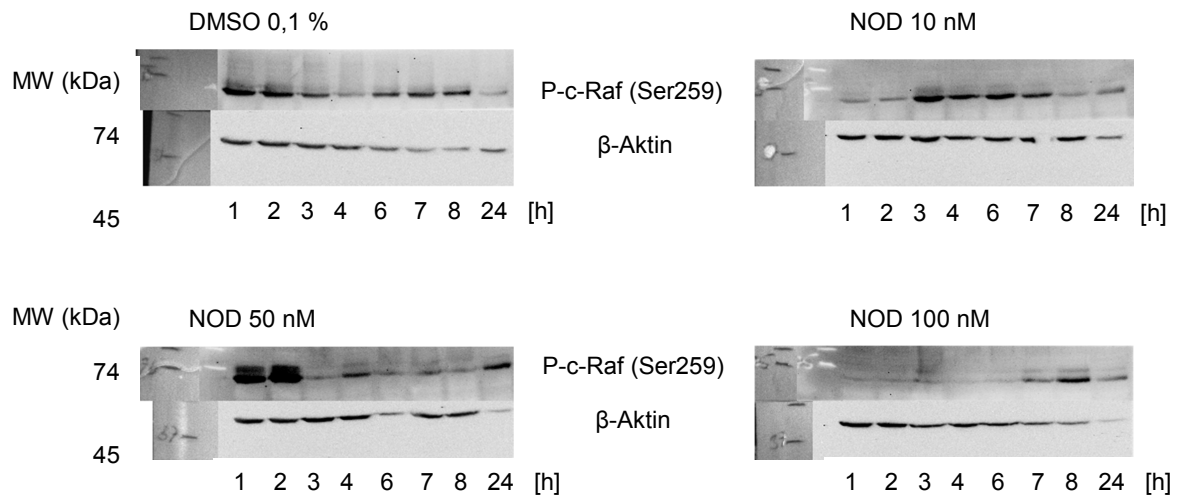


Abbildung 47: Western Blot P-c-Raf für NOD.
 Status an P-c-Raf (Ser259) in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1 %) und NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 24 h. Repräsentative Western Blots.

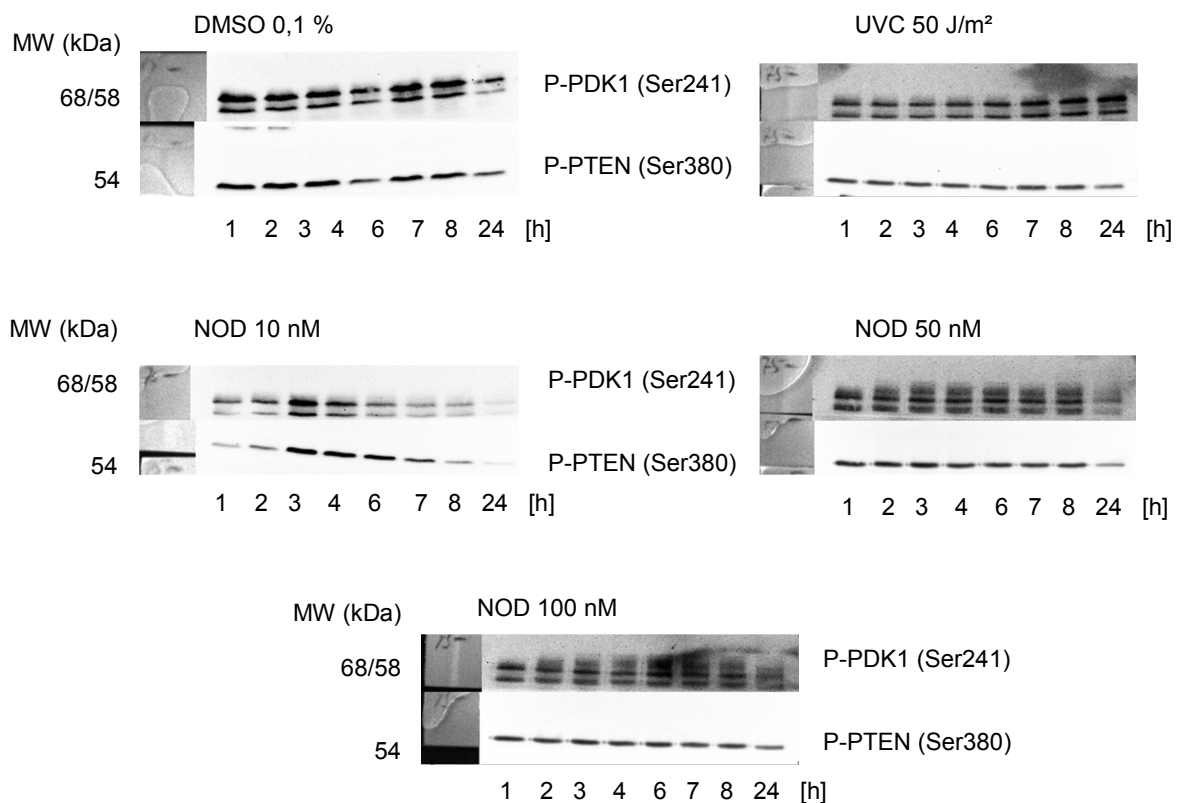


Abbildung 48: Western Blot P-PDK1 und P-PTEN für NOD.
 Status an P-PDK1 (Ser259) und P-PTEN (Ser380) in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1 %), UVC (50 J/m²) und NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 24 h. Repräsentative Western Blots.

Zusammenfassend konnte weder durch MC-LR noch NOD eine Wirkung auf den Akt-Signalweg festgestellt werden, was auf eine Gegenregulation durch PI3K, PTEN zurückzuführen werden könnte.

5.5. MAPKinase-Signalweg

Durch die Hemmung der Serin/Threonin Proteinphosphatasen PP2A und PP1 wird das Gleichgewicht zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung gestört. Dadurch verursachen MCs und NOD Leberschädigungen und wirken als Tumorpromotoren in der Leber. Dabei sind der molekulare Wirkmechanismus der Leberschädigung und die Art des störenden Einflusses auf die Balance zwischen Zelltod und Überleben unklar (Komatsu, et al., 2007). Einen möglichen Signalweg stellt der mehrstufige MAP (*mitogen-activated protein*) Kinase-Weg dar, welcher an der Regulation der Embryogenese, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und der Apoptose beteiligt ist. Diese Kaskade besteht aus drei Kinasen (MAPKKK, MAPKK, MAPK), die sich durch Phosphorylierungen an Serin/Threonin- und Tyrosin-Resten gegenseitig aktivieren und letztendlich im Zellkern die Transkription von Zielgenen regulieren. Die Aktivierung der MAPK durch MCs und NODs kann über verschiedene Signalwege erfolgen (siehe Kapitel 2.1.) Eine Hemmung von PP2A/PP1 kann zur Hyperphosphorylierung von MEK1/2 (MAPK *extracellular signal regulated kinase*) und dadurch zu deren Aktivierung führen, welche im nächsten Schritt ERK1/2 (*extracellular signal regulated kinases*) phosphoryliert. Dadurch kommt es über eine Aktivierung von p90RSK (p90 *ribosomal S6 kinases*) und p70RSK (p70 *ribosomal S6 kinase*) zur Phosphorylierung von rpS6 (*ribosomal protein S6*). Die Kinase p90RSK ist weiterhin beteiligt an der Regulierung von Apoptosemarkern wie Bad, Bcl2, Bcl-xL und Bax. Ein zweiter MAPK-Signalweg wird durch Stress und Tumornekrosefaktoren ausgelöst und führt zu einer Aktivierung von p38 und dadurch von MSK1/2 (*RSK-related kinases*) (Pearson, et al., 2001; Seger, et al., 1995) (siehe Kapitel 2.1.2). Für die Untersuchungen dient UVC-Bestrahlung als Positivkontrolle, da diese ein Stimulus für eine Aktivierung der MAPK-Signalwege darstellt (Bode, et al., 2003; Matsuda, et al., 2000; Adler, et al., 1996)

5.5.1. Status an Phospho-MEK1/2 und Phospho-ERK1/2

Die Aktivierung von MEK1/2 erfolgt Raf-vermittelt über Phosphorylierung zweier Serin-Reste an Position 217 und 221. Diese Kinase wiederum phosphoryliert ERK1/2 (p44 und p42) an Threonin 202 und Tyrosin 204. PP2A und PP1 können unter anderem die MAPK MEK1/2 und ERK1/2 am Serin- oder Threonin-Rest dephosphorylieren und dadurch eine Inaktivierung dieser Enzyme bewirken. Eine Inhibierung von PP2A/PP1 führt zu einer Störung dieser Balance, wodurch der Schwerpunkt Richtung Aktivierung verlagert wird und

es zu Veränderungen in der Genexpression kommen kann (Svircev, et al., 2010; Roberts, et al., 2007).

Um zu untersuchen inwiefern MC-LR und NOD konzentrations- und zeitabhängig in der Lage sind den Phosphorylierungsstatus von MEK1/2 zu verändern, wurden primäre Rattenhepatozyten mit MC-LR und NOD in den Konzentrationen 10, 50 und 100 nM für 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 21 h inkubiert. Mittels Western Blot wurde auf Proteinebene der Gehalt an endogenem P-MEK1/2 (Ser221) erfasst und auf die Gesamtmenge an MEK1/2 bezogen. Dabei diente β -Aktin als Ladungskontrolle. Die ermittelten Daten wurden weiterhin auf den jeweiligen Zeitpunkt der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) bezogen. Zur Darstellung wurde auf 1 h der jeweiligen Behandlung der Bezug genommen. Für die Aktivierung der MAPK-Kaskade wurde UVC-Licht 50 J/m² verwendet. In Abbildung 49 (A) sind fünf repräsentative Western Blots und (B) die densitometrische Auswertung aller Versuche für DMSO, UVC und NOD 10, 50, 100 nM dargestellt. Der Zeitpunkt 21 h ist nicht zu sehen, da dieser zwar einen stark erhöhten Phosphorylierungsstatus zeigt, jedoch auf Grund zytotoxischer Effekte nicht repräsentativ ist. Über die Zeit von 8 h nimmt der Phosphorylierungsgehalt von P-MEK1/2 (A) für DMSO (0,1 %) ab, während die Gesamtmenge an MEK1/2 und β -Aktin gleich bleibt. Die Bestrahlung mit UVC-Licht 50 J/m² und die Behandlung mit NOD 10 nM verursacht in Bezug auf DMSO (0,1 %) und 1 h einen zwei- bis dreifach erhöhten Status an P-MEK1/2. Dieser Effekt ist für UVC ab einem Zeitpunkt von 6 h (B) statistisch signifikant und zeigt einen dreifachen Anstieg an phosphoryliertem MEK1/2. Für NOD 10 nM ist die Tendenz eines Anstiegs des MEK1/2-Gehalts nicht statistisch signifikant (B). Die Behandlung mit 50 nM zeigt einen statistisch signifikanten mehr als zweifachen Anstieg bis 6 h, welcher dann wieder abnimmt. Ein gleicher Effekt kann für NOD 100 nM beobachtet werden. Ab dem Zeitpunkt von 6 h kommt es zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Gehalts an P-MEK1/2, welcher bis 8 h konstant bleibt. Zusammenfassend wurde für NOD eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme an P-MEK1/2 (Ser221) auf Proteinebene beobachtet.

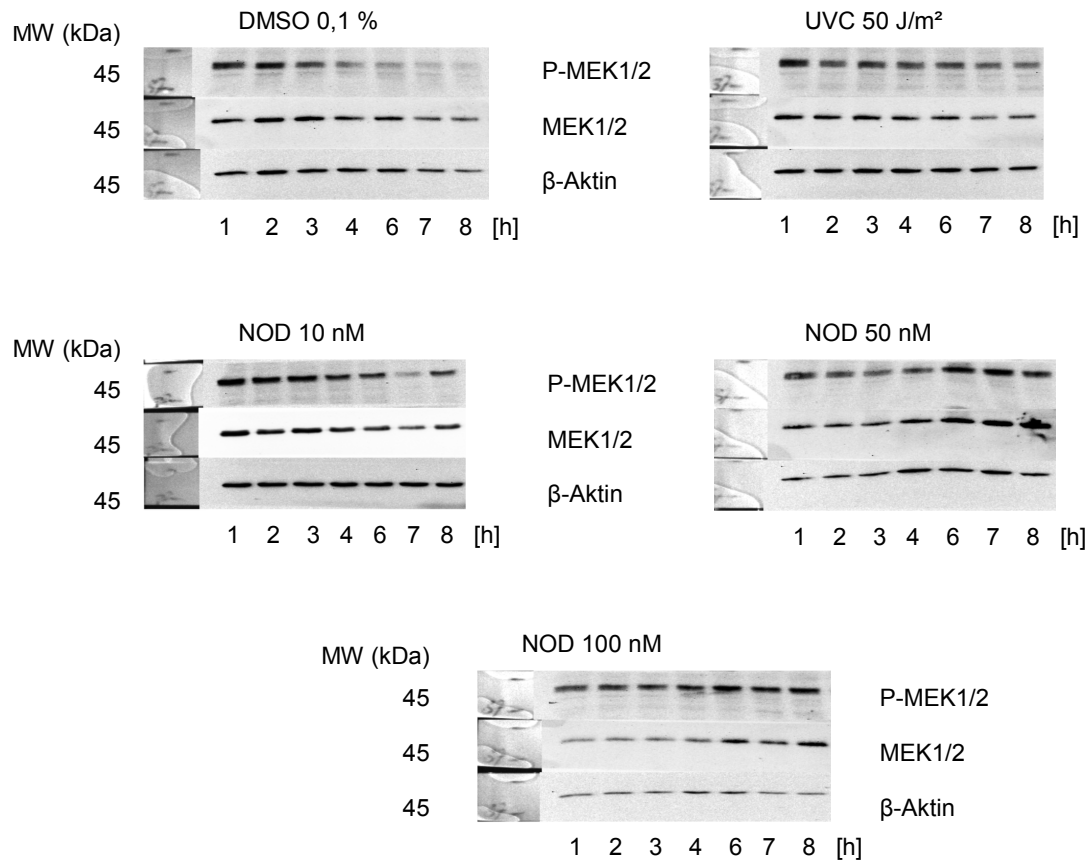
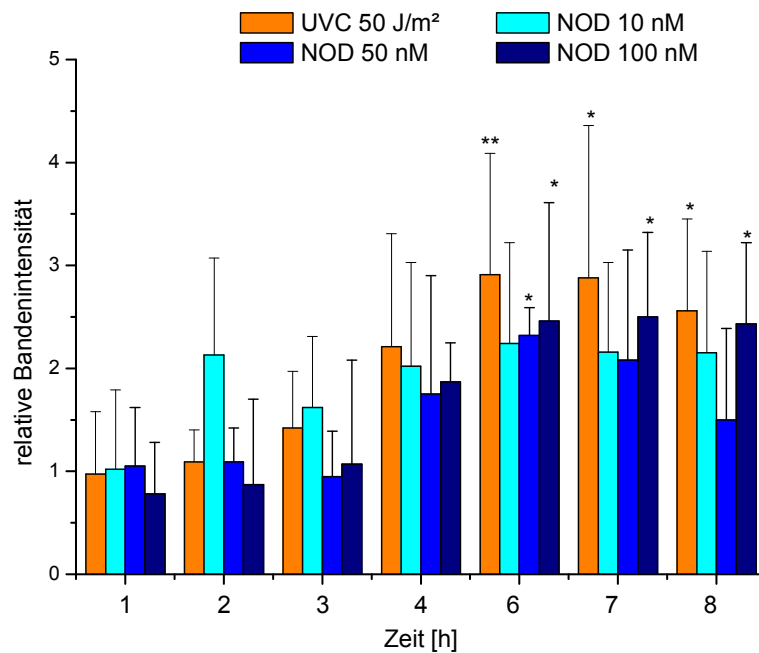
A**B**

Abbildung 49: Western Blot P-MEK1/2 für NOD.

Status an P-MEK1/2 in primären Rattenhepatozyten von UVC-Licht (50 J/m²) und NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentativer Western Blot (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW±SD; n≥3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01.

MEK1/2 aktiviert ERK1/2 durch Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 und Thr185/Tyr187. Die Untersuchung von P-ERK1/2 ist auf Grund seines Einflusses auf die Regulierung der Proliferation und des Überlebens von Zellen notwendig. Weiterhin beeinflusst ERK1/2 die Kinasen p90RSK und MSK1/2 (Roberts, et al., 2007). Da ERK1/2 in der Lage ist durch Rückkopplungen zeitabhängig den Raf-vermittelten MAPK-Weg hemmend oder aktivierend zu beeinflussen, ist diese Kinase als Aktivierungsmarker für die MAPK-Kaskade repräsentativ (Kholodenko, et al., 2010).

Um den zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluss von MC-LR, MC-RR und NOD auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 in primären Rattenhepatozyten zu verdeutlichen, wurden zwei Experimente auf Proteinebene durchgeführt. Zum einen wurden mittels Western Blot die Menge an endogenem P-ERK1/2 (zweifach phosphoryliert an Thr202/Tyr204 und Thr185/Tyr187 oder einfach phosphoryliert an Thr202) bestimmt, welche auf den Gesamtgehalt an ERK1/2 bezogen wurde. Dabei diente β -Aktin als Ladungskontrolle. Die ermittelten Daten wurden weiterhin als Summe aus ERK1 und 2 auf den jeweiligen Zeitpunkt der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) bezogen. Für die Positivkontrolle der MAPK-Kaskade wurde UVC-Licht 50 J/m² verwendet. Weiterhin wurden fluoreszenzmikroskopische Bilder mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie von P-ERK1/2-markierten primären Rattenhepatozyten nach 1, 6 und 8 h aufgenommen. Durch ein Labeling von Aktinfilamenten konnte ebenfalls der zeitabhängige Einfluss der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V), Positivkontrolle (UVC-Licht 50 J/m²) und den Behandlungen mit MC-LR und NOD der Konzentrationen 10, 50 und 100 nM auf das Aktinnetzwerk gezeigt werden.

In Abbildung 50 (A) sind fünf repräsentative Western Blots und (B) die densitometrische Auswertung der ermittelten Daten für DMSO, UVC und MC-LR 10, 50, 100 nM gezeigt. Die Gesamtgehalte für ERK1/2 und β -Aktin sind durchgehend für alle Untersuchungen unverändert. Der Phosphorylierungsstatus von P-ERK1 (P-p44) nimmt für die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) über den Zeitraum von 8 h leicht ab, während dieser für P-ERK2 (P-p42) konstant bleibt. Die Bestrahlung mit UVC-Licht 50 J/m² erhöht bezogen auf 1 h ab 6 h statistisch signifikant vor allem die Menge an P-ERK2 (A, B). Interessanterweise zeigt die Behandlung mit MC-LR 10, 50 und 100 nM keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Gehalt von P-ERK1/2 (Abbildung 50). Da MC-RR kein starker Inhibitor der PP ist, ist erwartungsgemäß keine Auswirkung von MC-RR 200 nM auf den Gehalt an P-ERK1/2 zu beobachten (Abbildung 50, A, B).

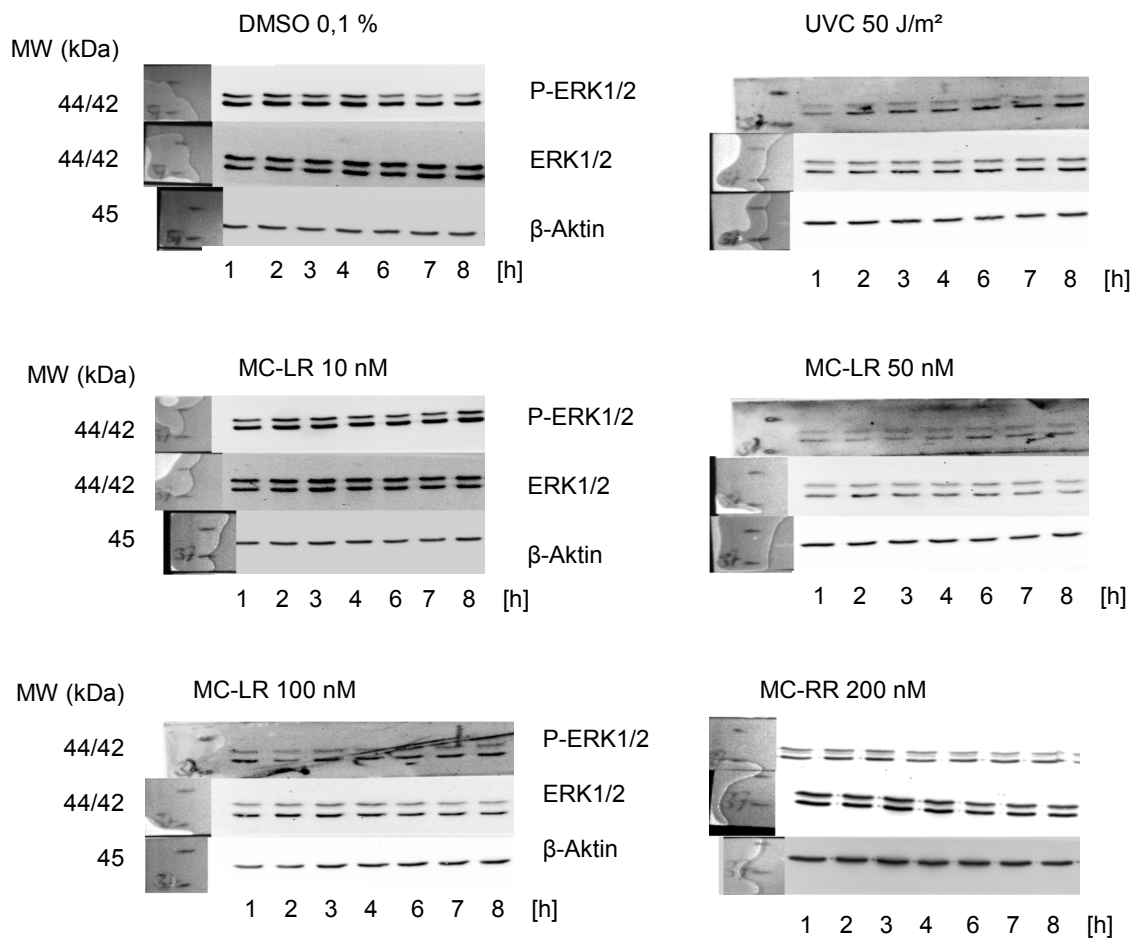
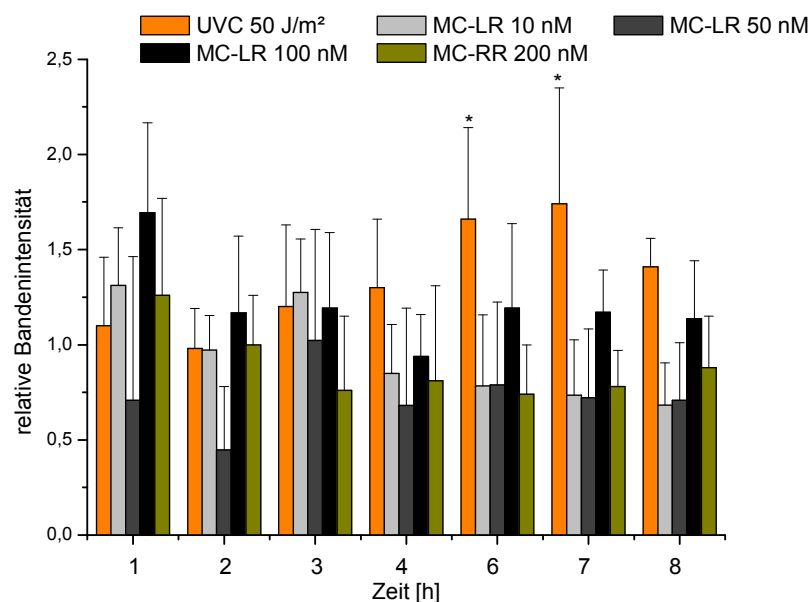
A**B**

Abbildung 50: Western Blot P-ERK1/2 für MC-LR.
 Status an P-ERK1/2 in primären Rattenhepatozyten von UVC-Licht (50 J/m²) und MC-LR 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentativer Western Blot (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW±SD; n≥3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05.

Die konfokalen Immunfluoreszenz-Analysen zeigen in Abbildung 51 (A) für die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) ein hochorganisiertes dichtes Aktinnetzwerk, welches durch Ausbreitung in benachbarte Zellen für hohe Stabilität des Monolayers der Hepatozyten sorgt. Über den Zeitraum von 8 h kann keine Veränderung der Aktinfilamente beobachtet werden. Der Gehalt an P-ERK1/2 zeigt ein schwaches Signal, das konstant bleibt. Anders verhält es sich für die Zellen, die mit UVC-Licht 50 J/m² (Abbildung 51, B) bestrahlt wurden. Bereits ab einer Stunde kann ein Einfluss auf das Aktinnetz (rot) festgestellt werden. Die Zellen sind stark abgerundet und die Aktinfilamente sind vor allem in den äußeren Schichten der Hepatozyten zu sehen. Der normalerweise stark ausgeprägte Zell-Zell-Kontakt nimmt ab dem Zeitpunkt 8 h ab. Weiterhin kann nach einer 8 h Behandlung das Kollabieren und Aggregieren der Aktinfilamente in der Zellmitte oder an einem Pol der Zelle (B, weiße Pfeile) beobachtet werden. Die Menge an P-ERK1/2 (grün) nimmt von 1 h auf 6 h zu und ist bei 8 h im gesamten Zytoplasma stark vertreten.

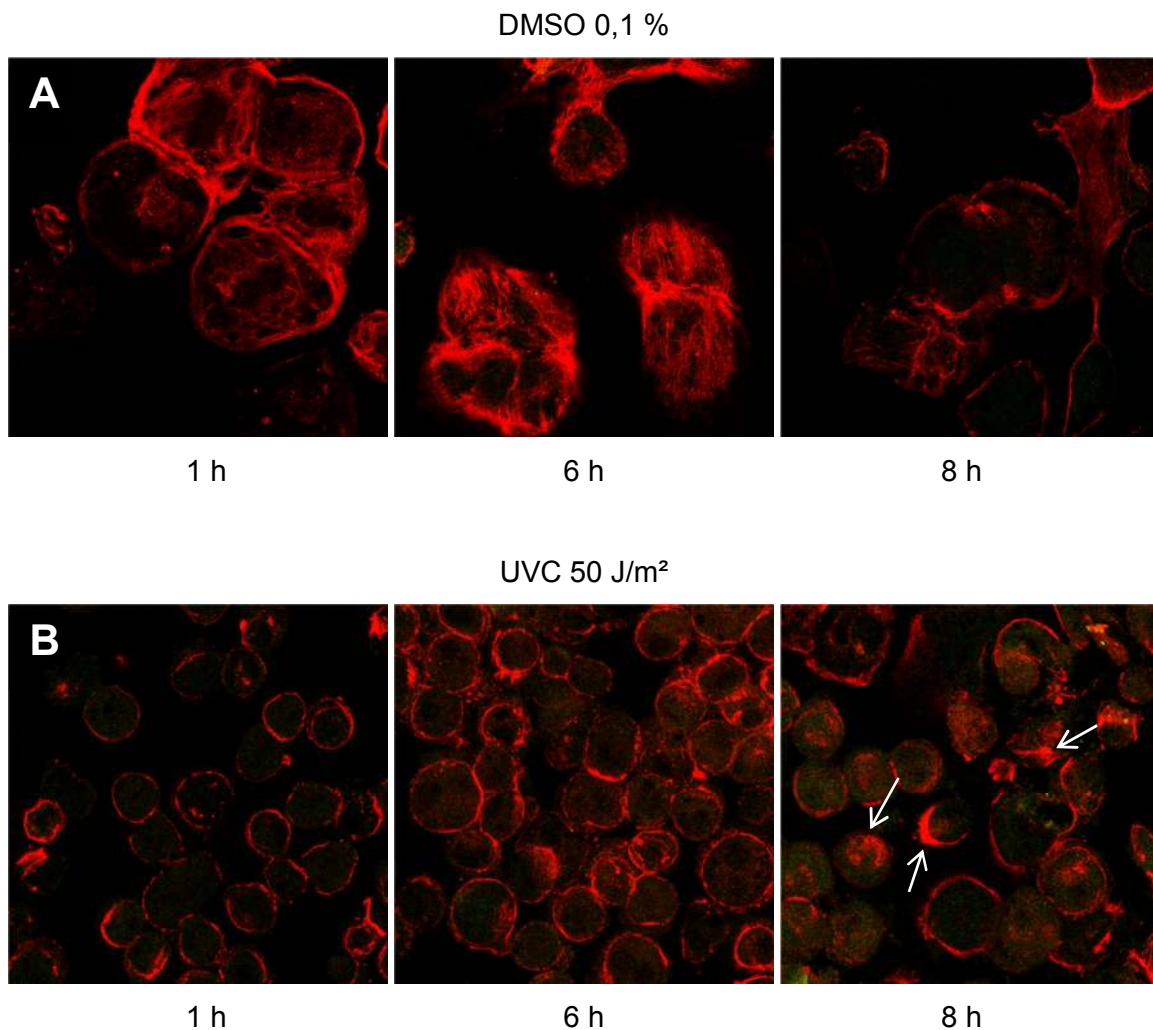


Abbildung 51: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von DMSO und UVC-Licht. Status an P-ERK1/2 (grün) in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1% V/V) (A) und UVC-Licht (50 J/m²) (B) nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

Eine Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit MC-LR 10 nM (Abbildung 52, A) nach einer und sechs Stunden zeigt keine eindeutige Veränderung des Aktins, jedoch einen Anstieg an P-ERK1/2. Ab dem Zeitpunkt 8 h aggregiert und kollabiert Aktin und die Zellmembran wird porös (Abbildung 52, A, weiße Pfeile). Bei einer 8 h-Behandlung mit MC-LR 50 nM kann eine leichte Erhöhung des P-ERK1/2-Gehalts festgestellt werden (Abbildung 52, B). Das Aktinnetzwerk bleibt bis 6 h unverändert, ist jedoch nach 8 h kollabiert und kondensiert um die Zelle und in der Zellmitte (B, weiße Pfeile). Eine Vernetzung zwischen den Zellen kann nicht mehr beobachtet werden und die Zellen sind stark geschrumpft. Dieser charakteristische und ausgeprägte Einfluss von MC-LR 100 nM auf das Aktinnetz ist in bereits ab 1 h zu sehen (Abbildung 52, C, weiße Pfeile). Der hohe Status an P-ERK1/2 bei 6 und 8 h steht zu den Ergebnissen des Western Blots im Widerspruch.

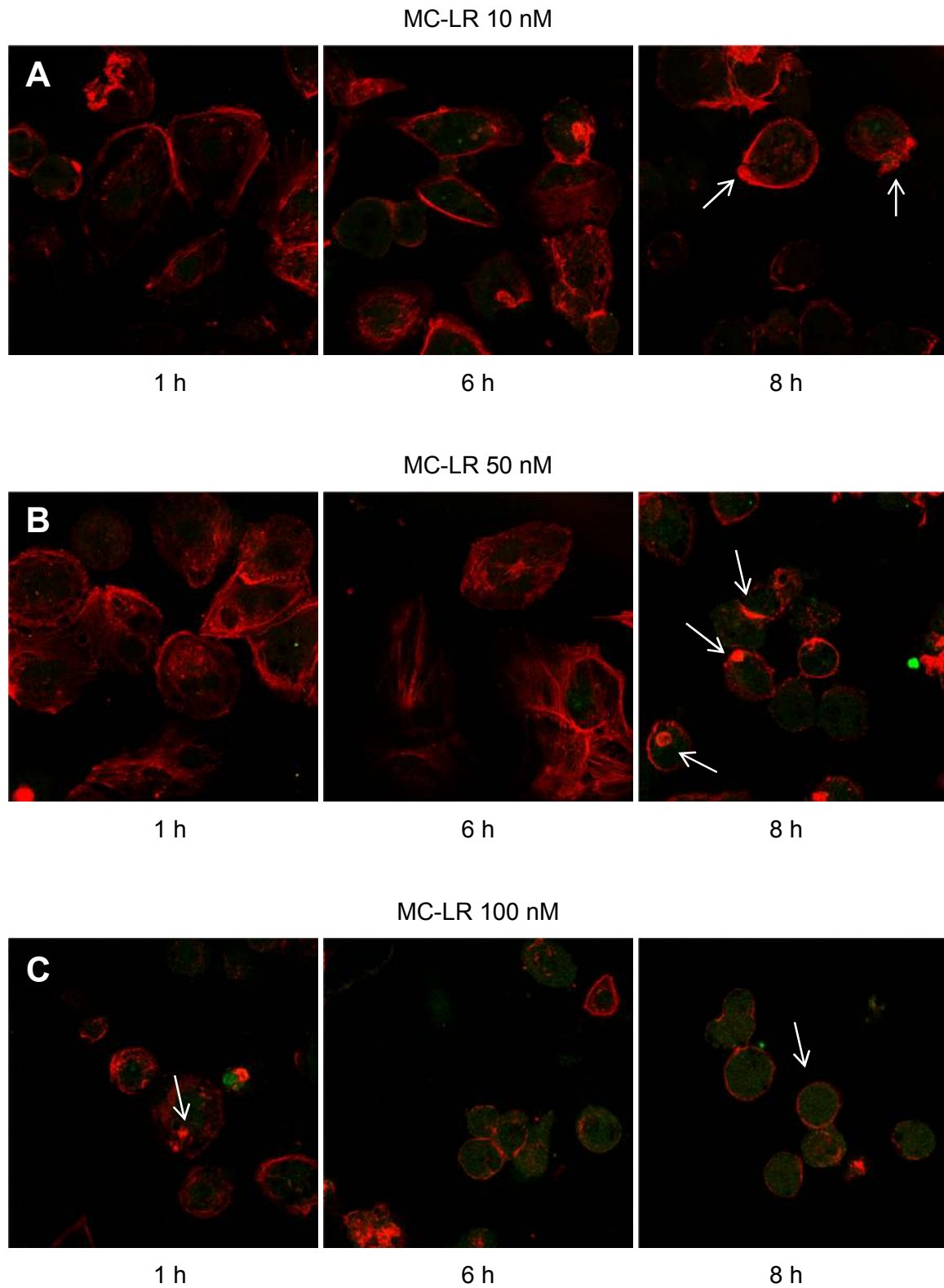


Abbildung 52: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von MC-LR. Status an P-ERK1/2 (grün) in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10 nM (A), 50 nM (B) und 100 nM (C) nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

Die zeit- und konzentrationsabhängige Beeinflussung von NOD auf den P-ERK1/2-Gehalt in primären Rattenhepatozyten zeigt im Vergleich zu MC-LR ein etwas anderes konsistentes Bild. Die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) weist (Abbildung 53 A, B) über 8 h keine Veränderung der P-ERK1/2-Menge auf. Die UVC-Bestrahlung und NOD 10 nM - Behandlung bewirkt bezogen auf 1 h eine zeitabhängige Erhöhung des phosphorylierten ERK1/2. Dieser Effekt ist für UVC bei 6 h und für NOD 10 nM bei 8 h statistisch signifikant und für UVC bei 7 h hoch signifikant. Ein stärkerer Einfluss ist bei Inkubation mit NOD 50 und 100 nM (Abbildung 53) festzustellen. NOD 50 nM bewirkt bezogen auf 1 h ab dem Zeitpunkt von 6 h einen deutlichen Anstieg an P-ERK1/2 (Abbildung 53 A), welcher bei 7 h statistisch signifikant ist (Abbildung 53 B), während der Gehalt an ERK1/2 konstant bleibt (Abbildung 53 A). Für NOD 100 nM kann eine Erhöhung von P-ERK1/2 bereits ab 4 h festgestellt werden (Abbildung 53 A), welche bei 6 und 7 h statistisch hoch signifikant ist und bezogen auf 1 h um das Zweifache ansteigt (Abbildung 53 B). Die konfokalen Immunfluoreszenz-Analysen bestätigen die ermittelten Daten des Western Blots. Für NOD 10, 50 und 100 nM können bei 1 h weder für das Aktinnetz noch für P-ERK1/2 Auswirkungen beobachtet werden (Abbildung 54 A, B, C). Bei 6 und 8 h jedoch werden eine Erhöhung des P-ERK1/2-Gehalts und die typischen stark ausgeprägten Veränderungen der Zellen, wie Zellschrumpfung, poröse Membran, kollabierte und kondensierte Aktinfilamente und Verlust des Zell-Zell-Kontakts festgestellt (weiße Pfeile).

Zusammenfassend wurde für NOD eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme an P-ERK1/2 und der stärkere Einfluss als MC-LR auf die Zelle festgestellt. Die Untersuchungen mit MC-LR liefern widersprüchliche Ergebnisse. Während die Daten der Western Blots keinen Effekt auf den Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 zeigen, kann bei konfokalen Immunfluoreszenz-Analysen eine konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung des P-ERK1/2-Gehalts beobachtet werden. Die Feststellung kann auf die niedrige Sensitivität des Western Blots zurückgeführt werden.

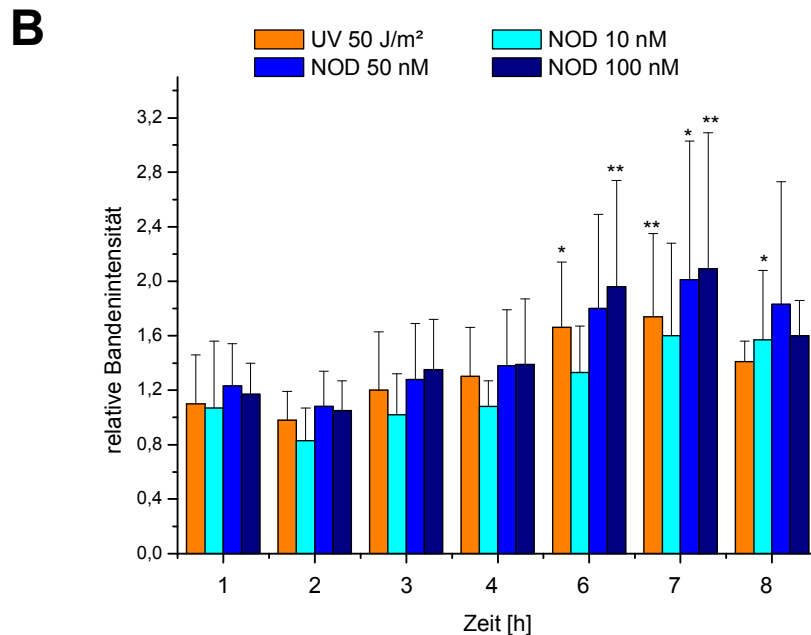
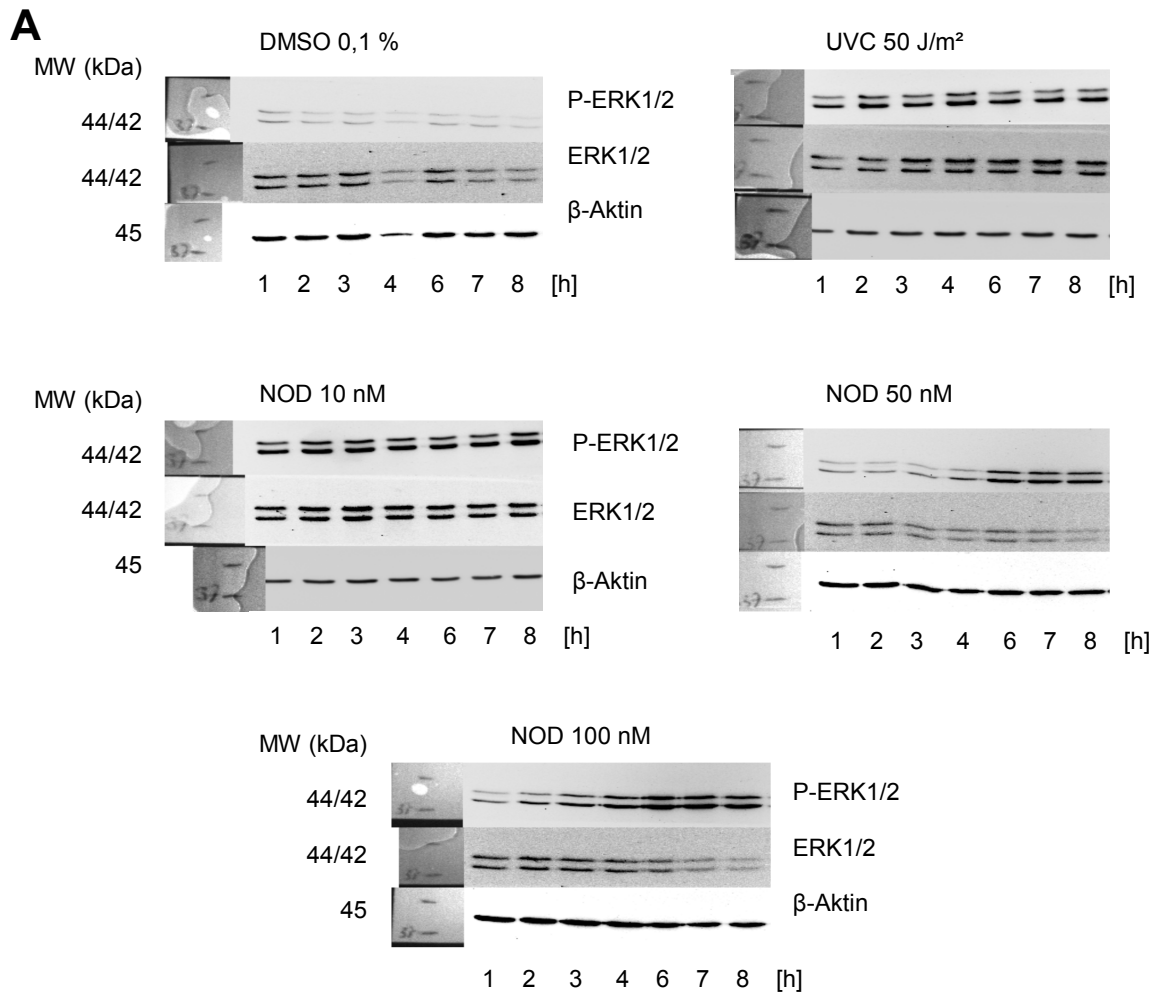


Abbildung 53: Western Blot P-ERK1/2 für NOD.
 Status an P-ERK1/2 in primären Rattenhepatozyten von UVC-Licht (50 J/m²) und NOD 10, 50 und 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentativer Western Blot (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW±SD; n≥3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01.

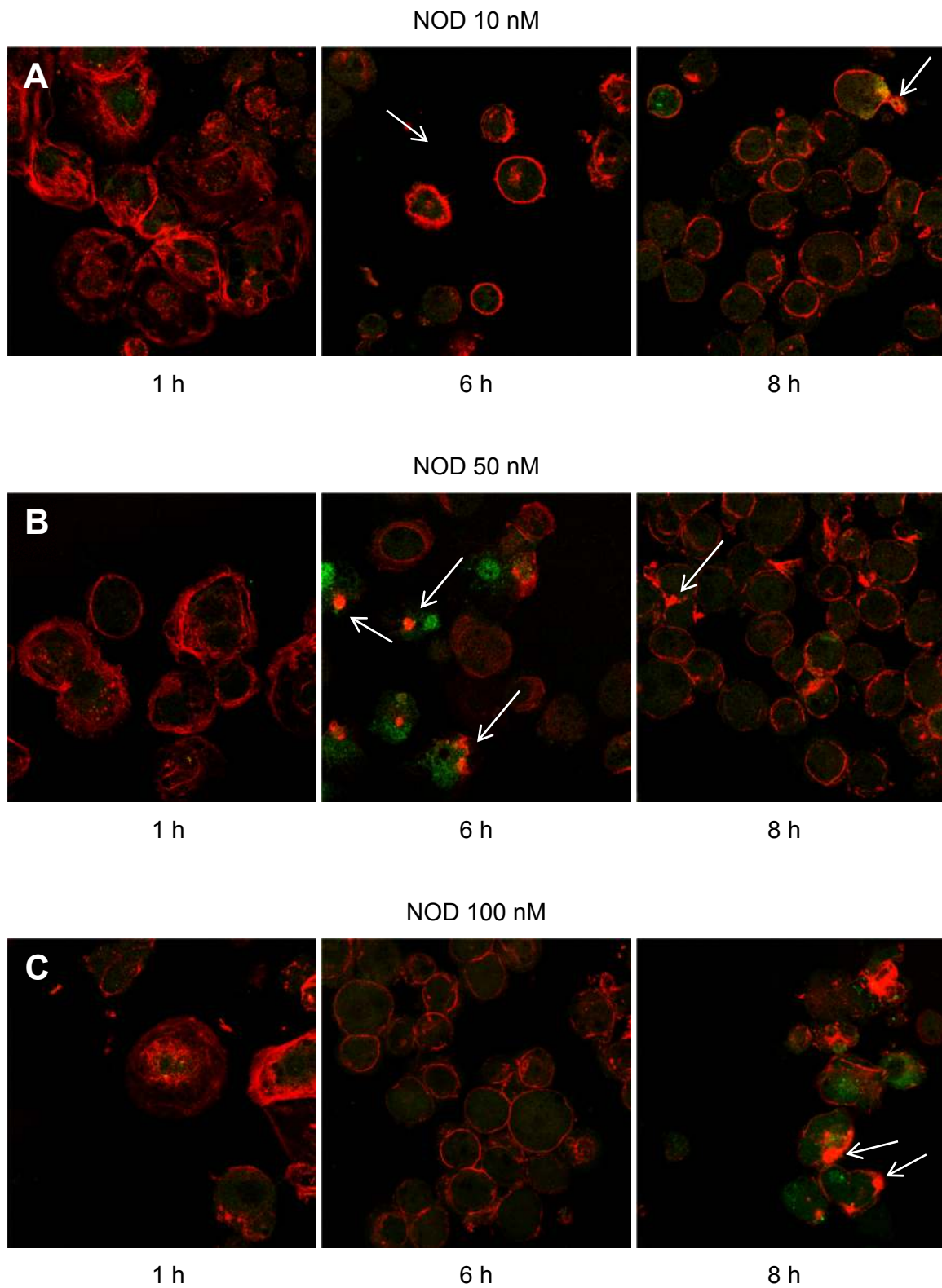


Abbildung 54: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von NOD.
Status an P-ERK1/2 (grün) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50 und 100 nM nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

5.5.2. Status an Phospho-p90RSK

Ein direktes Substrat von ERK1/2 stellt die p90kDa ribosomale S6 Serin/Threonin-Kinasen (RSK1-4)-Familie dar, welche wiederum S6 Proteine phosphorylieren. Für die Aktivierung der Kinasen ist die Phosphorylierung an Ser380, Thr359, Ser363 und Thr573 entscheidend. Dies kann durch Autophosphorylierung, MAPK und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) erfolgen (Frödin, et al., 1999).

