

**Mechanistische Analyse der
Nephrokarzinogenese mit Hilfe von
Expressionsanalysen *in vivo* und *in vitro***

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Christina Weiland
aus Trier

September 2007

Aus dem Institut für Toxikologie der Bayer HealthCare AG Wuppertal

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich Heine Universität

Referent: Prof. Dr. H.-W. Vohr

Koreferent: Prof. Dr. F. Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2007

Erklärung

Die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Mechanistische Analyse der Nephrokarzinogenese mit Hilfe von Expressionsanalysen *in vivo* und *in vitro*" habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, September 2007

Christina Weiland

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Niere und Modelle der Niere	1
1.1.1	<i>In-vitro</i> -Modelle	3
1.2	Allgemeine Kanzerogenese und Nierenkanzerogenese	5
1.3	Nierenkanzerogene, die in dieser Arbeit verwendet wurden	12
1.4	Toxicogenomics	14
1.5	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	15
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Chemikalien	17
2.1.2	Verbrauchsmaterial	19
2.1.3	Kits und Microarrays	20
2.1.4	Geräte	21
2.1.5	Versuchstiere	22
2.1.6	Zellen und Zelllinien	23
2.1.7	Zellkulturmedien	23
2.1.8	Stammösungen für das HK-2-Medium	24
2.1.9	Synthetische Oligonukleotide	24
2.1.10	Software	27
2.1.11	Puffer und Lösungen	27
2.2	Methoden	29
2.2.1	Durchführung der <i>in-vivo</i> -Studien	29
2.2.1.1	Histopathologische Untersuchungen	31
2.2.2	Zellkultur	31
2.2.2.1	Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus der Ratte	31
2.2.2.2	Kultivierung von NRK-52E-Zellen	32
2.2.2.3	Kultivierung von HK-2-Zellen	33
2.2.2.4	Langzeitlagerung von Zellen mittels Kryokonservierung	33
2.2.2.5	Auftauen von kryokonservierten Zellen	33
2.2.2.6	Zellzahlbestimmung	34
2.2.2.7	Antikörperfärbungen zur Charakterisierung der rPTCs	34
2.2.2.8	Behandlung mit den Nephrokarzinogenen	35
2.2.2.9	Bestimmung der Viabilität nach der Behandlung mit OTA	35
2.2.2.10	Viabilitätstests mit HK-2-Zellen	36
2.2.3	RNA-Isolation	37
2.2.3.1	RNA-Isolation aus Zellen	37
2.2.3.1.1	rPTCs	37
2.2.3.1.2	NRK-52E-Zellen	38
2.2.3.1.3	HK-2-Zellen	38
2.2.3.1.4	Humane PTCs	39
2.2.3.2	RNA-Isolation aus Gewebe	39

2.2.3.2.5	Niere.....	39
2.2.3.2.6	Leber.....	40
2.2.3.2.7	Herz.....	40
2.2.4	Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA.....	40
2.2.4.1	Qualitätsüberprüfung der RNA mittels Bioanalyzer.....	40
2.2.4.2	Quantifizierung der RNA.....	40
2.2.5	Real-Time-PCR.....	41
2.2.5.1	Reverse Transkription.....	42
2.2.5.2	Taqman-PCR mit SYBR Green Detektion.....	42
2.2.5.3	Taqman-PCR mit 'Assays on demand'.....	43
2.2.5.4	Auswertung der Taqman®-Ergebnisse: <i>In-vitro</i> - Modellcharakterisierung.....	43
2.2.5.5	Auswertung der Taqman®-Ergebnisse: NRK-52E-Zellen und rPTCs nach OTA-Behandlung und HK-2-Zellen nach der Behandlung mit den Nephrokarzinogenen.....	43
2.2.6	Molekularbiologische Arbeiten zur Genexpressionsanalyse.....	44
2.2.6.1	Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) - Reverse Transkription.....	45
2.2.6.2	Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) - <i>In-vitro</i> -Transkription.....	46
2.2.6.3	Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) - Hybridisierung der Microarrays.....	47
2.2.6.4	One_Cycle_Affx-Kit (16 h) - Protokoll.....	48
2.2.6.5	Färben und Scannen der Microarrays.....	49
2.2.7	Auswertung der Microarrays.....	49
2.2.7.1	Qualitätskontrolle der Microarrays und „Kondensierung“ der Daten.....	49
2.2.7.2	Analyse der Genexpressionsdaten.....	50
2.2.7.2.1	Box Plot Analyse.....	50
2.2.7.2.2	Hauptkomponentenanalyse (PCA = Principal Component Analysis).....	51
2.2.7.2.3	Histogramm.....	51
2.2.7.2.4	N-Way ANOVA.....	51
2.2.7.2.5	Unpaired t-Test.....	51
2.2.7.2.6	Paired t-Test.....	52
2.2.7.2.7	Welch-t-Test.....	52
2.2.7.2.8	Self-organizing maps (SOM-Analyse).....	52
2.2.7.2.9	Hierarchical 'Clustering'.....	52
3	ERGEBNISSE.....	53
3.1	Vergleich der <i>in-vivo</i> -Studien mit den Nephrokarzinogenen.....	53
3.1.1	Histopathologie.....	53
3.1.2	Vergleich der Genexpressionsprofile genotoxischer Nephrokarzinogene.....	55
3.1.2.1	Qualitätsüberprüfung und statistische Analyse.....	55
3.1.2.2	Mechanistische Analyse der genotoxischen Nephrokarzinogene.....	57
3.1.2.3	Mechanistische Analyse genotoxischer Marker-Gene in verschiedenen Geweben am Beispiel von 2NF.....	61
3.1.2.4	Mechanistische Analyse von nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen.....	62
3.2	<i>In-vitro</i> -Modelle der Niere.....	66
3.2.1	Antikörperfärbungen zur Charakterisierung der rPTCs.....	66

3.2.1.1	Zellzahlbestimmung.....	67
3.2.2	Vergleich zwischen rPTCs und der Rattenniere <i>in vivo</i> mittels Genexpressionsanalyse.....	68
3.2.2.1	Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	72
3.2.3	Vergleich von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach der Behandlung mit OTA	73
3.2.3.1	Konzentrationsbestimmung.....	73
3.2.3.2	Vergleich der Genexpression <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> nach OTA.....	76
3.2.4	Vergleich von verschiedenen <i>in-vitro</i> -Modellen nach der Behandlung mit OTA.....	78
3.2.4.1	Humane <i>in-vitro</i> -Modelle.....	78
3.2.4.1.1	Konzentrationsbestimmung.....	78
3.2.4.1.2	Genexpressionsanalyse.....	80
3.2.4.2	Vergleich von humanen <i>in-vitro</i> -Modellen mit <i>in-vitro</i> -Modellen der Ratte nach OTA-Behandlung.....	82
3.2.5	Vergleich weiterer Nephrokarzinogene mittels eines humanen Zellmodells für die Niere.....	85
3.2.5.1	Konzentrationsbestimmung.....	85
3.2.5.2	Genexpressionsanalyse.....	87
4	DISKUSSION	95
4.1	Vergleich genotoxischer Nephrokarzinogene <i>in vivo</i>	95
4.2	Vergleich nicht-genotoxischer Nephrokarzinogene <i>in vivo</i>	100
4.3	Proximale Tubuluszellen der Ratte als Beispiel für ein <i>in-vitro</i> -Modell der Niere.....	105
4.4	Vergleich verschiedener Modelle der Ratte und vom Menschen nach OTA Behandlung.....	114
4.5	Vergleich weiterer Nephrokarzinogene mittels eines humanen Zellmodells für die Niere.....	117
4.6	Wichtige Aspekte der <i>in-vitro</i> -Systeme.....	120
4.7	Ausblick.....	121
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	127
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	145
8	DANKSAGUNGEN.....	147
9	LEBENS LAUF	149
10	VORTRÄGE UND VERÖFFENTLICHUNGEN	151
11	ANHANG	153

1 Einleitung

1.1 Die Niere und Modelle der Niere

Die Niere spielt eine wichtige Rolle in der Exkretion von metabolischen Endprodukten und vom Körper nicht mehr benötigten Ionen, aber auch in der Rückresorption von lebensnotwendigen Ionen und Nährstoffen. Dadurch wird unter anderem die Zusammensetzung der Elektrolyte und das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit bestimmt. Die Niere setzt sich im Wesentlichen aus den drei Teilen Kortex, Medulla und Papille zusammen und ist von einer festen Kapsel aus Bindegewebe und glatten Muskeln umgeben. Sie besteht insgesamt aus etwa 1 Million Nephronen. Diese Nephronen werden aus dem Nierenkörperchen und den dazugehörigen Nierenkanälchen (Tubulussystem) gebildet, die über den proximalen Tubulus, die Henle'sche Schleife und den distalen Tubulus in das Sammelrohrsystem münden. Neben anderen Zellen besteht der Kortex hauptsächlich aus den epithelialen proximalen Tubuluszellen, welche sich zur Bowman'schen Kapsel formen. Diese wiederum umgibt den Glomerulum, der von dem Geflecht der glomerulären Kapillaren, bestehend aus fenestrierten endothelialen Zellen, einer Basalmembran und den sogenannten Podozyten, die auf der Basalmembran sitzen, gebildet wird. Im Glomerulum wird das Blut, das über das Kapillargeflecht ankommt, gefiltert, d. h. Proteine und Zellen werden zurückgehalten, während das Wasser mit allen sonstigen gelösten Stoffen in den Tubulus gelangt. Von dort wird der größte Teil dieses Filtrats durch die Tubuluswand wieder ins Blut zurücktransportiert (Resorption). Der Rest wird mit dem Urin ausgeschieden. Im proximalen Tubulus befinden sich spezielle Transporter, die für die Resorption von Glukose und Aminosäuren zuständig sind. Darüber hinaus spielen die tubulären Zellen eine entscheidende Rolle im Säure-Base-Gleichgewicht, da das meiste Bikarbonat resorbiert wird und das synthetisierte Ammonium in das tubuläre Lumen diffundiert (Haschek und Rousseaux, 1991).

Da 90 % des Blutes, das in der Niere ankommt, durch den Kortex fließt, sind nach Einwirken von Xenobiotika und deren Metaboliten meistens die Zellen des proximalen Tubulus betroffen. Außerdem findet der tubuläre Transport von organischen und anorganischen Ionen, Proteinen und Peptiden mit einem geringen Molekulargewicht, GSH-Konjugaten und Schwermetallen überwiegend, wenn nicht sogar ausschließlich, im proximalen Tubulus statt. Ein Grund für die erhöhte Empfindlichkeit des proximalen Tubulus für Toxine könnte auch mit der fast ausschließlich dort vorkommenden Aktivität des Cytochrom P450 und der β -Lyase zusammenhängen, da die Bioaktivierung von Substanzen dadurch ebenfalls auf diese Region der Niere beschränkt ist. Schädigungen der

proximalen Tubuli wirken sich auf das Gleichgewicht zwischen Wasser und den gelösten Stoffen aus, da 60-80 % der gelösten Stoffe und des Wassers dort resorbiert werden. Eine Reihe von Medikamenten, Metallen und Schadstoffen aus der Umwelt können eine Schädigung der Niere verursachen, die im Wesentlichen aus der Aufkonzentrierung während der Wasserresorption in den Tubuli resultiert. Klinische Symptome von Nierenschäden treten oft erst sehr spät auf, d. h. wenn bereits 70-80 % der Niere zerstört sind, da in der Niere zunächst gegenregulatorische Reaktionen ablaufen (Pfaller und Graunthaler, 1998).

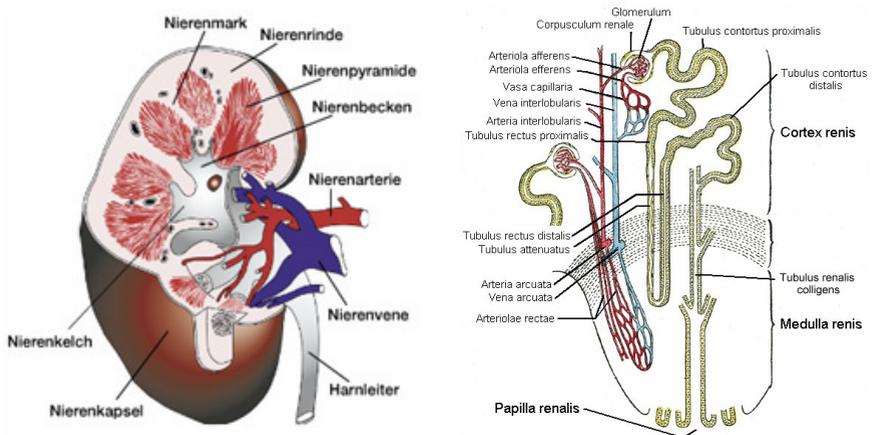


Abb. 1: *Links:* Grober Aufbau der Niere (<http://www.cystinose-selbsthilfe.de/images/nierequerschnitt.jpg>); *Rechts:* Feinbau der Niere (modifiziert nach Gray mit anatomischen Fachtermini).