Der Einfluss von MC-LR und NOD auf den Phosphorylierungsstatus von p90RSK wurde in primären Rattenhepatozyten auf Protein-Ebene mittels Western Blot untersucht. Dabei wurde zeit- und konzentrationsabhängig der P-p90RSK (Ser380)- und P-p90RSK (Thr359/Ser363)-Status betrachtet, welche auf den Gehalt der Ladungskontrolle β -Aktin und Gesamtproteinmenge an RSK1-3 bezogen wurden. Die ermittelten Daten der jeweiligen Konzentration von MC-LR oder NOD wurden auf den Zeitpunkt 1 h in Abhängigkeit gesetzt. In Abbildung 55 sind repräsentative Western Blots der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) und Positivkontrolle (UVC-Licht 50 J/m²) für den Gehalt an P-p90RSK (Ser380) (Abbildung 55 A), P-p90 (Thr359/Ser363) (Abbildung 55 B) und die Gesamtmenge von RSK1-3 dargestellt. Dabei kann kein Effekt für die Lösungsmittelkontrolle DMSO (0,1 %, V/V) und eine zeitabhängige leichte Erhöhung für die Bestrahlung mit UVC-Licht sowohl von P-p90RSK (Ser380) als auch von P-p90 (Thr359/Ser363) festgestellt werden. Der RSK1-3- und β -Aktin-Gehalt bleibt für alle Untersuchungen konstant.

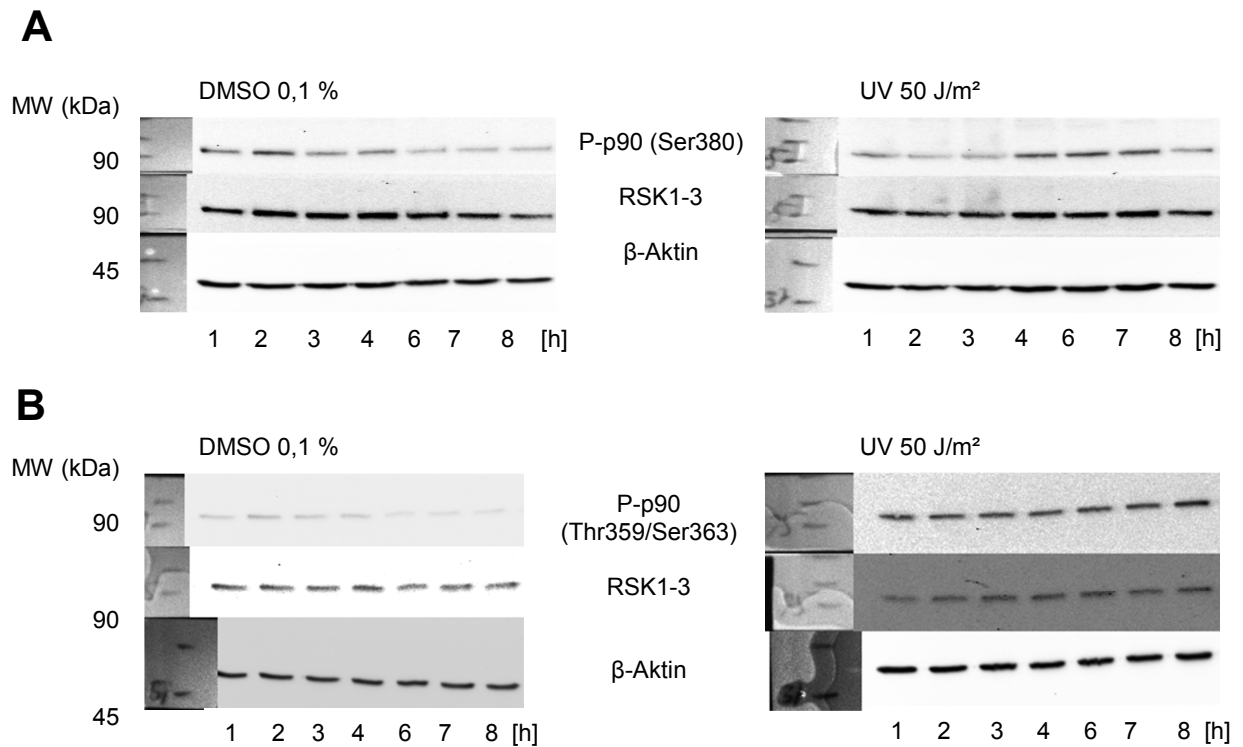


Abbildung 55: Western Blot P-p90RSK für Kontrollen.
 Status an P-p90RSK in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1% V/V) und UVC-Licht (50 J/m²) nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots für P-p90RSK (Ser380) (A) und P-p90RSK (Thr359/Ser363) (B).

Die Versuche mit MC-LR der Konzentrationen 10 und 50 nM und MC-RR 200 nM ergaben keine zeitabhängige Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus von p90RSK (Abbildung 56 und Abbildung 57). MC-LR 100 nM zeigt dagegen ab 4 h eine drei- bis fünffache Zunahme an P-p90RSK (Ser380) bezogen auf 1 h (Abbildung 56 A, B), welche bei 7 und 8 h statistisch hoch signifikant wird.

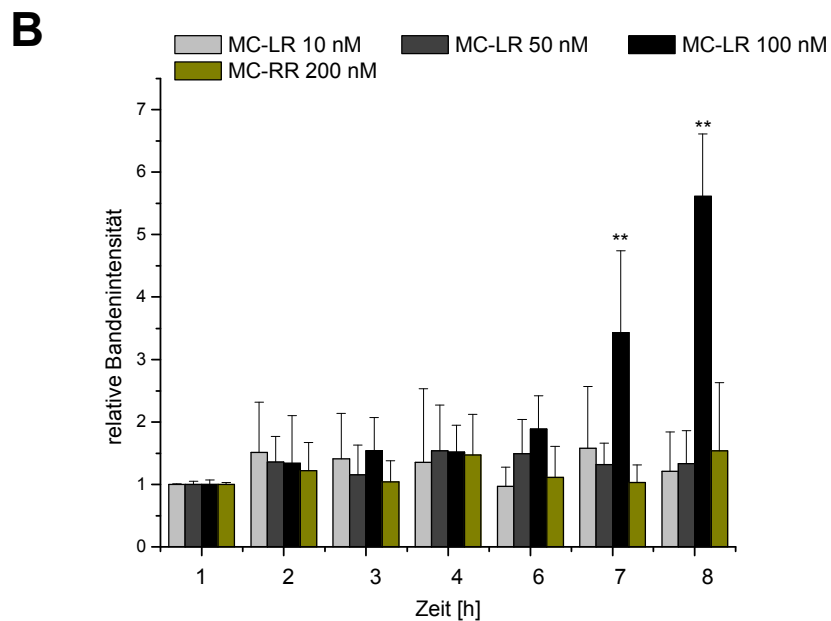
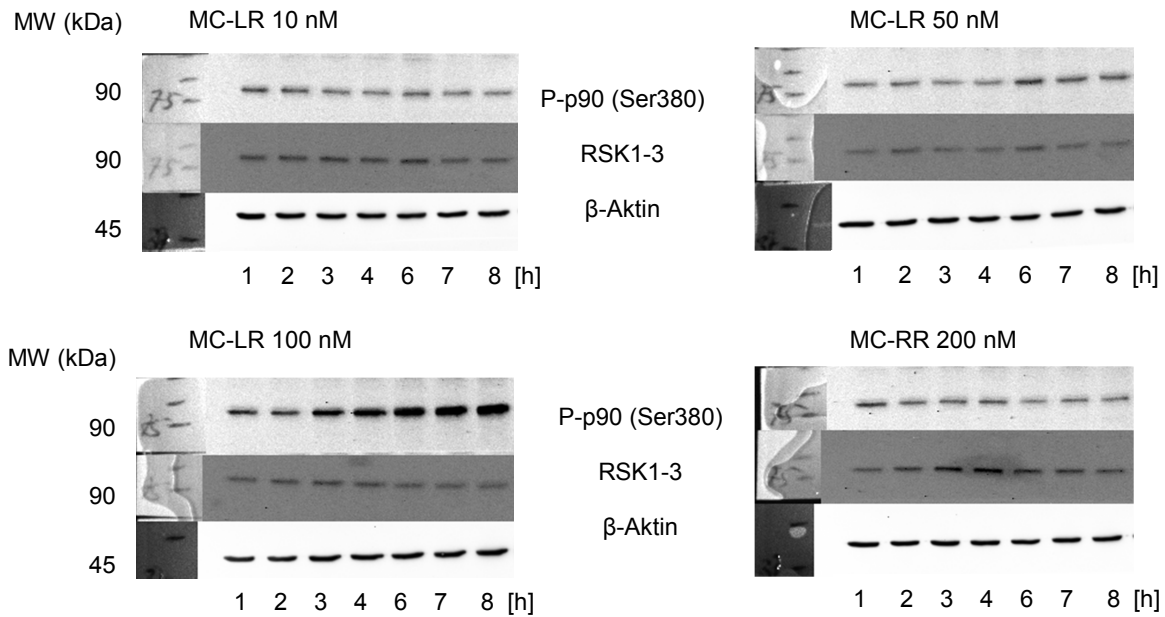


Abbildung 56: Western Blot P-p90RSK für MC-LR und MC-RR.
 Status an P-p90RSK (Ser380) in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50 und 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW±SD; n≥3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, ** ≤ 0,01.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für P-p90RSK (Thr359/Ser363) (Abbildung 57, A), der Effekt ist jedoch weniger stark ausgeprägt als für P-p90RSK (Ser380). Die Behandlung mit MC-LR 100 nM bewirkt eine zwei- bis dreifache statistisch signifikante Erhöhung des

P-p90RSK (Thr359/Ser363)-Gehalts zum Zeitpunkt von 7 h und eine statistisch hoch signifikante bei 8 h (Abbildung 57, B).

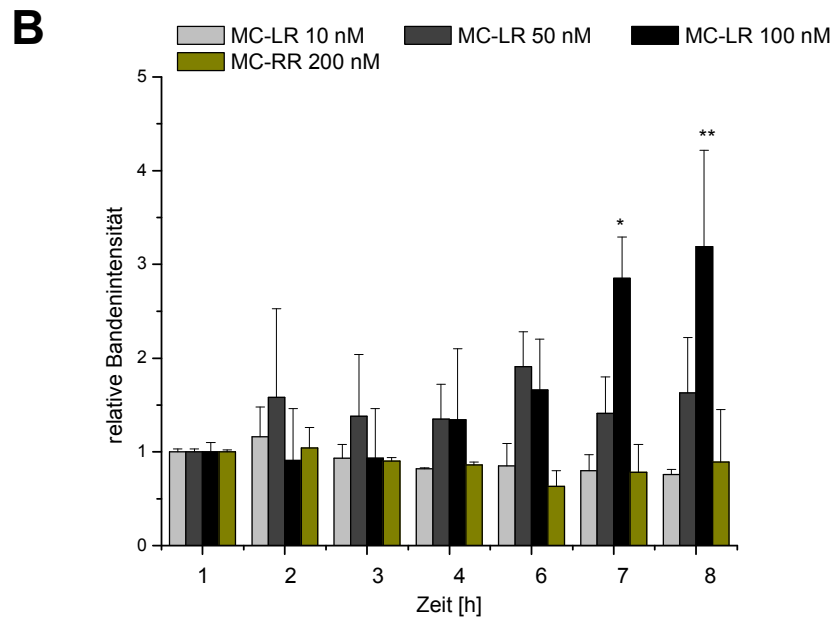
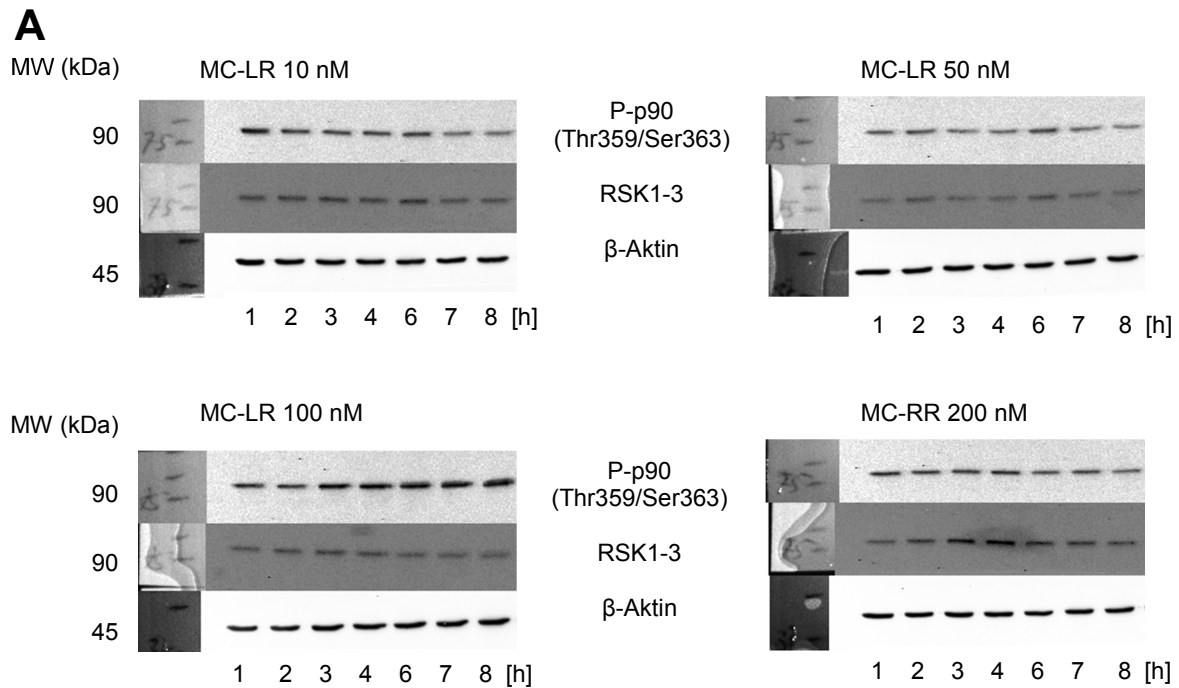


Abbildung 57: Western Blot P-p90RSK für MC-LR und MC-RR.
 Status an P-p90RSK (Thr359/Ser363) in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50 und 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW \pm SD; n=4. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnnett's post test*, * $\leq 0,05$, ** $\leq 0,01$.

Der Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von p90RSK in primären Rattenhepatozyten durch NOD ist ausgeprägter als der durch MC-LR. Eine konsistente konzentrations- und zeitabhängige Zunahme an P-p90RSK (Ser380) und P-p90RSK (Thr359/Ser363) ist in den Abbildung 58 und Abbildung 59 zu sehen. Für NOD 10 nM wurde bereits ab einem Zeitpunkt von 3 h der Gehalt an P-p90RSK (Ser380) und ab 6 h für P-p90RSK (Thr359/Ser363) statistisch signifikant erhöht. Mit zunehmender Konzentration von NOD wurde ein höherer Anstieg beobachtet, der bezogen auf 1 h fünf- bis sechsfach zunimmt. Dabei ist für NOD 50 und 100 nM die statistische Signifikanz zu späteren Zeitpunkten als für NOD 10 nM zu sehen, was jedoch auf die Fehlerbalken zurückzuführen ist.

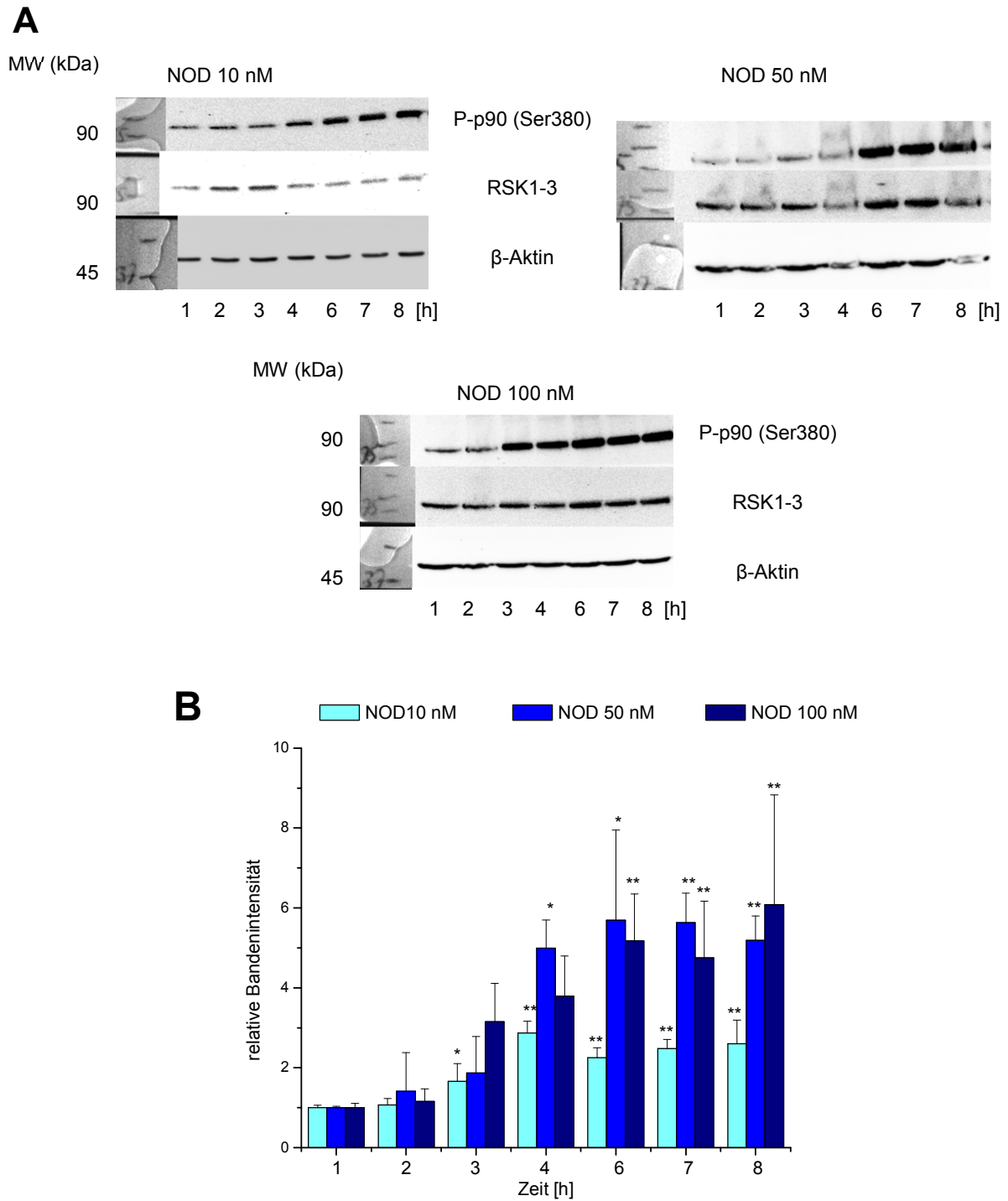


Abbildung 58: Western Blot P-p90RSK für NOD.

Status an P-p90RSK (Ser380) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50 und 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW \pm SD; n \geq 3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

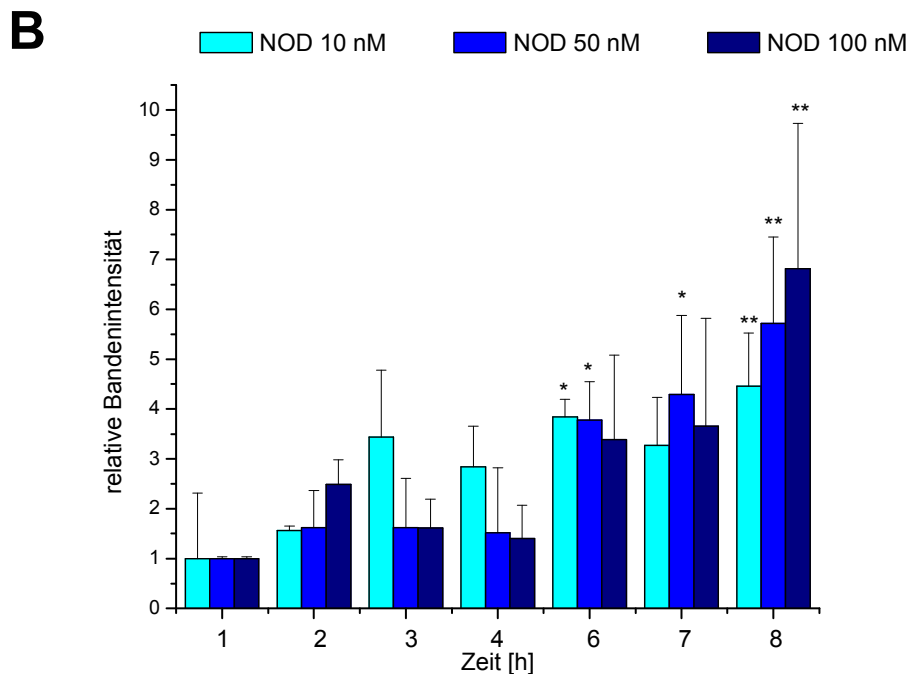
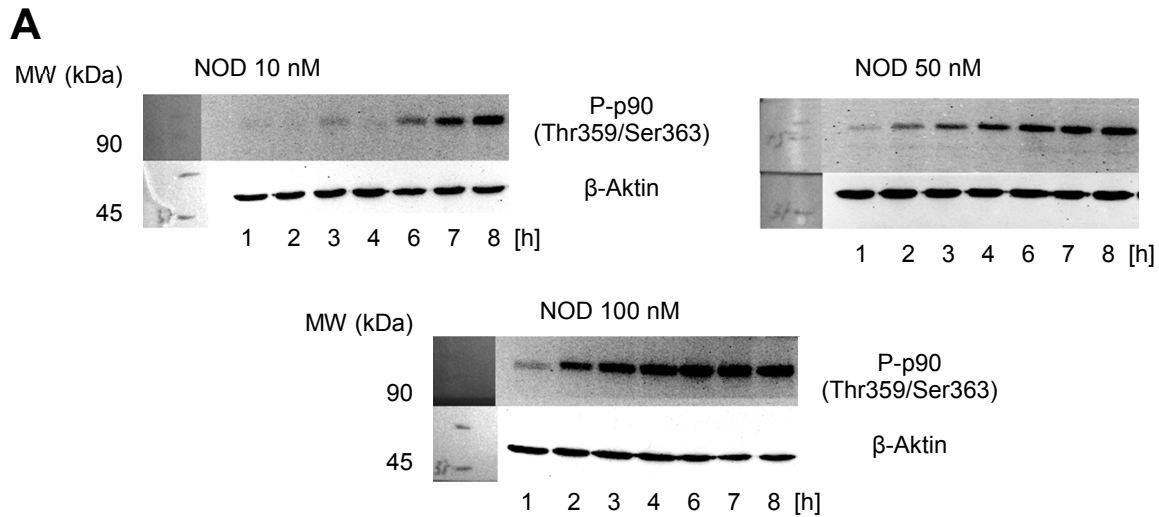


Abbildung 59: Western Blot P-p90RSK für NOD.
 Status an P-p90RSK (Thr359/Ser363) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50 und 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW±SD; n≥3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01.

Zusammenfassend wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Aktivierung des RSK-Signalwegs beobachtet, welcher durch NOD deutlich stärker beeinflusst wurde als durch MC-LR. Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass eine zweifache Zunahme von phosphoryliertem p90RSK durch NOD bereits bei einem frühen Zeitpunkt von 3 h erfolgt, während für P-ERK1/2 ein zweifacher Anstieg erst ab 6 h zu sehen ist.

5.5.3. Status an Phospho-p85/p70 und Phospho-S6rP

Weitere Kinasen, die in der Lage sind S6 Proteine zu phosphorylieren und somit Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung zu beeinflussen, stellen die p85 S6- und p70 S6-Kinase dar. Diese phosphorylieren S6 Proteine an der 40S ribosomalen Untereinheit, was zu einer erhöhten Translation von mRNA mit einer Oligopyrimidinsequenz in der 5' untranslatierten Region führt. Diese Gruppe von mRNA (5'TOP) verschlüsselten Proteinen sind an der Zellzyklusprogression beteiligt und Teil der Translation, wie ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren (Peterson, 1998; Jefferies, et al., 1997). PP2A/PP1 können p85/70 S6-Kinasen sowohl direkt als auch über eine Inhibierung von PDK1 (*3-hosphoinositide dependent protein kinase-1*) und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinasen) hemmen (Peterson, 1998; Basu, 2011; Eichhorn, et al., 2009; Kim, et al., 2007).

Der Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von p85 S6, p70 S6 und S6rP (ribosomales Protein) durch MC-LR, MC-RR und NOD wurde in primären Rattenhepatozyten auf Protein-Ebene mittels Western Blot festgestellt. Dabei wurde auf P-p85 (Thr412) und P-p70 (Thr389) zeit- und konzentrationsabhängig untersucht, welche auf die Ladungskontrolle β -Aktin bezogen wurden. Die Durchführung eines PathScan Multiplex Western Cocktails lieferte den Phosphorylierungsstatus für P-S6rP (Ser235/236), wobei das von der Phosphorylierung unabhängige Protein eIF4E (*eukariotischer Initiationsfaktor 4E*) als Ladungskontrolle gegeben war. Die ermittelten Daten der jeweiligen Konzentration von MC-LR oder NOD wurden auf den Zeitpunkt 1 h bezogen. In Abbildung 60 sind repräsentative Western Blots (A) und die densitometrische Auswertung (B) der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V), Positivkontrolle (UVC-Licht 50 J/m²), MC-LR 10, 50, 100 nM und MC-RR 200 nM für den Gehalt an P-p85/p70 S6 (Thr412)/(Thr389) dargestellt. Dabei kann durch die Lösungsmittelkontrolle kein Einfluss und durch UVC-Behandlung eine zeitabhängige Erhöhung sowohl von P-p85 S6 (Thr412) als auch von P-p70 S6 (Thr389) beobachtet werden. Die Untersuchungen mit MC-LR in den Konzentrationen 10 und 50 nM sowie MC-RR 200 nM ergeben keine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus von P-p85/p70 S6 (Thr412)/(Thr389). MC-LR 100 nM zeigt eine leichte erhöhende Tendenz für P-p70 S6 (Thr389) (A), welche jedoch statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 60, B).

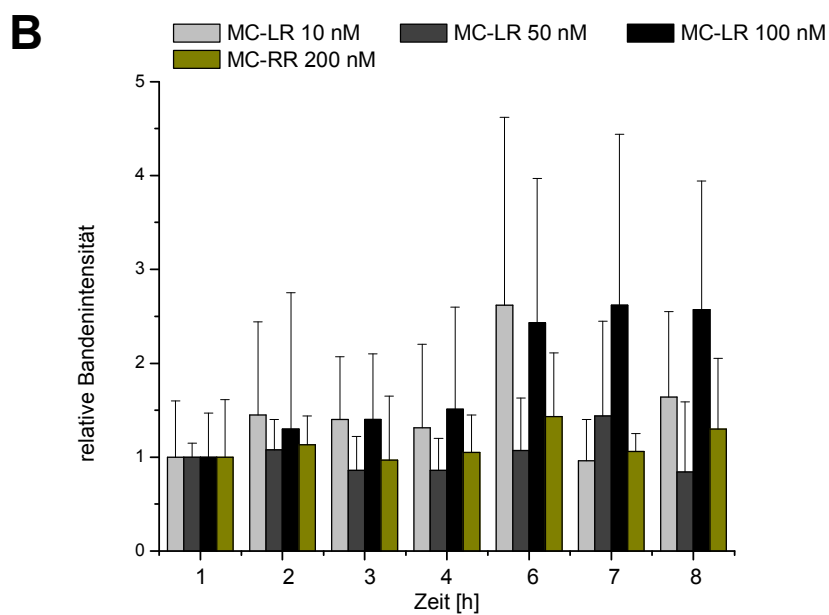
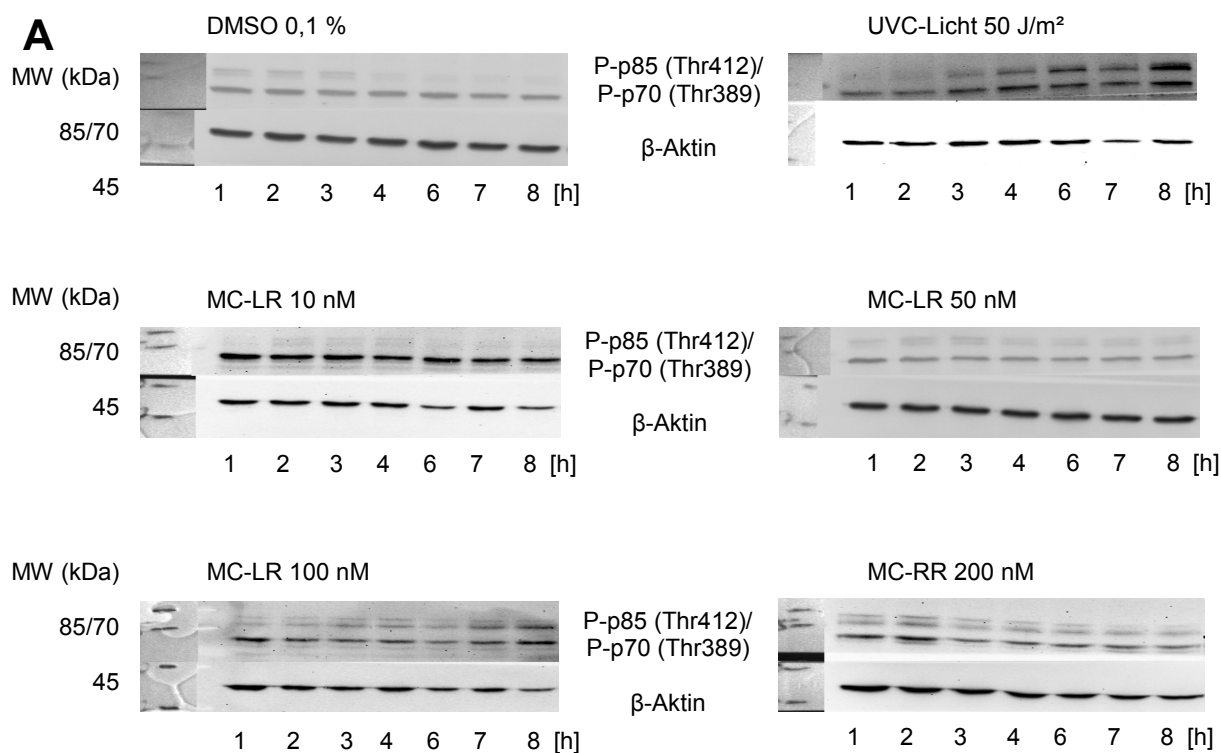


Abbildung 60: Western Blot P-p70S6 für MC-LR und MC-RR.
 Status an P-p70S6 (Thr389) in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50, 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung (B) aus MW \pm SD; n=4. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnnett's post test*.

Ein anderes Bild zeigen dagegen die Versuche mit NOD. In Abbildung 61 kann eine konsistente statistisch signifikante konzentrations- und zeitabhängige Erhöhung von P-p85 (Thr412) und P-p70 S6 (Thr389) beobachtet werden. Dabei wird der Status an P-p70 S6 (Thr389) bei einem früheren Zeitpunkt erhöht als der an P-p85 S6 (Thr412), jedoch weniger stark ausgeprägt. Besonders deutlich ist dies für die Konzentration 10 nM gezeigt (Abbildung 61 A). Eine statistisch signifikante Zunahme an P-p85 S6 (Thr412) erfolgt bei 7 h und erreicht ein Maximum für diese Konzentration bei einer vierfachen Erhöhung (Abbildung 61 A, B), wobei die Menge an P-p70 S6 (Thr389) bereits ab 3 h (Abbildung 61 A) zunimmt. Diese ist jedoch erst bei 8 h statistisch hoch signifikant und ebenfalls um das Vierfache erhöht (Abbildung 61 C). Für die Konzentrationen 50 und 100 nM kann eine entsprechend verstärkte Wirkung, die zu einem früheren Zeitpunkt eintritt, gezeigt werden (Abbildung 61 A). Dabei werden bezogen auf 1 h eine elffache Zunahme für P-p85 S6 (Thr412) und eine vierfache für P-p70 S6 (Thr389) (Abbildung 61 B, C) festgestellt.

Die Erhöhung des Phosphorylierungsstatus für p90RSK und p85/70 S6 durch NOD sollte folglich eine klare Auswirkung auf P-S6 ribosomales Protein zeigen. Betrachtet man aber Abbildung 62, kann bis auf eine leichte Tendenz einer Erhöhung keine deutliche Zunahme beobachtet werden. Nur die Konzentration 100 nM liefert einen statistisch signifikanten Anstieg an P-S6rP (Ser235/236) bei 8 h (Abbildung 62 B). Vergleicht man den basalen Status bei der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) mit dem der jeweiligen Behandlungen, kann eine allgemeine zeitunabhängige Zunahme an P-S6rP (Ser235/236) (Abbildung 62, A) festgestellt werden.

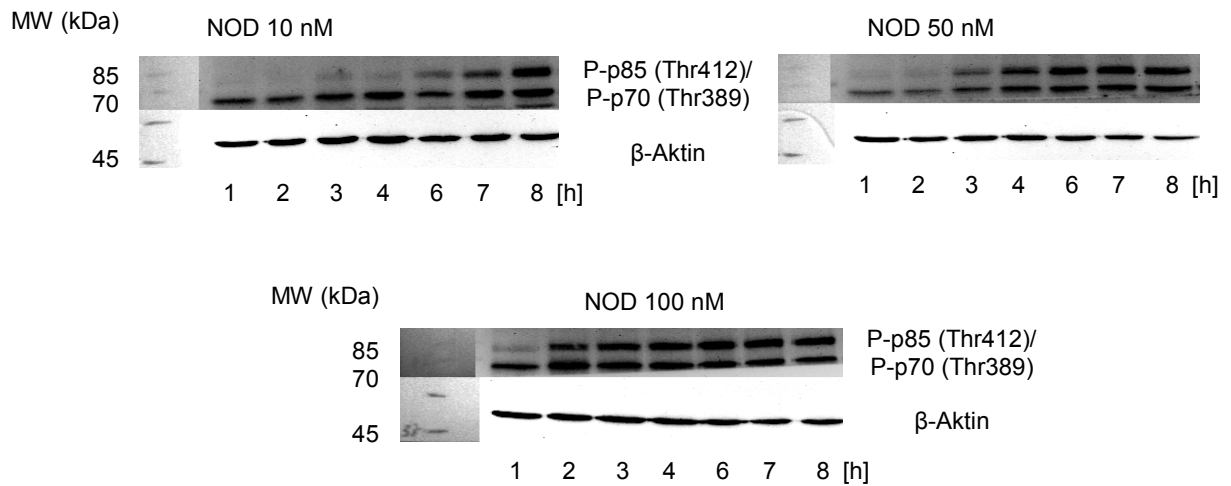
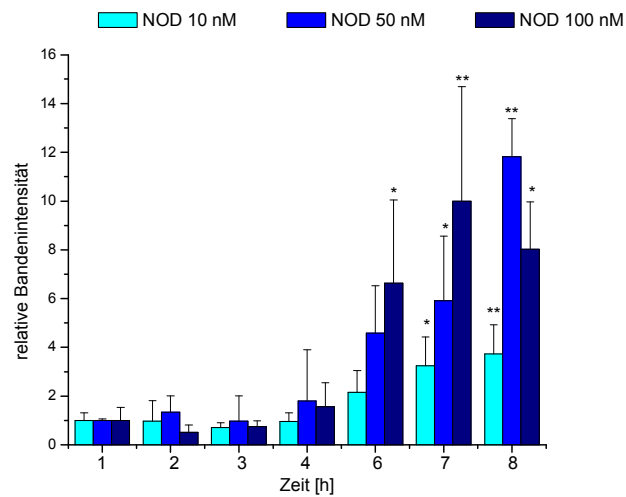
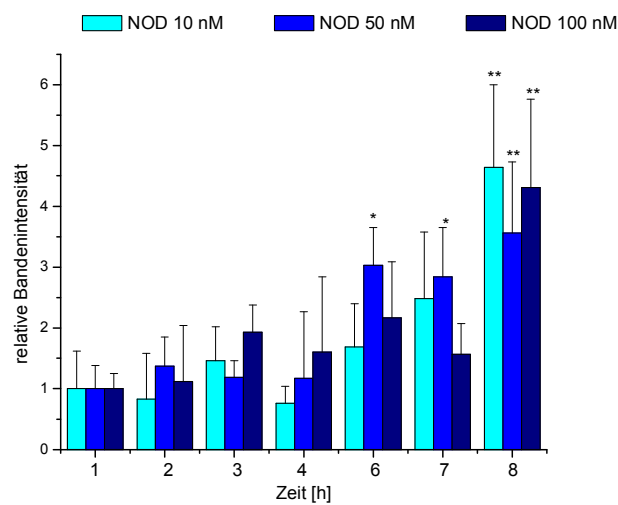
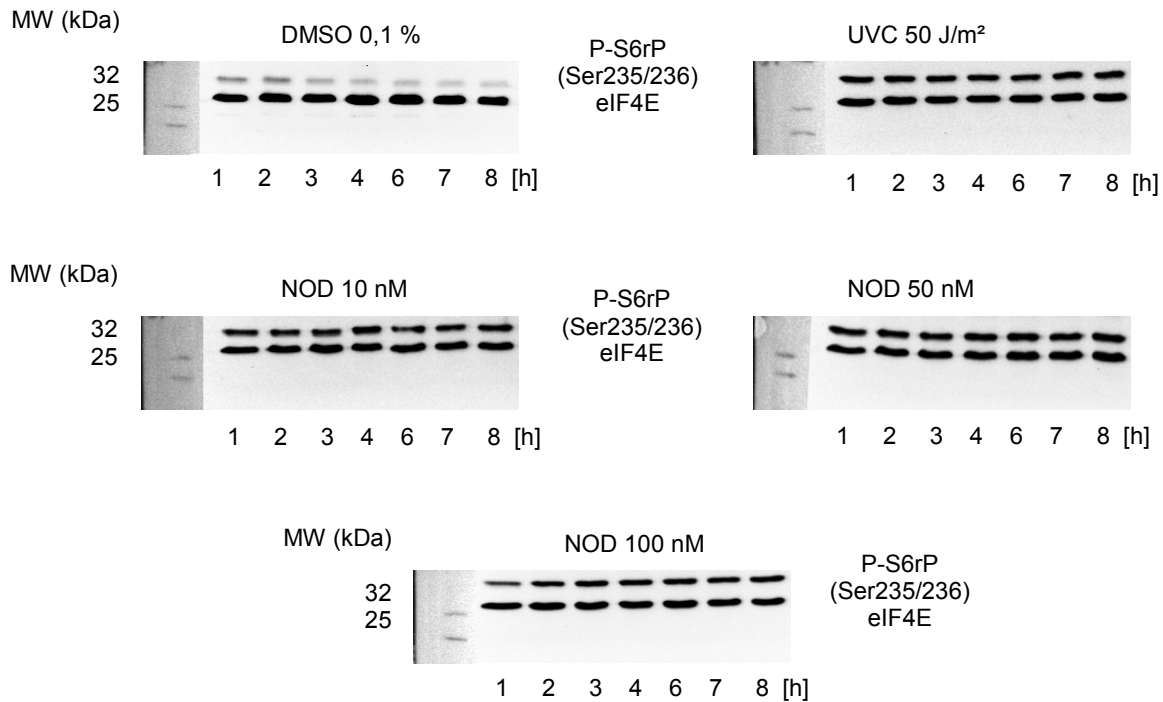
A**B****C**

Abbildung 61: Western Blot P-p85/p70S6 für NOD.
 Status an P-p85/p70S6 (Thr412)/(Thr389) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für

P-p85S6 (Thr412) (B) und P-p70S6 (Thr389) (C) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

A



B

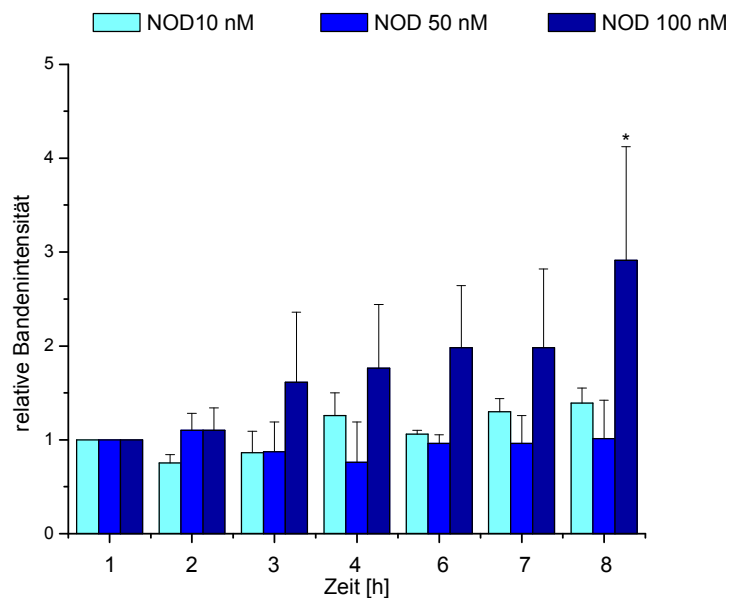


Abbildung 62: Western Blot P-S6rP für NOD.

Status an P-S6 ribosomales Protein (Ser235/236) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für P-S6 ribosomales Protein (Ser235/236) (B) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, ** \leq 0,01.

5.5.4. Status an Phospho-p38 MAPK und Phospho-MSK1/2

Zellulärer Stress wie osmotischer Schock, Zytokine, LPS (Lipopolysaccharide), UV-Licht-Bestrahlung und Wachstumsfaktoren führt zu Auslösung des p38-Signalwegs. Die Aktivierung der MAPKinase p38 erfolgt durch MKK3, MKK6 und SEK mittels Phosphorylierung von Thr180 und Tyr182. MSK1/2 kann wiederum durch p38 und ERK1/2 aktiviert werden, indem eine Phosphorylierung an Ser360 und Ser376 stattfindet (Pearson, et al., 2001).

Primäre Rattenhepatozyten wurden mit NOD 10, 50 und 100 nM inkubiert und nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h auf Proteinebene mittels Western Blot auf den P-p38 (Thr180/Tyr182)-, MSK1/2 (Ser360)- und MSK1/2 (Ser376)-Status untersucht. Für die Ermittlung des Phosphorylierungsstatus von P-p38 (Thr180/Tyr182) wurde ein PathScan Multiplex Western Cocktail verwendet, in dem die Ladungskontrolle eIF4E vorgegeben war. Es wurde auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) bezogen und für die jeweiligen Konzentrationen in Abhängigkeit zu 1 h gesetzt. Um sicher zu stellen, dass kein Einfluss durch NOD auf den Gesamtproteingehalt von p38 vorliegt, wurde ebenfalls mittels Western Blot die Proteinmenge ermittelt (siehe Anhang Abbildung 93). Die Verwendung zweier unabhängiger MSK1/2-Antikörper konnte keine Daten bezüglich des Phosphorylierungsstatus liefern, da für keine Behandlung Banden detektiert werden konnten.

Abbildung 63 zeigt für die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) keinen und für UVC-Bestrahlung einen erhöhenden Einfluss auf den P-p38 (Thr180/Tyr182)-Status (Abbildung 63 A). Die Behandlung mit NOD 10 nM ergibt bezogen auf 1 h im untersuchten Zeitintervall von 8 h eine zeitabhängige dreifache Zunahme von P-p38 (Thr180/Tyr182) (Abbildung 63 A, B), die bereits ab 4 h eine Tendenz der Zunahme aufweist. Mit höheren Konzentrationen (50 und 100 nM) kommt es zu einem verstärkten Einfluss auf den P-p38 (Thr180/Tyr182)-Status, der einen vierfachen Anstieg hervorruft und zu einem früheren Zeitpunkt eintritt. So kann eine Erhöhung des Phosphorylierungsgehalts von p38 (Thr180/Tyr182) bereits ab 2 h (Abbildung 63 A) beobachtet werden, die für NOD 50 nM bei 8 h statistisch signifikant und für NOD 100 nM ab 6 h statistisch hoch signifikant ist.

Da sowohl der ERK1/2- als auch p38-Signalweg durch NOD ab 10 nM ab 4 bis 6 h eindeutig aktiviert wurde und beide einen Einfluss auf MSK1/2 haben, sollte eine Erhöhung des Phosphorylierungsgehalts von MSK1 (Ser360) und MSK1 (Ser376) zu erwarten sein. Da keine Banden und somit Daten ermittelt werden konnten, kann keine klare Aussage getroffen werden.

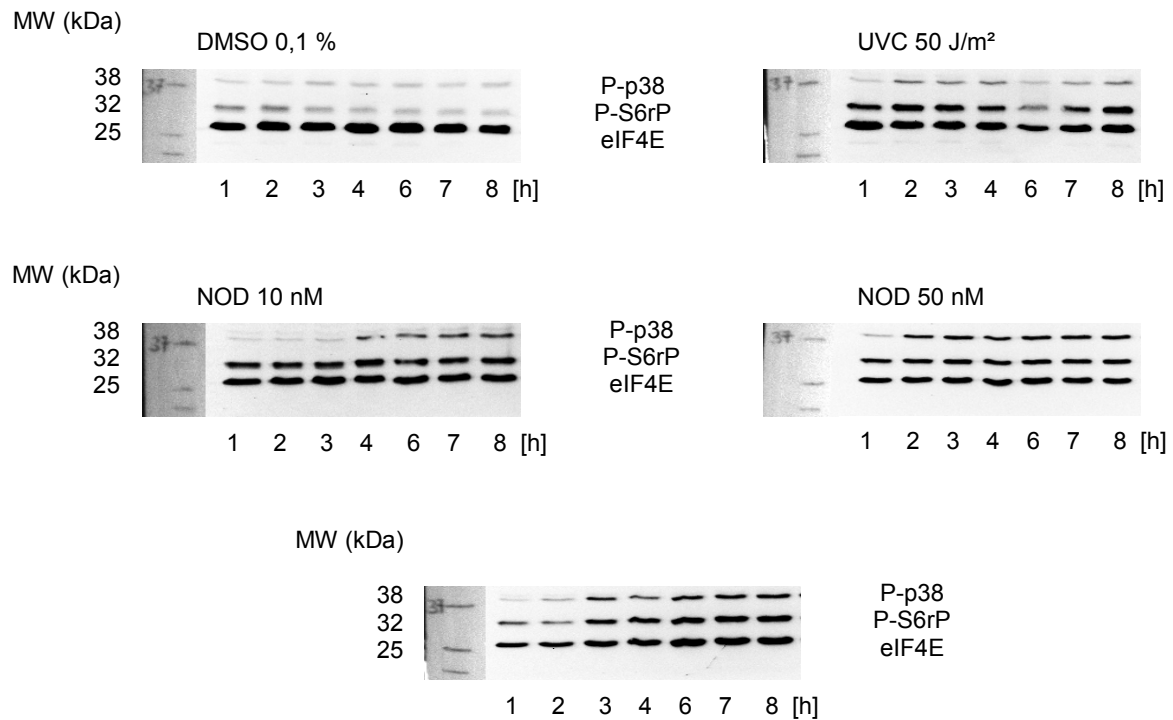
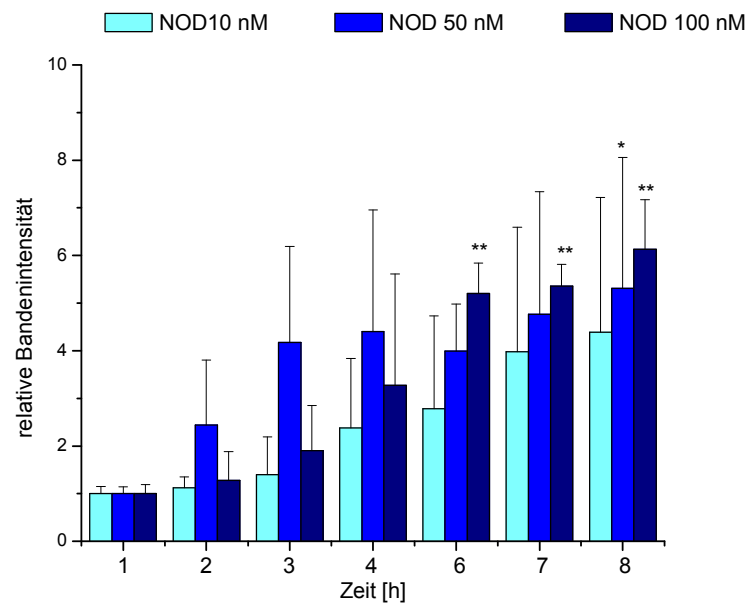
A**B**

Abbildung 63: Western Blot P-p38MAPK für NOD.

Status an P-p38MAPK (Thr180/Tyr182) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für P-p38MAPK (Thr180/Tyr182) (B) aus MW±SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * ≤ 0,05, ** ≤ 0,01.

5.5.5. Status an Bax, Bcl2 und Bcl-xL

Da MCs und NODs durch Hemmung von PP2A und PP1 in der Lage sind Apoptosen auszulösen und der Signalweg über MAPKinasen an der Regulierung von Apoptosemarkern beteiligt ist (Svircev, et al., 2010), wurde der mögliche Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischer Proteine untersucht. Bax spielt eine entscheidende Rolle in der durch mitochondrialen Stress verursachten Apoptose. Dabei erhöht Bax die Membranpermeabilität von Mitochondrien, wodurch Cytochrom c freigesetzt und Caspase 9 aktiviert wird (Narita, et al., 1998). Bcl-2 stellt als antiapoptotisches Protein einen Gegenspieler von Bax dar, indem es die Freisetzung von Cytochrom c inhibiert. Ein weiteres Mitglied der Bcl-2-Familie ist Bcl-xL, welches ebenfalls antiapoptotisch wirkt. Durch die Bildung eines Heterodimers mit Bax, welches porenbildende Eigenschaften aufweist, wird die Aufrechterhaltung der Membranintegrität von Mitochondrien gewährleistet und somit apoptotische Effekte gehemmt (Zhou, et al., 2010).

In primären Rattenhepatozyten wurde die Wirkung durch MC-LR und NOD auf Bax (pro-apoptotisch), Bcl2 und Bcl-xL (anti-apoptotisch) auf Proteinebene mittels Western Blot und für Bcl-xL zusätzlich mittels konfokalen Immunfluoreszenz-Analysen untersucht. Für die densitometrische Auswertung wurden die Gehalte für Bax, Bcl-2 und Bcl-xL auf die Ladungskontrolle (β -Aktin), dann auf die entsprechenden Zeitpunkte der Lösungsmittelkontrolle (DMSO) und zum Schluss auf den Zeitpunkt 1 h der jeweiligen Konzentration bezogen.

In Abbildung 64 sind für primäre Rattenhepatozyten repräsentative Western Blots (Abbildung 64 A) und eine densitometrische Auswertung (Abbildung 64 B) für MC-LR und MC-RR dargestellt. Dabei kommt es erwartungsgemäß in einem Zeitraum von 24 h zu keiner Regulierung des Bax-Gehalts durch die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) und zu einer Hochregulierung durch UVC-Bestrahlung (Abbildung 64 A). MC-LR 100 nM ist in der Lage bei den Zeitpunkten 8 und 24 h einen schwachen Anstieg des Bax-Gehalts hervorzurufen (Abbildung 64 A), wobei keine statistische Signifikanz gegeben ist (Abbildung 64 B). MC-RR besitzt keinen Einfluss auf Bax (Abbildung 64 A, B).

Die Behandlung mit NOD zeigt eine zeitabhängige zweifache Induktion von Bax (Abbildung 65). Dabei steigt die Proteinmenge an Bax für NOD 10 nM bis 8 h und fällt bei 24 h leicht ab (Abbildung 65 A, B). Auch die höheren Konzentrationen (50 und 100 nM) führen zu einer zweifachen Induktion von Bax, wobei eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit nicht zu erkennen ist.

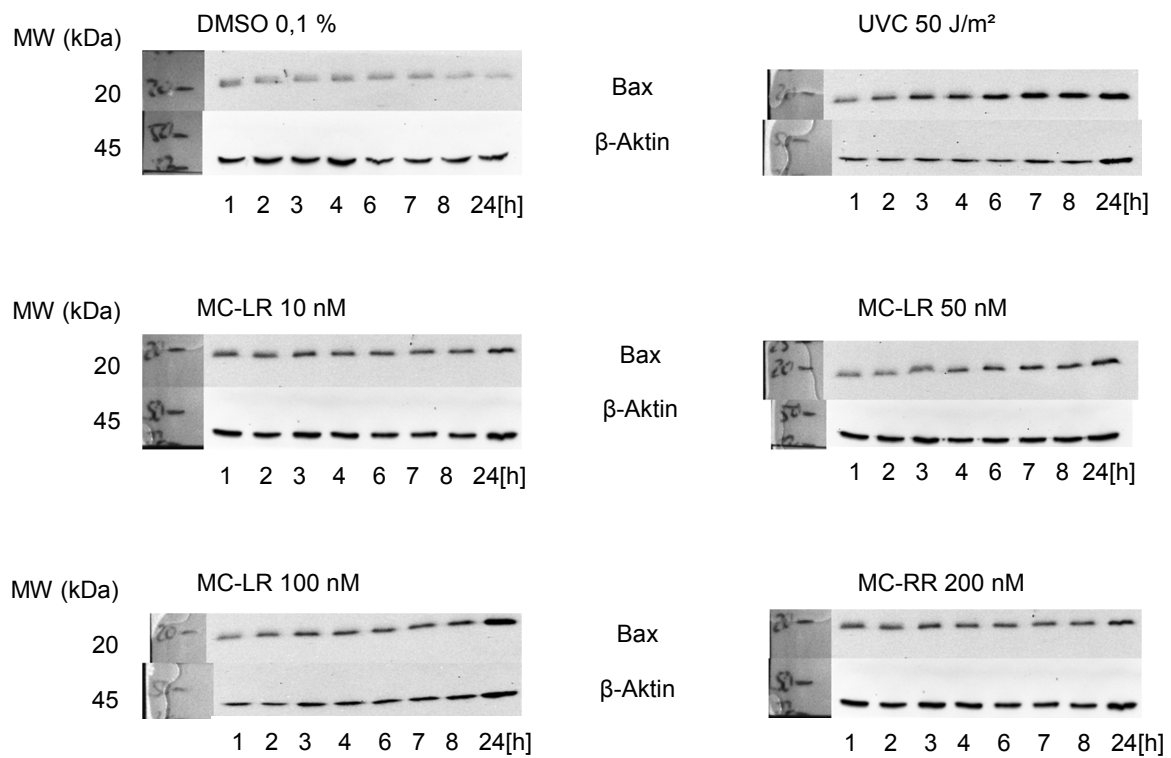
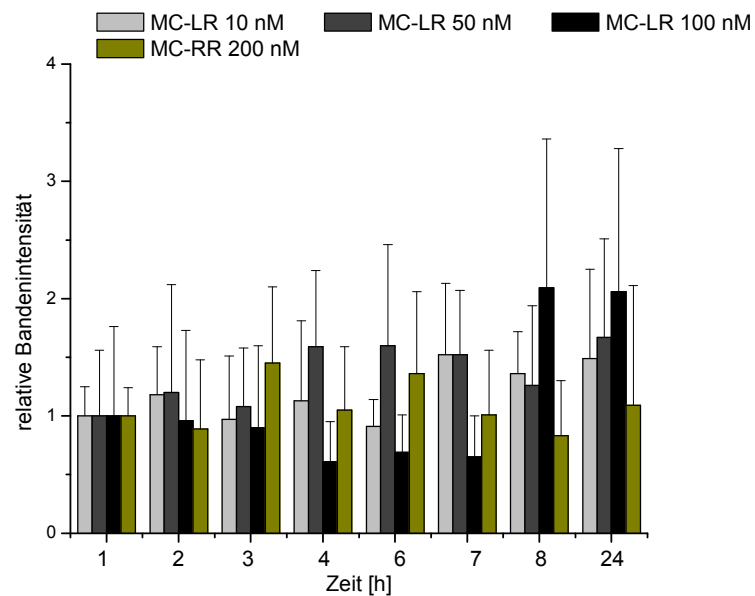
A**B**

Abbildung 64: Western Blot Bax für MC-LR und MC-RR. Status an Bax in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50, 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 24 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bax (B) aus MW \pm SD; n=4. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnnett's post test*.

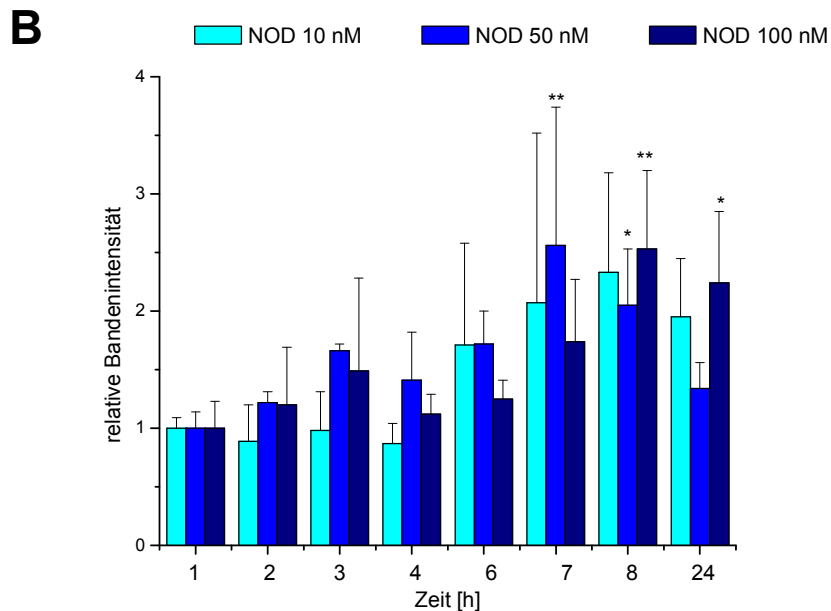
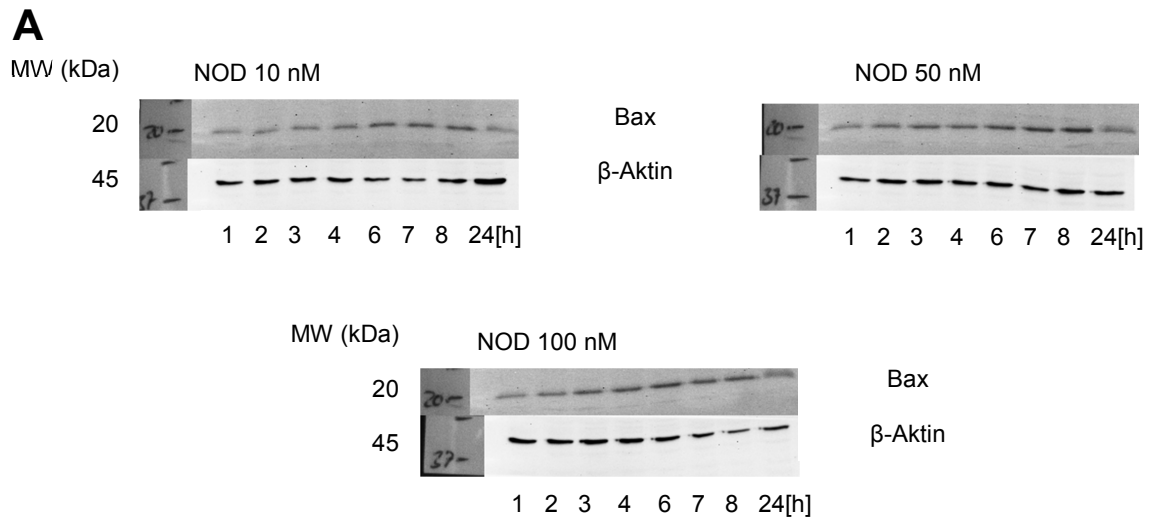


Abbildung 65: Western Blot Bax für NOD.

Status an Bax in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bax (B) aus MW \pm SD; n=5. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*, * \leq 0,05, ** \leq 0,01.

Weder die Behandlung mit MC-LR noch mit MC-RR oder NOD haben Einfluss auf die Bcl-2-Induktion in primären Hepatozyten der Ratte. In den Abbildung 66 und Abbildung 67 kann in den repräsentativen Blots (A) und der densitometrischen Auswertung (B) über einen Zeitraum von 24 h keine Veränderung bezüglich des Proteingehalts an Bcl-2 im Vergleich zum basalen Status der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) beobachtet werden.

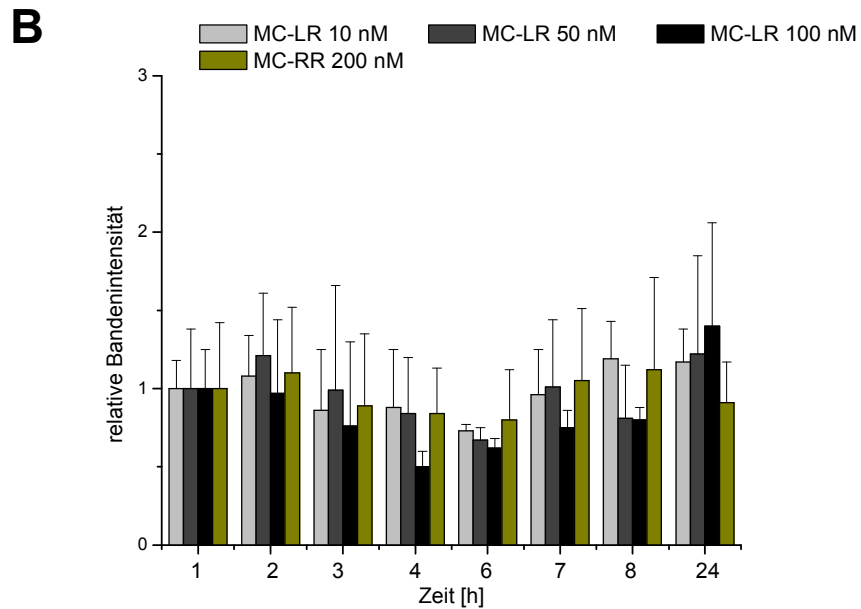
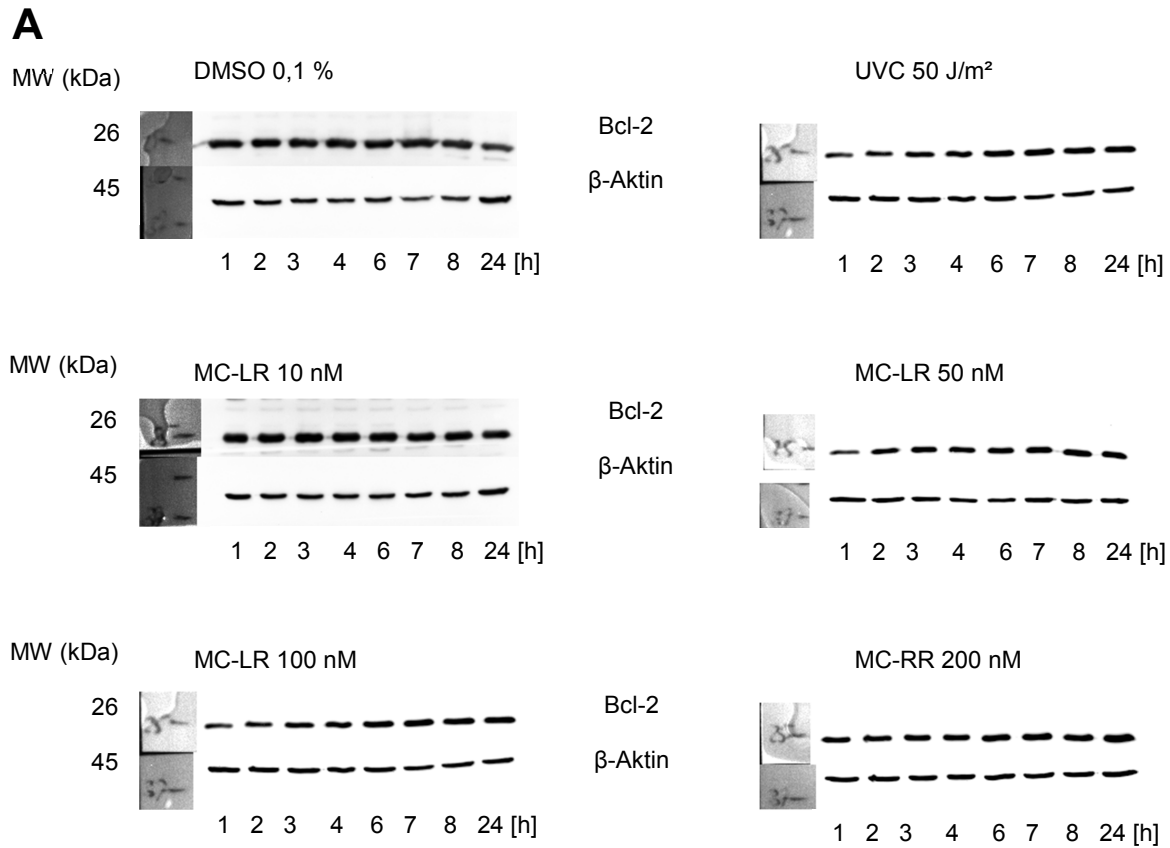


Abbildung 66: Western Blot Bcl-2 für MC-LR und MC-RR.
 Status an Bcl-2 in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50, 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bcl-2 (B) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

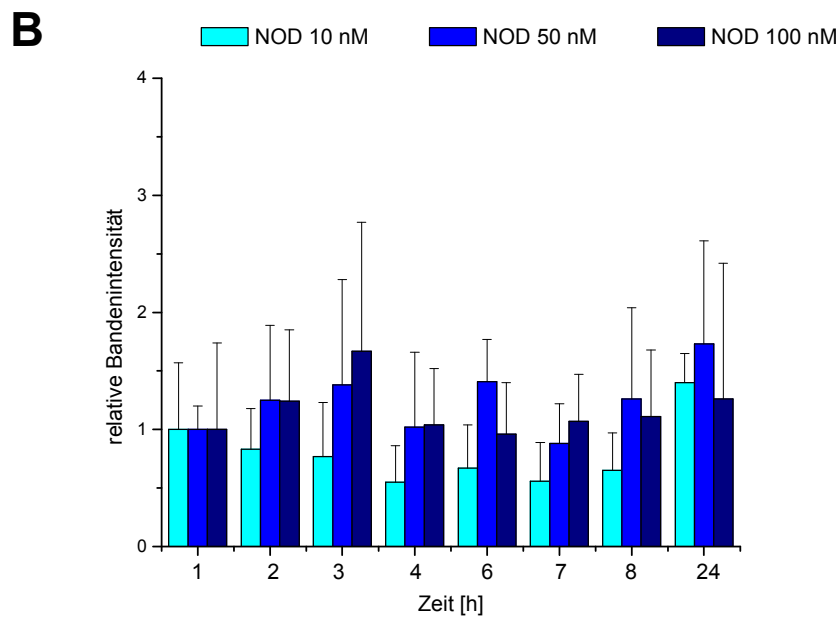
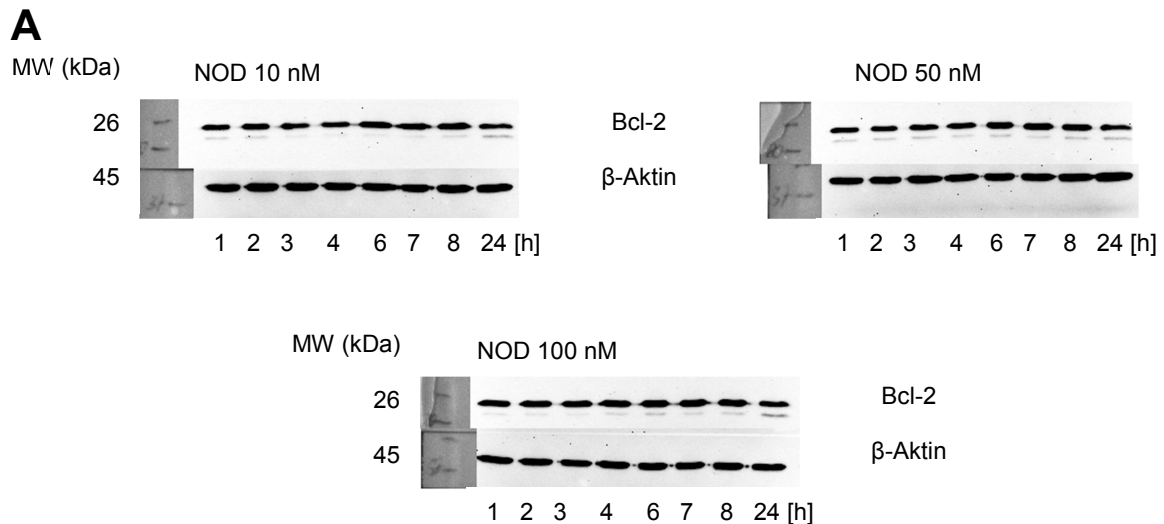
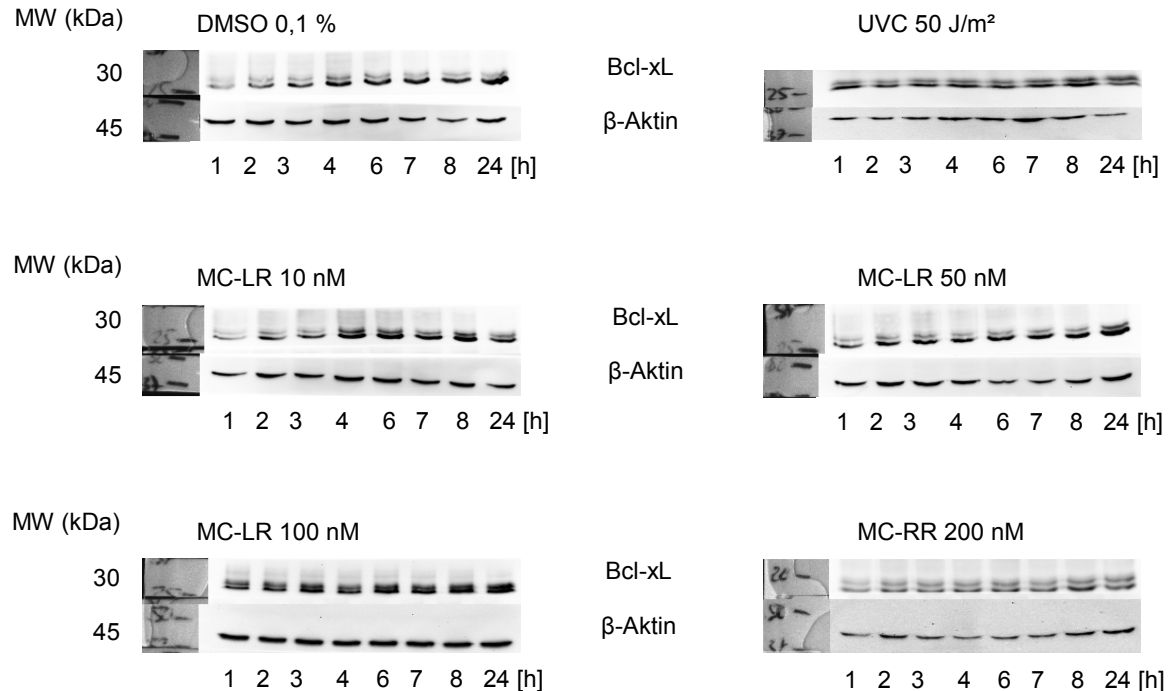


Abbildung 67: Western Blot Bcl-2 für NOD.
 Status an Bcl-2 in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bcl-2 (B) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

Die Untersuchungen primärer Rattenhepatozyten mittels Western Blot zeigen für MC-LR 10, 50 und 100 nM und MC-RR 200 nM keine Veränderung für die Proteinmenge an Bcl-xL (Abbildung 68, A, B). In Abbildung 69 sind konfokale Immunofluoreszenz-Analysen für die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) und UVC-Bestrahlung dargestellt. Dabei ist für DMSO bei allen Zeitpunkten (1, 6 und 8 h) ein gleichbleibendes starkes Signal für Bcl-xL zu sehen. Die UVC-Bestrahlung zeigt eine leichte Abnahme des Bcl-xL-Gehalts (Abbildung 69).

Die Behandlung mit MC-LR 10, 50 und 100 nM liefern keinen Einfluss auf Bcl-xL, obwohl bereits apoptotische Merkmale zu erkennen sind (weiße Pfeile) (Abbildung 70).

A



B

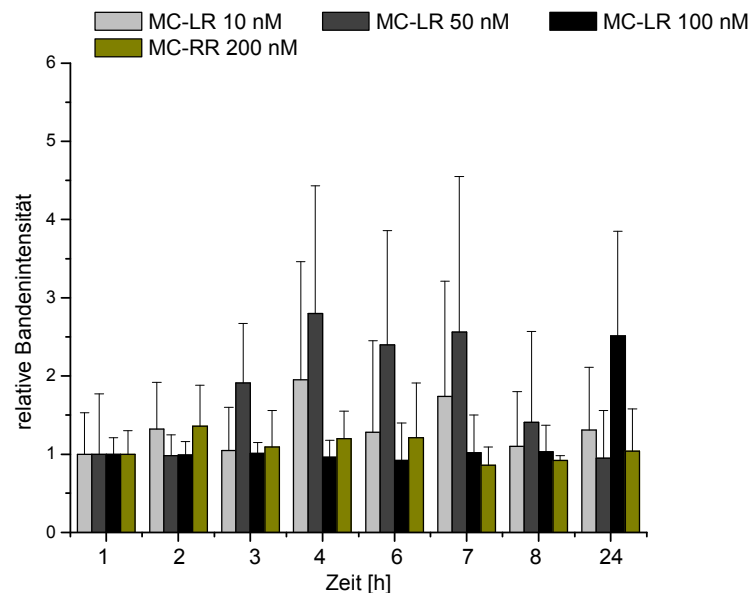


Abbildung 68: Western Blot Bcl-xL für MC-LR und MC-RR.

Status an Bcl-xL in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50, 100 nM und MC-RR 200 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bcl-xL (B) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

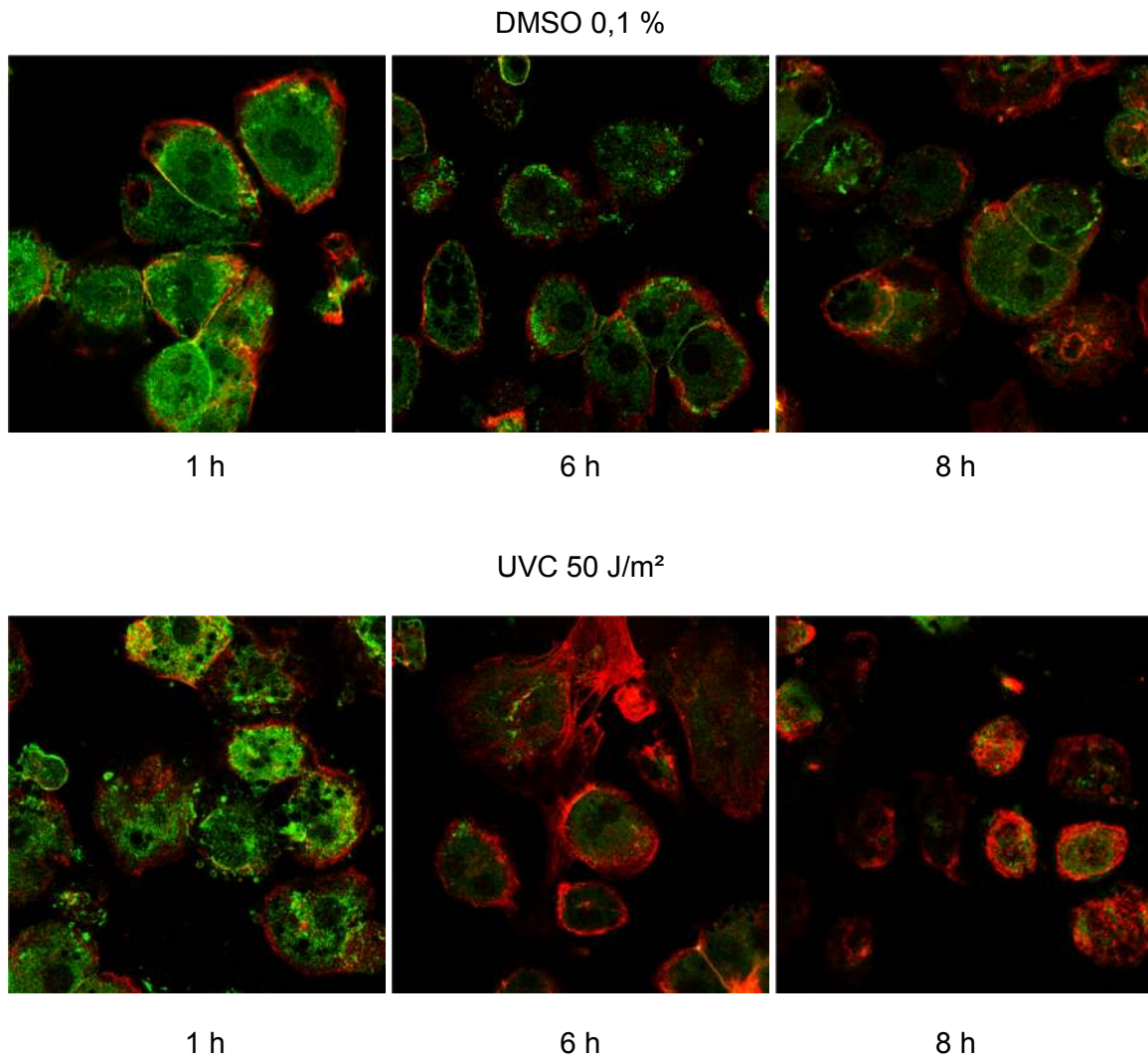


Abbildung 69: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von Kontrollen.
Status an Bcl-xL (grün) in primären Rattenhepatozyten von DMSO (0,1 %, V/V) und UVC-Licht (50 J/m²) nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

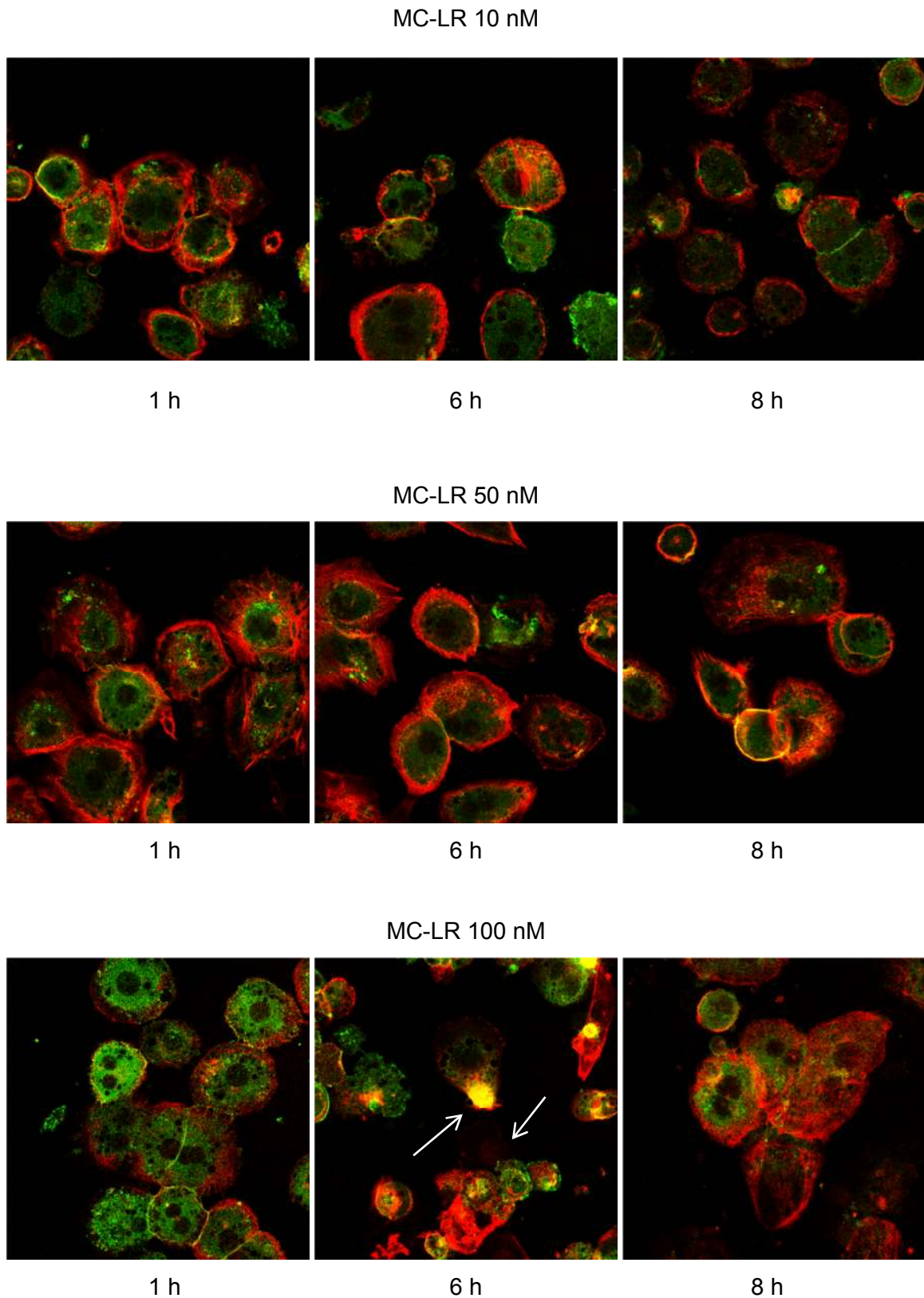


Abbildung 70: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von MC-LR.
Status an Bcl-xL (grün) in primären Rattenhepatozyten von MC-LR 10, 50 und 100 nM nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

Auf Grund zytotoxischer Wirkung durch MC-LR und NOD wurden keine Immunofluoreszenz-Analysen für 24 h durchgeführt.

Im Gegensatz zu MC-LR liefern Untersuchungen mit NOD eine klare Aussage bezüglich des Einflusses auf Bcl-xL. Im Western Blot (Abbildung 71, A) kann bis auf leichte Schwankungen im Bcl-xL-Gehalt eine induzierende Wirkung beobachtet werden. Die densitometrische Auswertung (Abbildung 71 B) verdeutlicht diesen Befund, da konzentrationsabhängig eine zwei- bis fünffache statistisch signifikante bzw. hoch signifikante Erhöhung des Bcl-xL-Gehalts bei 24 h vorliegt. Interessanterweise kann für alle drei Konzentrationen bis 3 h (Abbildung 71, B) ein leichter Abwärtstrend der Bcl-xL-Menge, welche ab 4 h wieder konsistent zunimmt, beobachtet werden (Abbildung 71, B). In den konfokalen Immunofluoreszenz-Analysen kann kein eindeutiger Einfluss durch NOD auf Bcl-xL im untersuchten Zeitraum beobachtet werden (Abbildung 71 und Abbildung 72).

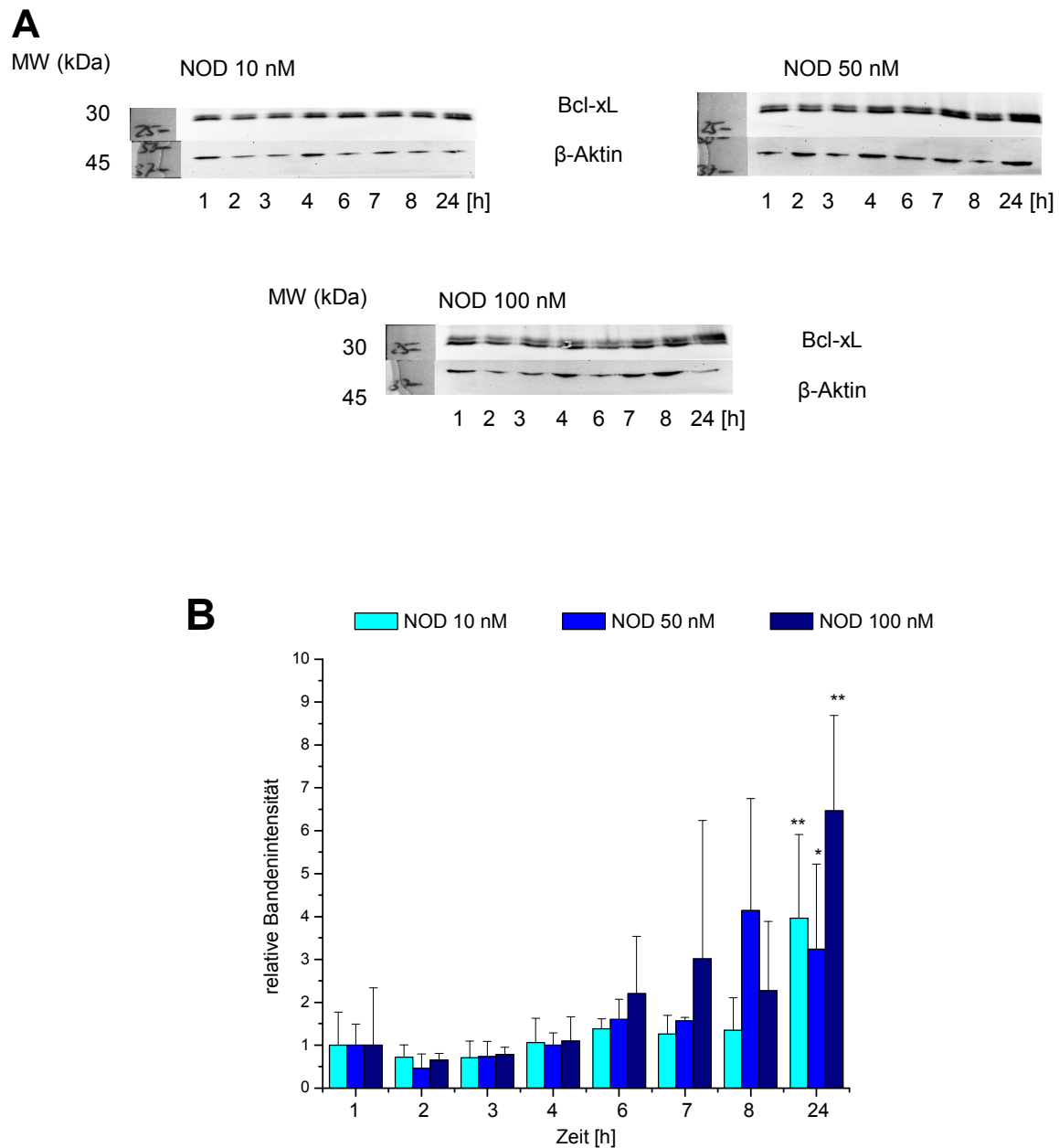


Abbildung 71: Western Blot Bcl-xL für NOD.

Status an Bcl-xL in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Repräsentative Western Blots (A) und densitometrische Auswertung für Bcl-xL (B) aus MW \pm SD; n=3. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

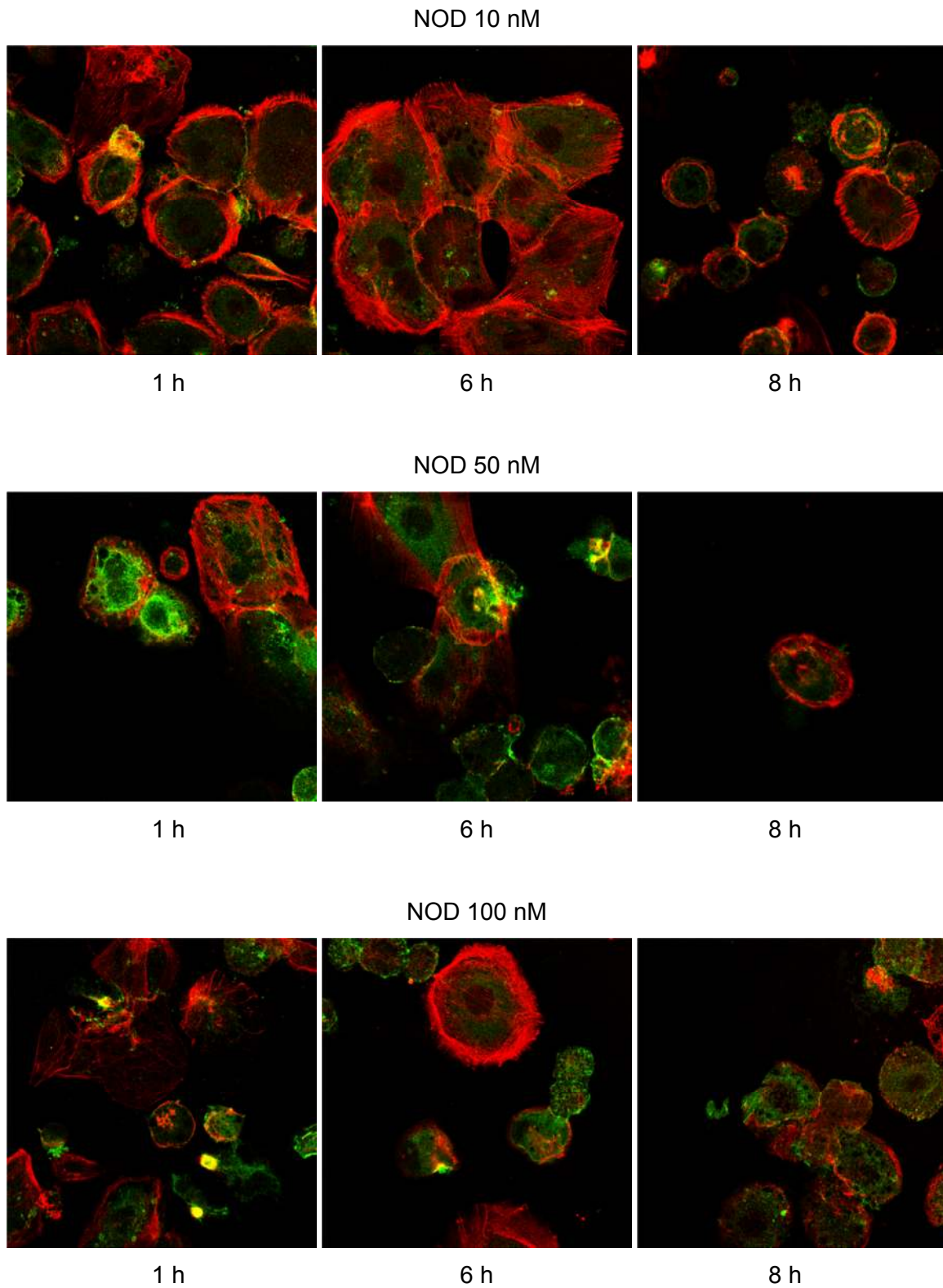


Abbildung 72: Konfokale Immunfluoreszenz-Analyse von NOD.
Status an Bcl-xL (grün) in primären Rattenhepatozyten von NOD 10, 50 und 100 nM nach 1, 6 und 8 h. Markierung der Aktinfilamente mit Alexa Fluor Phalloidin (rot), Vergrößerung 630x Immersionsöl.

Zusammenfassend konnte in primären Rattenhepatozyten durch Inkubation mit MC-LR oder NOD eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme von Bax, jedoch kein Einfluss auf Bcl-2 festgestellt werden. Der Gehalt an Bcl-xL wurde durch MC-LR und MC-RR nicht beeinflusst, wobei NOD nach 24 h im zytotoxischen Bereich eine deutliche Induktion bewirkte. Somit spielen Bax und Bcl-xL eine entscheidende Rolle in der durch MC-LR und NOD induzierten Apoptose und als Marker für einen MAPK-vermittelten Signalweg. Da Bcl-xL durch p90RSK und p85/70 über eine hemmende Wirkung auf Bad (pro-apoptotisch) aktiviert werden kann, können anti-apoptotische Effekte die Folge sein. Auf Grund des gestörten Gleichgewichts von Bax und Bcl-2 kann die Reaktion aber auch in Richtung Apoptoseinduktion gelenkt werden.

6. Diskussion

Die Toxine der Cyanobakterien, vor allem die zyklischen Hepatotoxine Microcystine (MCs) und Nodularine (NODs), stellen weltweit ein ernstes gesundheitliches Problem für Mensch und Tier dar. Nach der Blütezeit setzen Cyanobakterien diese Toxine ins Wasser frei, wodurch es zu Kontamination von Gewässern, Trinkwasser und Nahrungsmitteln kommt und dadurch Menschen, Haustiere und Vieh mit den Toxinen in Kontakt treten können (Ibelings, et al., 2007; Schaeffer, et al., 1999; Pearson, et al., 2010). Außerdem hat die Verwendung von Algen allgemein, aber auch von Cyanobakterien, in der asiatischen Küche eine lange Tradition. Die Gattung *Spirulina* wurde bereits bei den Azteken in Mexiko zu einer Art Brot, dem Tacuitlatl, verarbeitet und wird heute als Nahrungsergänzungsmittel in den Handel gebracht (Hoeger, et al., 2005; Belay, et al., 1993; Engeli, 2005).