Ganz allgemein können in der Niere Veränderungen des Ionengleichgewichts, der Zellpolarität, der Calciumhomöostase und der mitochondrialen Funktion als Reaktion auf eine Toxineinwirkung stattfinden (Klaasen, 2001). Aminoglykoside, Amphotericin und Cisplatin verursachen durch ihre tubuläre Toxizität eine schwere Schädigung des Nierengewebes, die bis zum akuten Nierenversagen führen kann (Nagai and Takano, 2004; Mayer *et al.*, 2002; Saleh und El-Demerdash, 2005; Grauer, 1996), welches wiederum mit einer drastischen Senkung der glomerulären Filtrationsrate einhergeht. Penizilline und Cephalosporine führen zu einer akuten interstitiellen Nephritis, die durch eine inflammatorische Reaktion und Infiltrierung durch Lymphozyten und Monozyten gekennzeichnet ist (Borlak, 2005). Des Weiteren führen sie zu einer akuten Nekrose im proximalen Tubulus, die in erster Linie durch Azylierung bestimmter Zielproteine und durch Lipidperoxidation verursacht wird (Tune, 1997).

Einige natürliche und synthetische Substanzen zeigten karzinogenes Potential in Langzeitstudien mit Ratten. Eines dieser Nierenkarzinogene ist Ochratoxin A (OTA), das auch für den Menschen als kanzerogen eingestuft wurde (Lock und Hard, 2004). Obwohl einige Studien zu OTA existieren, ist der Mechanismus, über den die Toxizität und Kanzerogenität vermittelt wird, noch immer nicht geklärt. Ähnlich wie OTA sind auch Fumonisin B1, Chloroform, Kaliumbromat, N-Nitrosomorpholin, Aristolochiasäure und 2-Nitrofluoren krebserregend für die Ratte und werden somit als potenziell krebserregend für den Menschen angesehen, wobei auch hier bisher die Aufklärung des Wirkungsmechanismus unzureichend ist. Generell kann man sagen, dass das Epithelium des proximalen Tubulus sehr häufig bei solchen toxischen Effekten betroffen ist und als Reaktion auf diese Substanzen eine Reihe von komplexen Vorgängen durchläuft, deren Mechanismen allerdings weitestgehend unbekannt sind. Um eine genauere Vorstellung dieser Vorgänge zu bekommen, denen die Nephrotoxizität zugrunde liegt, ist der Einsatz von *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen unabdingbar.

1.1.1 *In-vitro*-Modelle

In den letzten Jahrzehnten wurden neben *in-vivo*-Studien verstärkt *in-vitro*-Systeme entwickelt, um die zellulären und genetischen Veränderungen in der Niere zu erforschen. Wichtig war und ist dabei die Untersuchung der Eignung der *in-vitro*-Systeme als repräsentative Systeme für die Niere. In der Literatur wurde schon über eine Reihe von verschiedenen *in-vitro*-Modellen für die Niere berichtet. Boogaard *et al.* (1990) beschrieben die am häufigsten genutzten Modelle, wie Gewebeschnitte der Niere, perfundierte Nephronsegmente, isolierte Tubuli sowie isolierte tubuläre Zellen in Suspension, langlebige primäre Zellkulturen und Zelllinien. Alle diese Modelle haben ihre Vor- und Nachteile, die im Folgenden kurz erläutert werden. Gewebeschnitte aus Niere, Leber und Lunge stellen mit ihrer dreidimensionalen Architektur eine sehr nützliche Methode für Kurzzeit-Behandlungsstudien dar (De Kanter *et al.*, 2002), allerdings sind funktionelle Veränderungen, die nur in bestimmten Zelltypen vorkommen, in Gewebeschnitten sehr schwierig zu ermitteln (Ruegg, 1994) und die Zellen an der Oberfläche dieser Schnitte nehmen oftmals Schaden während der Präparation, so dass eine vernünftige Auswertung beeinträchtigt wird.

Bei perfundierten Nephronsegmenten ist ungünstig, dass einige Substanzen die tubuläre Oberflächenbeschaffenheit verändern und dieses System dadurch instabil machen. Bei isolierten Tubuli hingegen müssen die Substanzen erst bis ins Innere diffundieren, um eine Reaktion zu erzeugen. Von Nachteil ist dabei, dass dieser Prozess länger dauern kann als die Lebensdauer dieser Tubuli, die nur einige Stunden beträgt (Pfaller und Gstraunthaler,

1998). Im Großen und Ganzen haben sich in den letzten Jahren primäre Zellkulturen und die Kultivierung bestimmter Nierenzelllinien als *in-vitro*-Modell durchgesetzt. Zum Beispiel erforschten Hara-Chikuma und Verkman (2006) die Rolle von Aquaporin-1 in primären murinen proximalen Tubuluszellen bei der Migration dieser Zellen und deren Verhalten nach Toxineinwirkung. In primären Rattenzellen konnten neue Aspekte zur proapoptotischen Wirkung von polychlorierten Biphenylen erforscht werden (Santiago *et al.*, 2006). Lühe *et al.* (2003) beobachteten die Induktion gleicher Gene in primären proximalen Tubuluszellen der Ratte und der Rattenniere *in vivo* nach der Behandlung beider Modelle für ein oder drei Tage mit OTA. In einem weiteren *in-vitro*-Modell, der Rattennieren-Zelllinie NRK-52E, wurde z. B. festgestellt, dass Cadmium den Zellzyklus in der G2/M-Phase blockiert, der durch eine erhöhte Aktivität des Tumorsuppressorproteins *p53*, eine erhöhte Expression von Zellzyklus-Kinase Inhibitoren wie *p27* und *p21* und eine erniedrigte Expression der Zellzyklus-Kinasen Cdk1 und Cdk2 gekennzeichnet war (Xie und Shaikh, 2006). Ebenfalls konnte mittels der NRK-52E-Zellen beobachtet werden, dass Oxalat, welches als metabolisches Produkt von der Niere exkretiert wird und in höheren Konzentrationen zu oxidativem Stress und Zelltod führt, sowohl zu apoptotischem als auch zu nekrotischem Zelltod führt (Miller *et al.*, 2000). In Versuchen mit der humanen Nierenzelllinie HK-2 konnte gezeigt werden, dass Cyclosporin A (CsA), welches als Immunsuppressivum in der Transplantationsmedizin Einsatz findet, zur epithelialen mesenchymalen Transition und somit zur Nierenfibrose führt, und Mediatoren wie TGF-beta und CTGF induziert (McMorrow *et al.*, 2005). Diese Untersuchungen könnten neue Strategien aufzeigen, um die CsA induzierte Nierenfibrose zu verhindern.

Zuverlässige *in-vitro*-Modelle sind dringend notwendig. Die Entwicklung dieser Modelle wird durch verschiedene Gründe vorangetrieben. Im Wesentlichen sind dies ethische Gründe und die '3 R's': 'Reduction', 'Refinement' und 'Replacement', aber auch Gründe, wie Kosten- und Zeiteinsparung. Zuverlässige *in-vitro*-Modelle könnten in Zukunft entscheidend zur Reduzierung von *in-vivo*-Studien beitragen und nach entsprechender Validierung möglicherweise manche *in-vivo*-Experimente ganz ersetzen. Allerdings zeigen die Daten, dass die bisherigen *in-vitro*-Modelle die *in-vivo*-Situation nur z. T. widerspiegeln und dass nur ganz bestimmte Fragestellungen mit *in-vitro*-Systemen untersucht werden können. Beispielsweise wurde festgestellt, dass primäre Hepatozyten, aus Mensch oder Tier isoliert, in Kultur genommen und mit der Leber an sich verglichen, eine Reihe von leberspezifischen Eigenschaften verlieren (Boess *et al.*, 2003; Waring *et al.*, 2003). Gant und Zhang (2005) zeigten, dass sich das Expressionsprofil von primären hippocampalen neuronalen Zellen während der Kultivierung zunehmend veränderte und

somit nicht stabil war. Um diese Diskrepanzen zu beseitigen, sind weitere Untersuchungen und Verbesserungen unbedingt erforderlich.

1.2 Allgemeine Kanzerogenese und Nierenkanzerogenese

Für die Entstehung von Krebs wird eine Vielzahl von Möglichkeiten diskutiert. Die Entstehung von Krebs läuft in drei Phasen ab (Abb. 2): Initiation, Promotion und Progression (Borzelleca, 2001), wobei nur in der ersten und letzten Phase die strukturellen Veränderungen der DNA zu beobachten sind. Metabolismus, DNA-Schädigung und -Reparatur, sowie eine DNA-Schädigung fixierende Zellteilung sind die wichtigsten Abläufe in der Initiationsphase. Niedrige Dosen von Karzinogenen können unter anderem in dieser Phase sogar protektiv sein, was mit dem Begriff der Hormesis beschrieben wird (Henschler, 2006). Kritische Mutationen in bestimmten Genen, die möglicherweise in der Initiationsphase entstehen, können zur neoplastischen Transformation führen (Williams, 2001).

Eher reversible Veränderungen, wie z. B. die Aktivierung von proliferativen Signalwegen, sind die molekulare Basis der Tumorpromotion. Sowohl bei der Initiation als auch der Promotion scheint die Zellzyklusregulation wesentlich beteiligt zu sein. Das Tumorsuppressorgen *p53* spielt dabei eine entscheidende Rolle. Es verhindert die Progression des Zellzyklus nach einer Schädigung der DNA, z. B. nach Substanzeinwirkung, wodurch entweder der Schaden repariert werden oder die Zelle bei zu starker DNA-Schädigung in die Apoptose eintreten kann. Wenn nun aber das *p53*-Gen mutiert ist oder fehlt, kann der Zellzyklus nicht angehalten werden und die geschädigte DNA wird somit repliziert, was zu Mutationen in weiteren kritischen Genen führen kann. Das heißt, dass eine veränderte Zelle neue Eigenschaften und einen Vorteil gegenüber normalen Zellen erwerben kann, welches dann zum nächsten Schritt, der Progression, führt.

Die Phase der Progression beschreibt demnach die Entstehung und Manifestation einer karyotypischen Instabilität, die zur Mutation von weiteren Genen führt. Die Tumorprogression bedeutet den Übergang vom benignen Tumor bzw. der präneoplastischen Läsion zum malignen invasiven Tumor. Damit wird deutlich, dass eine Tumorzelle neben den oben genannten noch eine Reihe von neuen Eigenschaften gegenüber einer gesunden Zelle erworben hat: Dedifferenzierung, Verlust der Kontaktinhibition und Instabilität des Phänotyps. Zusätzlich kann eine Mobilisierung in den Blutkreislauf oder das lymphatische Gewebe und dadurch eine Ansiedelung in weiteren Geweben auftreten, welches dann zur Metastasenbildung führt.

Wie bereits erwähnt unterliegen die Krebszellen nicht mehr der normal vorherrschenden Kontrolle von Regulationsproteinen. Die kritischen Mutationen findet man in bestimmten Genen, die im Wesentlichen in zwei Klassen eingeteilt werden: Proto-Onkogene oder zelluläre Onkogene, wie z. B. *myc*, *fos*, *jun*, *ras*, *raf*, *src*, *met*, *sis*, *fgf*, und Tumorsuppressorgene, wie z. B. *RB-1* oder *p53*. Die Aktivierung der Onkogene und Inaktivierung der Tumorsuppressorgene geschieht beispielsweise durch Punktmutation, Insertion und Deletion, die aus der DNA-Synthese in Anwesenheit von Addukten resultieren kann, oder durch Veränderungen des Methylierungsstatus. Diese Gene sind in verschiedene Signalwege involviert, die dann nicht mehr den normalen Mechanismen der

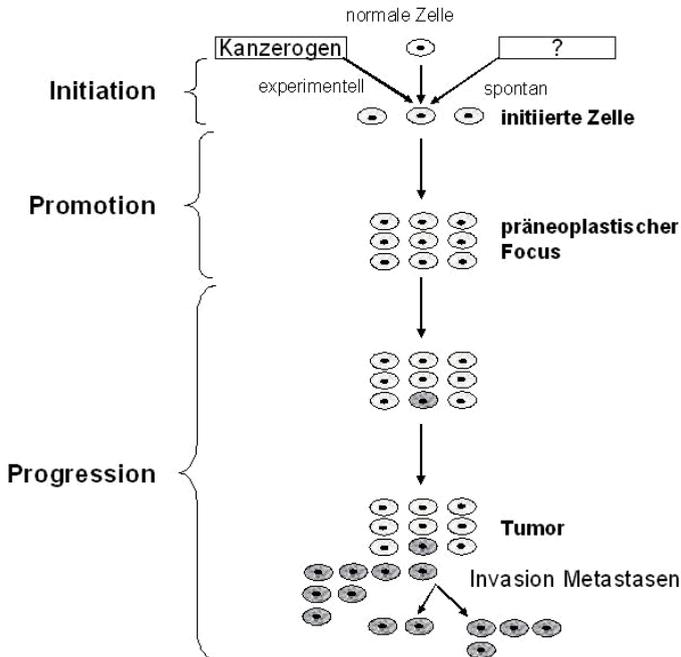


Abb. 2: Mehrstufenmodell der Kanzerogenese (verändert nach A. Ramstöck; Vortrag: Chemische Kanzerogenese)

Wachstumskontrolle unterliegen. Beispielsweise zeigte Hall 1994, dass *ras* für Guanosinriphosphatasen kodiert, die in Signaltransduktionswegen für die Kontrolle des Wachstums und der Differenzierung fungieren. Verschiedene Mutationen des Gens lösen eine dauerhafte Aktivierung aus, stören somit den natürlichen Aktivierungs- und Inaktivierungsmechanismus und dadurch auch die Regulationen von Wachstum und Differenzierung. Dem Tumorsuppressorgen *p53* kommt eine besondere Rolle zu, da es als

Wildtypgen eine neoplastische Transformation unterbinden kann. Heutzutage sind über 20000 Mutationen dieses Gens bekannt und in 50 % aller Krebsarten des Menschen liegt eine Mutation dieses Gens vor. Da dieses Tumorsuppressorgen in verschiedenen Signalwegen, wie Wachstums-Arrest, Apoptose, DNA-Reparatur und Differenzierung, involviert ist, stellen Veränderungen des Gens verschiedene kritische Ausgangspunkte dar, die wiederum neue 'Targets' und Therapiemöglichkeiten eröffnen (Hussain und Harris, 2006). Ein weiterer Mechanismus, der in Krebszellen aktiviert ist, die Telomeraseaktivität, ermöglicht die unbegrenzte Zellteilung. Sie verhindert den Verlust von genetischem Material an den Chromosomenenden, der normalerweise als Alterungsprozess in Körperzellen auftritt.