Vornehmlich die Familien der zyklischen Heptapeptide MCs mit über 90 Strukturvarianten und der zyklischen Pentapeptide NODs mit acht Strukturkongeneren werden für die toxischen Effekte verantwortlich gemacht (Carmichael, et al., 1988; Dawson, 1998; Chorus, et al., 1999; Saito, et al., 2001; deSilva, et al., 1992).

Als möglicher Wirkmechanismus wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* die Hemmung der Serin/Threonin Proteinphosphatasen (PP) identifiziert, welche mit einer Hyperphosphorylierung zellulärer Proteine einhergeht (Runnegar, et al., 1995; Solter, et al., 1998; Honkanen, et al., 1994; MacKintoshl, et al., 1990; MacKintosh, et al., 1995). Eine relevante Aufnahme dieser Toxine wird für Leberschädigung und Lebertumorpromotion als mögliche akute und Langzeit Auswirkungen in Erwägung gezogen (Hu, et al., 2002; Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992; Carmichael, 1992; IARC, 2006).

Bei der Überwachung von Gewässern werden die Proben auf die wenigen rechtlich relevanten MCs MC-LR, MC-RR und MC-YR mit einer HPLC-UV-Vis-Messmethode gemäß der Norm ISO 20179 untersucht. Jedoch werden ebenfalls in beachtlichen Mengen vorkommenden toxikologisch relevanten MCs, NODs und die entsprechenden Desmethyl-Varianten, über deren Struktur-Wirkungsbeziehung wenig bekannt ist, nicht voneinander getrennt oder klassifiziert sondern gemeinsam miterfasst (Hoeger, 2003; Krüger, et al., 2009; Hoeger, et al., 2007; ISO 20179, 2005; Mazur-Marzec, et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und toxikologischer Relevanz hepatotoxischer MCs und NOD, sowie desmethylierter Strukturvarianten aufgeklärt werden.

Es sollten vergleichende Untersuchungen zur Zytotoxizität und zu Wirkmechanismen der Toxizität von MCs und NOD, sowie ihrer desmethylierten Kongenere durchgeführt werden. Zunächst sollten deren zytotoxischen Eigenschaften in Ratten- und Humanhepatozyten in Primärkultur erfasst und mit der Hemmwirkung auf die Proteinphosphatasen (PP) 1 und 2 humanen und tierischen Ursprungs verglichen werden.

Außerdem sollte die Frage geklärt werden, in wieweit die Auslösung von Apoptose einen relevanten Wirkmechanismus von MCs und NOD darstellt. Abschließend sollte zeit- und konzentrationsabhängig die Wirkung der Hemmung von PPs auf deren zellulären Regulationsmechanismen untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen veränderter zellulärer Signalkette und Tumorpromotion in der Leber zu knüpfen. Die Aufklärung der toxikologischen Relevanz von MCs, NOD und ihrer desmethylierten Kongenere soll auf der Grundlage toxikologischer Daten eine bessere Einschätzung der Gefährdung für Mensch und Tier gewährleisten.

6.1. Zytotoxizität und Hemmung von Proteinphosphatasen durch Microcystine und Nodularine

Die Zytotoxizität in Korrelation mit Modifikationen der Struktur verschiedener MCs, NOD und desmethylierter Varianten wurde in primären Ratten- und Humanhepatozyten untersucht. Aufgrund struktureller Eigenschaften von MCs und NODs werden spezielle Transporter benötigt, da eine Diffusion wegen chemischer Beschaffenheit wie Größe und Hydrophilie sehr erschwert ist. Hepatozyten besitzen die nötigen Transportproteine der Superfamilie OATP, weshalb die Leber das Hauptzielorgan zur Aufnahme von MCs und NODs darstellt (Runnegar, et al., 1991; Eriksson, et al., 1990; Fischer, et al., 2005). Weitere Organe, die diese Transportproteine exprimieren, sind Niere, Lunge, Darm und Gehirn (Herfindal, et al., 2011; Fischer, et al., 2005). Aber nicht nur Aufnahme und Transport von MCs und NODs spielen eine entscheidende Rolle bei der zytotoxischen Wirkung, sondern auch die Detoxifizierung, wobei Metabolisierungsprodukte wie Glutathion- und Cysteinikonjugate an Mdha oder Konjugate mit oxidiertem Dien-Bindung von Adda entstehen (Bourne, et al., 1996; Pflugmacher, et al., 2001; Pflugmacher, et al., 1988; Kondo, et al., 1996; Takenaka, 2001). Vorallem aber der inhibitorische Effekt auf die Proteinphosphatasen wie PP1 und PP2A, welcher durch strukturelle Modifikationen verstärkt oder abgeschwächt werden kann, ist ausschlaggebend für die Zytotoxizität durch MCs und NODs (Blom, et al., 2005; MacKintoshl, et al., 1990; Runnegar, et al., 1995).

Die Unterschiede in der konzentrationsabhängigen zytotoxischen Wirkung bezogen auf strukturelle Eigenschaften können durch die in dieser Arbeit erzielten Daten belegt werden. So wird in primären Rattenhepatozyten sowohl im LDH-Leakage-Assay (EC_{50} -Wert: $1,6 \pm 0,07$ nM) als auch im Resazurinreduktionstest (EC_{50} -Wert: $1,8 \pm 0,3$ nM) gezeigt, dass MC-LW mit L-Leu und L-Trp an den zwei variablen Stellen nach einer 24-stündigen Behandlung das höchste zytotoxische Potential aufweist (Tabelle 38). In primären Humanhepatozyten zeigt sich MC-LW (EC_{50} -Wert: $5,3 \pm 0,6$ nM) ebenfalls als zytotoxischstes Microcystin, ist aber im Vergleich zu primären Rattenhepatozyten im Resazurinreduktionstest in seiner Wirkung weniger sensitiv (EC_{50} -Wert: $1,8 \pm 0,3$ nM) (Tabelle 38).

Die Zytotoxizitätsdaten werden im PPI-Assay für MC-LW mit einer hohen Bindungsaffinität sowohl zu humanem PP2A (IC_{50} -Wert: $0,06 \pm 0,006$ nM) als auch zu humanem PP1 α (IC_{50} -Wert: $0,14 \pm 0,03$ nM) bestätigt (Tabelle 39).

Tabelle 38: EC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) von MC- und NOD-Kongeneren aus dem Resazurinreduktionstest und LDH-Leakage-Test in primären Ratten- und Humanhepatozyten nach 24 h.

Behandlung	EC ₅₀ (nM) ± 95 %		EC ₅₀ (nM) ± 95 %	
	Konfidenzintervall in primären Rattenhepatozyten aus Resazurinreduktionstest	Konfidenzintervall in primären Rattenhepatozyten aus LDH-Assay	Konfidenzintervall in primären Humanhepatozyten aus Resazurinreduktionstest	Konfidenzintervall in primären Humanhepatozyten aus Resazurinreduktionstest
MC-LR	53,6 ± 11,7	90,3 ± 6,3	119,1 ± 14,6	
[³ Asp]MC-LR	2,7 ± 0,4	6,8 ± 0,5	20,1 ± 4,2	
[⁷ Dha]MC-LR	18,9 ± 4,8	36,3 ± 13,2	159,8 ± 11,9	
MC-RR	> 100	> 100	n.d.	
[³ Asp]MC-RR	> 100	> 100	n.d.	
[⁷ Dha]MC-RR	> 100	> 100	n.d.	
MC-YR	10,1 ± 3,8	9,7 ± 2,9	n.d.	
dmMC-YR	10,2 ± 0,8	21,4 ± 0,7	n.d.	
MC-HtyR	37,2 ± 5	> 100	> 500	
MC-LW	1,8 ± 0,3	1,6 ± 0,07	5,3 ± 0,6	
MC-WR	14,4 ± 2,4	29,8 ± 2,2	> 500	
MC-LY	9,2 ± 1,4	30,1 ± 4,1	106,2 ± 9,6	
MC-LA	3,3 ± 0,1	7,3 ± 2,1	16,8 ± 2,2	
MC-LF	> 5	> 10	n. d.	
NOD	31,2 ± 7,3	67,5 ± 2,9	77,2 ± 2,2	
[¹ Asp]NOD:	19,2 ± 9,1	40,6 ± 1,2	n.d.	
[⁵ Dhb]NOD				
> 10 : 1				
[¹ Asp]NOD	> 50	130,4 ± 69,4	> 600	

n.d.: nicht detektiert

Tabelle 39: IC₅₀-Werte (MW ± SD aus n ≥ 3) aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1α tierischem und humanem Ursprung im Vergleich

Behandlung	IC₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP2A aus Rinderniere	IC₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP1α aus Kaninchenmuskel	IC₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in PP2A humaner Erythrozyten	IC₅₀ (nM) ± 95 % Konfidenzintervall in humaner PP1α (rekombinant)
MC-LR	0,21 ± 0,12	1,1 ± 0,4	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01
[³ Asp]MC-LR	n.d.	n.d.	0,07 ± 0,01	0,11 ± 0,02
[⁷ Dha]MC-LR	0,11 ± 0,04	0,54 ± 0,12	0,09 ± 0,01	0,25 ± 0,01
MC-RR	10,3 ± 2,0	7,7 ± 1,2	5,9 ± 1,2	3,2 ± 0,8
[³ Asp]MC-RR	n.d.	n.d.	11,5 ± 2,6	5,4 ± 2,5
[⁷ Dha]MC-RR	3,7 ± 1,3	8,3 ± 0,8	6,6 ± 2,4	0,8 ± 0,08
MC-YR	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,13 ± 0,01
dmMC-YR	0,15 ± 0,03	0,19 ± 0,09	2,4 ± 0,4	2,9 ± 0,1
MC-HtyR	n.d.	n.d.	0,48 ± 0,09	1,3 ± 0,2
MC-LW	n.d.	n.d.	0,06 ± 0,006	0,14 ± 0,03
MC-WR	n.d.	n.d.	0,42 ± 0,05	0,22 ± 0,03
MC-LY	n.d.	n.d.	0,37 ± 0,06	1,2 ± 0,01
MC-LA	0,02 ± 0,0007	n.d.	n.d.	n.d.
MC-LF	0,09 ± 0,02	n.d.	n.d.	n.d.
NOD	0,61 ± 0,42	0,97 ± 0,18	0,17 ± 0,04	0,37 ± 0,04
[¹ Asp]NOD: [⁵ Dhb]NOD > 10 : 1	0,29 ± 0,08	1,6 ± 0,9	0,48 ± 0,09	0,87 ± 0,16

n.d.: nicht detektiert

Das Microcystin MC-LA mit L-Leu und L-Ala (Abbildung 73) an den zwei variablen Stellen ist in seiner Zytotoxizität etwas schwächer als MC-LW, gehört aber wie auch MC-LF (L-Leu und L-Phe) und MC-LY (L-Leu und L-Tyr) zu den stark wirksamen MCs. So zeigt MC-LA in primären Rattenhepatozyten in beiden Zytotoxizitätstests (EC₅₀-Werte: 3,3 ± 0,1 nM und 7,3 ± 2,1 nM) und in Humanhepatozyten im Resazurinreduktionstest (EC₅₀-Wert: 16,8 ± 2,2 nM) ein starkes zytotoxisches Potential (Tabelle 38). Die Untersuchung mittels PPI-Assay für MC-LA mit einem IC₅₀-Wert von 0,02 nM für PP2A (Rinderniere) bestätigt die Zytotoxizität (Tabelle 39). In einer Studie wurde bei der Untersuchung des hemmenden Effekts von MC-LA auf PP2A (Kaninchenmuskel) ein etwa gleich starker Einfluss mit einem IC₅₀-Wert von 0,04 nM festgestellt. Weiterhin wurden auch IC₅₀-Werte für MC-LR ebenfalls von 0,04 nM und für NOD von 0,03 nM ermittelt (Honkanen, et al., 1994).

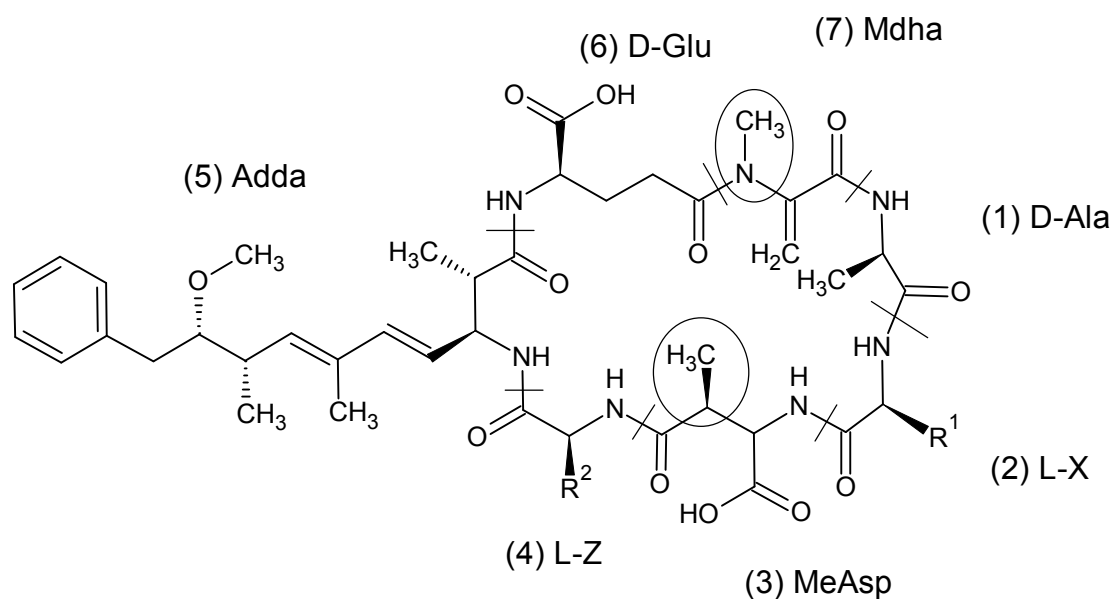


Abbildung 73: Grundstruktur der MCs

In dieser Arbeit kann, bezogen auf das hemmende Potential von PP2A (Rinderniere), eine abweichende Beobachtung gemacht werden. So zeigen MC-LR und NOD mit einem IC_{50} -Wert von 0,2 nM und 0,6 nM eine mindestens zehnfach schwächere Wirkung auf die PP2A-Aktivität (Rinderniere) als MC-LA. Das bedeutet, dass der Austausch der variablen Aminosäure L-Arg durch L-Ala an Position vier (Abbildung 73) für die PP2A-Inhibierung wegen der veränderten Bindungsstärke an PP2A eine Rolle spielt. NOD, dessen Struktur zwei Aminosäuren weniger enthält als MC-LR oder MC-LA, zeigt eine leichte Abschwächung in der Bindungsstärke zu PP2A (Rinderniere) (Tabelle 39).

Der Vergleich der weiteren getesteten PPs zeigt, dass die Inhibierung von PP1 α (Kaninchenmuskel) durch MC-LR mit einem IC_{50} -Wert von 1,1 nM gleich stark ausgeprägt ist wie die Inhibierung durch NOD (IC_{50} -Wert: 0,97 nM) (Abbildung 74). Anders sieht es für die Hemmung der PPs humanen Ursprungs aus. Hier liegt verglichen mit MC-LR (IC_{50} -Werte: 0,03 nM (PP2A) und 0,04 nM (PP1 α)) eine um den Faktor 10 schwächere Wirkung durch NOD (IC_{50} -Werte: 0,17 nM (PP2A) und 0,04 nM (PP1 α)) sowohl für PP2A als auch für PP1 α vor (Tabelle 39). Interessanterweise weist NOD in den Untersuchungen auf Zytotoxizität in primären Ratten- und Humanhepatozyten einen leicht stärkeren Effekt auf als MC-LR (Tabelle 38). Wiederum ist die zytotoxische Wirkung auf Humanhepatozyten im Vergleich zu Rattenhepatozyten leicht abgeschwächt (EC_{50} -Wert für MC-LR: 119 nM und für NOD: 77,2 nM). Bouaïcha und Maatouk haben in einer Studie in primären Rattenhepatozyten ähnliche zytotoxische Potenz für NOD und MC-LR im Konzentrationsbereich von 0-150 nM

für oxidative Zellschädigung ermittelt (Bouaicha, et al., 2004). In einer Studie von Batista et al. wurde für primäre humane Hepatozyten nach einer sechsstündigen Exposition für MC-LR ein EC_{50} -Wert von 25 nM und für Rattenhepatozyten von 50 nM abgeleitet (Batista, et al., 2003).

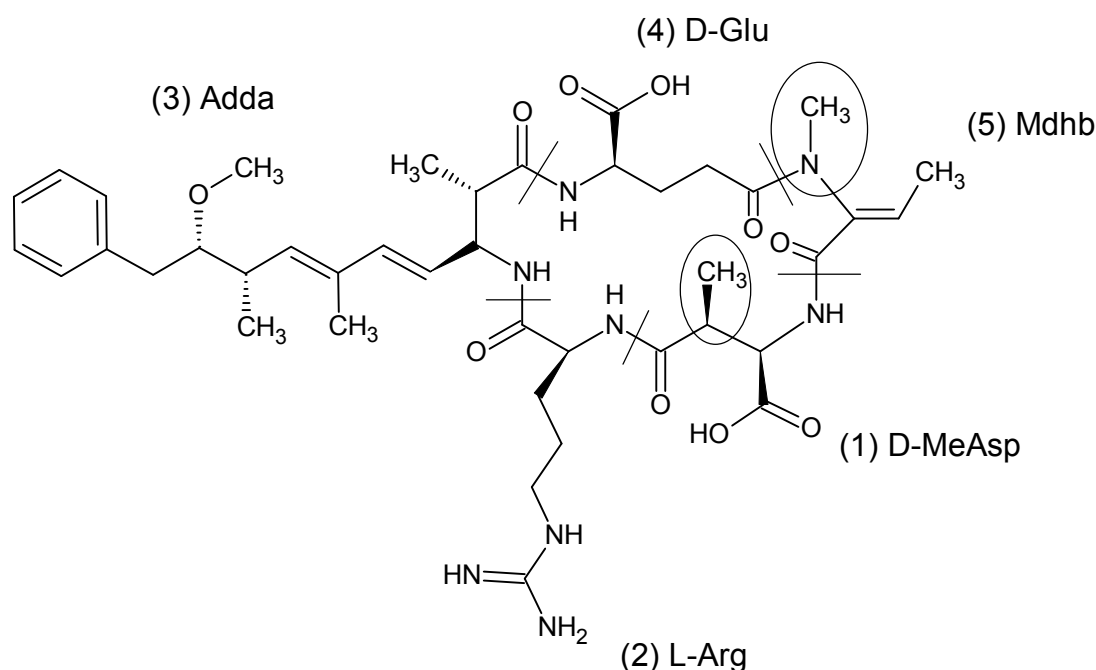


Abbildung 74: Grundstruktur von NOD

Die inhibierende Potenz auf die untersuchten PPs im Vergleich zur Zytotoxizität ist gesteigert. Daraus kann geschlossen werden, dass eine zytotoxische Wirkung nicht nur durch die Inhibierung von PPs allein, sondern auch strukturbedingt durch eine mögliche schnellere Aufnahme von NOD hervorgerufen wird. Diese Feststellung kann ebenfalls durch die Tatsache, dass MC-LR eine andere Interaktion mit den PPs eingeht als NOD, untermauert werden (Dawson, et al., 1999; Maynes, et al., 2006; Kelker, et al., 2009).

Wie stark eine Modifikation der MCs, NODs und PPs die hemmende Wirkung auf die PPs und die zytotoxischen Effekte beeinflusst, wird im Folgenden erläutert.

In einer Studie von Dawson und Holmes wurde am Beispiel von PP1 dargestellt, wie MC-LR mit Enzymen interagiert (Abbildung 75). So bindet MC-LR an PP1 durch Interaktion mit drei Regionen der Phosphatase. Die Carboxylgruppe von Glutamat und die angrenzende Carbonylgruppe koordinieren über die Wassermoleküle an die zwei Metallatome im aktiven Zentrum des Enzyms. Weiterhin kommt es zu einer Wechselwirkung der Carboxylgruppe von MeAsp mit Arg-96 und Tyr-134, was zur Folge hat, dass Arg-96 nicht mehr mit der Phosphatgruppe von Phosphatase-Substraten interagieren kann. Dadurch blockiert MC-LR

den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms. Auch L-Leu von MC-LR ist an einer Wechselwirkung mit PP1 über Tyr-272 beteiligt. So führt eine Mutation von Tyr-272 zur Abschwächung der toxischen Wirkung von MC-LR. Der Austausch von L-Leu durch andere hydrophobe Aminosäuren hat nur einen geringfügigen Effekt auf die Toxizität, wohingegen Aminosäuren mit polaren Gruppen zu einer leichten Herabregulierung der Wirkung führen. Ein Austausch der variablen Aminosäure L-Arg in MC-LR durch L-Ala (unpolar), L-Met (unpolar), L-Phe (unpolar) oder L-Leu (unpolar) zeigt keine nennenswerte Veränderung in der Toxizität. Das kommt daher, dass L-Arg vom katalytischen Zentrum sterisch wegsteht und somit an keiner Interaktion mit der Phosphatase beteiligt ist. Aber nicht nur Modifikationen der Toxine, sondern auch Mutationen der Phosphatasen selbst führen zu starken Veränderungen der Wechselwirkungen und somit der Toxizität von MCs (Dawson, et al., 1999).

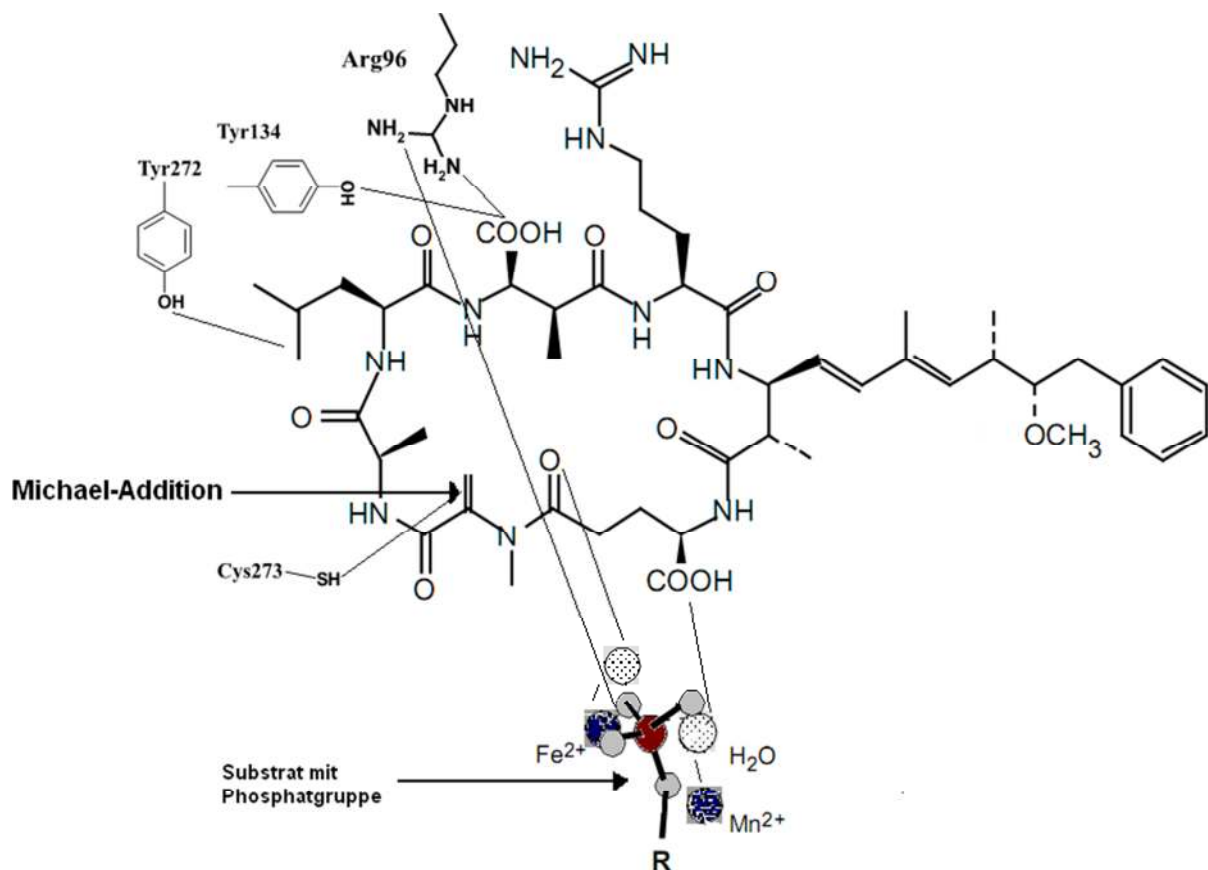


Abbildung 75: Interaktion zwischen MC-LR und PP1
(Dawson, et al., 1999)

NOD dagegen bindet über Wasserstoffbrücken und nicht kovalent an die Enzyme, obwohl der Arg- und Mdhb-Rest mit Cys273 eine Michael-Reaktion eingehen könnten, sind beide zu weit entfernt und deshalb kann der für ein PP-MC-Komplex entscheidende β 12- β 13-Loop

des Enzyms nicht beobachtet werden. Weiterhin kommt es zu einer Bindung des hydrophoben Adda-Rests an PP (Maynes, et al., 2006; Kelker, et al., 2009).

Bei einem direkten Vergleich der getesteten vollmethylierten MCs untereinander kann ein Unterschied sowohl in der zytotoxischen Wirkung als auch in dem hemmenden Effekt auf die untersuchten PPs festgestellt werden. Bezüglich der Zytotoxizität in primären Ratten- und Humanhepatozyten kann folgende Rangfolge aufgestellt werden (Abbildung 76).

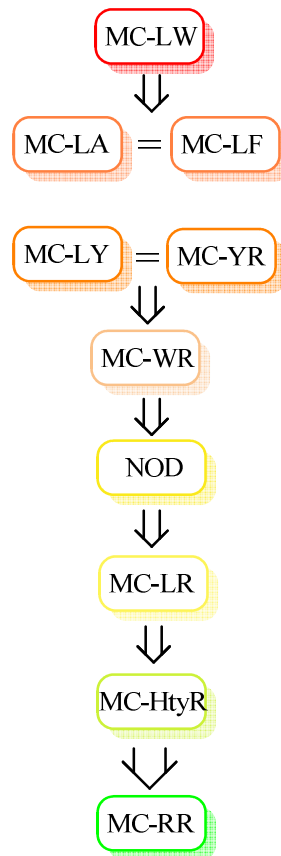


Abbildung 76: Zytotoxizität

von rot nach grün: abnehmende zytotoxische Wirkung in primären Hepatozyten

Die ermittelten Daten aus den humanen PPI-Assays zeigen ein etwas anderes Bild (Abbildung 77).

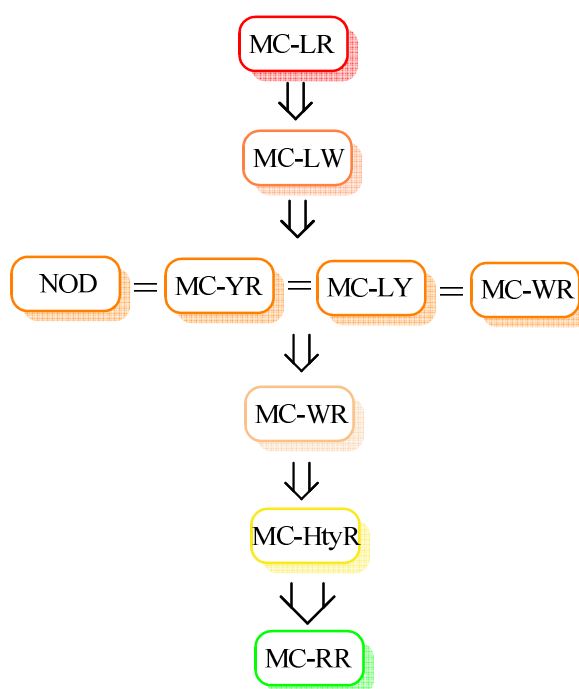


Abbildung 77: PP-Inhibierung

von rot nach grün: abnehmende PP-Hemmwirkung

Hier erweisen sich MC-LR und MC-LW als starke Inhibitoren, MC-RR besitzt dagegen das schwächste hemmende Potential und die restlichen vollmethylierten MCs inhibieren in einem Bereich der IC_{50} -Werte von 0,17 – 0,48 nM für PP2A (human) und 0,13 - 1,3 nM für PP1 α (human). Dabei korrelieren die IC_{50} -Werte besser für PP2A als PP1 α (human) sehr gut mit den EC_{50} -Werten (human) für die untersuchten MCs, bis auf MC-LY und MC-LR (5.3: Abbildung 44). In einer Studie von Chen et al. wurde ebenfalls festgestellt, dass die MC-induzierte Toxizität im Tierversuch stärker mit den Ergebnissen aus der Hemmung von PP2A korreliert als mit den Daten aus der PP1-Inhibition und somit PP2A besser geeignet ist, um die toxische Wirkung durch MCs abzuschätzen. Es ist unklar, warum eine Desmethylierung Einfluss auf den inhibitorischen Effekt hat. Möglicherweise sind die Methylgruppen an der Wechselwirkung oder sogar an der kovalenten Bindung zwischen Enzym und MC beteiligt (Chen, et al., 2006).

Da jedoch die meisten MCs ein ähnlich starkes Hemmpotential aufweisen und MC-LR nicht das zytotoxischste Kongener, jedoch eines der stärksten Inhibitoren von PPs darstellt, bekräftigt diese die Vermutung, dass möglicherweise die Aufnahmefähigkeit der Hepatozyten entscheidend ist für die zytotoxische Wirkung.

Dass der Transport für MCs und NODs ein ausschlaggebender Faktor für die toxische Wirkung ist, wird durch zahlreiche Studien belegt. Das Hauptzielorgan der MCs und der NODs ist aufgrund der Expression der benötigten OATP-Transporter die Leber, weshalb die Toxine auch am besten durch Hepatozyten aufgenommen werden (Eriksson, et al., 1990). Da aber auch andere Organe betroffen sind, gibt es einige Zellen, die MCs und NODs ebenfalls teilweise durch OATP-Transporter oder etwas langsamer durch einfache Diffusion aufnehmen und so zytotoxische Wirkung erfahren. In einer Studie wurden verschiedene Zelltypen mit MC-LR im Konzentrationsbereich von 0,6-75 µg/ml (ca. 0,6-75 µM) für 48, 72 und 96 h inkubiert. Vier dieser Zelllinien waren H4IIE- (Hepatomzelllinie der Ratte), HepG2- (humane Hepatomzelllinie), KB- (humane orale Epidermoidkarzinomzellen) und CaCo2-Zellen (humane Kolonkarzinomzelllinie), welche mittels eines MTT-Tests auf Zytotoxizität untersucht wurden. MC-LR zeigte einen relativ geringen Effekt auf alle Zelllinien. Erst eine hohe Toxinkonzentration von 37,5 µg/ml (ca. 37,5 µM) und eine Inkubation von 96 h reduzierte stark die prozentuale Absorption von H4IIE-Zellen und weniger stark von KB-Zellen, was auf die Aufnahmefähigkeit von MC-LR durch die Zellen über verschiedene Transportsysteme zurückzuführen ist (Chong, et al., 2000). Eine weitere Studie untersuchte zusätzlich zu CaCo2-Zellen MCF-7-Zellen (humane Brustkarzinomzelllinie) auf zytotoxische Effekte durch MC-LR und NOD. Die Zellen wurden mit 50 µM MC-LR oder NOD für 24 h inkubiert. Dabei zeigten beide Zelllinien beim MTT-Test einen starken Rückgang der Zellvitalität, eine höhere LDH-Leakage wurde jedoch nur durch differenzierte CaCo2-Zellen erreicht (Botha, et al., 2004).

Auch andere Zelltypen wie humane Endothelialzellen, Hautfibroblasten, Epithelzellen und Rattenpromyelozyten wurden mit MC-LR im Konzentrationsbereich 0,8-100 µM getestet. Um morphologische Zellveränderungen zu induzieren, wurde für Hepatozyten eine 100-fach geringere Konzentration benötigt als für die restlichen Zellen (1 gegen 100 µM). Es wurde gezeigt, dass der Transport von MCs in Hepatozyten über OATPs erfolgt. Der Transport in Zellen, die solche Transportproteine nicht exprimieren, läuft deshalb oft durch eine Diffusion viel langsamer ab. Das erklärt auch, warum für nicht-Leber Zellen eine viel größere Konzentration benötigt wird, um einen Effekt auszulösen (McDermott, et al., 1998). Außerdem werden in der Literatur für OATPs Speziesunterschiede zwischen Mensch und Nagern beschrieben (Sekine, et al., 2006; Tamai, et al., 2008)

Anhand der ermittelten EC_{50} -Werte in dieser Arbeit, die für primäre Rattenhepatozyten um ein Vielfaches geringer sind als für primäre Humanhepatozyten, ist eine eindeutige Speziesabhängigkeit gezeigt.

Betrachtet man die Strukturunterschiede der in dieser Arbeit untersuchten MCs, so kann festgestellt werden, dass bei MC-LR ein Austausch der zweiten variablen L-Aminosäure L-Arg (polar) durch L-Trp (unpolar) (MC-LW) zu einer erhöhten zytotoxischen Wirkung führt. Der unpolare Rest L-Trp macht das MC hydrophober, wodurch es von der Zelle besser aufgenommen werden kann. Die gleiche Beobachtung wird für MC-LA, wo L-Arg durch die unpolare und kleine L-Aminosäure L-Ala ausgetauscht ist, gemacht. Auch hier wird möglicherweise der Transport in die Zelle erleichtert. Mehrere Studien bestätigen, dass der Transport von MCs mit unpolaren Resten rascher in die Zelle über OATPs erfolgt. Dadurch wird schneller eine hohe intrazelluläre Konzentration erreicht und deshalb findet eine PP-Inhibierung zu einem früheren Zeitpunkt statt (Fischer, et al., 2010; Feurstein, et al., 2009; Feurstein, et al., 2010; Monks, et al., 2007).

Studien belegen, dass verschiedene MC-Kongenerere eine vergleichbare toxikodynamische Eigenschaft (PP-Inhibierung) aufweisen, jedoch aufgrund ihrer Aufnahme (Toxikokinetik) unterschiedlich starke Zytotoxizität hervorrufen. So werden für MC-LR, MC-LF, MC-YR und MC-LW ähnlich hohe IC₅₀-Werte für PP2A und PP1 ermittelt (Monks, et al., 2007), jedoch unterschiedliches zytotoxisches Potential. Dabei wurde in Transportstudien MC-LF als zytotoxischstes Kongener eingestuft, gefolgt von MC-LW, MC-YR und MC-LR, was auf den effizienteren Transport in die Zelle zurückgeführt wurde. MC-RR erwies sich, vergleichbar zu dieser Arbeit, als schwacher PP-Inhibitor und zeigte schwaches zytotoxisches Potential (Feurstein, et al., 2009; Feurstein, et al., 2010; Fischer, et al., 2010). Auch in anderen Studien wurde festgestellt, dass die toxische Stärke nicht direkt mit dem inhibitorischen Effekt auf PP wie PP1 und PP2A übereinstimmt (Tabelle 40).

Tabelle 40: IC₅₀-Werte aus PP-Inhibierungstest für PP2A und PP1 α (Blom, et al., 2005).

Behandlung	IC ₅₀ (nM)	
	PP2A aus Kaninchenmuskel	PP1 α aus Kaninchenmuskel
MC-LR	0,05	0,25
[³ Asp]MC-LR	0,09	n.d.
MC-RR	0,1	0,68
[³ Asp, ⁷ Dhb]MC-RR	2,4	1,8
MC-YR	0,26	1,0
NOD	0,16	0,28

n.d. = not determined

Die Daten zeigen, dass [³Asp ⁷Dhb]MC-RR ein viel schwächerer Inhibitor von PP2A ist als NOD und die MCs, die Mdha (*N*-Methyl-dehydroalanin) in ihrer Struktur enthalten. Alle MCs und NOD außer [Asp³, Dhb⁷]MC-RR inhibierten PP1 schwächer als PP2A. In einer

Strukturuntersuchung von MC-LR/PP1 wurde gezeigt, dass die hydrophobe Seitenkette von Adda, die Carboxyl- und die benachbarte Carbonylgruppe von D-Glu und der Leucinrest von MCs für eine Bindung an die aktive Seite von PP1 essentiell sind. MC-LR erwies sich in den Bindungsuntersuchungen als stärkstes Kongener. Eine Veränderung der variablen Aminosäure L-Leu zu L-Arg oder L-Tyr zeigte einen leichten Verlust der inhibitorischen Wirkung auf PP1 oder PP2A. Ein Austausch von MeAsp durch Asp an Position drei bei MC-LR zeigte nur eine geringfügige Abschwächung des hemmenden Effekts auf PPs, während der Austausch von Mdha durch Dhb an Position sieben bei MC-RR dagegen einen starken Unterschied aufwies (Tabelle 40). Die Doppelbindung von Mdha ist essentiell für die kovalente Bindung an PP1 und PP2A, die Methylgruppe von Dhb dagegen erschwert den nukleophilen Angriff an die Doppelbindung. Obwohl [Asp³,Dhb⁷]MC-RR die schwächste inhibitorische Wirkung auf PP1 und PP2A zeigte, besaß es die höchste Toxizität im Tierversuch an Krebstieren. Das deutet darauf hin, dass andere Mechanismen wie die Aufnahme, der Transport, die Detoxifizierung und andere mögliche Angriffspunkte bei der Toxizität eine entscheidende Rolle spielen und den inhibitorischen Effekt auf die PP möglicherweise stören (Blom, et al., 2005).

Aber nicht nur strukturelle Unterschiede an den variablen Stellen der MCs spielen eine ausschlaggebende Rolle, sondern auch mögliche Desmethylierungen. Als Beispiel für MCs sind für dmMC-LR die Strukturvarianten [³Asp]MC-LR, [⁷Dha]MC-LR, [³Asp, ⁷Dhb]MC-LR und [⁵dmAdda]MC-LR möglich. In dieser Arbeit wurden für MC-LR und MC-RR die Kongenere [³Asp]MC-XR und [⁷Dha]MC-XR untersucht. Dabei bewirkte eine Desmethylierung von MC-LR an Position [⁷Dha] in primären Rattenhepatozyten eine dreifach höhere zytotoxische Wirkung im Vergleich zu MC-LR. In primären Humanhepatozyten dagegen zeigte sich MC-LR (EC₅₀-Wert: 119,1 ± 14,6 nM) etwa gleich zytotoxisch wie [⁷Dha]MC-LR (EC₅₀-Wert: 159,8 ± 11,9 nM) (Tabelle 38). Bemerkenswert ist auch, dass [⁷Dha]MC-LR mit gleicher Potenz tierische PPs hemmt wie MC-LR, jedoch einen dreifach schwächeren Inhibitor für humane PP2A und einen sechsfach schwächeren für humane PP1α darstellt (Tabelle 39). Diese Tatsache lässt wiederum vermuten, dass die Inhibierung der PPs nicht alleine entscheidend ist für die toxische Wirkung der MC-Varianten, sondern auch eine schnellere Aufnahme über OATPs. Die desmethylierte Variante [³Asp]MC-LR verdeutlicht diese Vermutung. Während das hemmende Potential auf humane PP halb so hoch ist wie das von MC-LR und nur etwas höher ist als das von [⁷Dha]MC-LR (Tabelle 39), zeigt [³Asp]MC-LR in primären Rattenhepatozyten eine 20-fach höhere Zytotoxizität als MC-LR und eine sechsfach höhere als [⁷Dha]MC-LR. Gleiche Tendenz kann auch für primäre Humanhepatozyten beobachtet werden, denn auch hier liegt ein sechsfach höherer zytotoxischer Effekt zu MC-LR und [⁷Dha]MC-LR vor (Tabelle 38).

Auch weitere Modifikationen in der Struktur der MCs und des NOD spielen eine wichtige Rolle für ihre Toxizität. So führen eine Veränderung der Adda-Seitenkette von einer 6E-Dien- zu 6Z-Dien-Isomerisierung und eine Alkylierung der Carboxylgruppe von D-Glu zu einem Verlust der toxischen Wirkung. In einer Untersuchung des inhibitorischen Effekts verschiedener MCs und des NOD auf PP1 (human) wurde gezeigt, dass Abwandlungen der Struktur einen großen Einfluss auf die Toxizität ausüben. MC-LR wies einen IC_{50} -Wert von 0,3 nM, [⁵dmAdda]MC-LR von 1,5 nM, [⁷Dha]MC-LR von 5 nM auf und die Varianten [6(Z)⁵Adda]MC-LR und [Glu-⁶OCH₃]MC-LR bis zu einer Konzentration von 0,1 μ M keinen inhibitorischen Effekt auf. NOD verhielt sich ähnlich, denn [6(Z)³Adda]NOD zeigte ebenfalls bis 0,1 μ M keine Wirkung und [³dmAdda]NOD hatte einen IC_{50} -Wert von 5 nM (An, et al., 1994).

Das Microcystin MC-RR, welches sich durch Austausch der variablen Aminosäure L-Leu durch L-Arg an der Position vier von MC-LR unterscheidet, und seine Desmethylkongenere [³Asp]MC-RR und [⁷Dha]MC-RR zeigten in primären Rattenhepatozyten im untersuchten Konzentrationsbereich kein zytotoxisches Potential auf. Im PPI-Assay erwiesen sich die MC-RR-Varianten mit IC_{50} -Werten im Bereich von 3,2-11,5 nM als schwache PP-Inhibitoren. Untersuchungen des inhibitorischen Potentials auf PPs von MC-LR und MC-RR durch Hoeger, et al. zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kongeneren. Es wurden IC_{50} -Werte für MC-LR, MC-RR und [³Asp]MC-RR für PP1 und PP2A abgeleitet. Alle lagen in einem Bereich von 1,9-3,8 nM für PP1 und 0,45-0,75 nM für PP2A, und somit für MC-RR-Varianten niedriger und für MC-LR höher als die in dieser Arbeit ermittelten Werte. [³Asp, ⁷Dhb]MC-RR benötigte hingegen eine 50-fach höhere Konzentration (29,8 nM) als die restlichen getesteten Varianten, um die PP2A-Aktivität um 50 % und eine 20-fach höhere Konzentration (56,4 nM), um die PP1-Aktivität um 50 % zu reduzieren. Diese Beobachtungen können auf strukturelle Eigenschaften der MCs zurückgeführt werden. So wurde gezeigt, dass [³Asp, ⁷Dhb]MC-RR an PP1 nicht kovalent bindet. Trotzdem zeigt [³Asp, ⁷Dhb]MC-RR *in vivo* einen vergleichbaren LD_{50} -Wert wie MC-RR. Das deutet darauf hin, dass toxikodynamische und toxikokinetische Charakteristika eine entscheidende Rolle bei der toxischen Wirkung spielen (Hoeger, et al., 2007). Eine ebenfalls schwache zytotoxische Wirkung durch die desmethylierte Variante [⁷Dha]MC-RR konnte in einer Studie belegt werden. Obwohl die Membrandurchdringungskapazität sowohl bei MC-LR (3 %) als auch bei [⁷Dha]MC-RR (6 %) sehr gering war, konnte [⁷Dha]MC-RR durch einfache Diffusion etwas leichter in Hepatozyten aufgenommen werden als MC-LR. Trotzdem war [⁷Dha]MC-RR sowohl *in vivo* als auch *in vitro* weniger toxisch, was wiederum auf die schwächere Bindungsaffinität von MC-RR zu den PPs zurückgeführt werden kann (Eriksson, et al., 1990).

In einer Untersuchung der Inhibierung von PP1 und PP2A durch verschiedene MCs wurde gezeigt, dass eine Desmethylierung von MC-RR an [³Asp] oder an [⁷Dha] nur zu einer geringfügigen Abschwächung der inhibierenden Wirkung führt. Es wurden IC₅₀-Werte von 0,4 nM für PP2A (Kaninchenmuskel) und von 0,3 nM für PP1 (Kaninchenmuskel) für MC-LR, 58 nM (PP2A) und 1,7 nM (PP1) für MC-RR, 86 nM (PP2A) und 2,2 nM (PP1) für [Dha⁷]MC-RR und 59 nM (PP2A) und 4,8 nM (PP1) für [³Asp]MC-RR abgeleitet (Chen, et al., 2006). Auch diese Arbeit zeigt, dass eine Desmethylierung von MC-RR sowohl auf die Inhibierung von PPs als auch auf die zytotoxische Wirkung keinen Einfluss besitzt. Da MC-RR zwei unpolare Reste an den variablen Stellen aufweist, wird die Aufnahme in die Zelle erschwert. Weiterhin war das hemmende Potential, sowohl für die vollmethylierten als auch desmethylierten Kongeneren, auf die getesteten PPs niedrig. Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem Fall eine Desmethylierung keine ausschlaggebende Rolle spielt.

Die MC-Varianten MC-YR und dmMC-YR, wobei die Stelle der Desmethylierung unbekannt ist und somit die Varianten [³Asp]MC-YR, [⁷Dha]MC-YR, [³Asp, ⁷Dhb]MC-YR und [⁵dmAdda]MC-YR möglich sind (Krüger, et al., 2009; Krüger, et al., 2010), zeigen eine ähnliche zytotoxische Wirkung auf primäre Rattenhepatozyten wie MC-LY. Im Vergleich zu den anderen getesteten MCs gehören sie in gleicher Weise wie auch MC-WR zu den stark zytotoxischen Kongeneren. Der Unterschied zu MC-LR liegt hier nicht wie bereits diskutiert im Austausch der variablen L-Aminosäure an der zweiten Position, sondern an der Ersten. So weist MC-YR L-Tyr und MC-WR L-Trp anstelle von L-Leu auf. Da beide Reste unpolar sind, sollte erwartungsgemäß kein nennenswerter Unterschied in der Zytotoxizität vorhanden sein. Die in primären Rattenhepatozyten ermittelten Daten jedoch zeigen die MC-YR-Varianten mit EC₅₀-Werten von 10 nM (Resazurinreduktionstest) als zytotoxischere MCs. Der Austausch der L-Aminosäure an Position zwei bewirkt zwar eine Abnahme der Bindungsaffinität zu den untersuchten PPs, jedoch keine Reduzierung der Zytotoxizität. Vor allem weist dmMC-YR mit IC₅₀-Werten von 2,3 nM für PP2A (human) und 2,9 nM für PP1α (human) einen viel schwächeren hemmenden Effekt, jedoch eine gleich starke zytotoxische Wirkung wie die vollmethylierte Variante MC-YR auf. Interessanterweise ist MC-HtyR mit L-Hty statt L-Tyr an der ersten variablen Stelle in seiner Wirkung schwächer als die zwei MC-YR-Varianten und weist ein ähnlich starkes zytotoxisches Potential auf wie MC-LR (Tabelle 38). Bei der Desmethylvariante dmMC-YR steht vermutlich die schnellere Aufnahme in die Hepatozyten im Vordergrund, da im Bezug auf MC-YR eine abgeschwächte PP-Inhibierung beobachtet wurde, aber eine gleich starke Zytotoxizität. Beim Kongener MC-HtyR verhält es sich genau umgekehrt. Da im Vergleich mit MC-YR eine ähnlich starke PP-Inhibierung ermittelt, aber schwächere zytotoxische Wirkung erfasst wurde, kann auf

Grund sterischer Effekte von einer abgeschwächteren Aufnahme in die Hepatozyten ausgegangen werden.