Allgemein unterscheidet man biologische, physikalische und chemische Faktoren, die die Entstehung von Krebs auslösen oder begünstigen. Als biologische Faktoren, die an einer Krebsentstehung beteiligt sein können, kommen vor allem Infektionen mit Würmern, Bakterien oder Viren in Betracht. Man hat herausgefunden, dass das Auftreten des Burkitt-Lymphoms in Verbindung mit Epstein-Barr-Virus-Infektionen steht und dass Infektionen mit dem Papillomavirus eine Rolle beim Gebärmutterhalskrebs spielen. Chronische Hepatitisinfektionen steigern nachweislich das Auftreten von Leberkrebs. Des Weiteren kann eine Infektion mit dem Magenbakterium *Helicobacter pylori* zu Lymphomen des Magens führen. Meist bringt der infizierende Organismus ein Fremdprotein in die Zelle ein, das in die normale Kontrolle der Zellproliferation eingreift. Weitere Faktoren, die zu einem erhöhten Krebsrisiko führen, sind angeborene genetische Veränderungen in bekannten oder noch unbekanntem Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen. Allerdings ist der prozentuale Anteil von Krebserkrankungen mit genetischem Hintergrund bei Erwachsenen recht niedrig, er beträgt nur 5-10 %. Als Beispiel seien Veränderungen des *BRCA1*- und *BRCA2*-Gens genannt, die bei der Entstehung von Brustkrebs entscheidend beteiligt sind (Boulton, 2006). Physikalische Ursachen, die zur Krebsentstehung führen können, sind z. B. ionisierende Strahlung, UV-Strahlen und Mineralfasern (Asbest). So kann es nach einer Strahlentherapie zur Bekämpfung eines Tumors, die erwartungsgemäß durch eine erhöhte Mutationsrate zum Absterben der Tumorzellen führt, aber auch unerwünschte Mutationen in den gesunden Zellen des Körpers verursacht, zur Ausbildung eines Sekundärtumors nach einer langen Latenzperiode kommen. Man unterscheidet die strukturellen Veränderungen der DNA, die durch UV-Einwirkung oder ionisierende Strahlung hervorgerufen werden: ersteres erzeugt Pyrimidindimere, wohingegen letzteres eher DNA-Strangbrüche verursacht.

Eine Reihe von chemischen Substanzen spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung von Tumoren. Sowohl synthetische als auch natürlich vorkommende Substanzen, die zur

Entstehung von Neoplasien führen, können auf verschiedene Art und Weise wirken. In der chemischen Kanzerogenese unterscheidet man genotoxische Kanzerogene, die mit der DNA direkt oder nach Umwandlung in einen reaktiven Metaboliten interagieren, wie z. B. 2-Nitrofluoren und Aristolochiasäure im Falle der Niere (Beije und Möller, 1998; Cui *et al.*, 1999), und nicht-genotoxische Kanzerogene, wie z. B. Ochratoxin A und Kaliumbromat (Chipman *et al.*, 1998; Turesky, 2005), die keine direkten DNA-Addukte bilden und Kanzerogenese über primär epigenetische Mechanismen induzieren.

Wie im letzten Absatz erwähnt, können manche genotoxischen Kanzerogene die DNA direkt angreifen, während andere zuerst durch Metabolisierung in ein reaktives Molekül umgewandelt werden müssen. Durch die Entdeckung dieses Mechanismus wurde die Wissenschaft der chemischen Kanzerogenese entscheidend vorangebracht. Am Beispiel der Ring-Hydroxylierung von 2-AAF (2-Acetylaminofluoren) konnte gezeigt werden, dass die Ausgangssubstanz nicht direkt kanzerogen war, sondern dass die durch Metabolismus entstandenen Elektrophile für die Mutationen verantwortlich waren (Stout *et al.*, 1980). Prinzipiell lässt sich die Metabolisierung von fremden, aber auch endogenen Substanzen in zwei Phasen einteilen. Der Phase-I-Metabolismus findet im ER mittels Cytochrom P450-Oxidasen und -Reduktasen, sowie durch Aminoxidasen statt. Generell kommt es dort zu einer Biotransformation, bei der die Substanz durch die Einführung eines Sauerstoffs polarer wird. Im Phase-II-Metabolismus laufen dann Konjugationsreaktionen ab, die in erster Linie im Cytosol stattfinden. Sowohl bei den Phase-I- als auch Phase-II-Reaktionen können hoch reaktive elektrophile Substanzen entstehen, die mit nukleophilen Zentren von Proteinen und Nukleinsäuren, z. B. der DNA, reagieren können. Bei der Reaktion mit DNA entstehen Addukte, die zu den erwähnten Mutationen führen können.

Ein Überblick über die bisher bekannten Mechanismen der Aktivierung von Kanzerogenen soll in den nächsten Abschnitten erfolgen.

Eine wichtige Rolle in der Karzinogenese spielen z. B. freie Radikale (Kovacic und Jacintho, 2001; Valko *et al.*, 2004). Eine Quelle für freie Radikale kann die Reduktion von molekularem Sauerstoff sein, welche z. B. bei der mitochondrialen Oxidation auftreten kann (Kowaltowski und Vercesi, 1999). Freie Radikal-Intermediate können aber auch im Phase-I-Metabolismus von chemischen Karzinogenen entstehen, z. B. bei der Metabolisierung von Chloroform durch CYP450-Monooxygenasen oder bei der Reduktion von Nitrobenzol. Ebenso wurden Radikale bei der Spaltung der Ester von heterozyklischen Aminen nach einer Phase-II-Konjugation nachgewiesen (Kovacic und Jacintho, 2001). Diese Radikale können dann direkt mit Makromolekülen reagieren. Die Aktivierung von Karzinogenen durch die Prostaglandin-H-Synthetase könnte eine weitere Möglichkeit darstellen, wobei die Oxidation mittels der Peroxidaseaktivität wiederum häufig zur

Entstehung eines freien Radikal-Produkts führt. Diesen Vorgang bezeichnet man als Co-Oxygenierung (Marnett, 1981) und konnte im Falle von 2-AAF gezeigt werden. Dieser Weg spielt vor allem eine Rolle in nicht-hepatischen Geweben, wie der Niere (Zenser *et al.*, 1981; Eling *et al.*, 1990). Hook und Ford (1983) fanden ebenfalls heraus, dass in der Niere die meisten Xenobiotika eine Aktivierung durch Metabolisierung durchlaufen. Obwohl nur sehr wenige Daten bisher dazu bekannt sind, steht die genannte Prostaglandin-H-Synthetase in Verbindung mit der Aktivierung von FNT (2-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]-hydrazide), einem bekannten Karzinogen für die Niere (Walters *et al.*, 1986). Normalerweise werden Substanzen durch die Konjugation mit Glutathion, katalysiert durch Glutathion-S-Transferasen, inaktiviert und ausgeschieden. In einigen Fällen kann dies aber auch zur metabolischen Aktivierung führen, wie z. B. bei Haloalkanen und -alkenen, die in einigen Organen Neoplasien induzieren – am häufigsten in der Niere (Monks *et al.*, 1990, Brüning *et al.*, 1997), wobei der endgültige Mechanismus auch hier noch unklar ist.

Ein Grund für das dauerhafte Bestehen von DNA-Addukten, und somit Veränderungen der DNA bei genotoxischen Wirkmechanismen, ist oftmals das Versagen der DNA-Reparaturmechanismen. Über 100 Gene sind in DNA-Reparaturmechanismen involviert und sorgen normalerweise für die Erkennung und die Reparatur schädigender Veränderungen. Als ein Beispiel für Reparaturenzyme der DNA seien Alkyltransferasen genannt, die z. B. die Alkylgruppen vom 0⁶-Guanin entfernen können (Hansen *et al.*, 2007). Ein weiterer Reparaturmechanismus, der bei den oben beschriebenen, durch UV-Strahlung verursachten Pyrimidindimere greift, ist die Nukleotidexzisionsreparatur (Van der Wees, 2007). Umar *et al.* (1994) konnten zeigen, dass ein weiterer DNA-Reparaturmechanismus, die Mismatch-Reparatur, in Krebs-Zelllinien defekt war und somit möglicherweise auch mit den humanen Krebsarten in Verbindung stehen könnte.

Die beschriebene metabolische Aktivierung ist für den Wirkmechanismus und auch die Organ- und Speziespezifität von genotoxischen Kanzerogenen entscheidend. Dagegen sind epigenetische bzw. nicht-genotoxische Karzinogene eher nicht reaktive Substanzen und bilden auch nach Metabolisierung keine DNA-Addukte. Für nicht-genotoxische Kanzerogene diskutierte Mechanismen sind z. B. die Aktivierung der Zellproliferation, die Hemmung der Apoptose, die Schwächung des Immunsystems und die dadurch verringerte Erkennung von entarteten Tumorzellen und Veränderungen in der Hormonregulation. Ein Spezialmechanismus, der nur bei männlichen Ratten auftritt, ist die Akkumulation des $\alpha_{2\mu}$ -Globulins durch bestimmte Stoffe, wie z. B. *d*-Limonen oder 1,4-Dichlorobenzen. Dies führt zur verstärkten Zellproliferation, einer weiteren Akkumulation des $\alpha_{2\mu}$ -Globulins und schließlich zur Degeneration der Zellen.

Sogenannte promovierende Substanzen können die Entwicklung von Tumoren in präinitiierten Zellen vorantreiben, im Prinzip durch die gleichen Mechanismen wie für komplette nicht-genotoxische Kanzerogene diskutiert. Der Unterschied zu kompletten Kanzerogenen ist, dass für promovierende Substanzen eine initiiierende Mutation in der Zielzellen-DNA vorhanden sein muss. Bei kompletten nicht-genotoxischen Kanzerogenen ist vorstellbar, dass indirekte DNA-Schäden durch z. B. substanzinduzierten oxidativen Stress entstehen, die somit zu initiiierenden Mutationen führen. Promovierende Substanzen können beispielsweise in bestimmte Signalwege eingreifen und dadurch die Genexpression verändern. TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), ein bekannter Tumorpromotor, führt zur konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase C, die normalerweise als Mediator nach Aktivierung von Tyrosinkinaserzeptoren und G-Protein gekoppelten Rezeptoren in der Zellmembran viele intrazelluläre Signalwege aktiviert (Ashendel, 1985). TCDD (2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-1,4-dioxin) bindet und aktiviert den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AHR) - ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor - und verstärkt somit die Transkription von Genen mit einer bestimmten Erkennungssequenz (HRE). Die Wirkung von promovierenden Substanzen scheint also auf die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren zurückzuführen zu sein, was eine Erklärung für die Gewebsspezifität bestimmter Substanzen unterstützt.

Eine Klassifizierung von Substanzen bezüglich ihres kanzerogenen Potentials besonders für den Menschen, aber auch für Tiere, wird von der IARC (International Agency for Research on Cancer), von der EPA (Environmental Protection Agency) und der EC (European Commission) durchgeführt. Durch die ständige Neuentwicklung von Chemikalien und Medikamenten ist es notwendig, geeignete Testsysteme zu etablieren, mit denen die Identifizierung und Klassifizierung von Substanzen vorgenommen werden kann, um die Belastung und die Gefahren für die Menschen möglichst gering zu halten. Heute weiß man, dass einige Stoffe, denen der Mensch am Arbeitsplatz ausgesetzt ist (z. B. beim Steinkohleabbau), oder die der Mensch mit der Nahrung zu sich nimmt (z. B. Ethanol und Aflatoxine), erheblich zur Krebsentstehung beitragen. Weitere Karzinogene für den Menschen stellen zum Beispiel Asbest und Vinylchlorid dar, wie auch verschiedene Chemotherapeutika (z. B. Cisplatin) und Immunsuppressiva wie Cyclosporin A. Zu den Risikofaktoren für Brustkrebs zählt unter anderem die Einnahme von synthetischen oralen Kontrazeptiva.