NOD und das Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 10 : 1 weisen im PPI-Assay eine ähnlich starke Hemmwirkung auf PP2A (IC₅₀-Werte zwischen 0,2 und 0,6 nM) und PP1α (IC₅₀-Werte zwischen 0,4 und 1,6 nM) auf, wobei kein nennenswerter Unterschied im Ursprung der PPs vorlag, jedoch PP2A stärker inhibiert wurde als PP1α. Somit zeigen beide NODs ein hohes hemmendes Potential auf und es kommt zu keiner Abschwächung der Inhibierung durch die vorliegenden Desmethylierungen. In den Zytotoxizitätstests erwiesen sich die NOD-Varianten mit EC₅₀-Werten zwischen 19 und 77,2 nM leicht zytotoxischer als MC-LR (EC₅₀-Werte zwischen 54 und 120 nM). Dieser Befund lässt sich wiederum durch die bessere Aufnahme der NODs in die Hepatozyten erklären. Die desmethylierte Variante [¹Asp]NOD zeigt im Vergleich zu NOD und MC-LR eine abgeschwächte zytotoxische Wirkung sowohl auf primäre Ratten- als auch Humanhepatozyten.

In einer Studie wurde für NOD ein ähnlicher IC₅₀-Wert auf PP1 und PP2A wie für MC-LR und MC-RR ermittelt, zeigte aber für NOD eine stärkere hepatotoxische Wirkung. Dies kann auf die kleinere Molekülgröße von NOD zurückgeführt werden, wodurch zusätzlich zum Transport eine leichtere Aufnahme durch Diffusion in die Hepatozyten erfolgen kann und somit größere zelluläre Effekte erzielt werden (Ohta, et al., 1994). Eine weitere Studie belegt durch eine Behandlung primärer Hepatozyten der Ratte, dass NOD ein stärkeres zytotoxisches Potential aufweist als MC-LR. Um nach einer Stunde Membranbläschen zu induzieren, reichten bereits 100 nM NOD, aber erst 250 nM MC-LR (Herfindal, et al., 2005). Ein dem widersprechendes Ergebnis liefert eine Untersuchung von primären Rattenhepatozyten auf die Zytotoxizität von MC-LR und NOD im Konzentrationsbereich von 0-150 ng/ml nach 24 h Inkubation. Diese ergab, dass MC-LR zytotoxischer ist als NOD. Dabei wurde der MTT-Test verwendet, welcher auf der mitochondrialen Succinatdehydrogenase-Aktivität basiert. MC-LR besaß der Studie zufolge einen EC₅₀-Wert von 48 ng/ml (ca. 48 nM), welcher mit dem in dieser Arbeit ermittelten EC₅₀-Wert von 54 nM übereinstimmt. Der EC₅₀-Wert von NOD von 62 ng/ml (ca. 75 nM) weicht dagegen von dem durch diese Arbeit herausgefundenen EC₅₀-Wert von 31 nM ab (Bouaicha, et al., 2004). Eine andere Studie zeigte ebenfalls in primären Rattenhepatozyten mittels MTT-Tests für MC-LR nach einer 24-stündigen Inkubation einen EC₅₀-Wert von 8 ng/ml (ca. 8 nM), welcher weit unter dem durch diese Arbeit ermittelten EC₅₀-Wert liegt (Chong, et al., 2002).

In einer Untersuchung des inhibitorischen Effekts von MC-LR, MC-RR, MC-YR und NOD auf humane PP2A wurden IC₅₀-Werte von Mountfort et al. ermittelt. Dabei zeigte NOD mit einem IC₅₀-Wert von 1,8 nM die stärkste Wirkung, dicht gefolgt von MC-LR (2,2 nM). Einen etwas

schwächeren Einfluss zeigte MC-YR (9 nM) und eine sehr schwache Wirkung wurde von MC-RR mit einem IC_{50} -Wert von 175 nM erreicht (Mountfort, et al., 2005). Eine ähnliche Tendenz kann, mit allerdings abweichenden IC_{50} -Werten (0,03 nM für MC-LR, 0,17 nM für NOD, 0,3 nM für MC-YR und 5,9 nM für MC-RR), auch in dieser Arbeit gezeigt werden. Eine etwas andere Rangfolge liefern die zwei folgenden Studien. In der ersten wurden ED_{50} -Werte von einem PP-Extrakt aus einer Mäuseleber für MC-LR, MC-RR, MC-YR und NOD ermittelt. Dabei inhibierte NOD (0,7 nM) am stärksten, MC-YR wies einen Wert von 1,4 nM auf und inhibierte etwa gleich stark wie MC-LR (1,6 nM), die schwächste Wirkung zeigte wiederum MC-RR mit einem Wert von 3,4 nM (Yoshizawa, et al., 1990). Da aber in dieser Untersuchung ein PP-Extrakt benutzt wurde und damit die Inhibierung mehrerer PPs möglich war, kann kein direkter Bezug zu den in dieser Arbeit gemessenen Daten genommen werden. Ein besserer Vergleich kann mit der zweiten Studie gezogen werden. Hier wurden IC_{50} -Werte für PP2A (human) von 0,05 nM für MC-LR, 0,07 nM für MC-RR, 0,15 nM für MC-YR, 0,1 nM für MC-LF und von 0,5 nM für NOD ermittelt (Ikehara, et al., 2008). Alle Werte, bis auf den von MC-RR, befinden sich im gleichen Bereich wie die in dieser Arbeit erhaltenen IC_{50} -Werte.

Bei einer toxischen Wirkung durch verschiedene MCs und NOD spielen viele Faktoren eine Rolle, die berücksichtigt werden müssen. So kann von der Inhibierung eines Enzyms wie PP2A noch nicht auf ein zytotoxisches Potential geschlossen werden. Auch weitere PPs wie PP1 und PP3 werden durch die Hepatotoxine gehemmt, wodurch es zu einer Hyperphosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine kommt und dadurch Apoptose und Nekrose ausgelöst werden (Honkanen, et al., 1994). Bei der Inhibierung kommt es vor allem auf die Bindungsstärke zwischen MCs und NODs und Enzymen an. Je fester die Bindung, desto stärker ist die Hemmung. Leichte Modifikationen sowohl der MCs und NODs z.B. Austausch von Aminosäuren und Desmethylierungen als auch der Enzyme können die toxische Wirkung mindern oder sogar vollkommen aufheben (Blom, et al., 2005). Besonders aber der Transport der MCs und der NODs ist ein entscheidender Faktor für die Toxizität. So werden vor allem kleinere Moleküle wie NOD, aber vermutlich auch MCs, die statt polaren unpolare Aminosäuren tragen, leichter in die Zellen aufgenommen und erzielen dadurch größere zelluläre Effekte (Ohta, et al., 1994).

6.2. Apoptose durch Microcystine und Nodularine

Durch eine Hemmung der PPs wie PP1 und PP2A kommt es zur Hyperphosphorylierung von Proteinen und dadurch zu Apoptosen. Verschiedene Studien bestätigen, dass eine Inhibierung von PP2A und PP1 in unterschiedlichen Zellen Apoptose induziert (Bøe, et al., 1991; Kiguchi, et al., 1994; Yan, et al., 1997).

Durch diese Arbeit konnte in primären Rattenhepatozyten durch MC-LR und NOD eine konzentrationsabhängige Auslösung von Apoptosen festgestellt werden. Dabei wurde eine Aktivierung von Procaspasen 8 und 9 und der Initiatorcaspasen 3 und 7 beobachtet (Abbildung 78), wobei für MC-LR die Aktivität der Procaspasen 8 und 9 in gleichem Maß ab einer Konzentration von 50 nM um das Dreifache erhöht wurde. Die ausführenden Caspasen 3 und 7 wiesen eine zehnfach höhere basale Aktivität auf, welche ab einer Konzentration von 50 nM um das Doppelte anstieg. Die gleichen Untersuchungen mit der desmethylierten Variante [⁷Dha]MC-LR zeigten keinen Unterschied im Vergleich zu MC-LR. So konnte ein ähnlicher Trend, der jedoch nicht so stark ausgeprägt war, beobachtet werden. Eine schwache, nicht statistisch signifikante Caspaseaktivierung von Caspase 8 und 3/7 wurde durch dmMC-YR bei einer Konzentration von 50 nM erzielt. Aus der Datenlage kann geschlossen werden, dass über beide Wege (intrinsisch und extrinsisch) Apoptose ausgelöst wird (Abbildung 78).

Die Versuche mit NOD und dem Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 10 : 1 ergaben, dass beide eine ähnliches Potential wie MC-LR aufweisen die Apoptosewege zu induzieren. Beim Vergleich der Potenz von MC-LR mit NOD konnte eine etwa gleich hohe Induktion der Aktivität der Effektor-Caspasen 3 und 7 beobachtet werden. Der Unterschied lag in den Aktivitäten der Caspasen 8 und 9. Während für MC-LR bezogen auf DMSO (0,1 %) die Aktivität für beide Caspasen ähnlich stark auf das Doppelte induziert wurde, erhöhte NOD die Aktivität von Caspase 8 um das Dreifache und die von Caspase 9 um das Zehnfache. Eine Erklärung des stärkeren Anstiegs von Caspase 9 ist, dass diese zusätzlich Calpain-vermittelt (Ca²⁺-abhängig) über Caspase 12 aktiviert werden kann. In einer Studie von Solstad et al. wurde die Hypothese aufgestellt, dass NOD durch eine Inhibierung von PPs (wie PP1A und PP2A) eine Calpain-vermittelte Apoptose hervorruft (Solstad, et al., 2008).

Fladmark et al. zeigten in primären Rattenhepatozyten ebenfalls, dass MC-LR mit der maximalen effektiven Konzentration von 16 µM und NOD mit einer Konzentration von 5 µM, welche innerhalb von 2 min 50 % apoptotische Zellen verursacht, eine Caspase-3 abhängige Apoptose auslösen (Fladmark, et al., 1999).

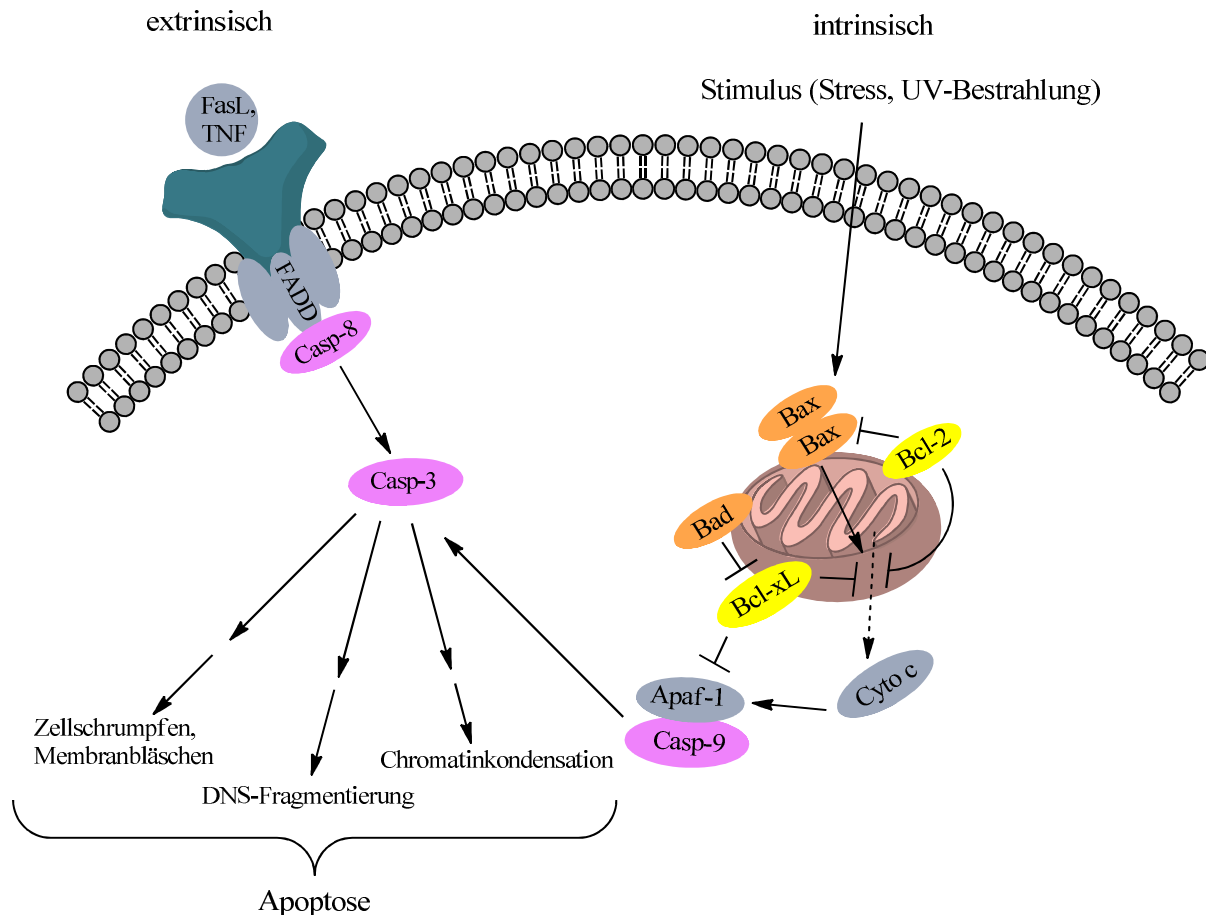


Abbildung 78: : Apoptose-Wege

rosa: Caspasen, gelb: anti-apoptotisch, orange; pro-apoptotisch, → Stimulation, —| Inhibierung, - - - → Translokation, → → Stimulation über Zwischenschritte

TNF: Tumor-Nekrose-Faktor; FADD: fas-associated death domain; Casp: Caspase; Apaf-1: apoptosis protease activating factor-1; Cyto c: Cytochrom c

Eine genauere Betrachtung der Zellen im Mikroskop nach sechsständiger Inkubation zeigte, dass die Zellen ab einer Konzentration von 50 nM NOD Anzeichen der apoptotischen Wirkung aufwiesen. Sie lösten sich voneinander ab und es konnten eindeutige Deformierungen wie Abrundung und Schrumpfen der Zellen sowie Apoptosebläschen beobachtet werden (Abbildung 94 im Anhang). In der höchsten Konzentration von 200 nM NOD waren nach 24 h die meisten Zellen abgestorben, und diejenigen, die noch am Kulturgefäß angewachsen waren, zeigten alle Anzeichen einer Degeneration. Die DAPI-Färbetests bestätigen die Apoptoseinduktion durch MC-LR und NOD in primären Rattenhepatozyten. Es konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme stark kondensierter, fragmentierter und halbmondförmiger Zellkerne beobachtet werden. Weitere für die Apoptose kennzeichnende Effekte wie internukleosomale DNS-Fragmentierung konnte ebenfalls für MC-LR und NOD konzentrationsabhängig festgestellt werden.

Bei den konfokalen Immunfluoreszenz-Analysen wies die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) ein hochorganisiertes dichtes Aktinnetzwerk auf, welches durch Ausbreitung in benachbarte Zellen für hohe Stabilität des Monolayers der Hepatozyten sorgt. Die Behandlungen primärer Rattenhepatozyten mit MC-LR und NOD zeigten konzentrationsabhängig einen Einfluss auf das Aktinnetzwerk. Die Zellen waren stark abgerundet und die Aktinfilamente waren vor allem in den äußeren Schichten der Hepatozyten zu sehen. Der normalerweise stark ausgeprägte Zell-Zell-Kontakt nahm ab. Weiterhin konnte ab 6 h das Kollabieren und Aggregieren der Aktinfilamente in der Zellmitte oder an einem Pol der Zelle beobachtet werden (siehe Kapitel 5.5).

Auch zahlreiche *in vitro* Untersuchungen an primären Ratten- und Humanhepatozyten belegen typische apoptotische Effekte mit Knospung der Zelloberfläche, Zellschrumpfung, Organellenumverteilung, Kondensation von Chromatin im Zellkern und teilweise Fragmentierung des Zellkerns, intakte Mitochondrien in apoptotischen Bläschen bzw. an einem Pol der Zelle, Abrundung der Zellen und Kollabieren des Aktinnetzwerks (Batista, et al., 2003; Boe, et al., 1991; Krakstad, et al., 2006; Fladmark, et al., 1999). Dabei ist die Wirkung der MCs und des NOD auf die verschiedenen Zellen unterschiedlich stark. So reicht für Hepatozyten bereits eine Konzentration von 0,8 μM MC-LR, um Effekte innerhalb von weniger als 15 min aufzuzeigen. Andere Zellsysteme wie humane Fibroblasten, Endothelzellen und Promyelozyten, die keinen Aufnahmemechanismus für MCs aufweisen, benötigen für apoptotische Effekte 100 μM MC-LR und sechs bis acht Stunden (Fladmark, et al., 1999; McDermott, et al., 1998). Die Apoptose wird dabei allgemein durch die Inhibierung von PP1 und PP2A in einem CaMKII-abhängigen Prozess ausgelöst, was zu vermehrter Phosphorylierung von Proteinen führt (Fladmark, et al., 2002; Solstad, et al., 2008). Auch wurde beobachtet, dass MCs in der Lage sind, die β -Einheit der ATP-Synthase zu binden und auf diesem Weg Apoptose auszulösen (Mikhailov, et al., 2003).

Dabei können apoptotische Merkmale bereits vor einer zytotoxischen Wirkung beobachtet werden. So wurde in einer Studie im LDH-Leakage-Assay nach einer sechsstündigen Behandlung keine aussagekräftige Erhöhung der Abgabe von LDH durch die Hepatozyten gezeigt. Bei einer genaueren Betrachtung der Zellen im Mikroskop jedoch konnten für NOD (10 nM) und für MC-LR im Konzentrationsbereich von 10-50 nM erste Anzeichen einer Zellschädigung beobachtet werden. Eine weitere Studie belegt diese Feststellung. Dort zeigte sich nach einer Behandlung von Rattenprimärhepatozyten mit MC-LR im Konzentrationsbereich von 10-80 nM in Bezug auf die Kontrolle nach 0,25-6 h keine signifikante Veränderung der Vitalität, obwohl Membranbläschen und andere

morphologische charakteristische Apoptosemerkmale bereits zu sehen waren (McDermott, et al., 1998).

Andere Studien zeigten bei einer relativ hohen Konzentration von 1 μM MC-LR bereits nach 50 min eine erhöhte LDH-Leakage. Bereits nach 30 min war Apoptose der Rattenhepatozyten, die sich durch Zellschrumpfung, Membranbläschen und Kernkondensation äußerte, zu erkennen (Ding, et al., 2000a; Ding, et al., 2001). Auch bei diesen Studien waren zuerst Zellschädigungen zu sehen, bevor eine Erhöhung der LDH-Leakage festzustellen war. Auch weitere Untersuchungen von Ding, et al. belegten, dass Apoptose bereits vor der Erhöhung der LDH-Leakage induziert wird. So wurde gezeigt, dass MC-LR das mitochondriale Membranpotential (MMP) schon vor der Erhöhung der LDH-Leakage erniedrigt. Das deutet darauf hin, dass eine MMP-Depolarisierung ein früherer Effekt der MC-induzierten Hepatotoxizität ist (Ding, et al., 2003).

Auch das starke hepatotoxische Potential von NOD wird in Studien belegt. So wurde gezeigt, dass NOD der Konzentration 200 nM schon nach einer Exposition von 10 min bei 50 % der Rattenprimärhepatozyten und nach 20 min bereits bei 90 % Apoptose auslöste. Außerdem wurde beschrieben, auf welchem Weg NOD den Zelltod induzierte. Eine Inhibierung der PPs (wie PP1 und PP2A) führt, wie auch durch diese Arbeit festgestellt, zu einer Hyperphosphorylierung von zellulären Proteinen, wobei eins dieser Proteine das Acyl-CoA Bindungsprotein ist, das wiederum Calpain aktiviert, was schließlich zu Apoptose führt (Solstad, et al., 2008).

Frühere *in vitro*- und *in vivo*-Studien untermauern das Apoptose auslösende Potential wie Chromatinkondensation, DNS-Fragmentierung und -Abbau, Senkung des mitochondrialen Membranpotentials und erhöhte Expression von Caspasen 3, 8 und 9 von MC-LR und NOD, wobei die Inhibierung der PPs verantwortlich gemacht wird (Boe, et al., 1991; Kiguchi, et al., 1994; Boudreau, et al., 2007; McDermott, et al., 1998; Rao, et al., 1996; Zezschwitz, et al., 1997; Li, et al., 2012; Kujbida, et al., 2008).

Zusammenfassend konnte in primären Rattenhepatozyten sowohl mittels Caspase-Aktivitätstests, als auch mikroskopischen Untersuchungen eine zeit- und konzentrationsabhängige Auslösung der Apoptose festgestellt werden. Dabei erwiesen sich NOD und MC-LR als etwa gleich starke Apoptose auslösende Kongenere.

6.3. Wirkmechanismus: MAPK-Signalweg

Die Inhibierung von PP führt zu einer Störung des Gleichgewichts zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und –Dephosphorylierung. MCs und NODs verursachen dadurch eine Leberschädigung und wirken tumorpromovierend. Der molekulare Wirkmechanismus dieser Leberschädigung und die Art des störenden Einflusses auf die Balance zwischen Zelltod und Zellüberleben sind unklar (Komatsu, et al., 2007; Hu, et al., 2002; Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992). Die Störung des MAPK-Signalwegs durch Hemmung von PPs führt zu einer Hyperphosphorylierung der Kinasen, einer damit einhergehenden Überaktivierung der Kaskade und letztendlich zu einer Veränderung in der Genexpression (Cargnello, et al., 2011). So besitzen PP2A und PP1 einen direkten Einfluss auf die MAPK MEK1/2 und ERK1/2, indem sie am Serin- oder Threonin-Rest dephosphorylieren und dadurch die Enzyme deaktivieren. Die Inhibierung von PP2A und PP1 führt folglich zu einer Aktivierung von MEK1/2 und ERK1/2 (Abbildung 79) (Svircev, et al., 2010; Roberts, et al., 2007).

Die Untersuchungen des Phosphorylierungsstatus von MEK1/2 in primären Rattenhepatozyten ergaben für NOD konzentrations- (10, 50 und 100 nM) und zeitabhängig (1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h) eine zwei- bis dreifache Erhöhung des Gehalts an P-MEK1/2 (Ser221) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V). Phosphoryliertes MEK1/2 aktiviert durch eine Phosphorylierung an Thr202/Tyr204 und Thr185/Tyr187 im nächsten Schritt ERK1/2. Diese Kinase ist als Aktivierungsmarker des MAPK-Signalwegs repräsentativ, da sie in der Lage ist durch Rückkopplung zeitabhängig den Raf-vermittelten MAPK-Weg hemmend oder aktivierend zu beeinflussen (Kholodenko, et al., 2010). Weiterhin beeinflusst ERK1/2 die Kinasen p90RSK und MSK1/2 (Abbildung 79) (Roberts, et al., 2007).

Eine zeit- und konzentrationsabhängige Behandlung primärer Rattenhepatozyten zeigte für MC-LR und MC-RR keine statistisch signifikante Veränderung des P-ERK1/2-Gehalts. Da MC-RR kein starker Inhibitor von PPs ist, wurde auch erwartungsgemäß keine Auswirkung auf den Gehalt an P-ERK1/2 beobachtet. Anders verhielt es sich für MC-LR. Da dieses MC einen der stärksten PP-Inhibitoren darstellt, sollte erwartungsgemäß eine starke Zunahme an hyperphosphorylierten Proteinen zu beobachten sein. Interessanterweise konnte zwar in den Western Blot- Untersuchungen keine Wirkung auf P-ERK1/2 festgestellt werden, jedoch zeigten die fluoreszenzmikroskopische Versuche eine leichte konzentrations- (10, 50 und 100 nM) und zeitabhängige (1, 6 und 8 h) Zunahme an markiertem P-ERK1/2, was auf die Sensitivität der Methoden zurückzuführen ist.

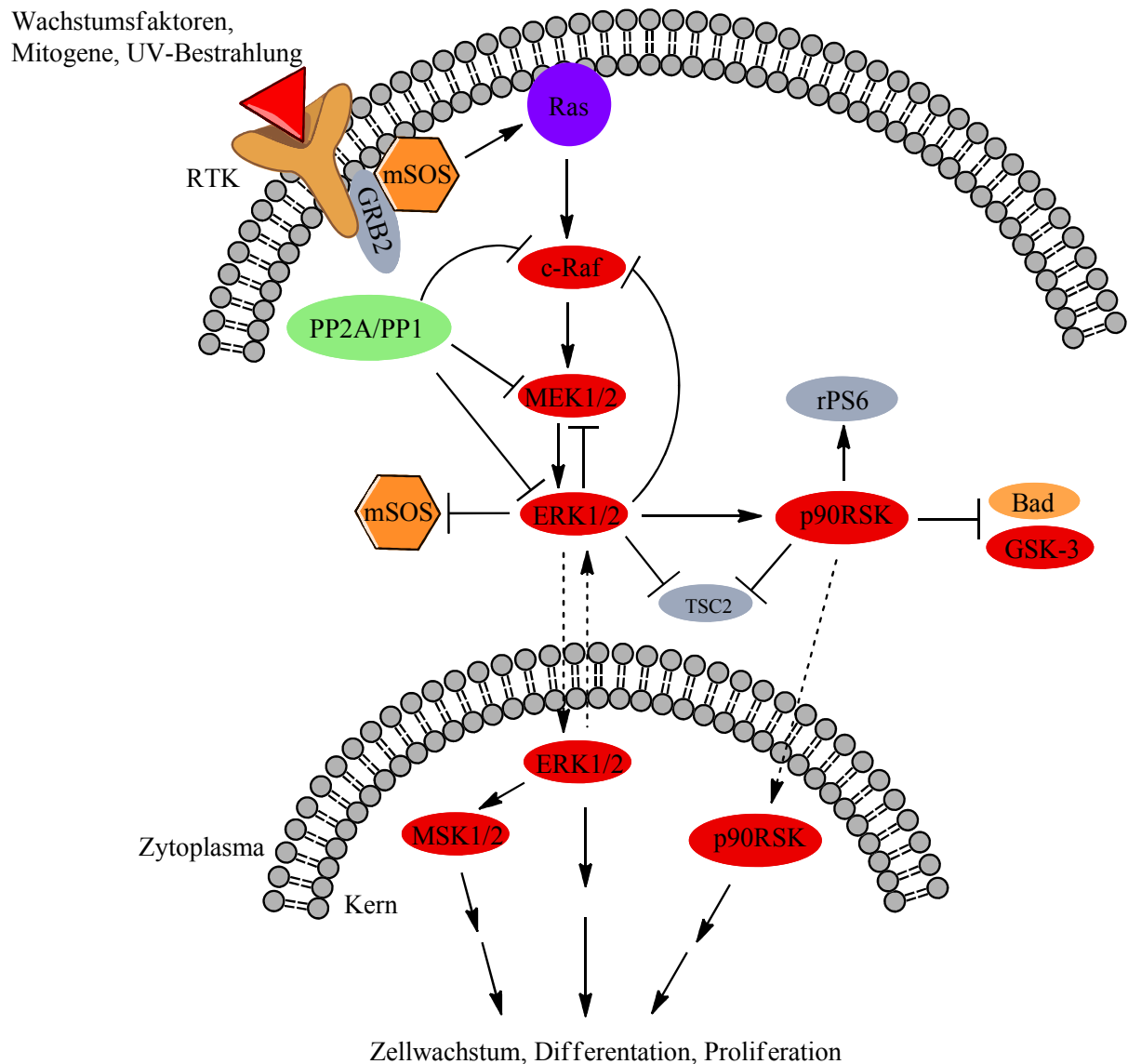


Abbildung 79: MAPK-Signalweg

rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, \rightarrow Stimulation, \dashv Inhibierung, \dashrightarrow Translokation,
 $\rightarrow \rightarrow$ Stimulation über Zwischenschritte

RTK: Rezeptor Tyrosin Kinasen; GRB2: growth factor receptor bound protein 2; mSOS: mammalian son-of-sevenless; Ras: rat sarcoma; PP2A/PP1: Proteinphosphatase 2A/1; c-Raf: rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma; MEK1/2: MAPK extracellular signal regulated kinase; ERK1/2: extracellular signal regulated kinases 1/2; TSC2: tuberous sclerosis protein 2; p90RSK: p90 kDa ribosomal S6 kinase; rPS6: ribosomal protein S6; GSK-3: Glykogensynthasekinase 3; MSK1/2: mitogen- and stress-activated protein kinase

Ein weiterer Ansatz, warum keine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 durch MC-LR erfolgte, ist, dass andere Kinasen wie p38 MAPK die Proteinphosphatase PP2A stimulieren und dieses wiederum MEK1/2 dephosphoryliert und im weiteren Schritt ERK1/2 durch MEK1/2 inaktiviert (Cuadrado, et al., 2010; Junttila, et al., 2008).

Betrachtet man verschiedene Studien, ist der Einfluss durch MC-LR auf ERK1/2 unklar und sogar kontrovers. So stellten Komatsu et al. in HEK293- (*human embryonic kidney 293*) und HeLa-Zellen (menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) einen Zusammenhang zwischen hyperphosphoryliertem ERK1/2 und der Induzierung einer MC-LR-vermittelten Apoptose fest (Komatsu, et al., 2007). In der Zelllinie Vero-E6 (*monkey kidney cell line*) dagegen wurde mittels Phosphorylierung die Aktivierung von ERK1/2 durch MC-LR mit einer vermehrten Proliferation der Zellen in Verbindung gebracht (Dias, et al., 2010). Eine andere Untersuchung wies für MC-LR in WB-F344 (*rat liver epithel cell line*) keine Hochregulierung von P-ERK1/2 auf (Bláha, et al., 2010). Auch in dieser Arbeit konnte durch eine Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit MC-LR kein Einfluss auf den P-ERK1/2-Gehalt festgestellt werden. Möglicherweise kann für die Rückkopplung durch ERK1/2 sowohl c-Raf als auch MEK1/2 verantwortlich gemacht werden. Außerdem ist auf Grund des Transports in die Zelle vermutlich nicht ausreichend MC-LR vorhanden, um den MAPK-Signalweg signifikant zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu MC-LR lieferte NOD ein eindeutigeres Ergebnis. Bei der zeit- (1, 2, 3, 4, 6 und 8 h) und konzentrationsabhängigen (10, 50, und 100 nM) Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit NOD konnte im Western Blot ein zweifacher Anstieg an P-ERK1/2 beobachtet werden. Die konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Analysen bestätigten die ermittelten Daten. Ab dem Behandlungszeitpunkt von 6 h wurde eine Erhöhung des phosphorylierten ERK1/2 festgestellt. Da NOD einen potenten Tumorpromotor (Hu, et al., 2002; Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992; Carmichael, 1992; IARC, 2006) und ein Leberkanzerogen (Yu, et al., 2001; Ito, et al., 1997b; Ding, et al., 1999; Abdel-Hamid, 2009; Zegura, et al., 2008; Ohta, et al., 1994) darstellt, liegt die Hypothese nahe, dass der Wirkmechanismus MAPK-vermittelt abläuft.

Ein direktes Substrat von ERK1/2 stellt p90RSK dar, welches wiederum S6 Proteine phosphoryliert (Abbildung 80). Der Einfluss von MC-LR, MC-RR und NOD in primären Rattenhepatozyten auf den P-p90RSK (Ser380)- und P-p90RSK (Thr359/Ser363)-Status wurde für die Konzentrationen 10, 50 und 100 bzw. 200 nM zeitabhängig (1, 2, 3, 4, 6 und 8 h) untersucht. Da MC-RR ein schwacher PP-Inhibitor ist, konnte erwartungsgemäß für MC-RR keine Wirkung auf phosphorylierte p90RSK beobachtet werden. MC-LR (100 nM) dagegen bewirkte eine fünffache Zunahme an P-p90RSK (Ser380) und eine zwei- bis dreifache Erhöhung von P-p90RSK (Thr359/Ser363), obwohl kein starker Einfluss auf P-ERK1/2 zu sehen war. Diese Beobachtung kann dadurch erklärt werden, dass p90RSK sowohl durch ERK1/2 als auch direkt durch PP2A/PP1 beeinflusst wird und somit über zwei Wege aktiviert werden kann. So dephosphoryliert und inaktiviert PP2A und PP1 *in*

vitro Raf-1 (c-Raf), MAPKK, MAPK und p90RSK (Kyriakis, et al., 1992; Dent, et al., 1992; Howe, et al., 1992; Force, et al., 1994; Fischer, et al., 1990). Die aktivierte Kinase ERK1/2 ist dagegen in der Lage mittels Rückkopplung zeitabhängig einen hemmenden Effekt auf den Raf-vermittelten MAPK-Weg auszuüben (Abbildung 80) (Kholodenko, et al., 2010).

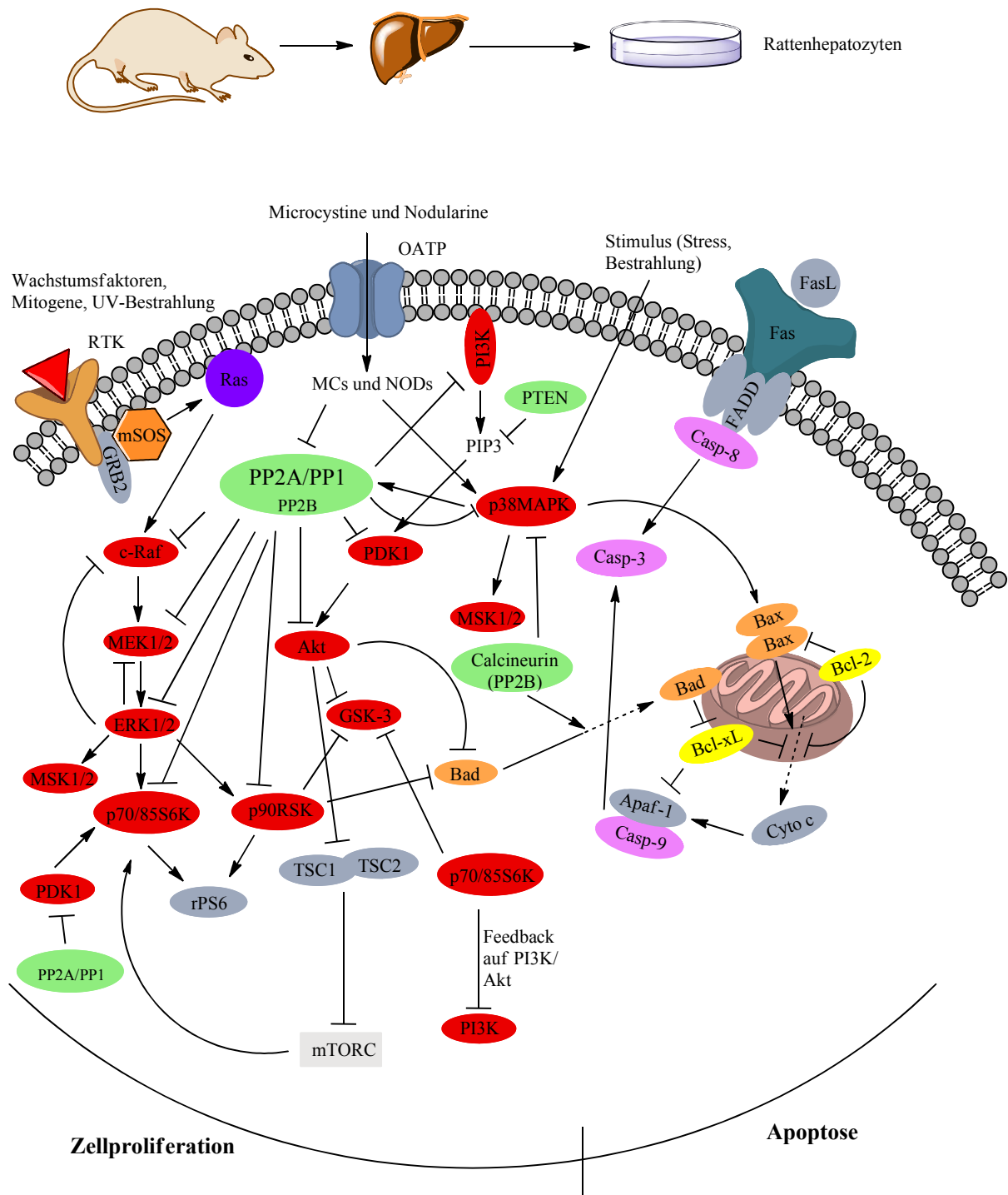


Abbildung 80: MAPK-, Akt- und Apoptose-Signalwege.

Theoretisch mögliche Wirkung durch MCs und NODs. rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, gelb: anti-apoptotisch, orange: pro-apoptotisch, \rightarrow Stimulation, \dashv Inhibierung, $\dashv\rightarrow$ Translokation, $\rightarrow\rightarrow$ Stimulation über Zwischenschritte.

RTK: Rezeptor Tyrosin Kinasen; GRB2: growth factor receptor bound protein 2; mSOS: mammalian son-of-sevenless; Ras: rat sarcoma; PP2A/PP1: Proteinphosphatase 2A/1; c-Raf: rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma; MEK1/2: MAPK extracellular signal regulated kinase; ERK1/2: extracellular signal regulated kinases 1/2; TSC: tuberous sclerosis protei; mTORC: mammalian target of rapamycin complex; p90RSK: p90 kDa ribosomal S6 kinase; rPS6: ribosomal protein S6; GSK-3: Glykogensynthasekinase 3; MSK1/2: mitogen- and stress-activated protein kinase; p38MAPK: p38 mitogen activated protein kinase; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase; PTEN: phosphatase and tensin homolog; PDK1: 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1; Akt: Proteinkinase B; p70/85S6K: p70/85 kDa ribosomal S6 kinase; FADD: fas-associated death domain; Casp: Caspase; Apaf-1: apoptosis protease activating factor-1; Cyto c: Cytochrom c;

NOD ist ein schwächerer Hemmer von PPs, besitzt jedoch großen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen, was auf die bessere Verfügbarkeit in der Zelle durch schnellere Aufnahme zurückzuführen ist. So wies die Behandlung mit NOD eine konzentrations- und zeitabhängige sechsfache Zunahme an P-p90RSK (Ser380) und P-p90RSK (Thr359/Ser363) auf. Dabei war ein zweifacher Anstieg von phosphoryliertem p90RSK durch NOD bereits ab einem frühen Zeitpunkt von 3 h zu sehen, während für P-ERK1/2 eine zweifache Zunahme erst ab 6 h zu beobachten war. Diese Feststellung bestätigt wiederum den bilateralen Einfluss auf p90RSK sowohl durch ERK1/2 als auch durch PP2A/PP1, wodurch eine stärkere Wirkung auf den P-p90RSK-Gehalt als auf den P-ERK1/2-Status zu erwarten war.

Die Kinasen p85 S6 und p70 S6 sind ebenfalls in der Lage S6 Proteine zu phosphorylieren, wodurch Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung beeinflusst werden (Abbildung 80). PP2A und PP1 können p85/70 S6-Kinasen sowohl direkt als auch über eine Inhibierung von PDK1 und PI3K hemmen (Westphal, et al., 1999; Tsai, et al., 1993). Außerdem ist der c-Raf/MEK/ERK-Signalweg in der Lage p70 S6 zu aktivieren (Iijima, et al., 2002; Wang, et al., 2001).

Die Untersuchung der Phosphorylierungsstatus von p85 S6, p70 S6 und S6rP durch MC-LR, MC-RR und NOD in primären Rattenhepatozyten ergab für MC-RR und für MC-LR (10 und 50 nM) keine Wirkung auf den Phosphorylierungsstatus von P-p85/p70 S6 (Thr412)/(Thr389) über einen Behandlungszeitraum von 24 h. MC-LR der Konzentration 100 nM zeigte eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante Tendenz einer Erhöhung für P-p70 S6 (Thr389). Wie bereits bei p90RSK beschrieben, wurde auch der Gehalt an P-p85 (Thr412) und P-p70 S6 (Thr389) durch eine Behandlung mit NOD (10, 50 und 100 nM) konzentrations- und zeitabhängig erhöht. Dabei wurde der Status an P-p70 S6 (Thr389) bei einem früheren Zeitpunkt erhöht als der an P-p85 S6 (Thr412), jedoch weniger stark ausgeprägt. So konnte bei einer Konzentration von 10 nM NOD eine vierfache Zunahme für P-p85 (Thr412) und P-p70 S6 (Thr389) festgestellt werden, wobei der P-p70 S6 (Thr389)-Gehalt ab einem Zeitpunkt von 3 h zunahm und der von P-p85 (Thr412) erst ab 6 h. Für die Konzentrationen 50 und 100 nM konnte eine entsprechend stärkere Wirkung, die zu einem früheren Zeitpunkt eintrat, gezeigt werden. Dabei wurde eine elffache Zunahme für P-p85 S6 (Thr412) und eine vierfache für P-p70 S6 (Thr389) festgestellt.

Die Erhöhung des Phosphorylierungsstatus für p90RSK und p85/70 S6 durch NOD sollte folglich eine klare Auswirkung auf das ribosomale Protein P-S6 zeigen (Abbildung 80). Bis auf eine leichte Tendenz einer Erhöhung des P-S6rP (Ser235/236)-Gehalts konnte keine

deutliche Zunahme beobachtet werden. Nur die Konzentration 100 nM (NOD) lieferte einen statistisch hoch signifikanten Anstieg an P-S6rP (Ser235/236) bei 8 h. Beim Vergleich des basalen Gehalts bei der Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 %) mit den jeweiligen Behandlungen mit NOD zeigte eine allgemeine zeitunabhängige Zunahme an P-S6rP (Ser235/236). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die Erhöhung von P-S6rP (Ser235/236) in einem anderen Zeitfenster erfolgt und/oder eine Gegenregulation stattfindet.

Eine Zellantwort via p38 MAPK erfolgt durch extrazellulären Stress, wobei die Aktivierung über eine duale Phosphorylierung durch MKK3/6 (MAPKK) verursacht wird (Abbildung 80). Weiterhin ist die aktivierte p38 MAPK in der Lage einen Cross-Talk zum ERK1/2-Weg herzustellen, indem es PP2A stimuliert und dieses wiederum MEK1/2 dephosphoryliert und im weiteren Schritt ERK1/2 durch MEK1/2 inaktiviert wird (Cuadrado, et al., 2010; Junttila, et al., 2008). PP2A kann eine Herabregulierung des p38-Signalwegs mittels einer Dephosphorylierung von Serin/Threonin-Resten hervorrufen (Zhang, et al., 2008; Zuluaga, et al., 2007).

Eine Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit NOD der Konzentrationen 10, 50 und 100 nM über einen Zeitraum von 8 h zeigte eine eindeutige zeit- und konzentrationsabhängige Zunahme des P-p38 (Thr180/Tyr182)-Gehalts. Dabei verursacht NOD bereits bei der Konzentration von 10 nM über 8 h einen dreifachen Anstieg an P-p38 (Thr180/Tyr182), der ab dem Zeitpunkt von 4 h eine Tendenz der Zunahme aufwies. Mit höheren Konzentrationen kam es zu einem verstärkten Einfluss auf den P-p38 (Thr180/Tyr182)-Gehalt, welcher über 8 h um das Vierfache erhöht wurde und die Zunahme bereits ab 2 h erfolgte.

Dass PP-Inhibitoren ihre Wirkung MAPK-vermittelt äußern, wird durch mehrere Studien belegt. So verursacht Okadasäure, ein starker PP-Hemmer, in Jurkat- und CCRF-CEM (*human caucasian acute lymphoblastic leukemia*)-Zellen eine erhöhte Phosphorylierung der p38MAPK (Boudreau, et al., 2007). In einer anderen Untersuchung mit MC-LR wurde in NCC-Zellen (*non-specific cytotoxic cells*) ebenfalls eine gesteigerte Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs gezeigt, was mit der möglichen tumorpromovierenden Eigenschaft von MC-LR in Verbindung gebracht wurde (Zhu, et al., 2005). In der Zelllinie Vero-E6 (*monkey kidney cell line*) wurde die Aktivierung von p38 durch MC-LR beobachtet, was mit einer vermehrten Proliferation der Zellen einherging (Dias, et al., 2010). Zwar wurde in dieser Arbeit ein Zellsystem (Primärhepatozyten) verwendet, das keine proliferierenden Eigenschaften aufweist, jedoch konnte eine Aktivierung des ERK- und p38-Signalwegs

beobachtet werden. Dadurch kann man vermuten, dass die *in vivo* beobachteten tumorpromovierenden Effekte MAPK-vermittelt hervorgerufen werden.

Da eine Aktivierung sowohl des ERK1/2- als auch p38-Signalwegs durch NOD ab 10 nM bei einem Zeitpunktraum von 4 bis 6 h eindeutig festgestellt wurde und beide einen Einfluss auf MSK1/2 haben (Yuan, et al., 2003; Cuadrado, et al., 2010; Frödin, et al., 1999), sollte eine Erhöhung des Phosphorylierungsgehalts von MSK1 (Ser360) und MSK1 (Ser376) zu erwarten sein. Da mit den verwendeten Antikörpern kein Signal erfasst werden konnte, konnten keine verwertbaren Daten ermittelt werden und somit keine klare Aussage bezüglich MSK-Aktivierung getroffen werden.

Die Weise, auf die aktivierte p38 MAPK wirkt, ist unklar. Frühere Untersuchungen belegen, dass die p38 MAPK eine kritische Rolle in Zellproliferation und –überleben spielt. Obwohl einige Studien p38 in Verbindung mit Funktionen für das Zellüberleben zeigen (Engel, et al., 2005; Nishida, et al., 2004; Yu, et al., 2007), assoziieren andere Untersuchungen p38 mit durch zellulären Stress verursachter Apoptose (Hanahan, et al., 2000; Dolado, et al., 2007; Wang, et al., 1998; Liao, et al., 2001). Diese Effekte können durch transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen, welche Todesrezeptoren und pro- und antiapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie beeinflussen, vermittelt werden (Cuenda, et al., 2007; Nebreda, et al., 2000; Shi, et al., 2002).