Die Identifizierung und Charakterisierung von potentiell krebserregenden Substanzen für den Menschen wird in Tierstudien vorgenommen. Epidemiologische Studien können zwar zur Entdeckung von Kanzerogenen des Menschen beitragen, lassen aber durch die Vielfältigkeit der Faktoren nicht immer eine eindeutige Schlussfolgerung zu und sind sehr

zeitaufwendig. Das kanzerogene Potential einer Substanz wird deshalb in einer Serie von Kurzzeit-*in-vitro*- und *in-vivo*-Tests und Langzeit- *in-vivo*-Studien (1,5 – 2 Jahre) festgestellt. Die *in-vitro*-Kurzzeit-Tests können eine Induktion von Gen-, Chromosom- oder Genom-Mutationen messen und somit genotoxische Mutagene erkennen, die *in vivo* potentiell zur Tumorentstehung führen. Ein Genmutations-Kurzzeittest ist der Ames-Test (Ames *et al.*, 1975), bei dem Bakterien, die aufgrund von Genmutationen ein Defizit in der DNA-Reparatur besitzen und nicht ohne Histidin wachsen können, mit verschiedenen Dosen der Testsubstanz behandelt werden. Danach wird die Rate der Reversion in einen histidinpositiven Phänotyp aufgrund einer substanzinduzierten Mutation ermittelt. Weil viele Substanzen erst durch Metabolisierung im Säugerorganismus in das eigentliche reaktive Molekül umgewandelt werden, und Bakterien das entsprechende Enzymsystem dazu nicht besitzen, wird der Ames-Test auch mit Rattenleberextrakt als CYP450-Enzym-Quelle und einem NADPH regenerierenden System durchgeführt, um eine metabolische Aktivierung der Testsubstanz zu ermöglichen. Der sogenannte S9-Extrakt stammt aus Lebern von Ratten, die mit einem CYP450s induzierenden Reagenz (Aroclor 1254) behandelt wurden, und entspricht dem Überstand nach Zentrifugation des Leberhomogenats mit $9000 \times g$ (McCann *et al.*, 1975). Insgesamt zeigen manche der *in-vitro*-Kurzzeittests eine hohe Falsch-Positiv-Rate (Kirkland *et al.*, 2006) und nur eine 30-80 %ige Übereinstimmung mit dem als Goldstandard geltenden Lebenszeit-*in-vivo*-Kanzerogenesetest bei Ratten und Mäusen, auch 'Bioassay' genannt. Dieser sieht Testgruppen mit 50 Ratten oder Mäusen beider Geschlechter pro Gruppe vor, die mit 2-3 Dosen der Substanz behandelt werden. In Vortests werden die akute Toxizität, der Weg der Verabreichung und die maximal tolerierte Dosis (MTD) bestimmt. Vainio *et al.* (1985) beobachteten, dass die meisten Human-Karzinogene auch in Tierstudien kanzerogen waren.

Umgekehrt gibt es viele Substanzen, die in Ratten über einen nicht-genotoxischen Mechanismus Tumore induzieren, aber nicht humankanzerogen sind, da dieser Mechanismus meistens nagetierspezifisch ist. Beispiele für neoplastische Läsionen, die ausschließlich in Nagern beobachtet werden, sind Neoplasien der Schilddrüse (McClain, 1989) und die Akkumulation von $\alpha_2\mu$ -Globulin in der männlichen Rattenniere (Hamamura *et al.*, 2006), was zu Nierentumoren führen kann. Dies stellt die Relevanz der Extrapolation von *in-vivo*-Tierstudien zur humanen *in-vivo*-Situation in Frage. Die Entwicklung eines humanen *in-vitro*-Testsystems erscheint unter diesem Gesichtspunkt sinnvoll, allerdings sind bisher noch nicht ausreichende Daten generiert worden, um den Einsatz eines validierten Human-Zellmodells für Kanzerogenesestudien in Betracht zu ziehen.

1.3 Nierenkanzerogene, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Die einzelnen in dieser Arbeit verwendeten Substanzen werden im Folgenden kurz vorgestellt. Details zum Wirkmechanismus werden in der Diskussion zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieben.

Ochratoxin A (OTA) wird von *Aspergillus*-Arten und einer *Penicillium*-Art produziert und kommt als Kontamination in Nahrungsmitteln wie Kaffee, Nüssen, Rotwein und vielen anderen vor (Walker, 2002; Blesa *et al.*, 2006). Stoev *et al.* (2001) zeigten, dass OTA zu den auslösenden Substanzen von Nephropathien in Schweinen gehört. Da die Niere des Schweins der des Menschen sehr ähnlich ist, wurde daraus geschlossen, dass OTA auch im Zusammenhang der BEN ('Balkan endemic nephropathy') stehen könnte. Verschiedenste Mechanismen sind in der Literatur im Zusammenhang mit OTA induzierter Toxizität und Kanzerogenität beschrieben, die im Wesentlichen in der Diskussion dieser Arbeit aufgegriffen werden. Die Karzinogenität von OTA wurde in vielen Studien gezeigt (Bendele *et al.*, 1985; Boorman *et al.*, 1992; Castegnaro *et al.*, 1998), aufgrund dessen es auch als Humankanzerogen eingestuft wurde.

Kaliumbromat (KBrO₃) wurde in Kosmetika und als Nahrungsergänzungsmittel verwendet, z. B. beim Brotbacken, kommt aber auch als Nebenprodukt bei der Desinfektion von Wasser mittels Ozonierung vor (Umemura *et al.*, 2004). Bezüglich der Genotoxizität von Kaliumbromat zeigten Kaya und Topaktas (2007) in einer neuen Studie, dass sowohl eine erhöhte Inzidenz für Schwesterchromatidaustausch als auch eine erhöhte Mikronukleusbildung zu erkennen war. Allerdings wird in den meisten Studien eher eine Involvierung von oxidativem Stress als Karzinogenesemechanismus vermutet. Kaliumbromat zeigte ebenfalls in einigen Studien ein karzinogenes Potential in der Rattenniere (Kurokawa *et al.*, 1986, 1990; De Angelo *et al.*, 1998; Delker *et al.*, 2006) und wurde deshalb in dieser Arbeit verwendet.

Die **Aristolochiasäure (AA)** kommt in verschiedenen Pflanzenteilen von *Aristolochia*-Arten (Pfeifenwinde) vor. Man unterscheidet zwischen Aristolochiasäure I und Aristolochiasäure II, welche die demethoxylierte Form der AA I darstellt. Die als chinesische Arzneipflanzen verwendeten *Aristolochia*-Arten verursachen bei der Einnahme die sog. „Chinesische-herb nephropathy“, die anfänglich zur Ausscheidung von Molekülen, wie β 2-Mikroglobulin (Kabanda *et al.*, 1995), zur Glucosurie (Reginster *et al.*, 1997) und zur Endopeptidase-Enzymurie (Nortier *et al.*, 1997) führt, und sich später zu einer aggressiven Nierenfibrose entwickelt. Die anfängliche Molekülausscheidung spricht dafür, dass proximale Tubuluszellen das erste Angriffsziel sind. Aristolochiasäure zählt zu den genotoxischen Nierenkarzinogenen, da sie in Tests wie dem Ames-Test und

Micronucleustest als positiv befundet wurde (Robisch *et al.*, 1982; Kevekordes *et al.*, 2001). Die Kanzerogenität im Menschen wurde durch einige Fälle aufgedeckt, in denen es zu einer Verwechslung mit einer anderen Arzneipflanze in Präparaten gekommen war, da ihr chinesischer Name sehr ähnlich klingt. Auch bei der Aristolochiasäure sind die molekularen Mechanismen, die letztendlich zu den pathologischen Ausprägungen führen, nicht ganz geklärt, werden aber im späteren Teil der Arbeit diskutiert. AA war in einigen Tierkanzerogenitäts-Studien positiv (Mengs *et al.*, 1982, 1983; Nortier *et al.*, 2000; Cosyns *et al.*, 2001).

N-Nitrosomorpholin (NNM) kommt bei der Gummi- und Reifenherstellung vor. Außerdem sind Dichlormethan und Chloroform mit N-Nitrosomorpholin kontaminiert. Brunneemann *et al.* (1982) berichteten von dem Vorkommen des N-Nitrosomorpholins in Schnupftabak. Zielorgane sind hauptsächlich die Niere und die Leber. N-Nitrosomorpholin zeigte sich karzinogen nach oraler Gabe mit dem Trinkwasser und auch nach intraperitonealer Applikation bei Ratten (IARC, 1978; Lijinsky *et al.*, 1988). Bannasch *et al.* (1979) beschäftigten sich hauptsächlich mit NNM als Verursacher der chemischen Leber- und Nierenkanzerogenese. Aufgrund der Positivität im Ames-Test wurde N-Nitrosomorpholin als genotoxisches Kanzerogen identifiziert.

2-Nitrofluoren (2NF) gehört zu den nitrierten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (nitro-PAHs) und kommt als Umweltgift in Abgasen von Diesel und Kerosin als Folge ihrer unvollständigen Verbrennung vor. Diese nitro-PAHs bilden ca. 12 % der Abgase (Schuetzle *et al.*, 1983). 2NF gilt als Modellsubstanz für Nitroarene und wurde von der IARC als karzinogen eingestuft (1989). Außerdem wurde es in einigen verschiedenen *in-vitro*-Tests auf Genotoxizität positiv befundet (Beije und Möller, 1988). Bei *in-vivo*-Genotoxizitätstests hingegen schien es nur nach oraler Aufnahme genotoxische Wirkungen zu erzielen, nicht jedoch nach intraperitonealer Applikation (Heussen *et al.*, 1990). In einer Studie zeigte sich, dass nach der Applikation von drei verschiedenen Dosen 2NF für elf Monate und einer Phase von 13 Monaten ohne 2NF-Gabe Tumore in der Niere zu beobachten waren. Diese konnten bei 50 % der Tiere, die mit der höchsten Dosis, und bei 79 % der Tiere, die mit der mittleren Dosis behandelt worden waren, festgestellt werden (Cui *et al.*, 1995). Weitere Tumore wurden in der Leber und dem Magen gefunden. Auch bei diesem Karzinogen ist noch nicht ganz geklärt, über welchen Mechanismus 2NF seine kanzerogene Wirkung ausübt, jedoch scheint die Reduzierung der Nitrogruppe entscheidend für die Mutagenität von 2NF zu sein. Ueda *et al.* (2001) zeigten, dass 2NF hauptsächlich zu 2-Aminofluoren und dessen acylierten Metaboliten umgewandelt wird.

Ein Vergleich dieser Karzinogene soll Unterschiede zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen aufzeigen und einen molekularen Einblick in deren Wirkungsweise geben.

1.4 Toxicogenomics

Um das Gefahrenpotential einer Substanz zu bestimmen, werden nach vorgegebenen Richtlinien (wie z. B. der OECD oder FDA) bestimmte Testverfahren durchgeführt. Diese beinhalten sowohl Tests auf akute aber auch auf chronische Toxizität mittels histopathologischer und klinisch-chemischer Untersuchungen. Diese Untersuchungen beschreiben zwar die toxischen Veränderungen, erklären in vielen Fällen aber nicht den molekularen Mechanismus, der der beobachteten Toxizität zugrunde liegt. Ein neueres Verfahren, das dafür einsetzbar wäre, ist Toxicogenomics. Durch die gleichzeitige Messung von Veränderungen in mehreren tausend Genen unter Verwendung von Microarrays stellt Toxicogenomics eine gute Methode dar, um Interaktionen jeglicher Art und frühe Veränderungen in der Expression von Genen (Transcriptomics), die z. B. durch eine Substanz hervorgerufen werden können, zu untersuchen. Dadurch erhofft man sich, die molekularen Veränderungen, die zu einem spezifischen Toxizitätsmechanismus beitragen, aufschlüsseln zu können. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, spezifische Biomarker zu entdecken, die dann für prädiktive Ansätze herangezogen werden könnten. Ebenso eignet sich diese Methode sehr gut, um die Unterschiede zwischen verschiedenen Testmodellen aufzuklären, wie z. B. zwischen verschiedenen Spezies, oder zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen. Wichtig ist, dass das Design eines Toxicogenomics-Experiments, mehr noch als bei anderen Verfahren, sehr gut geplant werden sollte – angefangen bei der Anzahl der zu verwendenden Chips, der Replikate, der Zeitpunkte und Dosen, dem Modell und schlussendlich der Analyse der Daten. Denn schon kleinste Veränderungen können Unterschiede im Genexpressionsprofil hervorrufen (Gant und Zhang, 2005). Auch wenn eine gewisse Vorsicht im Studiendesign und im Umgang mit der statistischen Analyse der Daten geboten ist, stellt Toxicogenomics in jedem Fall eine hilfreiche Methode für die Toxikologie dar, die sowohl im mechanistischen (Yang *et al.*, 2004, Lord *et al.*, 2006) als auch prädiktiven (Ruepp *et al.*, 2005) Bereich eingesetzt werden kann.

Eine wichtige Rolle kommt Toxicogenomics im Bereich der '3 R's' zu. Denn durch eine frühe Identifizierung von charakteristischen Veränderungen eines Genexpressionsprofils in Kurzzeitstudien könnten Langzeitstudien ersetzt, oder zumindest die Zahl der für Studien benötigten Tiere verringert werden. Des Weiteren ist die gleichzeitige Messung vieler

Parameter ein Vorteil. Mit Genexpressionsprofilierung kann eine detaillierte Charakterisierung verschiedener *in-vitro*-Modelle helfen, diese *in-vivo*-ähnlicher zu machen, bzw. diese gezielter einzusetzen. Dies könnte letztendlich dann wieder zur Reduktion der Tierstudien beitragen. Einige Beispiele zur Charakterisierung von *in-vitro*-Modellen mittels Genexpressionsanalysen wurden schon veröffentlicht. Dazu gehören die Studien von Waring *et al.* (2003) zu Humanhepatozyten, und Boess *et al.* (2003) zu Rattenhepatozyten. Auch die Untersuchung eines der in dieser Arbeit beschriebenen *in-vitro*-Nierenmodelle wurde schon veröffentlicht (Weiland *et al.*, 2007).

Auch für die Untersuchung spezifischer Mechanismen bezüglich der Entwicklung von Tumoren kann Toxicogenomics eingesetzt werden. Einige Studien wurden dazu schon berichtet, wie z. B. die Identifizierung bestimmter Signalwege im peritonealen Mesotheliom (Kim *et al.*, 2006) und auch im der renalen Tumorentstehung nach Kurzzeitbehandlung von Eker- und Wildtypmatten (Stemmer *et al.*, 2007). Ebenso findet man derzeit einige Publikationen mit einem prädiktiven Einsatz von Toxicogenomics. Im Bereich Kanzerogenese existieren auch einige Arbeiten, die sich mit den Genexpressionsanalysen von Tumoren aus Patienten beschäftigen, um eben jene zu klassifizieren und eine Aussage und Prognose durchführen zu können, ob eine gute Heilungschance oder eher eine hohe Wahrscheinlichkeit zur Metastasenbildung besteht. Ebenfalls können Expressionsprofile zeigen, ob Patienten gegenüber einer bestimmten Therapie empfänglich sind oder nicht. Rhodes *et al.* (2004) konnten mittels der Microarray-Technik in mehr als 3700 Proben verschiedener Krebsarten gemeinsame transkriptionelle Veränderungen von Genen identifizieren, die den Schluss zuließen, dass ähnliche Prozesse in Krebszellen verschiedenen Ursprungs für deren Undifferenziertheit verantwortlich sind. In einer anderen Studie konnten bestimmte Genmuster identifiziert werden, die in der Resistenz gegenüber Docetaxel, einem sehr häufig eingesetzten und wirksamen Mittel gegen Brustkrebs, eine große Rolle spielen (Chang *et al.*, 2003). Die molekulare Charakterisierung von Tumoren mit Hilfe der Genexpressionanalyse ist besonders für diagnostische Gesichtspunkte sehr hilfreich, um zum einen neue Targets für die Medikamentenentwicklung zu finden und zum anderen Diagnosemöglichkeiten zu identifizieren, die z. B. mit Hilfe von molekularen Biomarkern Therapieprognosen erstellen könnten.

1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Da die Niere ein wichtiges Zielorgan für viele krebserregende Substanzen darstellt, wurde in der folgenden Arbeit mittels der Microarray-Technik eine mechanistische Analyse der

Effekte von ausgewählten Nierenkarzinogenen durchgeführt. Zuerst wurden die Genexpressionsprofile verschiedener Kanzerogene, die entweder als genotoxisch oder nicht-genotoxisch beschrieben wurden, nach Behandlung von Ratten *in vivo* miteinander verglichen. Durch die mechanistische Analyse dieser Daten sollte versucht werden, die Unterschiede zwischen der genotoxischen und nicht-genotoxischen Wirkungsweise aufzuklären. Ebenfalls sollten bereits bekannte Toxizitätsmechanismen durch diese Technologie bestätigt werden. Um herauszufinden, ob schon sehr früh erste auffällige Veränderungen auf dem Level der Genexpression zu finden sind, wurde dieser Vergleich in Kurzzeitstudien durchgeführt. Die Analyse dieser Daten könnte somit im Sinne der '3 R's' den Einsatz von Langzeit-Tierstudien reduzieren.

Da allerdings aus verschiedenen Gesichtspunkten, wie Ethik, Tierschutz, Kosten und Zeit, die Entwicklung von aussagekräftigen *in-vitro*-Modellen heutzutage unabdingbar ist, folgte im weiteren Teil der Arbeit die Analyse verschiedener *in-vitro*-Modelle nach Behandlung mit den oben genannten Nierenkanzerogenen.

Zunächst sollte mittels der Microarray-Technologie der Vergleich zwischen primären proximalen Tubuluszellen der Ratte und der Rattenniere *in vivo* erfolgen, um das *in-vitro*-Modell umfassend zu charakterisieren. Dazu sollten zunächst sechs verschiedene Zeitpunkte nach der Isolation der primären proximalen Tubuluszellen der Ratte mit der Rattenniere bzw. dem Rattenkortex verglichen und mittels Affymetrix RAE230A GeneChips® untersucht werden. Die Analyse der deregulierten Gene sollte sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten zwischen den isolierten proximalen Tubuluszellen und dem Rattenkortex *in vivo* aufzeigen.

Ein Vergleich verschiedener *in-vitro*-Systeme für die Niere mittels Microarrays sollte nach der Behandlung mit OTA Aufschluss über die Vergleichbarkeit der Systeme untereinander und mit *in vivo* geben. Die Untersuchungen dieser Doktorarbeit wurden im Rahmen des EU-Projektes *Predictomics* durchgeführt. Dieses Projekt benutzt eines der hier zu charakterisierenden *in-vitro*-Nierenmodelle, die humane HK-2 Zellenlinie, um über Genexpressionsanalyse und weitere Untersuchungen nach Behandlung dieser Zellen mit einer Reihe von Nierentoxinen Marker für Nierentoxizität zu finden. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, die auch für *in-vivo*-Studien benutzten Nierenkarzinogene in diesem humanen Nierenmodell zu analysieren, und durch einen Vergleich aller Daten die Vor- und Nachteile von *in-vitro*-Nierenmodellen zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

- ◆ Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG (H+L), 2 mg/ml; Molecular Probes® Invitrogen Detection Technologies, Invitrogen GmbH Technologiepark Karlsruhe, Deutschland
- ◆ Ammoniumacetat (7,5 M); Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- ◆ Aristolochiasäure (A9451); Sigma
- ◆ Biotinyliertes - anti Streptavidin (0,5 mg in 1 ml Wasser lösen); Fa. Vector Laboratories, P/N BA-0500
- ◆ Bisbenzimid (B2261); Sigma
- ◆ BSA Fraktion V; Sigma
- ◆ BSA, Fraktion V (A9576); Sigma
- ◆ BSA acetyliert (50 mg/ml); Invitrogen GmbH
- ◆ CaCl₂ (wasserfrei); Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
- ◆ Casy® clean; Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland
- ◆ Casy® ton; Schärfe System GmbH
- ◆ Collagenase IV; Sigma
- ◆ Distilled Water, DNase; RNase free; Gibco® Cell Culture Systems, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- ◆ DMEM (ohne Glukose); Gibco® Cell Culture Systems
- ◆ DMSO; Sigma
- ◆ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; D2662); Sigma
- ◆ EDTA (E4378); Sigma
- ◆ EGF, epidermal growth factor (200 µg) (E9644); Sigma
- ◆ Eisessig (10 mM); Merck
- ◆ Ethanol; Merck
- ◆ Fötale Kälberserum (FCS); PAA Laboratories GmbH, A-4020 Linz; Austria
- ◆ Fötale Rinderserum (FBS; Cat.No: S1810); Biowest, Nuaille, Frankreich
- ◆ Glutamax (200 mM); Gibco® Cell Culture Systems
- ◆ Glutamin (200 mM) (G7513); Sigma

- ◆ HAM's F12 Supplement; Gibco® Cell Culture Systems
- ◆ HBSS (Hank's Balanced Salts Solution without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) (14170-088); Gibco® Cell Culture Systems
- ◆ Hepes (1M) (H0887); Sigma
- ◆ Heringssperma DNA (10 mg/ml); Sigma
- ◆ Hydrocortison (H0135); Sigma
- ◆ IgG (10 mg, in 1 ml PBS lösen) (I-5256); Sigma
- ◆ Isopropanol; Merck
- ◆ ITS (Insulin, Transferrin, Natriumselenit: je 25 mg) (I1884); Sigma
- ◆ Kaliumbromat (309087); Sigma
- ◆ β -Mercaptoethanol; Sigma
- ◆ MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) Natriumsalz; Sigma
- ◆ MES-Monohydrat; AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- ◆ Methanol; Merck
- ◆ MTT ((3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide) (M2128); Sigma (gelöst in PBS in 5 mg/ml; sterilfiltriert; 4 °C)
- ◆ Narcoren® (Natriumpentobarbital 160mg/mL); Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
- ◆ Natriumchloridlösung, isotonisch, steril; Fresenius AG, Bad Homburg, Deutschland
- ◆ Natriumchloridlösung (5 M); Sigma
- ◆ Natriumdodecylsulfat (SDS); Sigma
- ◆ N-Cadherin; BD Biosciences Heidelberg, Germany
- ◆ 2-Nitrofluoren (N16754); Sigma
- ◆ N-Nitrosomorpholin (N7382); Sigma
- ◆ Ochratoxin A; Sigma
- ◆ Penicillin/Streptomycin-Lösung (P4333: 10,000 units/ml penicillin and 10 mg/ml Streptomycin.); Sigma
- ◆ Phosphate buffered saline with Ca^{2+} and Mg^{2+} (PBS); PAA Laboratories GmbH, Wiener Str. 131, A-4020 Linz, Austria
- ◆ 2-Propanol; Merck
- ◆ Proteinase K; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- ◆ qPCR™ Mastermix Plus for SYBR® Green I; Eurogentec Deutschland GmbH

-
- ◆ RNA 6000 Ladder; Ambion Inc., Austin, Texas
 - ◆ RNALater; Qiagen GmbH
 - ◆ Resazurin (R7017) oder (TOX8); Sigma
 - ◆ Salzsäure (1M); Merck
 - ◆ Salzsäure, rauchend; Merck
 - ◆ SSPE 20 × (3 M Natriumchloride, 0,2 M Natriumdihydrogenphosphate, 0,02 M EDTA); Invitrogen
 - ◆ Streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate (SAPE, 1mg/mL); Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies
 - ◆ TE-Puffer RNase frei 20 ×, 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 2,5 (25 ml); Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies
 - ◆ Tris-HCl-Puffer (1 M); pH 7.4; Sigma
 - ◆ Triton X-100; Fluka (Sigma)
 - ◆ Trypsin-EDTA Lösung (0,25 %) (T4049); Sigma
 - ◆ 10 % Tween 20; BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- ◆ ABI Prism[®] Optical Adhesive Covers; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- ◆ ABI Prism[®] 96-Well Optical Reaction Plates with Barcode; Applied Biosystems
- ◆ Biocoat[™] Collagen-I-coated 24-Well plates; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- ◆ Biocoat[™] Collagen-I-coated culture slides (2 und 4 Kammern); BD Biosciences
- ◆ Combitips plus 10 ml/5 ml/0,5 ml; Eppendorf AG, Hamburg; Deutschland
- ◆ Deckgläser (24 x 24 mm); Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland
- ◆ Einwegkanülen (20G); Introcan
- ◆ Einwegskalpelle, steril (Cutfix); Aesculap AG & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland
- ◆ Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml); BD Biosciences
- ◆ Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml); Eppendorf AG
- ◆ Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml); BD Biosciences
- ◆ Gaze: 135 µm; Udo Fleischhacker GmbH
- ◆ Gewebekulturflaschen, T75; BD Biosciences

- ◆ Kryo-Röhrchen (1 ml, 3 ml, 5 ml); Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
- ◆ MATRIX Pipettenspitzen (205 µl, 12,5 µl); MATRIX Lower Meadow Road, Brooke Park, Handforth, Wilmslow Cheshire, SK9 3LP, UK
- ◆ MicroAmp®; Applied Biosystems
- ◆ Microtest™ Tissue Culture Plate (96 well); BD Biosciences
- ◆ Petrischalen; BD Biosciences
- ◆ Pipetten, gestopft, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml); BD Falcon
- ◆ Pipetten, gestopft, steril, breite Öffnung (5 ml, 10 ml); BD Falcon
- ◆ Pipetten, gestopft (10 ml, 25 ml); Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- ◆ Pipettenspitzen, steril (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl, 2500 µl); Eppendorf, Biozym
- ◆ Pipettenspitzen, steril, 250 µl; Bioclean, RAININ, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
- ◆ Pipettenspitzen, 20 µl; ART® 20 Pipet Tips, Molecular Bio Products, Inc., San Diego, CA
- ◆ Pipettenspitzen, 10 µl; Biozym Scientific GmbH
- ◆ QIAshredder™ (250); QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
- ◆ Sterilfiltersystem (250 ml, 500mL, 1000mL); Corning® Vakuum Filter Systeme
- ◆ UV-Star® 384-Well-Platten; Greiner Bio-One GmbH
- ◆ Zellsiebe, 70 µm; BD/Falcon

2.1.3 Kits und Microarrays

- ◆ Bio-Array™ *HighYield*™ RNA Transcript Labeling Kit (TA), 10 labeling reactions; Enzo Life Sciences, Inc. 60 Executive Boulevard, Farmingdale, NY 11735
- ◆ cDNA Doppelstang Synthese Kit; Life Technologies It.
- ◆ Clonetics® REGM™ SingleQuots®; Cambrex Bio Science Walkersville, Inc. Walkersville, MD USA
- ◆ Cytotoxicity Detection Kit (Cat. No. 11644793001); Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
- ◆ GeneChip® Eukaryotic hybridization Control Kit; Enzo Life Sciences, Inc. 60 Executive Boulevard. Farmingdale, NY 11735