Durch die Hemmung von PP2A und PP1 sind MCs und NODs in der Lage Apoptosen auszulösen. Da weiterhin der Signalweg über MAPKinasen an der Regulierung von Apoptosemarkern beteiligt ist (Svircev, et al., 2010), wurde der mögliche Einfluss auf das Gleichgewicht zwischen pro- und antiapoptotischen Proteinen untersucht (Abbildung 80).

Durch die Fähigkeit von Bax die Membranpermeabilität von Mitochondrien zu erhöhen, wodurch Cytochrom c freigesetzt wird und Caspase 9 aktiviert wird (Narita, et al., 1998), stellt dieses pro-apoptotische Protein einen wichtigen Apoptosemarker dar.

Die Versuche mit MC-RR der Konzentration von 200 nM zeigten erwartungsgemäß über eine Zeitspanne von 24 h im Western Blot keinen Einfluss auf Bax. MC-LR 100 nM war in der Lage ab einem Zeitpunkt von 8 h einen schwachen (einfachen) Anstieg des Bax-Gehalts zu verursachen. MC-LR wirkt als Tumorpromotor und ist ebenfalls in der Lage in verschiedenen Zellsystemen, unter anderem in primären Maushepatozyten und in HepG2, Apoptosen zu induzieren (Clark, et al., 2008; Zegura, et al., 2008; Fu, et al., 2005; Tachi, et al., 2007). So zeigt eine frühere Studie, dass MC-LR in Rattenhepatozyten (BRL-3A) die Expression von Bax erhöht und gleichzeitig die von Bcl-2 senkt (Fu, et al., 2005). In einer *in vivo*

Untersuchung an Mäusen verursachten 50 µg MC-LR/kg KG Bid-Bax-Bcl-2 abhängige Apoptosen in der Leber, wobei eine höhere Dosis von 70 µg/kg KG MC-LR Apoptose über ROS-Bildung verursachte (Chen, et al., 2005).

Die Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit NOD 10 nM zeigte über einen Zeitraum von 8 h eine zeitabhängige Erhöhung des Bax-Proteingehalts um das Zweifache an, welcher bei 24 h wieder abfiel, was auf zytotoxische Effekte zurückzuführen ist. Bei höheren Konzentrationen (50 und 100 nM) stieg die Proteinmenge an Bax ebenfalls zweifach an, weshalb eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit nicht festgestellt werden konnte.

Einen Gegenspieler von Bax stellt Bcl-2 als anti-apoptotisches Protein dar, indem es die Freisetzung von Cytochrom c inhibiert (Zhou, et al., 2010). In dieser Arbeit konnte in primären Hepatozyten der Ratte über einen Behandlungszeitraum von 24 h weder für MC-RR noch für MC-LR oder NOD ein Einfluss auf den Bcl-2-Proteingehalt festgestellt werden. Bei einer Untersuchung von Boudreau et al. konnte in Jurkat- und CCRF-CEM (*human caucasian acute lymphoblastic leukemia*)-Zellen, die mit 100 nM Okadasäure verschiedener Konzentrationen behandelt wurden, kein Einfluss auf die Bcl-2-Expression beobachtet werden. Sie schlossen daraus, dass die durch PP2A-Inhibierung verursachte Apoptose nicht über eine Überexpression von Bcl-2 vermittelt ist (Boudreau, et al., 2007). Eine andere Studie konnte ebenfalls in verschiedenen Zelllinien für eine hohe Konzentration von 5 µM NOD keine Bcl-2-abhängige Induktion von Apoptose feststellen (Fladmark, et al., 1999).

Ein weiteres Mitglied der Bcl-2-Familie ist Bcl-xL, welches ebenfalls anti-apoptotisch wirkt. Durch die Bildung eines Heterodimers mit Bax wird die Aufrechterhaltung der Membranintegrität von Mitochondrien gewährleistet und somit die apoptotische Wirkung von Bax gehemmt (Zhou, et al., 2010). Die Menge an Bcl-xL blieb durch MC-RR und MC-LR über einen Zeitraum von 24 h in den Western Blot- und den konfokalen Immunofluoreszenz-Analysen konstant, obwohl apoptotische Merkmale zu erkennen waren. Dagegen lieferten die Untersuchungen mit NOD eine eindeutige Aussage. Im Western Blot wurde eine konzentrations- und zeitabhängige zwei- bis fünffache Erhöhung des Bcl-xL-Gehalts durch NOD verursacht. Interessanterweise konnte zu den früheren Zeitpunkten ein Abwärtstrend der Proteinmenge beobachtet werden, welcher jedoch ab 4 h wieder konsistent zunahm. Erstaunlicherweise konnte in den konfokalen Immunofluoreszenz-Analysen kein eindeutiger Einfluss durch NOD auf Bcl-xL im untersuchten Zeitraum beobachtet werden. Eine *in vivo* Untersuchung an F344 Ratten mit NOD (25 µg/kg KG) in Kombination mit Diethylnitrosamin (200 mg/kg KG) *i.p.* zeigte im Western Blot ebenfalls eine Induktion der Bcl-xL-Expression

(Lim, et al., 2001). Da sich primäre Hepatozyten nicht mehr im Zellverband befinden, ist es nicht verwunderlich, dass *in vitro* die Kontrollmechanismen für ein Zellüberleben nicht effektiv genug wie in einem *in vivo*- System greifen.

Da die Proteine Bax und Bcl-xL durch NOD und MC-LR beeinflusst wurden, spielen diese eine entscheidende Rolle in der durch MCs und NODs induzierten Apoptose und dienen als Marker für einen MAPK-vermittelten Signalweg. Die Kinasen p90RSK und p85/70 können über eine hemmende Wirkung auf Bad (pro-apoptotisch) Bcl-xL aktivieren, weshalb anti-apoptotische Effekte die Folge sein können. Aufgrund des gestörten Gleichgewichts von Bax und Bcl-2 kann die Reaktion aber auch in Richtung der Apoptoseinduktion gelenkt werden.

Zusammenfassend konnte durch die MC- und NOD- vermittelte PP-Hemmung der Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen und damit auf das Gleichgewicht zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung gezeigt werden. MC-LR und NOD waren in der Lage zeit- und konzentrationsabhängig Apoptosemarker wie Bax und Bcl-xL zu beeinflussen und die MAPK-Signalkette zu aktivieren. Dabei wies NOD eine stärkere Wirkung auf als MC-LR.

6.4. Wirkmechanismus: AKT-Signalweg

Der Serin/Threonin Kinase Akt-Signalweg, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB)-Signalweg, spielt eine kritische Rolle bei der Zellproliferation durch eine Unterdrückung von Apoptose (Manning, et al., 2007; Bellacosa, et al., 2005; Engelman, et al., 2006). Außerdem ist Akt in der Lage einen Einfluss auf das Zellüberleben auszuüben, indem pro-apoptotische Marker wie Bax direkt inhibiert werden (Franke, et al., 1997). Eine indirekte Hemmung durch Phosphorylierung der Procaspase 9 und die daraus resultierende Inhibierung der Freisetzung von Cytochrom c wirkt ebenfalls anti-apoptotisch (Hers, et al., 2011).

Durch eine Hemmung von PP1 und PP2A durch MCs und NOD könnte theoretisch der Akt-Signalweg aktiviert werden, indem durch Dephosphorylierung an Ser473 und Thr308 keine Inhibierung stattfindet (Abbildung 81) (Brazil, et al., 2004; Chen, et al., 2010; Millward, et al., 1999).

Bei der Erfassung der Phosphorylierungsstatus von P-Akt (Ser473), P-Akt (Thr308), P-c-Raf (Ser259), P-GSK-3 β (Ser9), P-PTEN (Ser380) und P-PDK 1 (Ser241) konnte für MC-LR keine Wirkung auf den Akt-Signalweg festgestellt werden (Daten nicht dargestellt). NOD 10 nM zeigte bei der Behandlung von primären Rattenhepatozyten bei den Zeitpunkten 3, 4, 6 und 7 h eine Erhöhung von P-c-Raf (Ser259) auf, NOD 50 nM bei 1 und 2 h und NOD 100 nM eine leichte Erhöhung bei 8 h. Bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle konnte jedoch von keiner konsistenten zeit- oder konzentrationsabhängigen Wirkung auf P-c-Raf (Ser259) ausgegangen werden. Für P-PDK1 (Ser241) und P-PTEN (Ser380) wies NOD in allen Konzentrationen keinen Einfluss auf. Auch weitere Untersuchungen bezüglich des Akt-Signalweges ergaben keine aufschlussreichen Erkenntnisse.

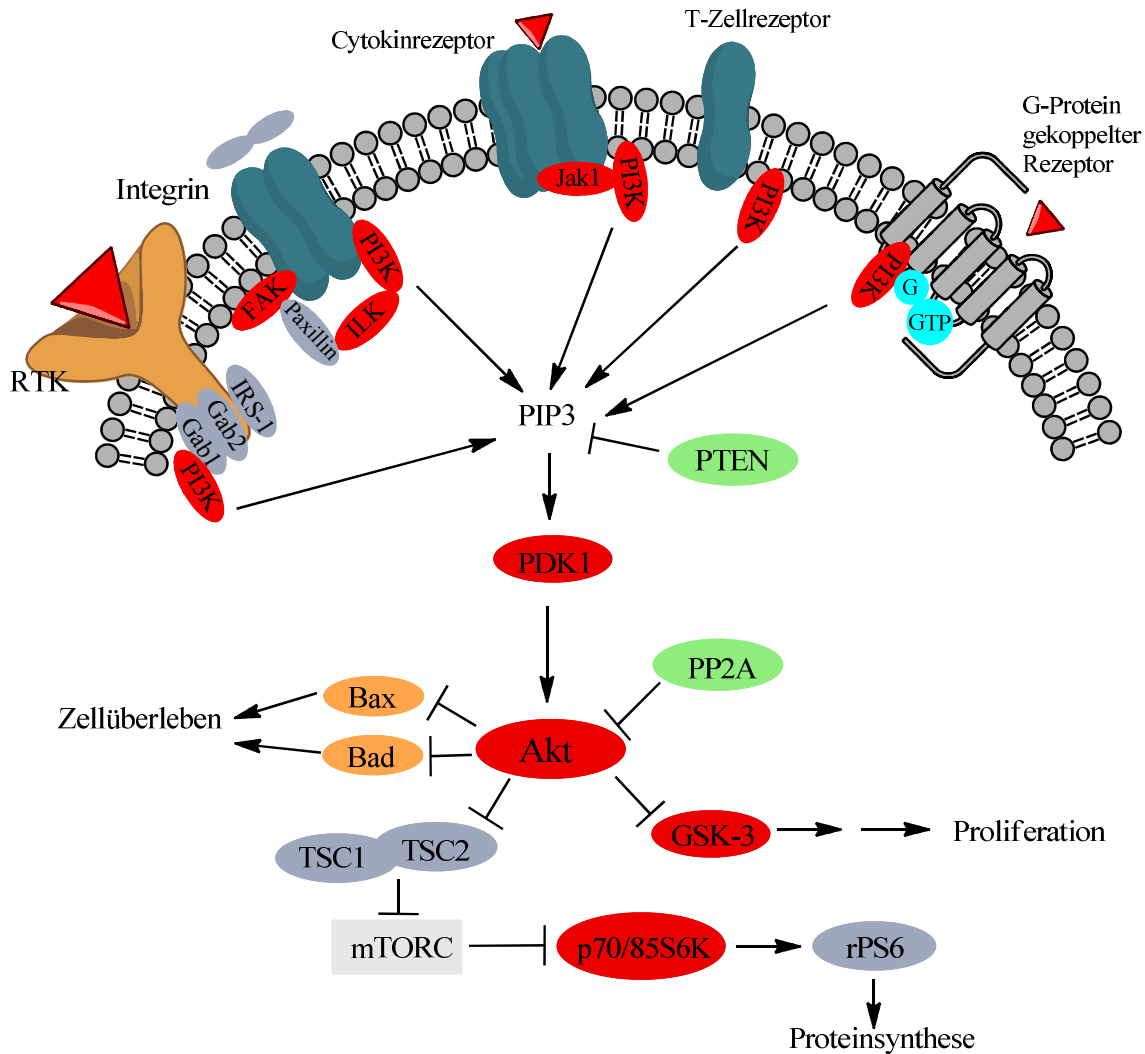


Abbildung 81: Akt-Signalweg

rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, → Stimulation, —| Inhibierung, - - - → Translokation, → → Stimulation über Zwischenschritte

RTK: Rezeptor Tyrosin Kinasen; **PI3K:** Phosphoinositid-3-Kinase; **Gab:** Grb-associated binder; **IRS-1:** insulin receptor substrate 1; **FAK:** focal adhesion kinase; **ILK:** integrin-linked kinases; **Jak1:** janus family of tyrosine kinases 1; **PTEN:** phosphatase and tensin homolog; **PDK1:** 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1; **PP2A:** Proteinphosphatase 2; **Akt:** Proteinkinase B; **GSK-3:** Glykogensynthasekinase 3; **TSC:** tuberous sclerosis protein; **p70/85S6K:** p70/85 kDa ribosomal S6 kinase; **rPS6:** ribosomal protein S6

Zusammenfassend konnte weder durch MC-LR noch durch NOD eine Wirkung auf den Akt-Signalweg festgestellt werden, was womöglich auf eine Gegenregulation durch PTEN zurückgeführt werden kann. PTEN stellt einen Gegenspieler von PI3K dar, welcher die Inaktivierung des Akt-Signalwegs hervorruft (Kong, et al., 2009).

Außerdem sind p90RSK und p70/p85S6K, welche durch MC-LR und insbesondere durch NOD aktiviert wurden, in der Lage GSK-3 β zu inhibieren (Cross, et al., 1995; Alessi, et al., 1996b). Weiterhin ist der aktivierte MAPK-Signalweg in der Lage TSC1/2 (*tuberous sclerosis factor*) zu hemmen, was in einer Aktivierung von p70RSK und aufgrund einer Feedback-

Inhibierung von PI3K/Akt in einer verminderten Aktivität des Akt-Wegs resultiert (Magnuson, et al., 2012). Durch diese Tatsachen kann die Hypothese, dass der Wirkmechanismus von MCs und NODs nicht Akt-vermittelt abläuft, aufgestellt werden, warum keine Wirkung auf den Akt-Signalweg zu beobachten war.

Im Widerspruch zu den ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit steht eine Studie von Takumi et al.. Nach einer Behandlung von HEK293-OATP1B3-Zellen (*human embryonic kidney cells stably transfected with SLCO1B3*) mit 50 nM MC-LR für 24 h wurde eine Hochregulierung von P-Akt und P-GSK-3 β beobachtet, was letztendlich zu Zellproliferation führt (Takumi, et al., 2010). Eine weitere *in vitro* Studie mit NCC-Zellen macht für die Kanzerogenese von kolorektalem Krebs, verursacht durch MC-LR, ebenfalls den Akt-, aber auch den p38-MAPK-Signalweg verantwortlich (Zhu, et al., 2005).

7. Zusammenfassende Diskussion

Durch die Untersuchung an Leberzellensystemen in Primärhepatozyten männlicher Wistar Ratten und Humanhepatozyten konnten Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und toxikologischer Relevanz von MCs, NODs und deren Strukturvarianten untersucht werden. Der Vergleich von Zytotoxizität und Inhibierung von PPs (PP2A und PP1) lieferte weitere aufschlussreiche Erkenntnisse über Wirkmechanismus und letztendlichen Einfluss auf die Zellsysteme. Mittels abschließender Aufdeckung möglicher zellulärer Regulationsmechanismen, über welche MCs und NODs eine Schädigung und Langzeit Tumorpromotion in der Leber induzieren, konnte mehr Klarheit gewonnen werden über welche Signalwege deren Wirkung erfolgen könnte.

Es konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische Wirkung von MCs und NODs strukturabhängig ist. So wurde bezüglich der Zytotoxizität in primären Ratten- und Humanhepatozyten folgende Rangfolge ermittelt (Abbildung 82).

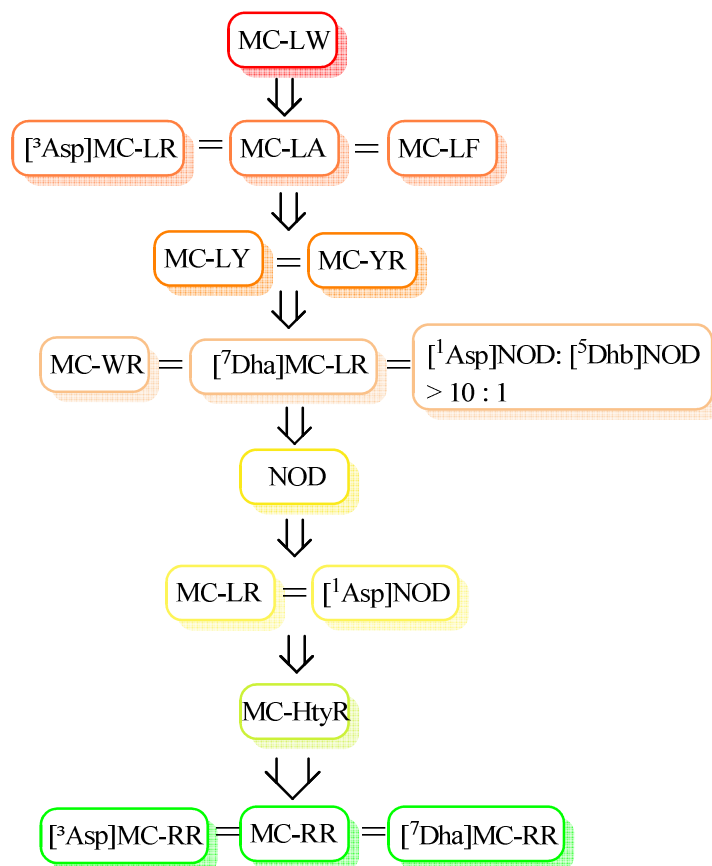


Abbildung 82: Rangfolge der Zytotoxizität

von rot nach grün: abnehmende zytotoxische Wirkung in primären Hepatozyten

Jedoch konnte durch die erhaltenen Daten keine exakte Korrelation zwischen PP-Hemmung und Zytotoxizität abgeleitet werden. So ergab der PPI-Assay für humane PP1 und PP2A folgende Rangfolge (Abbildung 83).

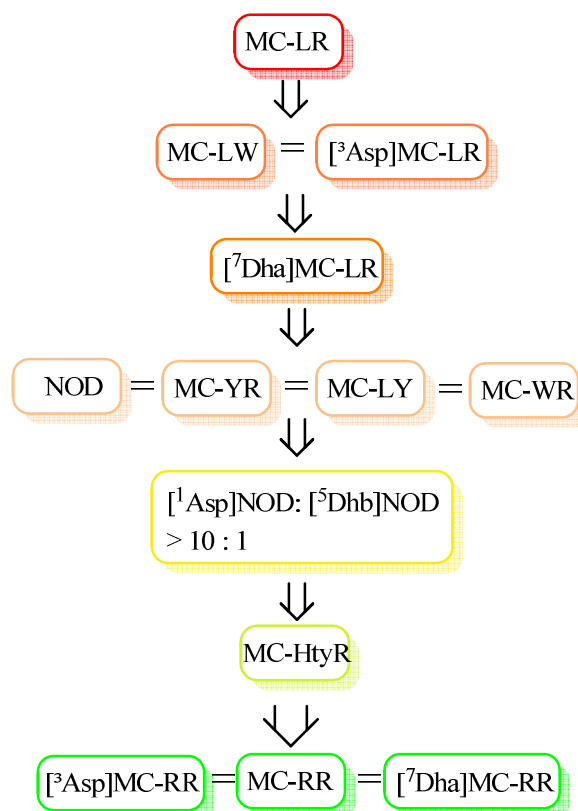


Abbildung 83: PP-Inhibierung (human)

von rot nach grün: abnehmende PP-Hemmwirkung

Dabei wurde PP2A insgesamt stärker gehemmt als PP1. Besonders hervorzuheben ist, dass die Leitsubstanz MC-LR zwar die getesteten PPs am stärksten hemmte, jedoch im Vergleich nicht am zytotoxischsten wirkte. Beim Vergleich von MC-LR und der desmethylierten Kongonere $[^3\text{Asp}]\text{MC-LR}$ und $[^7\text{Dha}]\text{MC-LR}$ konnte ebenfalls festgestellt werden, dass die PP-Inhibierung nicht direkt mit der Zytotoxizität korreliert. So zeigte $[^3\text{Asp}]\text{MC-LR}$ zwar ein halb so hohes hemmendes Potential auf humane PPs als MC-LR und ein etwas ausgeprägteres als das von $[^7\text{Dha}]\text{MC-LR}$, jedoch wirkte es in primären Rattenhepatozyten 20-fach höher zytotoxisch als MC-LR und sechsfach höher als $[^7\text{Dha}]\text{MC-LR}$. Auch in primären Humanhepatozyten konnte die gleiche Tendenz beobachtet werden, denn $[^3\text{Asp}]\text{MC-LR}$ war sechsfach stärker zytotoxisch als MC-LR und $[^7\text{Dha}]\text{MC-LR}$. Erwähnenswert ist auch die Tatsache, dass MC-RR, welches bei der Überwachung von Gewässern rechtlich relevanten ist, und seine Desmethylvarianten sowohl in den PPI-Assays als auch den Zytotoxizitätstests keine Wirkungen zeigten.

In den Untersuchungen erwiesen sich die NOD-Varianten NOD, [¹Asp]NOD und das Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 10 : 1 als ungefähr gleich starke PP-Inhibitoren, wobei auch hier PP2A stärker gehemmt wurde als PP1. Im direkten Vergleich untereinander zeigte das Gemisch [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 10 : 1 das höchste zytotoxische Potential. Alle getesteten Varianten waren leicht zytotoxischer als MC-LR.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass nicht ausschließlich die PP-Hemmung ausschlaggebend ist, sondern auch die Aufnahme in die Zelle über Transporter (OATP), abhängig von der Hydrophilie und Größe der MCs und NODs, einen großen Einfluss auf die toxische Wirkung ausübt. Dieser Tatbestand wird durch unterschiedliche Transportstudien belegt (Feurstein, et al., 2009; Feurstein, et al., 2010; Fischer, et al., 2010; Eriksson, et al., 1990).

Weiterhin hat sich anhand der ermittelten EC₅₀-Werte herausgestellt, dass diese für primäre Rattenhepatozyten (2,7 – 100 nM) um ein Vielfaches geringer waren als diejenigen für humane Hepatozyten (5,3 – 600 nM) und deshalb eine eindeutige Speziesabhängigkeit vorliegt.

Die Hemmung der PPs wie PP1 und PP2A hat einen starken Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen und damit auf das Gleichgewicht zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung. So kann eine PP-Inhibierung einerseits Apoptose (Bøe, et al., 1991; Kiguchi, et al., 1994; Yan, et al., 1997) andererseits aber auch Zellproliferation induzieren (Engel, et al., 2005; Nishida, et al., 2004; Yu, et al., 2007; Raman, et al., 2007).

Bei der Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit verschiedenen MCs und NODs für 24 h konnte in dieser Arbeit über mehrere Wege eine konzentrationsabhängige Auslösung von Apoptose festgestellt werden. So wurden die Aktivität der Initiator-Caspasen 8 und 9 und die Effektor-Caspasen 3 und 7 induziert (Abbildung 84). Dabei zeigte NOD eine eher Caspase 9-abhängige Apoptoseinduktion (intrinsisch), wohingegen für MCs der intrinsische und extrinsische Weg gleich stark beeinflusst wurden. Auch die mikroskopischen Untersuchungen untermauerten die apoptotischen Effekte auf primäre Rattenhepatozyten. Es konnten eindeutige Deformierungen wie Abrundung und Schrumpfen der Zellen, Abnahme des ausgeprägten Zell-Zell-Kontakts, Apoptosebläschen, Kollabieren und Aggregieren des Aktinnetzwerks in der Zellmitte oder an einem Pol der Zelle, Kondensation von Chromatin im Zellkern und Fragmentierung von DNS beobachtet werden. Gleiche Feststellung bezüglich der apoptotischen Wirkung von MCs und NODs wird durch zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien belegt (Solstad, et al., 2008; Fladmark, et al., 1999; Batista, et al.,

2003; Boe, et al., 1991; Krakstad, et al., 2006; McDermott, et al., 1998; Kiguchi, et al., 1994; Zezschwitz, et al., 1997; Li, et al., 2012).

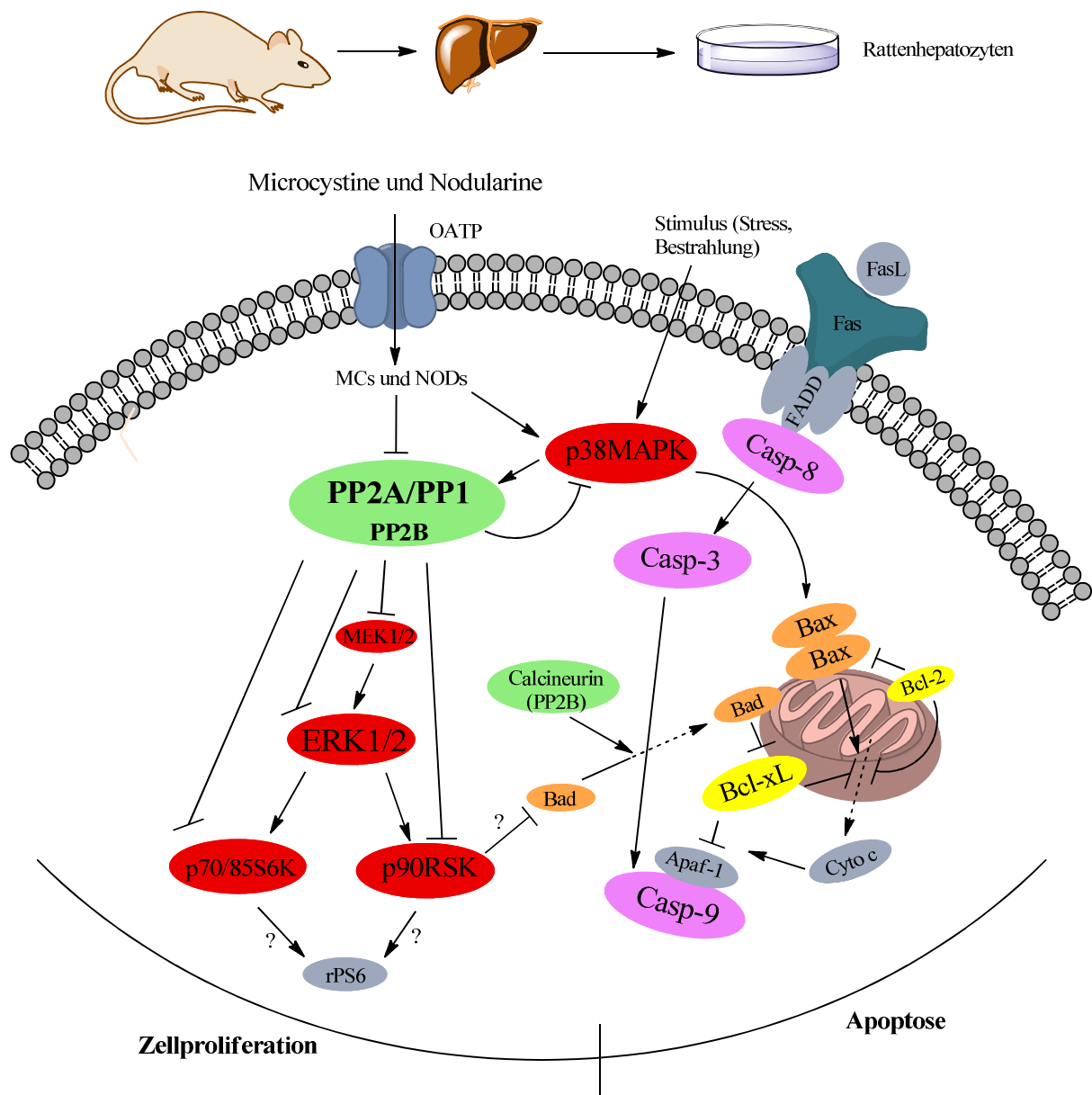


Abbildung 84 MAPK- und Apoptose-Signalwege.

Beobachtete Wirkung durch MCs und NODs. rot: Kinasen, grün: Phosphatasen, rosa: Caspasen, gelb: anti-apoptisch, orange: pro-apoptisch, → Stimulation, — Inhibierung, - - - → Translokation.

PP2A/PP1: Proteinphosphatase 2A/1; **MEK1/2:** MAPK extracellular signal regulated kinase; **ERK1/2:** extracellular signal regulated kinases 1/2; **p70/85S6K:** p70/85 kDa ribosomal S6 kinase; **p90RSK:** p90 kDa ribosomal S6 kinase; **rPS6:** ribosomal protein S6; **p38MAPK:** p38 mitogen activated protein kinase; **FADD:** fas-associated death domain; **Casp:** Caspase; **Apaf-1:** apoptosis protease activating factor-1; **Cyto c:** Cytochrom c

Bei der Untersuchung von Apoptosemarkern konnte festgestellt werden, dass MC-RR keinen Einfluss auf Bax, Bcl-2 und Bcl-xL aufwies. Obwohl MC-LR in der Lage war Apoptosen

auszulösen, konnte für Bax (pro-apoptotisch) erst ab einer hohen Konzentration von 100 nM ab einem Zeitpunkt von 8 h ein einfacher Anstieg beobachtet werden. Die Gegenspieler Bcl-2 und Bcl-xL (anti-apoptotisch) wurden durch MC-LR über 24 h nicht beeinflusst.

Für NOD konnte dagegen über einen Zeitraum von 24 h konzentrations- und zeitabhängig eine um das Vielfache ausgeprägtere Wirkung gezeigt werden. Für Bcl-2 konnte keine Beeinflussung auf den Gehalt, für Bax konnte ein zweifacher Anstieg und für Bcl-xL eine zwei- bis fünffache Erhöhung der Proteinmenge festgestellt werden (Abbildung 84).

Da MC-LR und NOD eine Wirkung auf das Gleichgewicht zwischen den Apoptosemarkern Bax (pro-apoptotisch) und Bcl-xL (anti-apoptotisch) zeigten, spielen diese sowohl in der durch MCs und NODs induzierten Apoptose als auch im MAPK-vermittelten Signalweg eine entscheidende Rolle.

Bei der Betrachtung, auf welche Weise die Leberschädigung und tumorpromovierende Eigenschaften von MCs und NODs zu Stande kommen, wurden zwei für die Zellproliferation und Apoptose wichtige Signalkaskaden (Manning, et al., 2007; Bellacosa, et al., 2005; Engelman, et al., 2006; Cargnello, et al., 2011; Roberts, et al., 2007; Svircev, et al., 2010), der Akt- und MAPK-Signalweg untersucht. Beide werden mittels Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch Kinasen und Proteinphosphatasen reguliert. So führt eine Inhibierung von PP2A und PP1 zur Hyperphosphorylierung der Kinasen, einer damit einhergehenden Überaktivierung der Kaskaden und folglich zu einer Veränderung in der Genexpression (Cargnello, et al., 2011; Manning, et al., 2007).

Bei den Untersuchungen des Akt-Signalwegs konnte für P-Akt (Ser473), P-Akt (Thr308), P-c-Raf (Ser259), P-GSK-3 β (Ser9), P-PTEN (Ser380) und P-PDK 1 (Ser241) durch die Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit MC-LR und NOD verschiedener Konzentrationen zeitabhängig kein Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus beobachtet werden. Deshalb lag der Fokus im nächsten Schritt auf dem MAPK-Weg.

MC-RR wies erwartungsgemäß keine Wirkung auf die MAPK-Kaskade auf, da dieses MC kein potenter Inhibitor von PP2A und PP1 ist und auch keinen zytotoxischen Einfluss auf primäre Human- und Rattenhepatozyten zeigte.

Für NOD (10, 50 und 100 nM) konnte bei der zeitabhängigen (1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h) Behandlung primärer Rattenhepatozyten eine zwei- bis dreifache Erhöhung des Gehalts an P-MEK1/2 (Ser221) und ein zweifacher Anstieg des direkten Substrats P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) beobachtet werden (Abbildung 84).

Interessanterweise zeigte der starke PP-Hemmer MC-LR keinen eindeutigen Einfluss auf P-MEK1/2 (Ser221) und P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204). Bei einem direkten Vergleich mit anderen Studien kann ebenfalls kein konsistenter Einfluss auf ERK1/2 beobachtet werden (Dias, et al., 2010; Komatsu, et al., 2007; Bláha, et al., 2010). Bei der Betrachtung des P-p90RSK (Ser380)- und P-p90RSK (Thr359/Ser363)-Gehalts konnte jedoch sowohl für NOD als auch für MC-LR eine konzentrations- und zeitabhängige starke Zunahme festgestellt werden. Diese Tatsache kann dadurch erklärt werden, dass p90RSK bilateral beeinflusst wird. Es ist ein direktes Substrat von ERK1/2, wird aber in gesunden Zellen auch durch PP2A und PP1 dephosphoryliert und damit inaktiviert. Im Falle einer PP-Inhibierung durch MCs und NODs wird die Deaktivierung von p90RSK vermindert (Kyriakis, et al., 1992; Dent, et al., 1992; Howe, et al., 1992; Force, et al., 1994; Fischer, et al., 1990).

Auch die Untersuchung der Kinasen p85 S6 und p70 S6, welche wie auch p90RSK in der Lage sind S6 Proteine zu phosphorylieren und somit Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung zu beeinflussen, ergab für MC-LR einen leicht und für NOD einen stark erhöhten Phosphorylierungsstatus (Abbildung 84). Auch diese Kinasen werden über zwei Wege beeinflusst, sowohl über den c-Raf/MEK/ERK-Signalweg als auch durch PP2A und PP1 (Iijima, et al., 2002; Wang, et al., 2001; Westphal, et al., 1999; Tsai, et al., 1993).

Die Beobachtung, dass der P-MEK1/2-Gehalt im Vergleich zu P-ERK1/2 und den nachgeschalteten Kinasen weniger stark erhöht wurde, kann auf eine zeitabhängige, hemmende Rückkopplung auf den Raf-vermittelten MAPK-Weg durch aktivierte ERK1/2 erklärt werden (Kholodenko, et al., 2010). Außerdem stimuliert die aktivierte p38 MAPK PP2A, welche wiederum MEK1/2 dephosphoryliert. MEK1/2 inaktiviert im weiteren Schritt ERK1/2 (Cuadrado, et al., 2010; Junttila, et al., 2008; Zhang, et al., 2008).

Die Untersuchungen des p38MAPK-Signalwegs ergaben einen zeit- und konzentrationsabhängigen vierfachen Anstieg des P-p38 (Thr180/Tyr182)-Gehalts durch die Behandlung primärer Rattenhepatozyten mit NOD. Die Literatur bestätigt *in vitro* (HCC-, Vero-E6- und Jurkat-Zellen) die aktivierenden Eigenschaften von MCs auf die p38 MAPK-Kaskade (Boudreau, et al., 2007; Zhu, et al., 2005; Dias, et al., 2010).

Da NOD einen potenten Tumorpromotor (Hu, et al., 2002; Carmichael, 1992; IARC, 2006) und ein Leberkanzerogen (Yu, et al., 2001; Ito, et al., 1997b; Ding, et al., 1999; Abdel-Hamid, 2009; Zegura, et al., 2008; Ohta, et al., 1994) darstellt und auch MC-LR beschrieben ist tumorpromovierend zu wirken (Ito, et al., 1997b; Nishiwaki-Matsushima, et al., 1992; Yu,

1995; Min, et al., 2011; Fabregat, 2009), liegt nach den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen die Hypothese nahe, dass der Wirkmechanismus MAPK-vermittelt abläuft.

Die Tatsache, dass die untersuchten MCs und NODs einerseits Apoptosen auslösen, andererseits den MAPK-Signalweg induzieren, was mit Zellproliferation im Zusammenhang steht, kann durch Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit erklärt werden. Hohe Konzentrationen führen akut zu Induktion apoptotischer Merkmale, DNS-Schädigung und letztendlich Zelltod, wohingegen geringere Konzentrationen über längeren Zeitraum zellproliferierend wirken. Verschiedene *in vivo* und *in vitro* Studien bestätigen diese Hypothese, dass einerseits durch MC-LR Zelltod andererseits Zellproliferation hervorgerufen werden kann (Gehring, 2004; Fladmark, et al., 1999; Solstad, et al., 2008; Mikhailov, et al., 2003; Svircev, et al., 2010; Ohta, et al., 1992; Ohta, et al., 1994).

Zusammenfassend konnte für die untersuchten MC- und NOD-Kongenere keine direkte Abhängigkeit einer PP-Inhibierung und Zytotoxizität festgestellt werden. Diese Tatsache kann auf die Toxikokinetik wie die Aufnahme über OATPs in die Leber und die Detoxifizierung über den Glutathion-Detoxifizierungsweg zurückgeführt werden. Weiterhin stellten sich primäre humane Hepatozyten im Vergleich zu primären Rattenhepatozyten als sensitiver heraus.

Die Hemmung der PPs durch MCs und NODs zeigte einen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen und damit auf das Gleichgewicht zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und -Dephosphorylierung. So konnte ein zeit- und konzentrationsabhängiges Auslösen der Apoptose die Beeinflussung der Apoptosemarker Bax und Bcl-xL und die Aktivierung der MAPK-Signalkette beobachtet werden. Der ebenfalls untersuchte Akt-Signalweg zeigte interessanterweise keine Veränderung in der Kaskade, was auf eine mögliche Gegenregulation zurückgeführt werden kann. Diese *in vitro* Daten weisen auf die Möglichkeit hin, dass die Exposition mit hohen Konzentrationen an MCs und NODs *in vivo* akut starke Leberschäden bis hin zum Tod verursachen. Geringere Konzentrationen dagegen bei einer Langzeitexposition MAPK-vermittelt tumorpromovierend und kanzerogen wirken können.

Eine Überwachung von Lebensmitteln und Gewässern sollte sich deshalb nicht nur auf die rechtlich relevanten MCs MC-LR, MC-RR und MC-YR fokussieren, sondern ebenfalls die zytotisch relevanten MCs und NODs und deren desmethylierten Kongenere miteinbeziehen.

8. Zusammenfassung und Ausblick

Microcystine (MCs) und Nodularine (NODs) sind zyklische Hepatotoxine, die wegen ihrer strukturellen Modifikationen eine hohe Diversität aufweisen. Da Cyanobakterien, die diese Toxine produzieren, an vielen Standorten wachsen können, stellt eine Vergiftung durch MCs und NODs weltweit ein ernstes gesundheitliches Problem für Mensch und Tier dar (Chorus, et al., 1999).

Die Überwachung von Gewässern erfolgt bislang auf die rechtlich relevanten MCs MC-LR, MC-RR und MC-YR mit Hilfe einer HPLC-UV-Vis-Messmethode gemäß der Norm ISO 20179. Dabei werden aber die ebenfalls vorkommenden MCs, NOD und die entsprechenden Desmethyl-Varianten, über deren Struktur-Wirkungsbeziehung wenig bekannt ist, nicht voneinander getrennt und gemeinsam miterfasst (ISO 20179, 2005).

NOD wird als potenter Tumorpromotor und Leberkanzerogen eingestuft und auch MC-LR wird als tumorpromovierend beschrieben. Die Auslösung von Apoptose soll ebenfalls einen relevanten Wirkmechanismus von MCs und NODs darstellen. Weltweit wird die Exposition mit MCs mit der Entstehung von HCC (*Hepatocellular carcinoma*) in Verbindung gebracht. Außerdem wurde festgestellt, dass die Entwicklung von HCC MAPK-vermittelt abläuft.

Durch diese Arbeit sollte die Auswirkung einer Hemmung von Proteinphosphatasen (PP1 und PP2A), über welche MCs und NODs *in vivo* und *in vitro* auf Hepatozyten Einfluss nehmen, in primären Ratten- und Humanhepatozyten untersucht werden. Außerdem sollte der Zusammenhang zwischen chemischer Struktur und toxikologischer Relevanz von MCs und NODs und ihrer Desmethyl-Varianten aufgeklärt werden.

Sowohl in primären Ratten- als auch in Humanhepatozyten konnte bestätigt werden, dass nicht nur die rechtlich relevanten MCs MC-LR, MC-RR und MC-YR für eine Überwachung von Lebensmitteln und Gewässern entscheidend sind, sondern alle getesteten MCs und NODs und deren desmethylierten Kongenere ein hohes zytotoxisches Potential aufweisen. Dabei kann aber keine direkte Abhängigkeit einer PP-Inhibierung und Zytotoxizität gesetzt werden. Vielmehr spielt die Toxikokinetik wie die Aufnahme der Toxine über spezifische Transporter (OATP) in die Leber und die Entgiftung über den Glutathion-Detoxifizierungsweg eine wichtige Rolle. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die zytotoxische Wirkung auf primäre humane Hepatozyten um ein Vielfaches geringer war als auf primäre Rattenhepatozyten, weshalb von einer Speziesabhängigkeit gesprochen werden kann.

Durch zahlreiche Studien ist belegt, dass die Hemmung von PPs wie PP1 und PP2A einen sehr großen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Proteinen und damit auf das

Gleichgewicht zwischen zellulärer Protein-Phosphorylierung und –Dephosphorylierung aufweist. So kann eine PP-Inhibierung einerseits Apoptose andererseits aber auch Zellproliferation induzieren. Auch diese Arbeit belegt, dass die MC- und NOD-vermittelte PP-Hemmung zeit- und konzentrationsabhängig sowohl Apoptosen auslöst und als auch in der Lage ist Apoptosemarker wie Bax und Bcl-xL zu beeinflussen und die MAPK-Signalkette aktiviert, was mit Zellproliferation in Verbindung steht. Dabei wies NOD eine stärkere Wirkung auf als MC-LR. Der ebenfalls untersuchte Akt-Signalweg zeigte interessanterweise keine Veränderung in der Kaskade, was auf eine mögliche Gegenregulation zurückgeführt werden kann.

Die *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass die Exposition mit hohen Konzentrationen an MCs und NODs *in vivo* akut starke Leberschäden bis hin zum Tod verursachen. Geringere Konzentrationen dagegen bei einer Langzeitexposition mit kontaminiertem Wasser, Nahrungsergänzungsmitteln und Lebensmitteln MAPK-vermittelt tumorpromovierend und kanzerogen wirken können.

Um den Mechanismus, über den MCs und NODs in der Lage sind tumorpromovierend und kanzerogen zu wirken, komplett aufzudecken, müssen weitere Untersuchungen erfolgen. So könnten weitere Versuche hinsichtlich PP-Inhibierungs-abhängigen Markern wie p53, p21 und zahlreichen Transkriptionsfaktoren auf Protein- und RNS-Ebene das Verständnis fördern. Die Betrachtung, welche Auswirkung die PP-Inhibierung auf den Zellzyklus eukaryontischer Zellen besitzt, würde ein klareres Bild über die Zellproliferation geben. Auch die Rolle von TNF α und die Freisetzung von Ca²⁺ ins Zytoplasma, die durch MC-LR induziert wird, sollte genauer betrachtet werden.

Weitere Studien, die sich damit beschäftigen, unter welchen Bedingungen toxische MCs gebildet werden, könnten Aufschluss darüber geben, ob es möglich ist Cyanobakterien frei von zytotoxischen Toxinen zu züchten, um Cyanobakterienblüten als Nahrungsquelle zu nutzen.

Literaturverzeichnis

Abdel-Hamid N. Update to risk factors for hepatocellular carcinoma. [Article] // International J. Medicine Medical Sci. - 2009. - 1(3). - S. 38–43.

Adachi M., Fukuda M. and Nishida E. Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. [Article] // J Cell Biol.. - 2000. - 148(5). - S. 849-56.

Adler V. [et al.] Dose rate and mode of exposure are key factors in JNK activation by UV irradiation. [Article] // Carcinogenesis. - 1996. - 17(9). - S. 2073-6.

Ahn N. G. The MAP kinase cascade. Discovery of a new signal transduction pathway. [Article] // Mol Cell Biochem. 1993 Nov;.. - 1993. - 127-128. - S. 201-9.

Alessi D. R. [et al.] Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. [Article] // Curr Biol. - 1997. - 7(4). - S. 261-9.

Alessi D. R. [et al.] Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. [Article] // FEBS Lett. - 1996b. - 399(3). - S. 333-8.

Alessi Dario R. [et al.] Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. [Article] // EMBO Journal. - 1996. - 15 (23). - S. 6541-6551.

Alonso G. [et al.] Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. [Article] // J Biol Chem. - 2000. - 275(51). - S. 40641-8.

An J. and Carmichael W.W. Use of a colorimetric protein phosphatase inhibition assay and enzyme linked immunosorbent assay for the study of microcystins and nodularins [Article] // Toxicol. - 1994. - 32. - pp. 1495-1307.

Anderson P. Kinase cascades regulating entry into apoptosis. [Article] // Microbiol Mol Biol Rev. - 1997. - 61(1). - S. 33-46.

Andjelković M. [et al.] Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. [Article] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1996. - 93(12). - S. 5699-704.

Ashworth A. [et al.] The amino acid sequence of a mammalian MAP kinase kinase. [Article] // Oncogene. - 1992. - 7(12). - S. 2555-6.

Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. [Article] // Trends Biochem Sci. - 1996. - 21(11). - S. 407-12.

Basu S. [et al.] Akt phosphorylates the Yes-associated protein, YAP, to induce interaction with 14-3-3 and attenuation of p73-mediated apoptosis. [Article] // Mol Cell. - 2003. - 11(1). - S. 11-23.

- Basu S.** PP2A in the Regulation of Cell Motility and Invasion. [Article] // Current Protein and Peptide Science. - 2011. - 12. - S. 3-11.
- Batista L. F. [et al.]** How DNA lesions are turned into powerful killing structures: insights from UV-induced apoptosis. [Article] // Mutat Res. - 2009. - 681(2-3). - S. 197-208.
- Batista T. [et al.]** Microcystin-LR causes the collapse of actin filaments in primary human hepatocytes [Article] // Aquat.Toxicol.. - 2003. - 65. - pp. 85-91.
- Belay A. [et al.]** Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. [Article] // Journal of Applied Phycology. - 1993. - 5(2). - S. 235-241.
- Bellacosa A. [et al.]** Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting. [Article] // Adv Cancer Res. - 2005. - 94. - S. 29-86.
- Berman-Frank I., Lundgren P. and Falkowski P.** Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. [Article] // Res Microbiol. - 2003. - 154(3). - S. 157-64.
- Bialojan C. and Taka i A.** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. [Article] // Biochem J. - 1988. - 256(1). - S. 283-90.
- Bialojan C. and Takai A.** Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics. [Article] // Biochem J. - 1988. - 256(1). - S. 283-90.
- Bláha L. [et al.]** Inhibition of gap-junctional intercellular communication and activation of mitogen-activated protein kinases by cyanobacterial extracts-indication of novel tumor promoting cyanotoxins? [Article] // Toxicon. - 2010. - 55(1). - S. 125-134.
- Blom J.F. and Jüttner F.** High crustacean toxicity of microcystin congeners does not correlate with high protein phosphatase inhibitory activity [Article] // Toxicon. - 2005. - 46. - pp. 465-470.
- Blumer K. J. and Johnson G. L.** Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. [Article] // Trends Biochem Sci. - 1994. - 19(6). - S. 236-40.
- Bode A. M. and Dong Z.** Mitogen-activated protein kinase activation in UV-induced signal transduction. [Article] // Sci STKE. - 2003. - 167. S. 2.
- Boe R. [et al.]** The Protein Phosphatase Inhibitor Okadaic Acid Induces Morphological Changes Typical of Apoptosis in Mammalian Cells. [Article] // Experimental Cell Research. - 1991. - 195. - S. 237-246.
- Bøe R. [et al.]** The protein phosphatase inhibitor okadaic acid induces morphological changes typical of apoptosis in mammalian cells. [Article] // Exp Cell Res. - 1991. - 195(1). - S. 237-46.
- Bogoyevitch M. A. [et al.]** c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges. [Article] // Biochim Biophys Acta. - 2010. - 1804(3). - S. 463-75.
- Botha N. [et al.]** The role of microcystin-LR in the induction of apoptosis and oxidative stress in CaCo2 cells [Article] // Toxicon. - 2004. - 43. - pp. 85-92.