-
- ◆ GeneChip® Microarray; Rat Expression, Array 230A; Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA 95051 USA
 - ◆ GeneChip® Microarray; Human Expression, Array 133 Plus2; Affymetrix
 - ◆ GeneChip® Sample Cleanup Module, developed and manufactured by Qiagen; Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA 95051 USA
 - ◆ One cycle Kit; Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA 95051 USA
 - ◆ RiboGreen™ RNA Quantitation Kit; Molecular Probes, Leiden, The Netherlands
 - ◆ RNA 6000 Nano Chips; Agilent Technologies GmbH Deutschland; 76337 Waldbronn, Deutschland
 - ◆ RNA 6000 Nano Reagents & Supplies; Agilent Technologies GmbH Deutschland; 76337 Waldbronn, Deutschland
 - ◆ RNase free DNase Set; Qiagen
 - ◆ RNeasy Mini Kit; QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
 - ◆ RNeasy Micro Kit; QIAGEN GmbH, D-40724 Hilden
 - ◆ Superscript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA 92008
 - ◆ SYBR® Green PCR Core Reagent; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.4 Geräte

- ◆ ABI Prism® 7900HT Sequence Detection System; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- ◆ Affymetrix 3000 Scanner; Affymetrix Inc. Santa Clara, CA 95051 USA
- ◆ Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies GmbH Deutschland; 76337 Waldbronn, Deutschland
- ◆ Brutschrank BBD 6220; Heraeus
- ◆ Casy® I Cell Counter; Schärfe-System, Reutlingen, Deutschland
- ◆ CytoFlour™ II, Fluorescence Multi-Well Plate Reader; Applied Biosystems (PerSeptive Biosystems)
- ◆ Eppendorf Zentrifuge 5415R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- ◆ Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf
- ◆ Gene Chip® Scanner 3000; Affymetrix
- ◆ GeneChip® Fluidic Station 400; Affymetrix

- ◆ GeneChip® Hybridization oven 640; Affymetrix
- ◆ GPKR Zentrifuge; Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland
- ◆ Lambda Scan 200; MWG-Biotech AG, Ebersberg, Deutschland
- ◆ Leica Mikroskop; Leitz; DMRB und DMRIB
- ◆ Leica Fotokamera Q500MC
- ◆ MATRIX *Impact2*® (250 µl, 12,5 µl); MATRIX Lower Meadow Road, Brooke Park, Handforth, Wilmslow Cheshire, SK9 3LP, UK
- ◆ Plattenschüttler TPM-2; Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
- ◆ Schwingmühle MM200; Retsch GmbH, Haan, Deutschland
- ◆ SPECTRA max PLUS; Molecular Devices Corporation
- ◆ SpectraFluorPlus; Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
- ◆ Stahlkugeln, 7mm, 5 mm; Retsch
- ◆ Sterilisator, Sorvall Heraeus; Kendro Laboratory Products
- ◆ Thermocycler: PTC-200; MJ Research; Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland
- ◆ Überkopfmischer; Heidolph
- ◆ Ultraschallbad, USR8; Julabo
- ◆ Vortex-Genie2; Scientific Industry
- ◆ IKA Vortex (Agilent Lab Chips); Agilent
- ◆ Wasserbad; Julabo
- ◆ Zentrifuge 4K15C, Laboratory Centrifuges; Sigma/Qiagen

2.1.5 Versuchstiere

Es wurden männliche Wistar-Ratten (HsdCpb:Wu; von Harlan Winkelmann oder Charles River Laboratories, Inc.) verwendet. Die Tiere wurden unter optimierten hygienischen Bedingungen mit Trinkwasser- und Futterzugang ad libitum gehalten. Alle Maßnahmen im Zusammenhang mit Bestellung, Haltung, Versorgung und Einsatz der Tiere wurden nach zurzeit geltenden Tierschutz-Richtlinien und -Verordnungen durchgeführt und kontrolliert. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte gemäß des Bundesgesetzblattes 2006 Teil 1, Nr. 25 (Bekanntmachung der Neufassung des Tierschutzgesetzes).

2.1.6 Zellen und Zelllinien

Tabelle 1: Verwendete Zellen und ihre Herkunft

Zellen	Bezeichnung und Herkunft
rPTCs	Primäre proximale Tubuluszellen der Ratte
NRK-52E	Epithelial-ähnliche Zellen aus der Rattenniere (ACC 199)
hPTCs	Primäre proximale Tubuluszellen des Menschen (Innsbruck)
HK-2	Humane proximale Tubuluszellen, immortalisiert durch Transduktion mit den Papilloma virus 16 (HPV-16) E6/E7 Genen (CRL2190)

Die NRK-52E-Zellen konnten bis zur Passage 18 subkultiviert werden, allerdings wurden sie für die Microarray-Versuche nur bis Passage 12 eingesetzt. Die HK-2-Zellen wurden ebenfalls nur zwischen Passage 6 und 12 für die Microarray-Versuche verwendet. Es war möglich die rPTCs bis Tag 14 zu kultivieren. Die hPTCs wurden in Innsbruck isoliert, einmal passagiert und für die Microarray-Versuche behandelt.

2.1.7 Zellkulturmedien

Im Folgenden sind alle Zellkulturmedien mit ihren Zusätzen und die darin kultivierten Zellen aufgelistet. Die Angaben entsprechen der Endkonzentration im Mediumgemisch.

Tabelle 2: Zellkulturmedien

Mediumbezeichnung	Mediumszusätze	Zellen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	10 % FCS 1 % P/S	NRK-52E
DMEM/F-12 Medium (1:1; ohne Phenolrot)	1 % P/S 1 % Hepes 5 % FCS 1 % L-Glutamin REGM singlequots (Transferrin; rhEGF; Triiodothyronin, Hydrocortison, Insulin)	rPTCs
DMEM-Medium/F-12 Supplement (1:1)	1 % P/S (100 ×) 1 % Glutamax (100 ×) 0,1% Hydrocortison (1000 ×) 0,1 % EGF (1000 ×) 1 % ITS (100 ×)	HK-2 hPTCs

2.1.8 Stammlösungen für das HK-2-Medium

- ◆ **ITS** (Insulin, Transferrin und Natriumselenit): 5 ml steril filtrierten, 10 mM Eisessig dazugeben, lösen, mit 45 ml sterilem Wasser auffüllen und in 5 ml Aliquots einfrieren.
- ◆ **EGF**: 20 ml steril filtrierten, 10 mM Eisessig mit 0,1 % BSA hinzufügen und in 500 µl Aliquots einfrieren.
- ◆ **Hydrocortison**: 1 ml wird in 100 %igem Ethanol gelöst und dann auf 28 ml mit PBS aufgefüllt. Anschließend in 500 µl Aliquots einfrieren.
- ◆ **Glutamax** (200 mM): In 5 ml Aliquots einfrieren.
- ◆ **Penicillin/Streptomycin** (10000 units Penicillin und 10 mg Streptomycin/ml stock solution): In 5 ml Aliquots einfrieren.

2.1.9 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten synthetischen Oligonukleotide, die mittels der Primer Express Software v 2.0 entworfen wurden, wurden von der Firma Invitrogen hergestellt (50 nmol). Eine Aufreinigung der Primer wurde beim Hersteller durch Entsalzen durchgeführt. Die Primer wurden durch eine entsprechende Validierung mittels Schmelzkurven auf ihre Spezifität im Labor nach Ankunft geprüft. In den Tabellen sind die Gennamen, Accession Nummern, Sequenzen der Primer, die 'Annealing'-Temperatur (T_a) und die Länge des PCR-Produkts mit angegeben. Der T7-(dT)₂₄ Primer für die *in-vitro*-Transkription mittels des 'Bio-Array™ HighYield™ RNA Transcript Labeling Kit' wurde von der Firma Prologo Primers and Probes bezogen. Im Gegensatz dazu war dieser im 'One Cycle Kit' von Affymetrix schon enthalten. Die fertig synthetisierten 'Assays on Demand' von Applied Biosystems, die jeweils aus einem Primerpaar und einer sogenannten 'Taqmanprobe' bestehen, sind mit der entsprechenden Assay Nummer, Accession Nummer, dem Startnukleotid und der Länge des Amplikons angegeben.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die *in-vitro*-Proben

Genname / Acc. No	Forward Primer 5'-3'	Reverse Primer 5'-3'	Ta (°C)	Amplikon (bp)
CDC2 Cell division cycle 2 protein kinase (CDK1) / NM_019296	CGCGTCCCACGTC AAGA	TGGATCATAGACCAGCA TTTTCG	59	70
CCNB1 Cyclin B1, G2/M-specific / L11995	TGCTGCAGGAGACCA TGTACA	GCATCTTCTTGGGCACACAA	59	78
MDM2 Ubiquitin E3 ligase / AI639488	CGCCCCCTGGCAAATCAC	GGACACACAA GACAAA GAGGAAAAGT	60	81
NQO1 NADPH-Quinone Oxidoreductase / J02679	ATGGGAGGTGGT CGAAATCTG	TTCCGGCTCCCCTGTGATG	60	81
CLU Clusterin / M64723	CAC TACGGGCCTCTGAGCTT	ACGTCCA TGGCCTGTTGAG	59	80
ANXA2 Annexin A2 (Lipocortin II) / L13039	ATCATCTGCTCAAGAA CCAA CCA	GATGTGCAGAGATGATGCCTCTCTC	58	101
CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1) / NM_080782	GCGGGACCGGGACATC	CGCTTGGAGTGATAGAAA TCTGTTAG	59	70
HO-1 Heme oxygenase 1 / J02722	TATCGTGTCTCGCATGAACACT	GGCGGTCTTAGCCTCTTCTGT	61	75
18S rRNA / V01270.1	GTAACCCGTTGAA CCCCATT	CCATCCAATCGGTTAGTAGCG	60	151

Tabelle 4: Verwendetes Oligonukleotid für die *in-vitro*-Transkription

Oligonukleotid (cRNA Synthese)	Sequenz
T7-(dT) ₂₄ Oligo	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT ₂₄

Tabelle 5: Verwendete 'Assays on Demand'

Assay No.	Acc. No.	Genname	Startnukleotid	Amplikon (bp)
Rn00563101_ml	NM_012815.2	GCLC g-glutamyl-cysteinyI-synthetase, catalytic subunit (GCS heavy chain	209	107
Rn00709600_ml	NM_031651.1	NAS1 Renal sodium/sulfate cotransporter (SLC13A1)	382	104
Rn00580893_ml	NM_031584.1	OCT2 Organic cation transporter 1 (SLC22A1)	1593	55
Hs00355782_ml	NM_078467.1	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	677	66
	NM_000389.2		563	
Hs99999901_s1	X03205.1	18S rRNA	609	187

2.1.10 Software

- ◆ CytoCalc™; Applied Biosystems (PerSeptive Biosystems)
- ◆ CytoFlour™ II; Applied Biosystems (PerSeptive Biosystems)
- ◆ Expressionist Refiner, Expressionist Analyst, und CoBi Database; Genedata AG, Basel, Schweiz
- ◆ GCOS Version 1.3; Affymetrix, Inc. Santa Clara, CA 95051 USA
- ◆ Ingenuity; Ingenuity® Systems Inc., 1700 Seaport Blvd. Third Floor Redwood City, CA 94063
- ◆ KC4 (KinetiCalc for Windows); MWG-Biotech AG, Deutschland
- ◆ Leica Q500MC software Q-Win
- ◆ Magellan v2.2x; TECAN Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
- ◆ Primer Express v2.0; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
- ◆ SDS 2.1; Applied Biosystems
- ◆ SoftMax Pro v 4.3 Enterprise Edition; Molecular Devices Corporation, USA

2.1.11 Puffer und Lösungen

Antikörperpuffer (je Microarray):

300 µl 2 × Färbepuffer
 6 µl anti IgG Ziege (10 mg/ml)
 24 µl acetyl. BSA (50mg/ml)
 3,6 µl biotinierter Antikörper 0.5 mg/ml
 266 µl RNase freies Wasser

BSA-Puffer (prim. Nierenzellen):

12,5 mg BSA
 ad 500 ml HBSS
 durch 0,2 µM steril filtrieren

Collagenasepuffer (prim. Nierenzellen):

221,98 mg CaCl₂ (wasserfrei)
 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung
 ad 500 ml HBSS
 Steril filtrieren durch 0,2 µm Filtersystem
 200 U/ml Collagenase IV

Entfärbelösung (für MTT):

0,4 ml 10 N Salzsäure
 ad 100 ml Isopropanol

Färbepuffer (2 ×) (Microarrays):

41,7 ml 12× MES
92,5 ml NaCl (5 M)
2,5 ml 10 % Tween 20
112,8 ml Wasser (RNase frei)
durch 0,2 µM sterilfiltrieren

Lysepuffer (RNA-Isolation):

50 ml RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit)
0,5 ml β-Mecaptoethanol
(innerhalb 1 Monats aufbrauchen)

**MES-Hybridisierungspuffer (2 ×)
(Microarrays)**

8,3 ml MES Stammlösung (12 ×)
17,7 ml NaCl (5M)
4 ml 0,5 M EDTA
0,1 ml 10 % Tween 20
19,9 ml Wasser (RNase frei)

MES-Stammlösung (12 ×) (Microarrays):

35,2 g MES freie Säure Monohydrat
96,7 g MES Natriumsalz
ad 400 ml Wasser (RNase frei)

Perfusionspuffer (prim. Nierenzellen):

95,1 mg EGTA
ad 500 ml HBSS
durch 0,2 µM steril filtrieren

Puffer A (Microarrays):

300 ml SSPE (20 ×)
1 ml 10 % Tween 20
699 ml aqua dest.
durch 0,2 µM steril filtrieren

Puffer B (Microarrays):

83,3 ml 12 × MES Stammlösung
5,2 ml NaCl (5M)
1 ml 10 % Tween 20
910,5 ml aqua dest.
durch 0,2 µM steril filtrieren

Resazurinlösung (20 ×):

0,011 g
1 ml NaOH
ad 50 ml PBS
pH 7,4 einstellen
durch 0,2 µM steril filtrieren
bei 4 °C 1 lagern

SAPE-Lösung (je Microarray):

600 µl 2 × Färbepuffer
540 µl RNase freies Wasser
48 µl acetyl. BSA (50 mg/ml)
12 µl SAPE 1 mg/ml

SDS-Lsung (für MTT):

3 g SDS
ad 100 ml aqua dest.

2.2 Methoden

2.2.1 Durchführung der *in-vivo*-Studien

Für die Untersuchung der frühen Effekte von Nierenkanzerogenen wurden die Versuchstiere (s. 2.1.5) mit den in Tabelle 6 gelisteten Substanzen und den dort angegebenen Dosen pro kg Körpergewicht (KG) täglich behandelt.

Die ersten Tierstudien (OTA, AA, NNM, KBrO₃ mit 30 mg/kg KG Dosierung) wurden unter der Leitung von Dr. F. Krötlinger und seinen Mitarbeitern, die zweite Studie (KBrO₃, mit 60 und 90 mg/kg KG Dosierung) unter der Leitung von Dr. R. Eiben und seinen Mitarbeitern, jeweils in der Abteilung für Experimentelle Toxikologie, Bayer HealthCare AG entsprechend den OECD Richtlinien zur Testung von Chemikalien durchgeführt. Die Studie zu 2NF wurde im Labor der Bayer Corporation, Agriculture Division Toxicology in Stilwell durchgeführt. Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten verwendet, die sieben Tage akklimatisiert wurden.

Die 6-7 Wochen alten Kontrolltiere für die *in-vivo*-Studien mit Aristolochiasäure, Kaliumbromat und N-Nitrosomorpholin wurden mit 10 ml/kg KG Wasser per Schlundsonde behandelt. Die Verabreichung der im Trinkwasser gelösten Substanz erfolgte für 14 Tage mit 10 ml/kg KG ebenfalls über eine Schlundsonde. Für die Studie mit Ochratoxin A wurden Tiere mit einem Gewicht von ca. 200 g behandelt. Diese wurden entweder mit dem Vehikel (Maiskeimöl) allein oder mit OTA behandelt. In der 2-Nitrofluoren-Studie wurden ebenfalls 8-12 Wochen alte männliche Ratten entweder mit 5 ml/kg KG Maiskeimöl oder 2-Nitrofluoren per Gavage behandelt.

Die Tiere wurden für die jeweiligen Zeitpunkte behandelt, am darauf folgenden Tag abgetötet und die Nieren entnommen. Eine Niere wurde in 10 %iger Formalinlösung (OTA-Studie) oder in Davidson'scher Lösung fixiert und diente für histopathologische Untersuchungen. Die zweite Niere wurde entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren (2NF-Studie) oder nach Zerteilen in zwei sagittale Hälften vier Tage lang in RNALater bei 4 °C aufbewahrt, um eine Degradation der RNA zu verhindern. Anschließend wurde der Kortex mittels eines Skalpell von der Medulla getrennt. Beides wurde anschließend ohne RNALater bei -80 °C gelagert.

Tabelle 6: Dosen und Zeitpunkte der *in-vivo*-Studien

Substanz (Abkürzung; CAS Nummer)	Dosis	Anzahl der für die Analyse verwendeten Tiere pro Zeitpunkt			
		Tag 1	Tag 3	Tag 7	Tag 14
Aristolochiasäure (AA) (AA I: 313-67-7; AA II: 475-80-9)	9,6 mg/kg KG		5	5	5
N-Nitrosomorpholine (NNM; 59-89-2)	12 mg/kg KG		5	5	5
Kaliumbromat (KBrO ₃ ; 7758-01-2)	30 mg/kg KG		5	5	5
	60 mg/kg KG		5	5	5
	90 mg/kg KG		5	5	5
Ochratoxin A (OTA; 303-47-9)	3 mg/kg KG	3	3	3	
2-Nitrofluoren (2NF; 607-57-8)	44 mg/kg KG		3	3	3

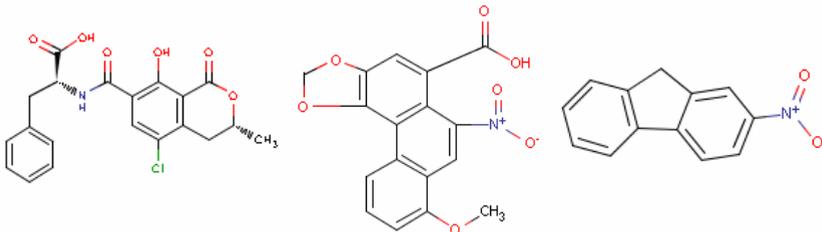


Abb. 3: Strukturformeln der Nephrokarzinogene I
Ochratoxin A (*links*), Aristolochiasäure (*Mitte*) und 2-Nitrofluoren (*rechts*).



Abb. 4: Strukturformeln der Nephrokarzinogene II
Kaliumbromat (*links*) und N-Nitrosomorpholin (*rechts*).

Für den Vergleich zwischen kultivierten primären proximalen Tubuluszellen der Ratte und unbehandelten Rattennieren wurden vier 140-160 g schwere männliche Wistar-Ratten nach einer Akklimatisierungsphase anästhesiert und durch einen Achselschnitt vollständig

entblutet. Anschließend wurden die Nieren entnommen, die Nierenkapsel entfernt und in zwei Hälften geschnitten. Diese wurden dann über Nacht in RNALater bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde ebenfalls der Kortex von der Medulla getrennt und in verschiedenen Gefäßen bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.1 Histopathologische Untersuchungen

Die histopathologischen Untersuchungen wurden von Dr. med. vet. U. Bach oder Dr. med. vet. E. Hartmann und Mitarbeitern in der Abteilung für toxikologische Pathologie der Bayer HealthCare AG durchgeführt. Aus den formalinfixierten Nierenhälften (OTA-Studie) bzw. aus den die in Davidson'scher Lösung fixierten Nierenhälften wurden ca. 5 µm dicke Paraffinschnitte hergestellt. Nach einer Färbung mit Eosin und Haematoxylin wurden die Gewebeschnitte histopathologisch ausgewertet.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen aus der Ratte

Die Tiere wurden für mindestens fünf Tage akklimatisiert. Für die Isolation der proximalen Tubuluszellen (rPTCs) wurden männliche Wistar-Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 180-200 g durch eine intraperitoneale Injektion mit 250 mg/kg KG Natriumpentobarbital (Narcoren®) narkotisiert. Nach der Desinfektion der gesamten Ventralseite des Tieres mit 70 %igem Ethanol wurde zunächst die oberste Hautschicht mit dem Fell entfernt und anschließend durch einen Schnitt in die Bauchhöhle die Abdominalhöhle eröffnet. Nach der Freilegung der Gefäßsysteme wurde vorsichtig ein dünner Schlauch in die Bauchorta (Aorta abdominalis) durch einen kleinen Schnitt eingeführt. An diesen Schlauch wurde anschließend eine 50 ml Spritze angeschlossen. Zunächst wurden die Nieren 10 min mit auf 37 °C vorgewärmtem Perfusionspuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 10 ml/min durchgespült und anschließend sofort in eine Petrischale, die sich auf Eis befand, gelegt und vom restlichen Fettgewebe befreit. Die Nierenkapsel wurde mit Hilfe von zwei Pinzetten entfernt, damit die Collagenase besser in das aufzuschließende Gewebe eindringen kann. Der Collagenaseverdau und somit das Aufbrechen der Zellverbände erfolgte in 25 ml vorgewärmtem Collagenasepuffer mit einer Aktivität von 200 U/ml im 37 °C Brutschrank unter ständigem Invertieren des Gefäßes für 10 min auf kleinster Stufe des Überkopfmischers. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Die Collagenaselösung wurde in ein 50 ml Gefäß überführt und die Nieren in eine Petrischale auf Eis gegeben. Nach der Halbierung der Nieren wurde der Kortex mit Hilfe eines Skalpell von der Medulla durch Schaben abgetrennt und möglichst fein zerkleinert,

dann in 10 ml BSA-Puffer aufgenommen. Nach dem Durchdrücken des Gewebebreis mit einer gebogenen Pinzette durch ein 135 μm Sieb folgte eine Trennung der Tubuluszellen von den anderen Zellen. Eine weitere Filtration folgte durch ein 70 μm Sieb. Die übriggebliebene Collagenaselösung wurde ebenfalls durch beide Netze gegeben und das Gefäß auf 50 ml mit BSA-Puffer aufgefüllt. Eine Reinigung der Zellen erfolgte durch eine Zentrifugation für fünf Minuten bei $110 \times g$, Vereinigung der Pellets beider Gefäße und einmaligem Waschen mit 10 ml des entsprechenden Kulturmediums (s. 2.1.7). Danach wurden die Zellen in ca. 100 ml Kulturmedium aufgenommen und im Casy® I Cell Counter gezählt. Die Zellen wurden mit $3,5 \times 10^5$ Zellen/'well' in mit Collagen I beschichteten 24-'well'-Platten ausgesät. Das Volumen im 'well' betrug bis zum fünften Tag 1,5 ml. Nach fünf Tagen Anheftungsphase erfolgte ein einmaliges Waschen mit 1,5-2 ml PBS, um die angehefteten Zellen von den abgestorbenen Zellen und Zelltrümmern zu befreien, und eine anschließende Erneuerung des Kulturmediums. Erst ab dem siebten Tag nach der Isolation konnte mit der Behandlung der Zellen begonnen werden, da erst dann die nötige Konfluenz erreicht war und die Zellen eine Monolayerschicht ausgebildet hatten. In dem weiteren Kultivierungszeitraum wurde alle 2-3 Tage das Medium erneuert.

2.2.2.2 Kultivierung von NRK-52E-Zellen

Bei den verwendeten NRK-52E-Zellen handelte es sich um epithelähnliche Klone, die ursprünglich aus der Niere normaler Ratten gewonnen wurden und sich von den Epithelzellen des proximalen Tubulus ableiten (de Larco und Todaro, 1978). Diese Zellen wurden von der DSMZ bezogen und in DMEM-Medium (mit 1000 mg/L Glukose und Glutamax) mit 1 % P/S und 10 % FCS im Brutschrank bei 5 % CO_2 und 37 °C kultiviert (s. 2.1.7). Die Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert. Dafür wurden die Zellen nach dem Abgießen des Mediums je einmal mit 5 ml PBS und 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation mit 5 ml Trypsinlösung pro Flasche für 10 - 15 min im Brutschrank. Durch leichtes bis mittelstarkes Klopfen konnte der Ablösevorgang noch beschleunigt werden. Die Zellen wurden anschließend in dem serumhaltigen Kulturmedium aufgenommen, um die Reaktion abzustoppen, und durch eine Zentrifugation für 10 min bei $340 \times g$ und 4 °C pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in entsprechender Menge Kulturmedium resuspendiert und gezählt. Pro Flasche wurde eine Zellzahl von $1,5\text{-}2 \times 10^6$ Zellen eingesetzt.

2.2.2.3 Kultivierung von HK-2-Zellen

Die humane Nierenzelllinie HK-2 wurde vom einem Partner des EU-Projektes *Predictomics*, University College of Dublin, an alle weiteren Partner des EU-Projektes geschickt, um Zellen des gleichen Pools zu verwenden. Ursprünglich waren sie über Promochem von der ATCC bezogen worden. HK-2-Zellen sind proximale Tubuluszellen und wurden ursprünglich aus der adulten humanen Niere isoliert (Ryan *et al.*, 1994). Wegen ihres humanen Ursprungs gehören sie zu den S2-Organismen und alle Gegenstände und Abfälle, die mit diesen Zellen in Berührung kommen bzw. bei dem Arbeiten mit ihnen anfallen, müssen vor der Entsorgung bei 134 °C und 0,125 Bar/min für 15 min autoklaviert werden. Die Zellen wurden in einem 1:1 Gemisch aus DMEM (ohne Glukose) und F12-supplement serumfrei kultiviert, dem außerdem noch EGF (10 ng/ml), Hydrocortison (36 ng/ml) und ITS (5 µg, 5 ng, 5 µg) zugegeben wurde (s. 2.1.7.). Zusätzlich enthielt das Medium 1 % P/S und 2 mM Glutamax (stabilisiertes Glutamin als Dipeptid), da der essentielle Mediumzusatz bei mehr als 4 °C höchst instabil ist. Nach dem Ablösen mit Trypsin für 5 min bei 37 °C wurden die Zellen in 10 % FCS-haltiges Medium gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren, und bei 110 × g zentrifugiert. Es stellte sich heraus, dass diese Zellen am besten wachsen, wenn man sie 1:3 aufteilt und alle zwei Tage einen Mediumwechsel durchführt.