- Bouaicha N. and Maatouk I.** Microcystin-LR and nodularin induce intracellular glutathione alteration, reactive oxygen species production and lipid peroxidation in primary cultured rat hepatocytes [Article] // *Toxicol. Lett.* - 2004. - 148. - pp. 53-63.
- Boudreau R. T. M., Conrad D. M. and Hoskin D. W.** Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. [Article] // *Cellular Signalling*. - 2007. - 19. - S. 139-151.
- Boudreau R. T. M., Conrad D. M. and Hoskin D. W.** Apoptosis induced by protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition in T leukemia cells is negatively regulated by PP2A-associated p38 mitogen-activated protein kinase. [Article] // *Cellular Signalling*. - 2007. - 19. - S. 139-151.
- Boulton T. G. [et al.]** An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. [Article] // *Science*. - 1990. - 6(249). - S. 64-67.
- Bourne D. G. [et al.]** Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. [Article] // *Appl Environ Microbiol.* - 1996. - 62(11). - S. 4086-94.
- Bradford M. M.** A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. [Article] // *Anal. Biochem.* - 1976. - 72. - S. 248-254.
- Brancho D. [et al.]** Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. [Article] // *Genes Dev.* - 2003. - 17(16). - S. 1969-78.
- Brautigan D. L. [et al.]** Cell cycle oscillation of phosphatase inhibitor-2 in rat fibroblasts coincident with p34cdc2 restriction. [Article] // *Nature*. - 1990. - 344(6261). - S. 74-8.
- Brazil D. P., Yang Z. Z. and Hemmings B. A.** Advances in protein kinase B signalling: AKTion on multiple fronts. [Article] // *Trends Biochem Sci.* - 2004. - 29(5). - S.233-42.
- Briand Jean-Francoise [et al.]** Health hazards for terrestrial vertebrates from toxic cyanobacteria in surface water ecosystems [Article] // *Vet. Res.* - 2003. - 34. - pp. 361-377.
- Brittain S. [et al.]** Isolation and characterization of microcystins from a River Nile strain of *Oscillatoria tenuis* Agardh ex Gomont [Article] // *Toxicon*. - 2000. - 38. - pp. 1759-1771.
- Buckley C. D. [et al.]** RGD peptides induce apoptosis by direct caspase-3 activation. [Article] // *Nature*. - 1999. - 397(6719). - S. 534-9.
- Budihardjo I. [et al.]** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [Article] // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. - 1999. - 15. -S. 269-290.
- Burgering B. M. [et al.]** cAMP antagonizes p21ras-directed activation of extracellular signal-regulated kinase 2 and phosphorylation of mSos nucleotide exchange factor. [Article] // *EMBO J.* - 1993. - 12(11). - S. 4211-20.

- Burgering B. M. and Coffey P. J.** Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. [Article] // *Nature*. - 1995. - 376(6541). - S. 599-602.
- Burnett G. and Kennedy E. P.** The enzymatic phosphorylation of proteins. [Article] // *J Biol Chem*. - 1954. - 211(2). - S. 969-80.
- Cargnello M and Roux P. P.** Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. [Article] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. - 2011. - 75(1). - S. 50-83.
- Carmichael W. W.** A review: cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. [Article] // *J. Applied Bacteriology*. - 1992. - 72. - S. 445–459.
- Carmichael W.W. [et al.]** Naming of cyclic heptapeptide toxins of Cyanobacteria (blue-green-algae) [Article] // *Toxicon*. - 1988. - 26. - pp. 971-973.
- Chen J., Martin B. L. and Brautigam D. L.** Regulation of protein serine-threonine phosphatase type-2A by tyrosine phosphorylation. [Article] // *Science*. - 257(5074). - S.1261-4.
- Chen K. F. [et al.]** Synergistic interactions between sorafenib and bortezomib in hepatocellular carcinoma involve PP2A-dependent Akt inactivation. [Article] // *J Hepatol*. - 2010. - 52(1). - S. 88-95.
- Chen T. [et al.]** Induction of apoptosis in mouse liver by microcystin-LR: a combined transcriptomic, proteomic, and simulation strategy. [Article] // *Mol. Cell. Proteomics*. - 2005. - 4. - S. 958-974.
- Chen Y.-M. [et al.]** Comparison of protein phosphatase inhibition activities and mouse toxicities of microcystins [Article] // *Toxicon*. - 2006. - 47. - pp. 742-746.
- Chen Z Gibson TB, Robinson, F. [et al.]** MAP kinases. [Article] // *Chem Rev*. - 2001. - 101(8)- - S. 2449-76.
- Cheng X. C. [et al.]** A new antibiotic, tautomycin. [Article] // *J Antibiot (Tokyo)*. - 1987. - 40(6). - S. 907-9.
- Chernoff N. [et al.]** Lack of teratogenicity of microcystin-LR in the mouse and toad [Article] // *J.Appl.Toxicol.* - 2002. - 22. - pp. 13-17.
- Chisholm A. A. and Cohen P.** The myosin-bound form of protein phosphatase 1 (PP-1M) is the enzyme that dephosphorylates native myosin in skeletal and cardiac muscles. [Article] // *Biochim Biophys Acta*. - 1988. - 971(2). - S. 163-9.
- Choi B. W. [et al.]** Isolation of linearpeptidesrelated to the hepatotoxins nodularin and microcystins. [Article] // *Tetrahedron Letters*. - 1993. - 34(49). - S. 7881–7884.
- Chong M. W. K. [et al.]** Study on the cytotoxicity of microcystin-LR on cultured cells [Article] // *Chemosphere*. - 2000. - 41. - pp. 143-147.
- Chong M.W.K. [et al.]** Toxicity and uptake mechanism of cylindrospermopsin lophytomin in primary rat hepatocytes [Article] // *Toxicon*. - 2002. - 40. - pp. 205-211.

Chorus I. [et al.] Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. [Article] // *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* - 2000. - 3(4). - S. 323-47.

Chorus Ingrid and Bartram Jamie Toxic cyanobacteria in water: A guide to their public health consequences, monitoring and management [Article] // WHO, Spon Press, London. - 1999.

Clark S. P. [et al.] Chronic microcystin exposure induces hepatocyte proliferation with increased expression of mitotic and cyclin-associated genes in p53-deficient mice. [Article] // *Toxicol. Pathol.* - 2008. - 36. - S. 190-623.

Cobb M. H. and Schäfer E. M. MAP Kinase Signaling Pathways. [Article] // *Promega Notes Magazine.* - 1996. - 59. - S. 37.

Cohen P. Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. [Article] // *Trends Biochem Sci.* - 1992. - 17(10). - S. 408-13.

Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. [Article] // *Annu Rev Biochem.* - 1989. - 58. - S. 453-508.

Cohen P., Holmes C. F. and Tsukitani Y. Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. [Article] // *Trends Biochem Sci.* - 1990. - 15(3). - S. 98-102.

Cohen P., Klumpp S. and Schelling D. L. An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. [Article] // *FEBS Lett.* - 1989b. - 250(2). - S. 596-600.

Cohen P.T.W. Protein phosphatase 1 – targeted in many directions [Article] // *Journal of Cell Science.* - 2002. - 115. - S. 241-256.

Crews C. M., Alessandrini A. and Erikson R. L. The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. [Article] // *Science.* - 1992. - 258(5081). - S. 478-80.

Cross D. A. [et al.] Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. [Article] // *Nature.* - 1995. - 378(6559). - S. 785-9.

Cross D. A. [et al.] Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. [Article] // *Nature.* - 1995. - 378(6559). - S. 785-9.

Cuadrado A. and Nebreda A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. [Article] // *Biochem J.* - 2010. - 429(3). - S. 403-17.

Cuenda A. and Rousseau S. p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. [Article] // *Biochim Biophys Acta.* - 2007. - 1773(8). - S. 1358-75.

Dasch P. Apoptosis, Basic medicayl sciences, St. Georges University, University of London [Online] // www.sgul.ac.uk/dept/immunology~dash. - 2008. - Mai 2012.

Datta S. R. [et al.] Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. [Article] // *Cell.* - 1997. - 91(2). - S. 231-41.

- Dawson J.F. and Holmes C.F.B.** Molecular mechanisms underlying inhibition of Protein Phosphatases by marine toxins [Article] // *Frontiers in Bioscience*. - 1999. - 4. - pp. 646-658.
- Dawson R. M.** The Toxicology of Microcystins [Article] // *Toxicon*. - 1998. - 36. - pp. 953-962.
- Dent P. [et al.]** Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro. [Article] // *Science*. - 1992. - 257(5075). - S. 1404-7.
- deSilva E. D., Williams D. E. and Andersen R. J.** Motuporin, A Potent Protein Phosphatase Inhibitor Isolated from the Papua New Guinea Sponge *Theonella swinhoei* Gray [Article] // *Tetrahedron Letters*. - 1992. - 33(12). - S. 1561–1564.
- Dias E. [et al.]** Microcystin-LR activates the ERK1/2 kinases and stimulates the proliferation of monkey kidney-derived cell line Vero-E6. [Article] // *Toxicol in Vitro*. - 2010. - 24(6). - S. 1689-95.
- Dietrich Daniel and Hoeger Stefan** Guidance values for microcystins in water and cyanobacterial supplement products (blue-green algal supplements): a reasonable or misguided approach? [Article] // *Toxicology and Applied Pharmacology*. - 2005. - 203. - pp. 273-289.
- Ding W.X. [et al.]** Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China [Article] // *Mutat.Res.* - 1999. - 442. - pp. 69-77.
- Ding W.-X., Shen H.-M. and Ong C.-N.** Critical Role of Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Permeability Transition in Microcystin-Induced Rapid Apoptosis in Rat Hepatocytes [Article] // *Hepatology*. - 2000b. - 32. - pp. 547-555.
- Ding W.-X., Shen H.-M. and Ong C.-N.** Microcystic Cyanobacteria Extract Induces Cytoskeletal Disruption and Intracellular Glutathione Alteration in Hepatocytes [Article] // *Environmental Health Perspectives*. - 2000a. - 108. - pp. 605-609.
- Ding W.-X., Shen H.-M. and Ong C.-N.** Pivotal Role of Mitochondrial Ca in Microcystin-Induced Mitochondrial Permeability Transition in Rat Hepatocytes [Article] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2001. - 285. - pp. 1155-1161.
- Ding W.-X., Shen H.-M. and Ong C.-N.** Role of oxidative stress and mitochondrial changes in cyanobacteria-induced apoptosis and hepatotoxicity [Article] // *FEMS Microbiology Letters*. - 2003. - 220. - pp. 1-7.
- Dittmann E. [et al.]** Insertional mutagenesis of a peptide synthetase gene that is responsible for hepatotoxin production in the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* PCC 7806. [Article] // *Mol Microbiol*. - 1997. - 26(4). - S. 779-87.
- Dittmann Elke and Wiegand Claudia** Cyanobacterial toxins – occurrence, biosynthesis and impact on human affairs [Article] // *Mol. Nitr. Food Res.* - 2006. - 50. - pp. 7-17.
- Dolado I. [et al.]** p38alpha MAP kinase as a sensor of reactive oxygen species in tumorigenesis. [Article] // *Cancer Cell*. - 2007. - 11(2). - S. 191-205.

- Dougherty M. K. [et al.]** Regulation of Raf-1 by direct feedback phosphorylation. [Article] // Mol Cell.. - 2005. - 17(2). - S. 215-24.
- Dounay A. B. and Forsyth C. J.** Okadaic acid: the archetypal serine/threonine protein phosphatase inhibitor. [Article] // Curr Med Chem. - 2002. - 9(22). - S. 1939-80.
- Doza Y. N. [et al.]** Activation of the MAP kinase homologue RK requires the phosphorylation of Thr-180 and Tyr-182 and both residues are phosphorylated in chemically stressed KB cells. [Article] // FEBS Lett. - 1995. - 364(2). - S. 223-8.
- Dragan Y. P. [et al.]** The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. [Article] // Proc Soc Exp Biol Med. - 1993. - 202(1). - S. 16-24.
- Dunn J.** Algae kills dialysis patient in Brazil [Article] // British Medical Journal. - 1996. - 312. - pp. 1183-1184.
- Duy T. N. [et al.]** Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. [Article] // Rev Environ Contam Toxicol. - 2000. - 163. - S. 113-85.
- Egan S. E. and Weinberg R. A.** The pathway to signal achievement. [Article] // Nature. - 1993. - 365(6449). - S. 781-3.
- Eichhorn P. J. A., Creighton M. P. and Bernards R.** Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer [Article] // Biochimica et Biophysica Acta.. - 2009. - 1795. - S. 1-15.
- Elmore S.** Apoptosis: a review of programmed cell death. [Article] // Toxicol Pathol. - 2007. - 35(4). - S. 495-516.
- Endo S. [et al.]** Multiple structural elements define the specificity of recombinant human inhibitor-1 as a protein phosphatase-1 inhibitor. [Article] // Biochemistry. - 1996. - 35(16). - S. 5220-8.
- Engel F. B. [et al.]** p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. [Article] // Genes Dev. - 2005. - 19(10). - S. 1175-87.
- Engeli Barbara** Annex zur SKLM-Stellungnahme "Microcystine in Algenprodukten zur Nahrungergänzung" [Article]. - 2005.
- Engelman J. A., Luo J. and Cantley L. C.** The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. [Article] // Nat Rev Genet. - 2006. - 7(8). - S. 606-19.
- Enslin H., Raingeaud J. and Davis R. J.** Selective activation of p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase isoforms by the MAP kinase kinases MKK3 and MKK6. [Article] // J Biol Chem. - 1998. - 273(3). - S. 1741-8.
- Eriksson J.E. [et al.]** Hepatocellular uptake of 3H-dihydromicrocystin-LR, a cyclic peptide toxin [Article] // Biochimica et Biophysica Acta. - 1990. - 1025. - pp. 60-66.
- Fabregat I.** Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. [Article] // World J Gastroenterol. - 2009. - 15(5). - S. 513-20.

Falconer I. R., Buckley T. and Runnegar M. T. Biological half-life, organ distribution and excretion of 125-I-labelled toxic peptide from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. [Article] // Aust J Biol Sci. - 1986. - 39(1). - S. 17-21.

Falconer I.R. [et al.] Oral toxicity of a bloom of the Cyanobacterium *Microcystis Aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year [Article] // J.Toxicol.EnvIRON.Health. - 1988. - 24. - pp. 291-305.

Falconer I.R. [et al.] Oral toxicity of a bloom of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* administered to mice over periods up to 1 year [Article] // J. Toxicol. Environ. Health. - 1988. - 24. - pp. 291-305.

Falconer I.R. [et al.] Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) *Microcystis aeruginosa* in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. [Article] // J.EnvIRON.Toxicol.Water Qual. - 1994. - 9. - S. 131-139.

Falconer I.R. and Humpage A.R. Health Risk Assessment of Cyanobacterial (Blue-green Algal) Toxins in Drinking Water [Article] // nt. J. Environ. Res. Public Health. - 2005. - 2. - pp. 43-50.

Farber E. Biochemistry of carcinogenesis. [Article] // Cancer Res. - 1968. - 28(9). - S. 1859-69.

Fastner J., Heinze R. and Chorus I. Microcystins-content, hepatotoxicity and cytotoxicity of cyanobacteria in some German water bodies [Article] // Water Science and Technology. - 1995. - 32. - pp. 165-270.

Fawell J.K. [et al.] The toxicity of cyanobacterial toxins in the mouse: I Microcystin-LR [Article] // Human & Experimental Toxicology. - 1999. - 18. - pp. 162-167.

Félix M. A., Cohen P. and Karsenti E. Cdc2 H1 kinase is negatively regulated by a type 2A phosphatase in the *Xenopus* early embryonic cell cycle: evidence from the effects of okadaic acid. [Article] // EMBO J. - 1990. - 9(3). - S. 675-83.

Feng G. [et al.] NF- κ B mediates the induction of Fas receptor and Fas ligand by microcystin-LR in HepG2 cells. [Article] // Mol Cell Biochem. - 2011. - 352(1-2). - S. 209-19.

Feng G., Li Y. and Bai Y. Induction of Fas receptor and Fas ligand by nodularin is mediated by NF- κ B in HepG2 cells. [Article] // Toxicol Appl Pharmacol. - 2011b. - 251(3). - S. 245-52.

Feurstein D. [et al.] Investigation of Microcystin Congener-Dependent Uptake into Primary Murine Neurons. [Article] // Human and Environmental Toxicology. - 2010. - 118. - S. 1370-1375.

Feurstein D. [et al.] Oatp-associated uptake and toxicity of microcystins in primary murine whole brain cells. [Article] // Toxicology and Applied Pharmacology. - 2009. - 234. - S. 247-255.

Figueiredo Daniela R. [et al.] Microcystin-producing blooms-a serious global public health issue [Article] // Ecotoxicology and Environmental Safety. - 2004. - 59. - pp. 151-163.

Fischer A [et al.] The role of organic anion transporting polypeptides (OATPs/SLCOs) in the toxicity of different microcystin congeners in vitro: A comparison of primary human hepatocytes and OATP-transfected HEK293 cells [Article] // Toxicology and Applied Pharmacology. - 2010. - 245. - S. 9-20.

Fischer E. H. [et al.] Protein tyrosine phosphatases: a novel family of enzymes involved in transmembrane signalling. [Article] // Adv Second Messenger Phosphoprotein Res. - 1990. - 24. - S. 273-9.

Fischer W. J. [et al.] Organic anion transporting polypeptides expressed in liver and brain mediate uptake of microcystin. [Article] // Toxicol Appl Pharmacol. - 2005. - 203(3). - S. 257-63.

Fladmark K.E. [et al.] Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis [Article] // J Biol Chem. - 2002. - 277. - pp. 2804-2811.

Fladmark K.E. [et al.] Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors [Article] // Cell Death Differ. - 1999. - 6. - pp. 1099-1108.

Force T. [et al.] Enzymatic characteristics of the c-Raf-1 protein kinase. [Article] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1994. - 91(4). - S. 1270-4.

Franke T. F. and Cantley L. C. Apoptosis. A Bad kinase makes good. [Article] // Nature. - 1997. - 390(6656). - S.116-7.

Franke Thomas F., Kaplan David R. and Cantley Lewis C. PI3K: Downstream AKTion locks Apoptosis [Article] // Cell Press. - 1997. - 88. - S. (435-437).

Frödin Morten and Gammelfort Steen Role and regulation of 90 kDa ribosomal S6 kinase (RSK) in signal transduction. [Article] // Molecular and Cellular Endocrinology. - 1999. - 151. - S. 65-77.

Fu W. [et al.] Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR in vivo and in vitro. [Article] // Toxicon. - 2005. - 46. - S. 171-177.

Garcia A. [et al.] Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A. [Article] // Biochimie. - 2003. - 85(8). - S. 721-6.

Gehring M. M. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular ejects: a dualistic response [Article] // FEBS Letters. - 2004. - 557. - pp. 1-8.

Gilroy D. J. [et al.] Assessing potential health risks from microcystin toxins in blue-green algae dietary supplements. [Article] // Environ Health Perspect. - 2000. - 108(5). - S. 435-9.

Gjertsen B. T. and Døskeland S. O. Protein phosphorylation in apoptosis. [Article] // Biochim Biophys Acta. - 1995. - 1269(2). - S. 187-99.

Goris J. [et al.] Okadaic acid, a specific protein phosphatase inhibitor, induces maturation and MPF formation in *Xenopus laevis* oocytes. [Article] // FEBS Lett. - 1989. - 245(1-2). - S. 91-4.

- Gottwald Wolfgang** Statistik für Anwender [Book]. - Weinheim : VCH, 2001.
- Graves J. D., Campbell J. S. and Krebs E. G.** Protein Serine/threonine Kinases of the MAPK Cascade. [Article] // Ann N Y Acad Sci. - 1995. - 7 (766). - S. 320-43.
- Graves L. M. [et al.]** Protein kinase A antagonizes platelet-derived growth factor-induced signaling by mitogen-activated protein kinase in human arterial smooth muscle cells. [Article] // Proc Natl Acad Sci U S A. - 1993. - 90(21). - S. 10300-4.
- Grosse Y. [et al.]** Carcinogenicity of nitrate, nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. [Article] // Lancet Oncol. - 2006. - 7(8). - S. 628-9.
- Guzman R.E. and Solter P.F.** Hepatic oxidative stress following prolonged sublethal microcystin LR exposure [Article] // Toxicol Pathol.. - 1999. - Vol. 27. - pp. 582-588.
- Hagenbuch B. and Meier P. J.** Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. [Article] // Pflugers Arch. - 2004. - 447(5). - S. 653-65.
- Hanahan D. and Weinberg R. A.** The hallmarks of cancer. [Article] // Cell. - 2000. - 100(1). - S. 57-70.
- Hartley D. and Cooper G. M.** Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity. [Article] // J Cell Biochem. - 2002. - 85(2). - S. 304-14.
- Helm R. F. [et al.]** Structural characterization of the released polysaccharide of desiccation-tolerant *Nostoc commune* DRH-1. [Article] // J Bacteriol. - 2000. - 182(4). - S. 974-82.
- Henson B. J. [et al.]** Molecular phylogeny of the heterocystous cyanobacteria (subsections IV and V) based on *nifD* [Article] // Int J Syst Evol Microbiol. - 2004. - 54(2). - S. 493-7.
- Herfindal L. [et al.]** A high proportion of Baltic Sea benthic cyanobacterial isolates contain apoptogens able to induce rapid death of isolated rat hepatocytes [Article] // Toxicol. - 2005. - 46. - pp. 252-260.
- Herfindal L. [et al.]** Nostocyclopeptide-M1: a potent, nontoxic inhibitor of the hepatocyte drug transporters OATP1B3 and OATP1B1. [Article] // Mol Pharm. - 2011. - 8(2). - S. 360-7.
- Hers I., Vincent E. E. and Tavaré J. M.** Akt signalling in health and disease. [Article] // Cell Signal. - 2011. - 23(10). - S.1515-27.
- Hitzfeld Bettina C., Hoger Stefan J. and Dietrich Daniel R.** Cyanobacterial Toxins: Removal during Drinking Water Treatment, and Human Risk Assessment [Article] // Environmental Health Perspectives. - 2000. - 108. - pp. 113-122.
- Hlobilková A. [et al.]** The mechanism of action of the tumour suppressor gene PTEN. [Article] // Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. - 2003. - 147(1). - S.19-25.
- Hoeger S. J.** Problems during drinking water treatment of cyanobacterial-loaded surface waters: Consequences for human health. [Article] // Dissertation. - Universität Konstanz, Fakultät für Biologie. : [s.n.], 2003.

- Hoeger S. J., Dietrich D.R. and Hitzfeld B. C.** Effect of ozonation on the removal of cyanobacterial toxins during drinking water treatment. [Article] // *Environ Health Perspect.* - 2002. - 110(11). - S. 1127-32.
- Hoeger S.J. [et al.]** Analytical and functional characterization of microcystins [Asp3]MC-RR and [Asp3,Dhb7]MC-RR: consequences for risk assessment? [Article] // *Environ Sci Technol.* - 2007. - 41. - pp. 2609-2016.
- Hoeger S.J., Hitzfeld B.C. and Dietrich D.R.** Occurrence and elimination of cyanobacterial toxins in drinking water treatment plants [Article] // *Toxicol Appl.Pharmacol.* - 2005. - 203. - pp. 231-242.
- Honkanen R. E.** Cantharidin, another natural toxin that inhibits the activity of serine/threonine protein phosphatases types 1 and 2A. [Article] // *FEBS Lett.* - 1993. - 330(3). - S. 283-6.
- Honkanen R.E. [et al.]** Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases [Article]. - 1994. - 32. - pp. 339-350.
- Hotz M. A. [et al.]** Flow cytometric detection of apoptosis: comparison of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. [Article] // *Cytometry.* - 1994. - 15(3). - S. 237-44.
- Howe L. R. [et al.]** Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. [Article] // *Cell.* - 1992. - 71(2). - S. 335-42.
- Hu Z. [et al.]** The expression of bcl-2 and bax genes during microcystin induced liver tumorigenesis. [Article] // *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* - 2002. - 36(4). - S. 239–242.
- Huang P. and Plunkett W.** A quantitative assay for fragmented DNA in apoptotic cells. [Article] // *Anal Biochem.* - 1992. - 207(1). - S. 163-7.
- Hubbard M. J. and Cohen P.** Regulation of protein phosphatase-1G from rabbit skeletal muscle. 2. Catalytic subunit translocation is a mechanism for reversible inhibition of activity toward glycogen-bound substrates. [Article] // *Eur J Biochem.* - 1989. - 186(3). - S. 711-6.
- Hunter T.** A thousand and one protein kinases. [Article] // *Cell.* - 1987. - 50(6). - S. 823-9.
- Hupfeld C.J. [et al.]** Insulin-induced beta-arrestin1 Ser-412 phosphorylation is a mechanism for desensitization of ERK activation by Galphai-coupled receptors. [Article] // *J Biol Chem.* - 2005. - 280(2). - S. 1016-23.
- IARC** Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. International Agency for Research on Cancer IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. [Article] // *IARC.* - 2006. - 94.
- Ibelings B.W. and Chorus I.** Accumulation of cyanobacterial toxins in freshwater “seafood” and its consequences for public health: A review [Article] // *Environmental Pollution.* - 2007. - 150. - pp. 177-192.

- Iijima Y. [et al.]** -Raf/MEK/ERK Pathway Controls Protein Kinase C-mediated p70S6K Activation in Adult Cardiac Muscle Cells. [Article] // The Journal of Chemistry. - 2002. - 277(26). - S. 23066-23076.
- Ikehara T. [et al.]** A protein phosphatase 2A (PP2A) inhibition assay using a recombinant enzyme for rapid detection of microcystins [Article] // Toxicon. - 2008. - 51. - pp. 1368-1373.
- Ingebritsen T. S. and Cohen P.** Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. [Article] // Science. - 1983. - 221(4608). - S. 331-8.
- ISO 20179 International Organization of Standardization** Water Quality-Determination of Microcystins – Method Using Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with Ultraviolet (UV) Detection. [Article]. - 2005.
- Ito E. [et al.]** Neoplastic nodular formation in mouse liver induced by repeated intraperitoneal injections of microcystin-LR [Article] // Toxicon. - 1997b. - 35. - pp. 1453-1457.
- Ito Emiko, Fumio Kondo and Harada Ken-Ichi** First report on the distribution of orally administered microcystin-LR in mouse tissue using an immunostaining method [Article] // Toxicon. - 2000. - 38. - pp. 37-48.
- Ito Emiko, Kondo Fumio and Harada Ken-Ichi** Hepatic necrosis in aged mice by oral administration of microcystin-LR [Article] // Toxicon. - 1997a. - 35. - pp. 231-239.
- Jefferies Harold B.J. [et al.]** Rapamycin suppresses 59TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k [Article] // EMBO Journal. - 1997. - 16 (12). - S. 3693–3704.
- Jochimsen [et al.]** Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil [Article] // N. Engl. J. Med.. - 1998. - 338. - pp. 873-878.
- Junttila M. R., Li S. P. and Westermarck J.** Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. [Article] // FASEB J. - 2008. - 22(4). - S. 954-65.
- Kaebnick M. [et al.]** Light and the transcriptional response of the microcystin biosynthesis gene cluster. [Article] // Appl Environ Microbiol. - 2000. - 66(8):3387-92.
- Kanzler S. and Galle P. R.** Apoptosis and the liver [Article] // Cancer Biology. - 2000. - 10. - S. 173-184.
- Karjalainen M. [et al.]** Ecosystem consequences of cyanobacteria in the northern Baltic Sea. [Article] // Ambio. . - 2007. - 36(2-3). - S. 195-202.
- Karlsson Krister [et al.]** Mass spectrometric detection of nodularin and desmethylnodularin in mussels and flounders [Article] // Journal of Chromatography. - 2003. - 784. - pp. 243-253.
- Kelker M. S., Page R. and Peti W.** Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to nodularin-R and tautomycin: a novel scaffold for structure-based drug design of serine/threonine phosphatase inhibitors. [Article] // J Mol Biol. - 2009. - 385(1). - S. 11-21.
- Khatra B. S.** Subunit structure and properties of the glycogen-bound phosphoprotein phosphatase from skeletal muscle. [Article] // J Biol Chem. - 1986. - 261(19). - S. 8944-52.

Kholodenko Boris N., Hancock John F. and Kolch Walter Signalling ballet in space and time [Article] // nature reviews molecular cell biology. - 2010. - 11(6). - S. 414-26.

Kiguchi K. [et al.] Differential induction of apoptosis in human breast tumor cells by okadaic acid and related inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. [Article] // Cell Growth Differ. - 1994. - 5(9). - S. 995-1004.

Kiguchi K. [et al.] Differential Induction of Apoptosis in Human Breast Tumor Cells by Okadaic Acid and Related Inhibitors of Protein Phosphatases 1 and 2A. [Article] // Cell Growth & Differentiation. - 1994. - 5. - S. 995-1004.

Kim S. K. and Novak R. F. The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. [Article] // Pharmacology & Therapeutics. - 2007. - 113. - S. 88-120.

Klaassen C. D. and Lu H. Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies. [Article] // Toxicol Sci. - 2008. - 101(2). - S. 186-96.

Kohn A. D., Kovacina K. S. and Roth R. A. Insulin stimulates the kinase activity of RAC-PK, a pleckstrin homology domain containing ser/thr kinase. [Article] // EMBO J. - 1995. - 14(17). - S. 4288-95.

Komatsu Masaharu [et al.] Involvement of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways in Microcystin-LR-Induced Apoptosis after its Selective Uptake Mediated by OATP1B1 and OATP1B3 [Article] // Toxicological Sciences. - 2007. - 97(2), - S. 407-416.

Kondo F. [et al.] Detection and identification of metabolites of microcystins formed in vivo in mouse and rat livers. [Article] // Chem Res Toxicol. - 1996. - 9(8). - S. 1355-9.

Kong D. and Yamori T. Advances in development of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. [Article] // Curr Med Chem. - 2009. - 16(22). - S.2839-54.

Koolmann J. and Röhm K.-H. Taschenatlas der Biochemie [Book]. - Stuttgart-New York : Georg Thieme Verlag , 2003.

Kosako H. [et al.] Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. [Article] // EMBO J. - 1992. - 11(8). - S. 2903-8.

Kottke T. J. [et al.] Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. [Article] // J Biol Chem. - 2002. - 277(1). - S. 804-15.

Krakstad C. [et al.] CaM-kinaseII-dependent commitment to microcystin induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation [Article] // Cell Death and Differentiation. - 2006. - 13. - pp. 1191-1202.

Krüger T. [et al.] More and more toxins around—analysis of cyanobacterial strains isolated from Lake Chao (Anhui Province, China). [Article] // Toxicon. - 2010. - 56. - S. 1520–1524.

Krüger T., Christian B. and Luckas B. Development of an analytical method for the unambiguous structure elucidation of cyclic peptides with special appliance for hepatotoxic desmethylated microcystins. [Article] // *Toxicon.* - 2009. - 54. - S. 302–312.

Krüger T., Hölzel N. and Luckas B. Influence of Cultivation Parameters on Growth and Microcystin Production of *Microcystis aeruginosa* (Cyanophyceae) Isolated from Lake Chao (China). [Article] // *Microb Ecol.* - 2012. - 63. - S. 199–209.

Kujbida P. [et al.] Analysis of chemokines and reactive oxygen species formation by rat and human neutrophils induced by microcystin-LA, -YR and -LR. [Article] // *Toxicon.* - 2008. - 51. - S. 1274-1280.

Kumar R. Cellular Adaptations, Cell Injury, and Cell Death. [Online] // <http://www.scribd.com/doc/3417084/Chapter-01-Robin-Kumar-Basic-Pathology>. - Mai 2012.

Kurmayer R. [et al.] Diversity of microcystin genes within a population of the toxic cyanobacterium *Microcystis* spp. in Lake Wannsee (Berlin, Germany). [Article] // *Microb Ecol.* - 2002. - 43(1). - S. 107-18.

Kyriakis J. M. [et al.] Raf-1 activates MAP kinase-kinase. [Article] // *Nature.* - 1992. - 358(6385). - S. 417-21.

Kyriakis J. M. and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. [Article] // *Physiol Rev.* - 2001. - 81(2). - S. 807-69.

Lankoff Anna, Banasik Anna and Nowak Monika Protective effect of melatonin against nodularin-induced oxidative stress in mouse liver [Article] // *Archives of Toxicology.* - 2002. - 76. - pp. 158-165.

Li X.-Y. [et al.] Toxicity of microcystins in the isolated hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [Article] // *Ecotoxicology and Environmental Safety.* - 2007. - 67. - pp. 447-451.

Li Y. and Han X. D. Microcystin–LR causes cytotoxicity effects in rat testicular Sertoli cells. [Article] // *Environmental Toxicology and Pharmacology.* - 2012. - 33. - S. 318-326.

Liao P. [et al.] The in vivo role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. [Article] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2001. - 98(21). - S. 12283-8.

Lim I. K. [et al.] Regulation of selection of liver nodules initiated with N-nitrosodiethylamine and promoted with nodularin injections in Fischer 344 male rats by reciprocal expression of transforming growth factor-beta1 and its receptors. [Article] // *Mol. Carcinog.* - 1999. - 26. - S. 83-92..

Lim I. K. [et al.] Selective left-lobe atrophy by nodularin treatment accompanied by reduced Protein Phosphatase 1/2A and increased Peroxisome proliferation in rat liver. [Article] // *Int. J. Cancer.* - 2001. - 91. - S. 32-40.

Lim I. K. Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fischer 344 male rats. [Article] // Mechanisms of Ageing and Development. - 2002. - 123. - S. 1665-1680.

Liu X. [et al.] Degradation and detoxification of microcystin-LR in drinking water by sequential use of UV and ozone. [Article] // J Environ Sci (China). - 2010. - 22(12). - S. 1897-902.

Lu H. [et al.] Characterization of organic anion transporting polypeptide 1b2-null mice: essential role in hepatic uptake/toxicity of phalloidin and microcystin-LR. [Article] // Toxicol Sci. - 2008. - 103(1). - S. 35-45.

Lukac M. and Aegerter R. Influence of trace metals on growth and toxin production of *Microcystis aeruginosa* [Article] // Toxicon. - 1993. - 31. - pp. 293-305.

Maatouk I. [et al.] Detection by (32)P-postlabelling of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA as biomarker of microcystin-LR- and nodularin-induced DNA damage in vitro in primary cultured rat hepatocytes and in vivo in rat liver [Article] // Mutat.Res.. - 2004. - 546. - pp. 9-20.

MacKintosh R.W. [et al.] The cyanobacterial toxin microcystin binds covalently to cysteine-273 on protein phosphatase 1 [Article] // FEBS Letters. - 1995. - 371. - pp. 236-240.

MacKintosh Carol [et al.] Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants [Article]. - 1990. - 264. - pp. 187-192.

Magnuson B., Ekim B. and Fingar C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. [Article] // Biochem J. - 2012. - 441. - S. 1–21.

Majno G. and Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. [Article] // Am J Pathol. - 1995. - 146(1). - S. 3-15.

Manning B. D. and Cantley L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream [Article] // Cell. - 2007. - 129(7). - S.1261-74.

Manning Brendan D. and C. Cantley Lewis AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. [Article] // Cell. - 2007. - 129 (7). - S. 1261-74.

Manning Brendan D., Tee Andrew R. Logsdon, M. Nicole and Blenis John and Cantley, Lewis C. Identification of the Tuberous Sclerosis Complex-2 Tumor Suppressor Gene Product Tuberin as a Target of the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Pathway. [Article] // Molecular Cell. - 2002. - 10. - S. 151-162.

Masango M. [et al.] A comparison of in vivo and in vitro assays to assess the toxicity of algal blooms [Article] // Water Research. - 2007. - 42. - pp. 3241-3248.

Matsuda N. [et al.] Differential activation of ERK 1/2 and JNK in normal human fibroblast-like cells in response to UVC radiation under different oxygen tensions. [Article] // Photochem Photobiol. - 2000. - 72(3). - S. 334-9.

Mayer-Jaekel R.E. and Hemmings B. A. Protein phosphatase 2A--a 'ménage à trois'. [Article] // Trends Cell Biol. - 1994. - 4(8). - S. 287-91.

Maynes J. T. [et al.] Crystal structures of protein phosphatase-1 bound to motuporin and dihydromicrocystin-LA: elucidation of the mechanism of enzyme inhibition by cyanobacterial toxins. [Article] // J Mol Biol. - 2006. - 356(1). - S. 111-20.

Mazur-Marzec H. [et al.] Characterization of nodularin variants in *Nodularia spumigena* from the Baltic Sea using liquid chromatography/mass spectrometry/mass spectrometry. [Article] // Rapid Commun Mass Spectrom. - 2006. - 20. - S. 2023–2032.

McDermott C.M. [et al.] The cyanobacterial toxin, microcystin-LR, can induce apoptosis in a variety of cell types [Article] // Toxicol. - 1998. - 36. - pp. 1981-1996.

McElhiney J. and Lawton L. A. Detection of the cyanobacterial hepatotoxins microcystins. [Article] // Toxicology and Applied Pharmacology. - 2005. - 203. - S. 219– 230.

Meier R. and Hetmings B. A. Regulation of Protein Kinase B [Article] // J. of Receptor & Signal Transduction Research. - 1999. - 19(1-4). - S. 121-128.

Mikalsen B. [et al.] Natural variation in the microcystin synthetase operon *mcyABC* and impact on microcystin production in *Microcystis* strains. [Article] // J Bacteriol. - 2003. - 185(9). - S. 2774-85.

Mikhailov A. [et al.] Identification of ATP-synthase as a novel intracellular target for microcystin-LR [Article]. - 2003. - 142. - pp. 223-237.

Millward T. A., Zolnierowicz S. and Hemmings B. A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. [Article] // Trends Biochem Sci. - 1999. - 24(5). - S. 186-91.

Milutinovic A. [et al.] Nephrotoxic effects of chronic administration of microcystins -LR and -YR [Article] // Toxicol. - 2003. - 29. - pp. 337-346.

Min L., He B. and Hui L. Mitogen-activated protein kinases in hepatocellular carcinoma development. [Article] // Semin Cancer Biol. - 2011. - 21(1). - S. 10-20.

Moffitt M. C. and Neilan B. A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. [Article] // Appl Environ Microbiol. - 2004. - 70(11). - S. 6353-62.

Moffitt M. C. and Neilan B. A. Characterization of the nodularin synthetase gene cluster and proposed theory of the evolution of cyanobacterial hepatotoxins. [Article] // Appl Environ Microbiol. - 2004. - 70(11). - S. 6353-62.

- Monks N. R., Liu S. and Xu Y.** Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells. [Article] // Mol Cancer Ther. - 2007. - 6. - S. 587-598.
- Moore R.E. [et al.]** Biosynthesis of Microcystin-LR. Origin of the Carbons in the Adda and Masp Units [Article] // J. Am. Chem. Soc.. - 1991. - 113. - pp. 5083-5084.
- Moran J. H. and Schnellmann R. G.** A Rapid P-NADH-Linked Fluorescence Assay for Lactate Dehydrogenase in Cellular Death [Article] // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. - 1996. - 36. - pp. 41-44.
- Morrison D. K. [et al.]** Direct activation of the serine/threonine kinase activity of Raf-1 through tyrosine phosphorylation by the PDGF beta-receptor. [Article] // Cell. - 1989. - 58(4). - S. 649-57.
- Morrison D. K. and Davis R. J.** Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. [Article] // Annu Rev Cell Dev Biol.. - 2003. - 19. - S. 91-118.
- Morrison D. K.** The Raf-1 kinase as a transducer of mitogenic signals. [Article] // Cancer Cells. - 1990. - 2(12). - S. 377-82.
- Mountfort D.O. [et al.]** Evaluation of the Fluorometric protein phosphatase inhibition assay in the determination of okadaic acid in mussels [Article] // Toxicon. - 1999. - 37. - pp. 909-922.
- Mountfort D.O., Holland P. and Sprosen J.** Method for detecting classes of microcystins by combination of protein phosphatase inhibition assay and ELISA: comparison with LC-MS [Article] // Toxicon. - 2005. - 45. - pp. 199-206.
- Msagati Titus A.M., Siame Bupe A. and Shushu Deborah D.** Evaluation of methods for the isolation, detection and quantification of cyanobacterial hepatotoxins [Article] // Aquatic Toxicology. - 2006. - 78. - pp. 382-397.
- Mumby M.C. and Walter G.** Protein serine/threonine phosphatases: structure, regulation, and functions in cell growth. [Article] // Physiol Rev. - 1993. - 73(4). S. 673-99.
- Nakielny S., Campbell D. G. and Cohen P.** The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. [Article] // Eur J Biochem. - 1991. - 199(3). - S. 713-22.
- Namikoshi M. and Rinehart M. L.** Totalsynthesis of Adda, the unique C20 amino acid of cyanobacterial hepatotoxins. [Article] // Tetrahedron Letters. - 1989. - 30(33). - S. 4349-4352.
- Narita M. [et al.]** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. [Article] // Proc. Natl. Acad. Sci.. - 1998. - USA95. -S. 14681-14686.
- Nebreda A. R. and Porras A.** p38 MAP kinases: beyond the stress response. [Article] // Trends Biochem Sci. - 2000. - 25(6). - S. 257-60.

Neilan B. A. [et al.] Environmental conditions that influence toxin biosynthesis in cyanobacteria. [Article] // *Environ Microbiol.* - 2012. - [Epub ahead of print].

Nishida K. [et al.] p38alpha mitogen-activated protein kinase plays a critical role in cardiomyocyte survival but not in cardiac hypertrophic growth in response to pressure overload. [Article] // *Mol Cell Biol.* - 2004. - 24(24). - S. 10611-20.

Nishiwaki-Matsushima R. [et al.] Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. [Article] // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* - 1992. - 118. - pp. 420-424.

Nishizawa T. [et al.] Polyketide synthase gene coupled to the peptide synthetase module involved in the biosynthesis of the cyclic heptapeptide microcystin. [Article] // *J Biochem.* - 2000. - 127(5). - S. 779-89.

O'Brien J. [et al.] Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assesment of mammalian cell cytotoxicity [Article] // *Eur. J. Biochem.* - 2000. - 267.

Ohta T. [et al.] Hyperphosphorylation of cytokeratins 8 and 18 by microcystin-LR, a new liver tumor promoter, in primary cultured rat hepatocytes [Article] // *Carcinogenesis.* - 1992. - 13. - pp. 2443-2447.

Ohta T. [et al.] Nodularin, a potent inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A, is a new environmental carcinogen in male F344 rat liver [Article] // *Cancer Research.* - 1994. - 54. - pp. 6402-6406.

Orr P.T. and Jone G.J. Relationship between microcystin production and cell division rates in nitrogen-limited *Microcystis aeruginosa* cultures [Article] // *Limnol. Oceanogr.* - 1998. - 43. - pp. 1604-1614.

Paerl H. W. Microscale physiological and ecological studies of aquatic cyanobacteria: macroscale implications. [Article] // *Microsc Res Tech.* - 1996. - 33(1). - S. 47-72.

Palinska K. A. [et al.] Phylogenetic evaluation of cyanobacteria preserved as historic herbarium exsiccata. [Article] // *Int J Syst Evol Microbiol.* - 2006. - 56(10). - S. 2253-63.

Pato M. D. and Adelstein R. S. Purification and characterization of a multisubunit phosphatase from turkey gizzard smooth muscle. The effect of calmodulin binding to myosin light chain kinase on dephosphorylation. [Article] // *J Biol Chem.* - 1983. - 258(11). - S. 7047-54.

Pearson G. W, Earnest S. and Cobb M. H. Cyclic AMP selectively uncouples mitogen-activated protein kinase cascades from activating signals. [Article] // *Mol Cell Biol.* - 2006. - 26(8). -S 3039-47.

Pearson Gray [et al.] Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinases Pathways: Regulation and Physiological Functions [Article] // *Endocrine Reviews.* - 2001. - 22(2), - S. 153-183.

- Pearson L. [et al.]** On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin. [Article] // *Mar Drugs*. - 2010. - 8(5). - S. 1650-80.
- Perez D. and White E.** TNF-alpha signals apoptosis through a bid-dependent conformational change in Bax that is inhibited by E1B 19K. [Article] // *Mol Cell*. - 2000. - 6(1). - S. 53-63.
- Peterson Randall T. and Schreiber, Stuart L.** Translation control: Connecting mitogens and the ribosome [Article] // *Current Biology*. - 1998. - 8: R248–R250.
- Pflugmacher S. [et al.]** Identification of an enzymatically formed glutathione conjugate of the cyanobacterial hepatotoxin microcystin-LR: the first step of detoxication. [Article] // *Biochim Biophys Acta*. - 1988. - 1425(3). - S. 527-33.
- Pflugmacher S. [et al.]** Uptake, effects, and metabolism of cyanobacterial toxins in the emergent reed plant *Phragmites australis* (cav.) trin. ex steud. [Article] // *Environ Toxicol Chem*. - 2001. - 20(4). - S. 846-52.
- Pflugmacher S., Olin M. and Kankaanpää H.** Nodularin induces oxidative stress in the Baltic Sea brown alga *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) [Article] // *Marine Environmental Research*. - 2007. - 64. - pp. 149-159.
- Pitoy S., Jackson M. H. and Wood B. J.** Sources of the eutrophication problems associated with toxic algae: an overview. [Article] // *J Environ Health*. - 2001. - 64(5). - S. 25-32.
- Pitoy H. C. [et al.]** Critical parameters in the quantitation of the stages of initiation, promotion, and progression in one model of hepatocarcinogenesis in the rat. [Article] // *Toxicol Pathol*. - 1989. - 17(1). - S. 594-611.
- Pitoy H. C. [et al.]** Quantitation of multistage carcinogenesis in rat liver. [Article] // *Toxicol Pathol*. - 1996. - 24(1). - S. 119-28.
- Poulter L. [et al.]** Analysis of the in vivo phosphorylation state of rabbit skeletal muscle glycogen synthase by fast-atom-bombardment mass spectrometry. [Article] // *Eur J Biochem*. - 1988. - 175(3). - S. 497-510.
- Pouria S. [et al.]** Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil [Article] // *Lancet*. - 1998. - 352. - pp. 21-26.
- Pullen N. [et al.]** Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. [Article] // *Science*. - 1998. - 279(5351). - S. 707-10.
- Raingeaud J. [et al.]** Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. [Article] // *J Biol Chem*. - 1995. - 270(13). - S. 7420-6.
- Raman M., Chen W. and Cobb M. H.** Differential regulation and properties of MAPKs. [Article] // *Oncogene*. - 2007. - 26(22). - S. 3100-12.

- Rao P.V. [et al.]** Toxicity evaluation of in vitro cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*: I. Hepatotoxic and histopathological effects in rats [Article] // *Biomed. Environ Sci.* - 1995. - 8. - pp. 254-264.
- Rao P.V. and Bhattacharya R.** The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo [Article] // *Toxicology.* - 1996. - 114. - pp. 29-36.
- Rapala J. [et al.]** Variation of Microcystins, Cyanobacterial Hepatotoxins, in *Anabaena* spp. as a Function of Growth Stimuli [Article] // *Applied an Environmental Microbiology.* - 1997. - 63. - pp. 2206-2212.
- Rapala J. and Sivonen K.** Assessment of Environmental Conditions That Favor Hepatotoxic and Neurotoxic *Anabaena* spp. Strains Cultured under Light Limitation at Different Temperatures [Article] // *Microbial Ecology.* - 1998. - 36. - pp. 181-192.
- Rinehart K. L. [et al.]** Nodularin, Microcystin, and the Configuration of Adda. [Article] // *J. Am. Chem. Soc.* - 1988. - 110. - S. 8557-8558.
- Rinehart K. L., Namikoshi M. and Choi B. W.** Structure and biosynthesis of toxins from blue-green algae (cyanobacteria). [Article] // *Journal of Applied Phycology.* - 1994. - 6(2). - S. 159-176.
- Roberts P.J. and Der C.J.** Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. [Article] // *Oncogene.* - 2007. - 26. - S. 3291-3310.
- Robinson N. A. [et al.]** Characterization of chemically tritiated microcystin-LR and its distribution in mice. [Article] // *Toxicon.* - 1989. - 27(9). - S. 1035-42.
- Robinson N. A. [et al.]** Tissue distribution, excretion and hepatic biotransformation of microcystin-LR in mice. [Article] // *J Pharmacol Exp Ther.* - 1991. - 256(1). - S. 176-82.
- Roelofsen H., Müller M. and Jansen P.L.** Regulation of organic anion transport in the liver. [Article] // *Yale J Biol Med.* - 1997. - 70(4). - S. 435-445.
- Rohrlack T. [et al.]** Effects of cell-bound microcystins on survival and feeding of *Daphnia* spp. [Article] // *Appl Environ Microbiol.* - 2001. - 67(8). - S. 3523-9.
- Rudolph-Böhner S., Mierke D. F. and Moroder L.** Molecular structure of the cyanobacterial tumor-promoting microcystins. [Article] // *FEBS Lett.* - 1994. - 349(3). - S. 319-23.
- Runnegar M. T. [et al.]** Lethal potency and tissue distribution of ¹²⁵I-labelled toxic peptides from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa*. [Article] // *Toxicon.* - 1986. - 24(5). - S. 506-9.
- Runnegar M.T., Wei X. and Hamm-Alvarez S.F.** Increased protein phosphorylation of cytoplasmic dynein results in impaired motor function [Article] // *Biochem. J.* - 1999. - 342. - pp. 1-6.
- Runnegar M.T.C., Gerdes R.G. and Falconer I.R.** The uptake of the cyanobacterial hepatotoxin Microcystin by isolated rat hepatocytes [Article] // *Toxicon.* - 1991. - 29. - pp. 43-51.

- Runnegar Maria [et al.]** In vivo and in vitro binding of microcystin to protein phosphatases 1 and 2A [Article] // Biochemical and Biophysical Research Communicationa . - 1995. - 216. - pp. 162-169.
- Ruvolo P. P., Deng X. and May W. S.** Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. [Article] // Leukemia. - 2001. - 15(4). - S. 515-22.
- Saito Kazunori [et al.]** Nodularin-Har, a new nodularin from Nodularia [Article] // J. Nat. Prod.. - 2001. - 64. - pp. 139-141.
- Sangolkar L. N., Maske S. S. and Chakrabarti T.** Methods for determining microcystins (peptide hepatotoxins) and microcystin-producing cyanobacteria. [Article] // Water Research. - 2006. - 40. - S. 3485 – 3496.
- Schaeffer D. J., Malpas P. B. and Barton L. L.** Risk assessment of microcystin in dietary Aphanizomenon flos-aquae. [Article] // Ecotoxicol Environ Saf. - 1999. - 44(1). - S. 73-80.
- Schmitz H.-J.** Enzyminduzierende Wirkung umweltrelevanter Gemische polychlorierter Biphenyle (PCB) in Zellkulturen der Ratte [Article] // Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Diplomarbeit. - 1994.
- Schoff J. W. and Packer B. M.** Early Archean (3.3-billion to 3.5-billion-year-old) microfossils from Warrawoona Group, Australia. [Article] // Science. - 1987. - 237. - S. 70-3.
- Seeger R. [et al.]** Human T-cell mitogen-activated protein kinase kinases are related to yeast signal transduction kinases. [Article] // J Biol Chem. - 1992. - 267(36). - S. 25628-31.
- Seeger Rony and Krebs Edwin G.** The MAPK signaling cascade [Article] // FASEB. - 1995. - 9. - S. 726-735.
- Seglen P. O.** Preparation of isolated rat liver cells [Article] // Methods Cell Biol.. - 1976. - 13. - pp. 29-83.
- Seithel A. [et al.]** The influence of macrolide antibiotics on the uptake of organic anions and drugs mediated by OATP1B1 and OATP1B3. [Article] // Drug Metab Dispos. - 2007. - 35(5). - S. 779-86.
- Sekine T., Miyazaki H. and Endou H.** Molecular physiology of renal organic anion transporters. [Article] // AJP - Renal Physiol . - 2006. - 290(2). - S. 251-261 .
- Shen P.P. [et al.]** Effects of cyanobacteria bloom extract on some parameters of immune function in mice [Article] // Toxicol. Lett.. - 2003. - Vol. 143. - pp. 27-36.
- Shi Y. and Gaestel M.** In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. [Article] // Biol Chem. - 2002. - 383(10). - S. 1519-36.
- Sivonen K. [et al.]** Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus Anabaena. [Article] // Appl Environ Microbiol. - 1992. - 58(8). - S. 2495-500.

- Sivonen K. [et al.]** Occurrence of the hepatotoxic cyanobacterium *Nodularia spumigena* in the Baltic Sea and structure of the toxin. [Article] // *Appl Environ Microbiol.* - 1989. - 55(8). - S. 1990-5.
- Solary E. [et al.]** Positive and negative regulation of apoptotic pathways by cytotoxic agents in hematological malignancies. [Article] // *Leukemia.* - 2000. - 14(10). - S. 1833-49.
- Solstad T. [et al.]** Identification of a novel phosphorylation site of acyl-CoA binding protein (ACBP) in nodularin-induced apoptotic hepatocytes [Article] // *Experimental Cell Research.* - 2008. - 314. - pp. 2141-2149.
- Solter P.F. [et al.]** Prolonged sublethal exposure to the protein phosphatase inhibitor microcystin-LR results in multiple dose-dependent hepatotoxic effects. [Article] // *Toxicological Sciences.* - 1998. - 44. - pp. 87-96.
- Song K. Y. [et al.]** Effect of nodularin on the expression of glutathione S-transferase placental form and proliferating cell nuclear antigen in N-nitrosodiethylamine initiated hepatocarcinogenesis in the male Fischer 344 rat. [Article] // *Carcinogenesis.* - 1999. - 20. - S. 1541-1548.
- Sontag E. [et al.]** The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. [Article] // *Cell.* - 1993. - 75(5). - S. 887-97.
- Stal L. J., Severin I. and Bolhuis H.** The ecology of nitrogen fixation in cyanobacterial mats. [Article] // *Adv Exp Med Biol.* - 2010. - 675. - S. 31-45.
- Stewart I. [et al.]** Occupational and environmental hazard assessments for the isolation, purification and toxicity testing of cyanobacterial toxins. [Article] // *Environ Health.* - 2009. - 8. - S. 52.
- Strack S., Cribbs J.T. and Gomez L.** Critical role for protein phosphatase 2A heterotrimers in mammalian cell survival. [Article] // *J Biol Chem.* - 2004. - 279(46). - S. 47732-9.
- Sturgill T. W. [et al.]** Insulin-stimulated MAP-2 kinase phosphorylates and activates ribosomal protein S6 kinase II. [Article] // *Nature.* - 1988. - 334(6184). - S. 715-8.
- Svircev Z. [et al.]** Molecular aspects of microcystin-induced hepatotoxicity and hepatocarcinogenesis. [Article] // *Journal of Environmental Science and Health.* - 2010. - 28(1). - S. 39-59.
- Swingle M., Ni L. and Honkanen R. E.** Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. [Article] // *Methods Mol Biol.* - 2007. - 365. - S. 23-38.
- Tachi M., Imanishi S. Y. and Harada K.** Phosphoprotein analysis for investigation of in vivo relationship between protein phosphatase inhibitory activities and acute hepatotoxicity of microcystin-LR. [Article] // *Environ. Toxicol.* - 2007. - 22. - S. 620-629.

Takenaka S. Covalent glutathione conjugation to cyanobacterial hepatotoxin microcystin LR by F344 rat cytosolic and microsomal glutathione S-transferases. [Article] // *Environ Toxicol Pharmacol.* - 2001. - 9(4). - S. 135-139.

Takumi S. [et al.] p53 Plays an Important Role in Cell Fate Determination after Exposure to Microcystin-LR. [Article] // *Environ Health Perspect.* - 2010. - 118. - S. 1292–1298.

Tamai I. [et al.] Identification and Species Difference of OATP/Oatp Transporters Responsible for Hepatic Uptake of Beta-Lactam Antibiotics. [Article] // *Drug Metab Pharmacokinet.* - 2008. - 23(5). - S. 347-355.

Tanabe Y., Kaya K. and Watanabe M. M. Evidence for recombination in the microcystin synthetase (mcy) genes of toxic cyanobacteria *Microcystis* spp. [Article] // *J Mol Evol.* - 2004. - 58(6). - S. 633-41.

Tillett D. [et al.] Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. [Article] // *Chem Biol.* - 2000. - 7(10). - S. 753-64.

Toivola D.M. [et al.] Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments [Article] // *J.Cell Sci.* - 1997. - 110. - pp. 23-33.

Trump B. F. [et al.] The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. [Article] // *Toxicol Pathol.* - 1997. - 25(1). - S. 82-8.

Tsai M. [et al.] Activation of MAP kinases, pp90^{rsk} and pp70-S6 kinases in mouse mast cells by signaling through the c-kit receptor tyrosine kinase or Fc epsilon RI: rapamycin inhibits activation of pp70-S6 kinase and proliferation in mouse mast cells. [Article] // *Eur J Immunol.* - 1993. - 23(12). - S. 3286-91.

Tsuji K. [et al.] Stability of microcystins from cyanobacteria--II. Effect of UV light on decomposition and isomerization. [Article] // *Toxicon.* - 1995. - 33(12). - S. 1619-31.

Ufelmann H. [et al.] Human and rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl-microcystins and nodularins. [Article] // *Toxicology.* - 2012. - 293(1-3). - S. 59-67.

Utkilen H. and Gjølme N. Iron-Stimulated Toxin Production in *Microcystis aeruginosa* [Article] // *Applied and Environmental Microbiology.* - 1995. - 61. - pp. 797-800.

van Apeldoorn M. E. [et al.] Toxins of cyanobacteria. [Article] // *Mol Nutr Food Res.* - 2007. - 51(1). - S. 7-60.

van Apeldoorn Marian E. [et al.] Toxins of cyanobacteria [Article] // *Mol. Nutr. Food Res.* - 2006. - 51. - pp. 7-60.

Vander Haar E. [et al.] Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. [Article] // *Nat Cell Biol.* - 2007. - 9(3). - S. 316-23.

- Vanlangenakker N., Vanden Berghe T. and Vandenabeele P.** Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. [Article] // *Cell Death Differ.* - 2012. - 19(1). - S. 75-86.
- Vanlangenakker N., Vanden Berghe T. and Vandenabeele P.** Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. [Article] // *Cell Death Differ.* - 2012. - 19(1). - S. 75-86.
- Walker K. S. [et al.]** Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. [Article] // *Biochem J.* - 1998. - 331(1). - S. 299-308.
- Walsh A. H., Cheng A. and Honkanen R. E.** Fostriecin, an antitumor antibiotic with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases types 1 (PP1) and 2A (PP2A), is highly selective for PP2A. [Article] // *FEBS Lett.* - 1997. - 416(3). - S. 230-4.
- Walter G. and Mumby M.** Protein serine/threonine phosphatases and cell transformation. [Article] // *Biochim Biophys Acta.* - 1993. - 1155(2). - S. 207-26.
- Wang B., Zhang P. and Wei Q.** Recent progress on the structure of Ser/Thr protein phosphatases. [Article] // *Sci China C Life Sci.* - 2008. - 51(6). - S. 487-94.
- Wang L., Gout I. and Proud C. G.** Cross-talk between the ERK and p70 S6 kinase (S6K) signaling pathways. MEK-dependent activation of S6K2 in cardiomyocytes. [Article] // *J Biol Chem.* - 2001. - 276(35). - S. 32670-7.
- Wang Y. [et al.]** Cardiac hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun NH2-terminal kinase in ventricular muscle cells. [Article] // *J Biol Chem.* - 1998. - 273(10). - S. 5423-6.
- Watanabe M. F. and Oishi S.** Effects of Environmental Factors on Toxicity of a Cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*) under Culture Conditions [Article] // *Applied and Environmental Microbiology.* - 1985. - 49. - pp. 1342-1344.
- Wera S. and Hemmings B. A.** Serine/threonine protein phosphatases. [Article] // *Biochem J.* - 1995. - 311(1). - S. 17-29.
- Westphal R. S. [et al.]** Identification of Kinase-Phosphatase Signaling Modules Composed of p70 S6 Kinase-Protein Phosphatase 2A (PP2A) and p21-activated Kinase-PP2A. [Article] // *The Journal of Biological Chemistry.* - 1999. - 274(2). - S. 687-692.
- Wilhelm S. [et al.]** Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie [Online] // www.zeiss.de. - 2012. - 2012.
- Wolf Hans Uwe and Frank Christian** Toxicity assessment of cyanobacterial toxin mixtures [Article] // *Environ. Toxicol.* - 2002. - 17. - pp. 395-399.
- Wu J. [et al.]** Molecular structure of a protein-tyrosine/threonine kinase activating p42 mitogen-activated protein (MAP) kinase: MAP kinase kinase. [Article] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 1993. - 90(1). - S. 173-7.
- Wudtiwai B. [et al.]** Methoxyflavone derivatives modulate the effect of TRAIL-induced apoptosis in human leukemic cell lines. [Article] // *J Hematol Oncol.* - 2011. - 21(4). - S. 52.

- Yan Y. [et al.]** Inhibition of protein phosphatase activity induces p53-dependent apoptosis in the absence of p53 transactivation. [Article] // J Biol Chem. - 1997. - 272(24). - S. 15220-6.
- Yea S. S. [et al.]** Microcystin-induced down-regulation of lymphocyte functions through reduced IL-2 mRNA stability [Article] // Toxicol. Lett.. - 2001. - 122. - pp. 21-31.
- Yoshida M. and Yagi K.** Purification and characterization of a phosphoprotein phosphatase that dephosphorylates myosin and the isolated light chain from chicken gizzard smooth muscle. [Article] // J Biochem. - 1986. - 99(4). - S. 1027-36.
- Yoshizawa S. [et al.]** Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity [Article] // J Cancer Res Clin Oncol. - 1990. - 116. - pp. 609-614.
- Yu S. Z.** Primary prevention of hepatocellular carcinoma. [Article] // J Gastroenterol Hepatol. - 1995. - 10(6). - S. 674-82.
- Yu S., Zhao N. and Zi X.** The relationship between cyanotoxin (microcystin, MC) in pond-ditch water and primary liver cancer in China. [Article] // Zhonghua Zhong Liu Za Zhi. - 2001. - 23(2). - S. 96-99.
- Yu T. [et al.]** Determinations of MC-LR and [Dha7] MC-LR Concentrations and Physicochemical Properties by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [Article] // Bull Environ Contam Toxicol. - 2009.
- Yu W. [et al.]** A novel amplification target, DUSP26, promotes anaplastic thyroid cancer cell growth by inhibiting p38 MAPK activity. [Article] // Oncogene. - 2007. - 26(8). - S. 1178-87.
- Yuan Z. Q. [et al.]** AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance. [Article] // J Biol Chem. - 2003. - 278(26). - S. 23432-40.
- Zegura B. [et al.]** Patterns of microcystin-LR induced alteration of the expression of genes involved in response to DNA damage and apoptosis [Article] // Toxicol. - 2008. - 51. - pp. 615-623.
- Zegura B., Lah T.T. and Filipic M.** Alteration of intracellular GSH levels and its role in microcystin-LR-induced DNA damage in human hepatoma HepG2 cells [Article] // Mutation Research. - 2006. - 611. - pp. 25-33.
- Zegura B., Lah T.T. and Filipic M.** The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage [Article] // Toxicology. - 2004. - 200. - pp. 59-68.
- Zegura B., Sedmak B. and Filipic M.** Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2 [Article] // Toxicol. - 2003. - 41. - pp. 41-48.
- Zejschwitz C. [et al.]** Apoptosis induction by inhibitors of Ser/Thr phosphatases 1 and 2A is associated with transglutaminase activation in two different human epithelial tumour lines. [Article] // FEBS Letters. - 1997. - 413. - S. 147-151.

Zhang H. H. [et al.] S6K1 regulates GSK3 under conditions of mTOR-dependent feedback inhibition of Akt. [Article] // Mol Cell. - 2006. - 24(2). - S. 185-97.

Zhang J. [et al.] A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. [Article] // J Biol Chem.. - 2003. - 278(32). - S. 29901-12.

Zhang J. H. and Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. [Article] // Cell Res. - 2000. - 10(3). - S. 205-11.

Zhang J. H. and Xu M. DNA fragmentation in apoptosis. [Article] // Cell Research. - 2000. - 10, -S. 205-211.

Zhang Y. Y. [et al.] Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. [Article] // J Biol Chem. - 2008. - 283(39). - S. 26591-601.

Zhou B. [et al.] Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. [Article] // J Biol Chem.. - 2006. - 281(50). - S. 38834-44.

Zhou F., Yang Y. and Xing D. Bcl-2 and Bcl-xL play important roles in the crosstalk between autophagy and apoptosis. [Article] // FEBS Journal. - 2010. - 278 (3). - S.403-13.

Zhu Y. [et al.] Transformation of immortalized colorectal crypt cells by microcystin involving constitutive activation of Akt and MAPK cascade. [Article] // Carcinogenesis. - 2005. - 26(7). - S. 1207-1214.

Zhu Yongliang [et al.] Transformation of immortalized colorectal crypt cells by microcystin involving constitutive activation of Akt and MAPK cascade. [Article] // Carcinogenesis. - 2005. - 26 (7). - S. (1207-1214).

Zimmermann Sven and Moelling, Karin Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B) [Article] // Science. - 1999. - 286 (5445). - S. 1741-1744 .

Zuluaga S. [et al.] Negative regulation of Akt activity by p38alpha MAP kinase in cardiomyocytes involves membrane localization of PP2A through interaction with caveolin-1. [Article] // Cell Signal. - 2007. - 19(1). - S. 62-74.

Anhänge

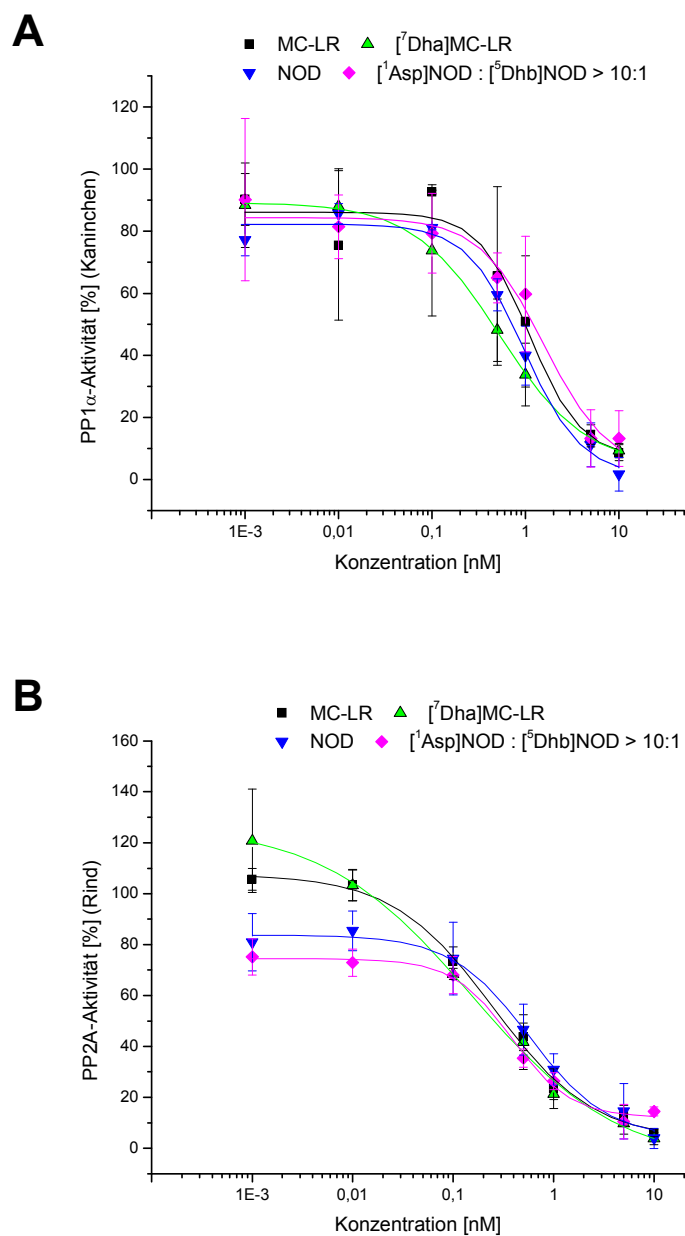


Abbildung 85: PP-Aktivität für MC-LR- und NOD-Varianten
Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch MC-LR, [7Dha]MC-LR, NOD und [1Asp]NOD : [5Dhb]NOD > 1 : 10 verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

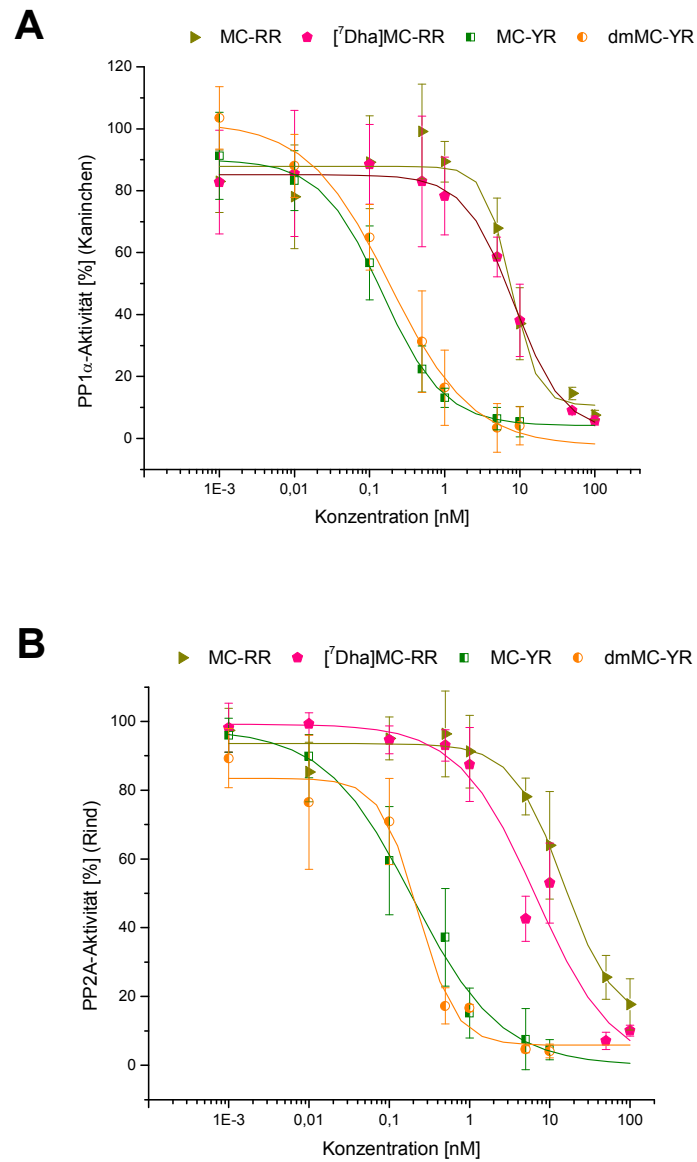


Abbildung 86: PP-Aktivität für MC-Varianten

Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch MC-RR, [7 Dha]MC-RR, MC-YR und dmMC-YR verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

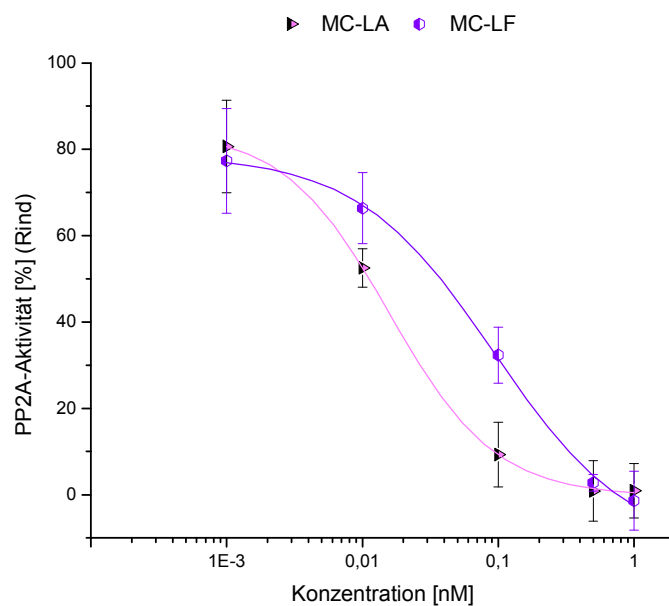


Abbildung 87: PP2A-Aktivität für MC-LA und MC-LF
Hemmung von PP2A durch MC-LA und MC-LF verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

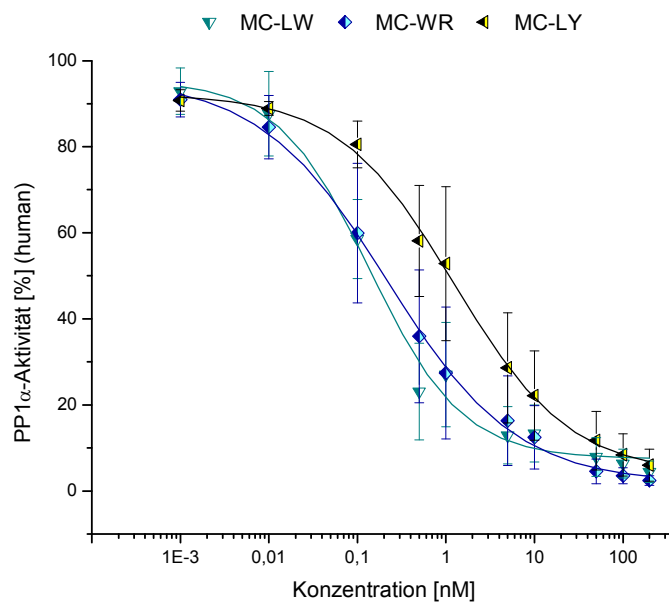


Abbildung 88: PP1 α -Aktivität für MC-LW, MC-WR und MC-LY
Hemmung von PP1 α durch MC-LW, MC-WR und MC-LY verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

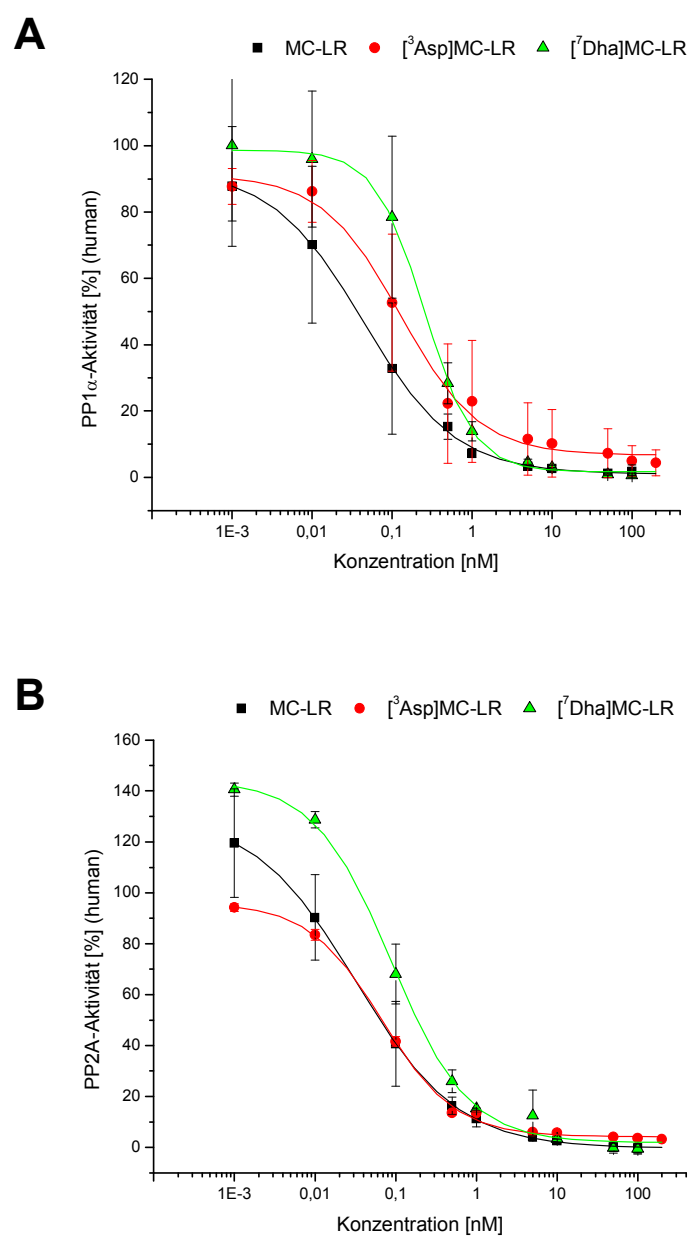


Abbildung 89: PP-Aktivität für MC-LR-Varianten

Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch MC-LR, [³Asp]MC-LR und [⁷Dha]MC-LR verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

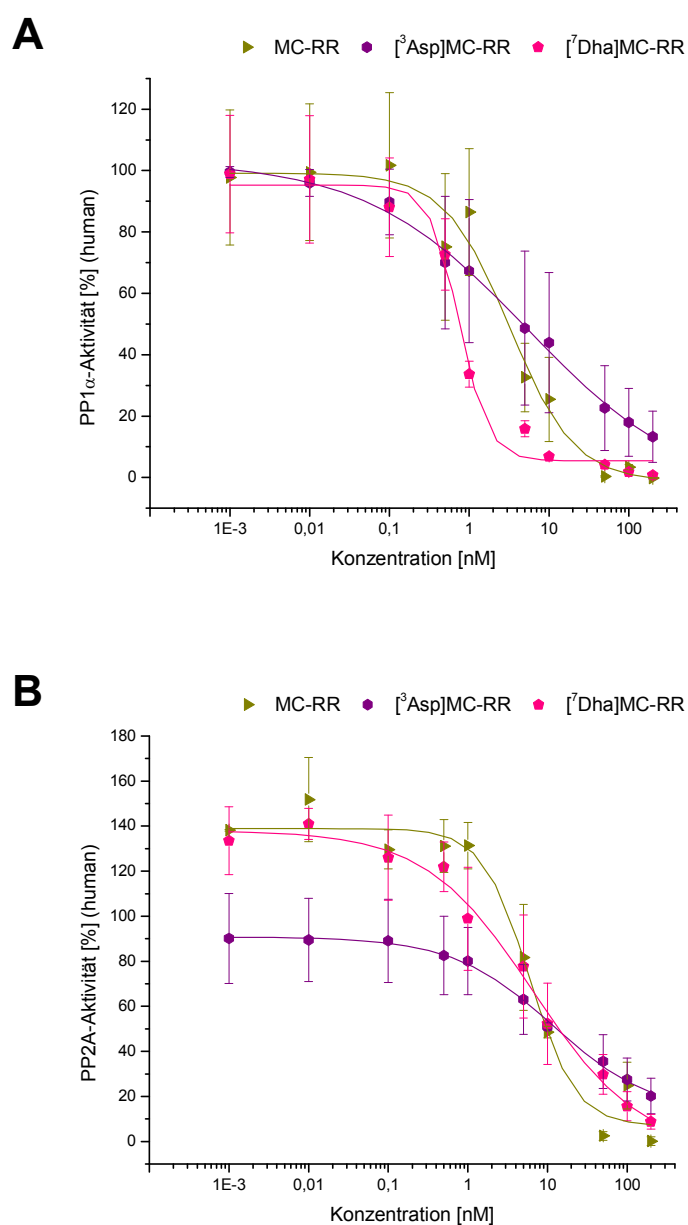


Abbildung 90: PP-Aktivität für MC-RR-Varianten
Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch MC-RR, [3 Asp]MC-RR und [7 Dha]MC-RR verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

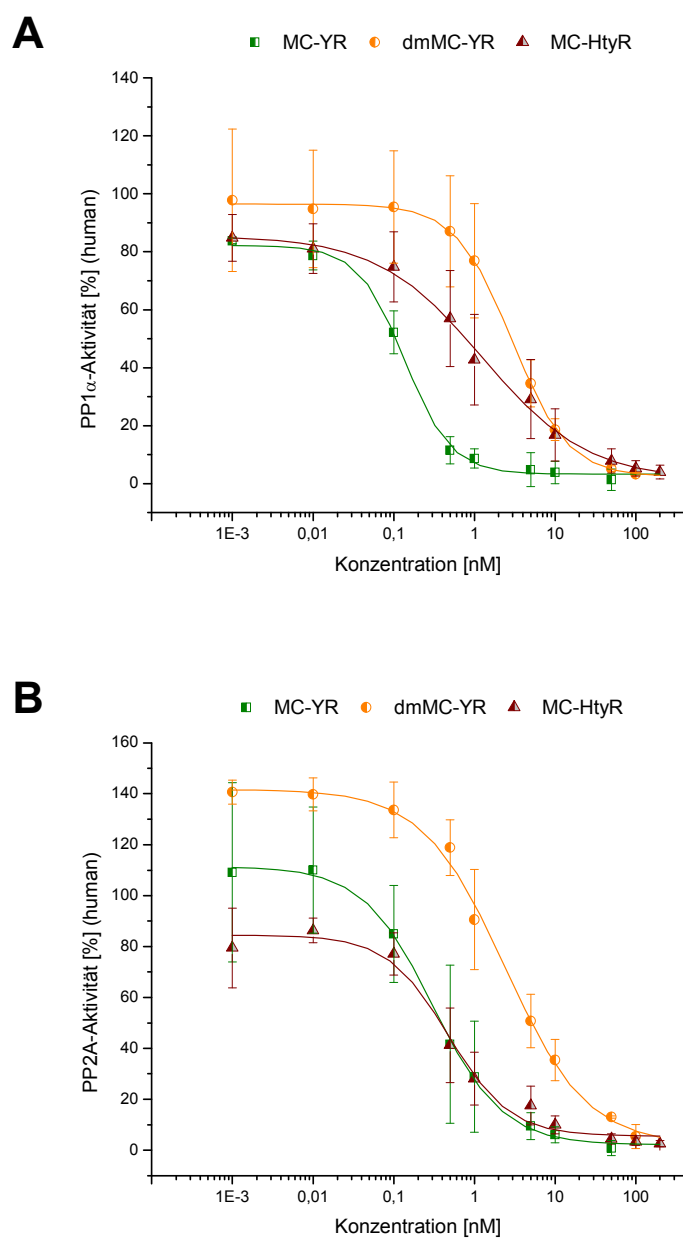


Abbildung 91: PP-Aktivität für MC-YR-Varianten

Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch MC-YR, dmMC-YR und MC-HtyR verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

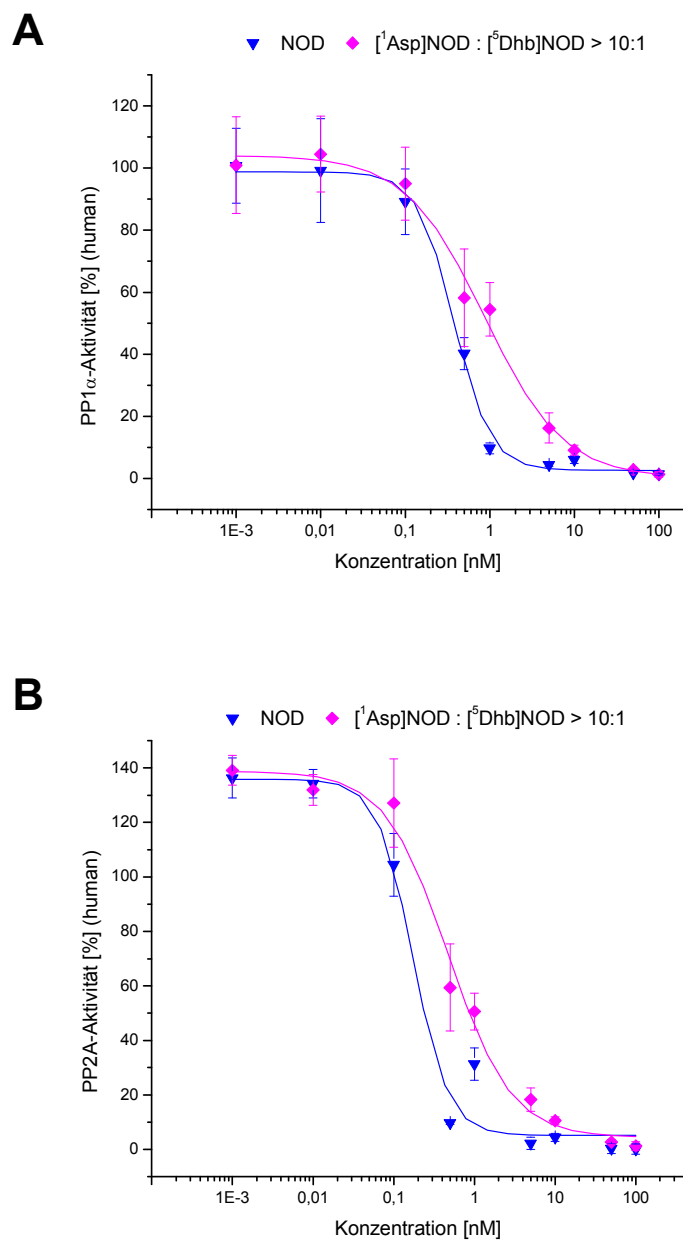


Abbildung 92: PP-Aktivität für NOD-Varianten

Hemmung von PP1 α (A) und PP2A (B) durch NOD und [¹Asp]NOD : [⁵Dhb]NOD > 1 : 10 verschiedener Konzentrationen nach 1,5 h bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (DMSO 0,1 % V/V) MW \pm SD; n \geq 3.

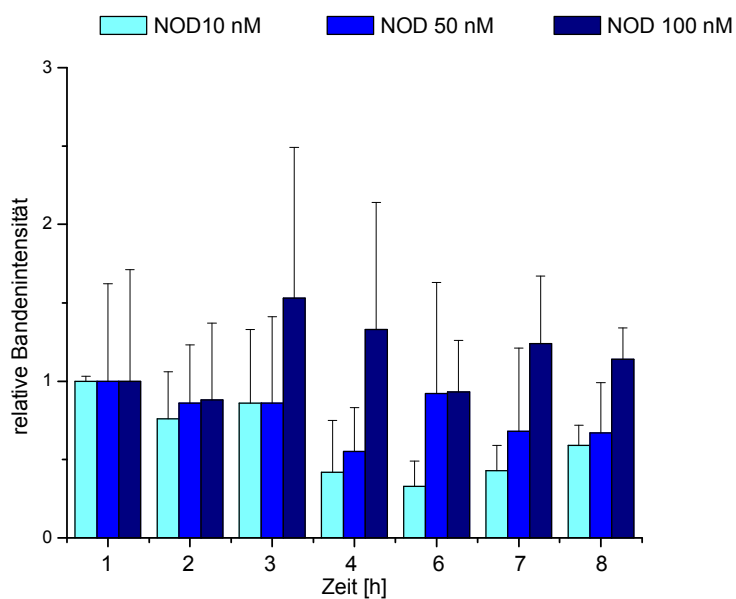


Abbildung 93: Western Blot p38MAPK für NOD.
Level an p38MAPK in primären Rattenhepatozyten mit NOD 10, 50, 100 nM nach 1, 2, 3, 4, 6, 7 und 8 h. Densitometrische Auswertung für p38MAPK aus $MW \pm SD$; $n=3$. 1 h vs. Zeitpunkte, *one-way ANOVA* und *Dunnett's post test*.

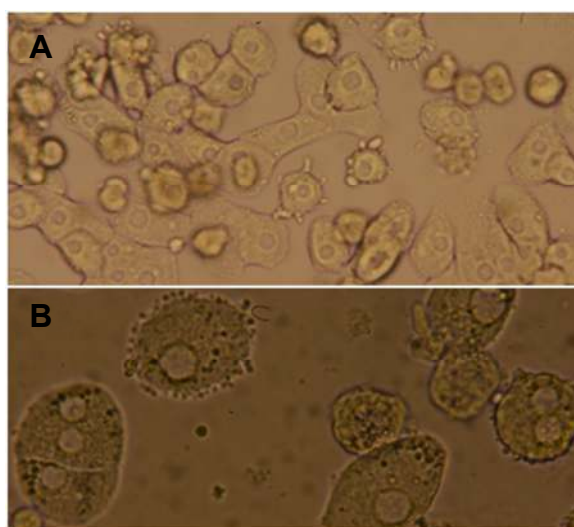


Abbildung 94: Primäre Rattenhepatozyten nach 6 h Inkubation mit NOD
A: 50 nM (Vergrößerung 200x); B: 50 nM (Vergrößerung 400x)

Lebenslauf

Helena Ufelmann

Diplom-Lebensmittelchemikerin



Promotion

Seit 11/2008

Promotion an der TU Kaiserslautern im Fachbereich Lebensmittelchemie und Toxikologie
Thema: „Toxikologische Relevanz des Vorkommens von Desmethyl-Varianten der Microcystine und des Nodularins in Gewässern und Nahrungsergänzungsmitteln“

Veröffentlichung und Posterbeiträge

Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B. Schrenk, D. (2011). Rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring demethylated-microcystins and nodularins. *Toxicology*. 293(1-3):59-67

46th Congress of the European Societies of Toxicology, Dresden, September 13-16, 2009: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Cytotoxicity of microcystins and nodularin.

8th International Conference on Toxic Cyanobacteria, Istanbul, Turkey, August 29- September 04, 2010: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Cytotoxicity and protein phosphatase inhibition by demethylated microcystins and nodularin.

39th Deutscher Lebensmittelchemikertag, Stuttgart-Hohenheim, September 20-22, 2010: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B.,

Schrenk, D.: Zytotoxizität und Proteinphosphatase-Hemmung durch Desmethylvarianten von Microcystinen und Nodularin.

14th International Conference on Harmful Algae, Hersonissos, Crete, Greece, November 01-05, 2010: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Cytotoxicity and protein phosphatase inhibition by demethylated microcystins and nodularin.

77th Jahrestagung der DGPT, Frankfurt, März 31- April 01, 2011: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Rat hepatocyte toxicity and protein phosphatase 1 and 2A inhibitory activity of naturally occurring desmethyl-microcystins and nodularins.

Arbeitstagung LChG Regionalverband Südwest, Kaiserslautern, März 05-06, 2012: Ufelmann, H., Krüger, T., Luckas, B., Schrenk, D.: Zytotoxizität und Proteinphosphatase-Hemmung durch Desmethylvarianten von Microcystinen und Nodularin.

Studium und Ausbildung

04/2004 – 10/2008

Universität, Kaiserslautern

Diplomstudiengang Lebensmittelchemie

- Diplomarbeit: Zytotoxizität der Microcystine und des Nodularins in primären Hepatozyten der Ratte
- Forschungsarbeit: Einfluss von Dexamethason, 17 β -Estradiol und Progesteron auf die TCDD-vermittelte CYP1A1-Aktivität in H4IIE-Zellen und in primären Hepatozyten der Ratte

Studienschwerpunkte

- Lebensmittelchemie und Toxikologie
- Biochemie
- Mikrobiologie

08/1994 – 03/2004

Immanuel-Kant-Gymnasium Pirmasens

Leistungskurse: Chemie, Biologie, Deutsch

Weiterbildungen

Seit 2009

Teilnahme am Weiterbildungsprogramm „Fachtoxikologie / in DGPT“ (in der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie)

Lebensmitteltoxikologie

Molekulare Zelltoxikologie

Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie I und II
Versuchstierkunde I / Biostatistik
Versuchstierkunde II
Klinische Toxikologie
Fremdstoffallergie/Immuntoxikologie
Fremdstoffmetabolismus/Toxikokinetik

Zusätzliches

Sprachen	Englisch: sehr gute Kenntnisse Französisch: Grundkenntnisse Russisch: Muttersprache Deutsch: Muttersprache
EDV	Sehr gute Kenntnisse in MS Excel, MS PowerPoint, MS Word, den entsprechenden Open Office Programmen, Origin, GraphPad InStat und Bildbearbeitungsprogrammen (Adobe Photoshop und GIMP)
Mitgliedschaft	Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh) (seit 2004)

Kaiserslautern, 18. Dezember 2012



Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation ohne Hilfe Dritter und nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe. Alle Stellen, die aus den Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht worden.

Bad Kreuznach, 7. Dezember 2012



Helena Ufelmann