2.2.2.4 Langzeitlagerung von Zellen mittels Kryokonservierung

Die Zellen wurden nach maximaler Vermehrung durch Trypsinierung von den Flaschen abgelöst, zentrifugiert und in Einfriermedium ($2\text{-}5 \times 10^6$ Zellen/ml) aufgenommen. Für das Einfriermedium wurden dem Kulturmedium der NRK-52E-Zellen 5 % DMSO und 10 % FCS zugesetzt, dem Medium der HK-Zellen hingegen 10 % DMSO und 10 % FCS. Anschließend wurden die Zellen in 1-2 ml Portionen auf Kryoröhrchen mit Schraubverschluss verteilt, und langsam auf -80 °C heruntergekühlt, indem sie zunächst für 1 h in den -20 °C Gefrierschrank und anschließend für mindestens 4 h in den -80 °C Gefrierschrank gestellt wurden, bevor sie dann anschließend in flüssigem Stickstoff aufbewahrt wurden.

2.2.2.5 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Damit die Zellen möglichst schnell aus dem Einfriermedium in das entsprechende Kulturmedium überführt werden konnten, sollte das Kulturmedium bei 37 °C vorgewärmt werden. Das in flüssigem Stickstoff gelagerte Kryoröhrchen mit den entsprechenden Zellen wurde zum Erwärmen in den Brutschrank gestellt, um ein schnelles Auftauen zu gewährleisten. Die aufgetauten Zellen wurden in 10 ml des entsprechenden

Kulturmediums aufgenommen und für 5-10 min – je nach Zelllinie – bei 110 oder $340 \times g$ und $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Die Zellen wurden in 20 ml des jeweiligen Kulturmediums aufgenommen und in T75 Flaschen ausgesät. Nach der Anheftung der Zellen wurden diese am nächsten Tag mit 5 ml PBS gewaschen und das Medium erneut gewechselt.

2.2.2.6 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Ablösen der Zellen mit vorgewärmter Trypsin-EDTA-Lösung. Das EDTA dient zur Komplexierung divalenter Ionen und das Trypsin spaltet extrazelluläre Proteine, so dass die Zellen nicht mehr an die Oberfläche binden können. Bei den rPTCs in den 24-'well'-Platten wurde für das Zählen der Zellen das Kulturmedium vollständig abgenommen und anschließend 300 μl der Trypsinlösung in jedes 'well' gegeben. Nach drei Minuten Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen noch einmal resuspendiert, um alle Zellen restlos abzulösen. Sie wurden dann in 4 ml Kulturmedium aufgenommen und anschließend durch eine Zentrifugation bei $340 \times g$ für 7 min pelletiert. Danach wurden die Zellen in 1 ml Kulturmedium aufgenommen und nach einer 1:1000 Verdünnung mit Casyton® im Casy® I Cell Counter gezählt. Bei den NRK-52E- und den HK-2-Zellen wurden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und nach der Aufnahme in entsprechendem Kulturmedium ebenfalls 1:1000 in Casyton® verdünnt und im Casy® I Cell Counter gezählt. Dies wurde vor allem für den Einsatz für die Zytotoxizitätsversuche und Versuche zur RNA-Gewinnung vorgenommen.

2.2.2.7 Antikörperfärbungen zur Charakterisierung der rPTCs

Um sicher zu gehen, dass bei der oben beschriebenen Isolation der proximalen Tubuluszellen aus Rattennieren auch die richtigen Zellen gewonnen wurden, wurden die Zellen mittels des Antikörpers für N-Cadherin, welches in der Niere spezifisch für proximale Tubuluszellen ist (Prozialeck *et al.*, 2004), angefärbt.

Die Zellen wurden mit 5×10^5 Zellen/Kammer auf die mit Collagen I beschichteten Zellkulturobjektträger in 24-'well'-Platten ausgesät und ebenfalls erstmals nach fünf Tagen Anheftungsphase mit PBS gewaschen und mit frischem Medium bedeckt. Nachdem sich eine breite Monolayerschicht ausgebildet hatte, wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellkulturobjektträger für 2 h unter der Sterilbank offen stehen gelassen, um sie weitestgehend zu trocknen. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem 100 %igem Methanol bedeckt und für 10 min bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert. Nach dem vollständigen Entfernen des Methanols war es möglich die Zellen bei $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Antikörperfärbung zu lagern. Vor der Färbung wurden die Objektträger dann dreimal drei Minuten lang mit PBS gewaschen. Eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte für 30 min mit PBS, das mit

0,5 % BSA und 5 % FCS versehen wurde. Danach wurden die fixierten Zellen mit dem monoklonalen Maus-anti-N-Cadherin-Antikörper, der in PBS mit 0,5 % BSA 1:500 verdünnt wurde, bei 4 °C über Nacht inkubiert. Ein erneutes Waschen mit PBS folgte. Anschließend wurden die Zellen für zwei Stunden mit dem zweiten Antikörper Alexa Fluor 488 Goat-Anti-mouse IgG, der in PBS mit 5 % FCS 1:250 verdünnt wurde, gefärbt. Durch die Anregung mit blauem Licht in einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) wurde die grüne Fluoreszenz der gebundenen Antikörperkomplexe sichtbar gemacht. Fotos wurden mit der entsprechenden Leica Q500MC Kamera aufgenommen.

2.2.2.8 Behandlung mit den Nephrokarzinogenen

Die Nephrokarzinogene Ochratoxin A (OTA), 2-Nitrofluoren (2NF) und Aristolochiasäure (AA) wurden in DMSO gelöst. OTA wurde als 100 mM Stammlösung bei -20 °C aufbewahrt. 2NF und AA wurden als 50 mM Stammlösung bei -80 °C aufbewahrt. Nach dem Auftauen sollten die gelösten Substanzen kurz gevortext werden. Die Verdünnung der Stammlösungen auf die jeweils einzusetzenden Konzentrationen erfolgte mit dem entsprechenden Kulturmedium. Die Endkonzentration von DMSO lag in allen Behandlungen unter 0,1 %, und war in allen Ansätzen inklusive Vehikelkontrolle gleich. Kaliumbromat (KBrO₃) und N-Nitrosomorpholin (NNM) wurden als Stammlösung in Medium angesetzt und direkt im Kulturmedium entsprechend verdünnt. OTA blieb bis zu drei Tagen auf den Zellen ohne Mediumswechsel, alle anderen Substanzen nur 48 h.

2.2.2.9 Bestimmung der Viabilität nach der Behandlung mit OTA

Für die Bestimmung der Konzentration, mit der die Zellen für die Microarray-Versuche behandelt werden sollten, wurden zunächst Zytotoxizitätstests nach Behandlung mit verschiedenen Dosen von OTA in 24 'well' (rPTCs) und 96 'well' (NRK-52E, HK-2), später jedoch in 6-'well'-Platten für die HK-2-Zellen durchgeführt. Diejenige Konzentration, die noch eine Vitalität um ca. 80 % der Zellen im Verhältnis zur Kontrolle erkennen ließ, sollte dann für die Versuche zur RNA-Gewinnung verwendet werden. Als Zytotoxizitätstest für die NRK-52E-, rPTCs und für die HK-2-Zellen wurde der MTT-Test gewählt. In diesem Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase bestimmt. Der Test beruht auf der enzymatischen Reduktion des lichtempfindlichen löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT ((3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) zu dem unlöslichen, blauen Formazan (Abb. 5).

Zu den Zellen wurden je 10 % des vorhandenen Gesamtvolumens im 'well' an MTT-Lösung (s. 2.1.11) hinzugegeben und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Nach der Abnahme des Mediums erfolgte die Lyse der Zellen mit der äquivalenten Menge an SDS-Lösung (s. 2.1.11), die an MTT-Lösung zugegeben worden war, und der Zugabe der 5-fachen

Menge Entfärbelösung, um die Farbstoffkristalle aufzulösen. Nach 15 min Inkubation auf einem Schüttler und anschließender Ruhephase für 15 min bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 570 nm in einem Tecan SpectraFluorPlus Photometer.

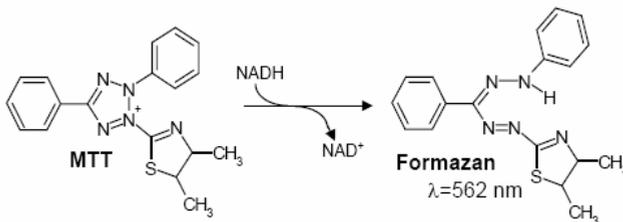


Abb. 5: Reduktion des MTT-Tetrazoliumsals zu seinem unlöslichen Formazan
 (Abb. aus dem Praktikumskript für Fortgeschrittene der Toxikologie der Universität Düsseldorf)

2.2.2.10 Viabilitätstests mit HK-2-Zellen

Für die HK-2-Zellen erfolgten im Rahmen des Eu-Projekts *Predictomics* neben dem oben beschriebenen MTT-Test noch die Durchführung des Resazurin-Tests und die Bestimmung der Lactatdehydrogenaseaktivität im Zellkulturüberstand. Resazurin ist ein Indikatorfarbstoff, der die Zellen penetriert und durch intrazelluläre Oxidoreduktasen und die mitochondriale Elektronentransportkette, ähnlich wie MTT, zu dem hoch fluoreszierenden, pinkfarbenen Resorufin umgesetzt wird (Abb. 6).

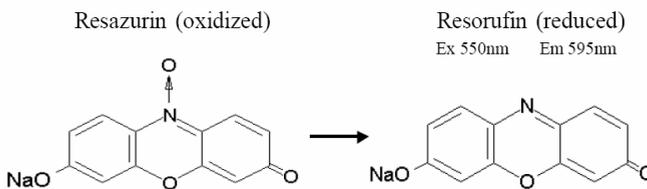


Abb. 6: Reduktion von Resazurin zu Resorufin (Poster von Talley D.L. *et al.*; Sigma-Aldrich Corporation)

Das Resorufin diffundiert in das Kulturmedium und kann durch eine Messung der Fluoreszenz bei einer Extinktion von 540 nm und einer Emission von 590 nm gemessen werden. Auch hier sollte für die Genexpressionsuntersuchungen eine Viabilität von 80 % bezogen auf die Kontrolle nach der Toxineinwirkung nicht unterschritten werden. Die Resazurininlösung wurde 1:20 mit dem entsprechenden Kulturmedium verdünnt. Nach der vollständigen Abnahme des substanzhaltigen Mediums nach entsprechender Behandlung

wurden 200 µl Medium pro 'well' bei einer 96 'well' Platte und 1,8 ml Medium pro 'well' bei einer 6-'well'-Platte hinzugefügt. Bei Verwendung der fertigen Lösung von Sigma wurden 10 % des Volumens des Kulturmediums hinzugefügt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 37 °C erfolgte die Messung in einem Tecan SpectraFluorPlus Photometer.

Die Methode zur Messung von LDH beruht darauf, dass LDH nur bei Schädigung der Zellmembran in den Kulturüberstand diffundieren kann. Durch Zugabe der entsprechenden Reagenzien zum Überstand der Zellen kann die Umsetzung von Lactat zu Pyruvat durch LDH erfolgen.



Durch das entstehende NADH+H⁺ wird der Detektionsfarbstoff wiederum reduziert. Dieser Farbumschlag konnte anschließend in einem Lambda Scan 200 (MWG-Biotech AG) bei 340 nm gemessen werden. Der Test wurde mittels des 'Cytotoxicity Detection Kit' von Roche durchgeführt, indem 100 µl der fertig gemischten Lösung zu 100 µl Überstand der Zellen gegeben wurden und in einer 96 'well' Platte für 10 min lichtgeschützt inkubiert wurden.

Generell wurden gleichzeitig zu den Inkubationsversuchen, die später für die Genexpressionsanalysen dienten, Zytotoxizitätsversuche durchgeführt, um den Versuchsablauf zu überprüfen und gegebenenfalls die Experimente bei zu niedriger Viabilität, aber auch Zytotoxizität der Zellen zu wiederholen.

2.2.3 RNA-Isolation

2.2.3.1 RNA-Isolation aus Zellen

2.2.3.1.1 rPTCs

Für die RNA-Isolation wurden die Zellen nach der Nierenperfusion mit einer Zellzahl von $3,5 \times 10^5$ Zellen pro well auf Collagen I beschichteten 24-'well'-Platten ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert. Für den Vergleich zwischen der Zellkultur und der unbehandelten Rattenniere wurde das Medium an Tag 5, 7, 8, 10, 12 und 14 vollständig abgenommen, die Zellen mit 1,5-2 ml PBS gewaschen, und anschließend 200 µl RLT-Lysepuffer (s. 2.1.1) pro 'well' hinzupipettiert, um das Volumen für die folgende RNA-Isolation über eine Minisäule so klein wie möglich zu halten. Um genügend RNA für die Genexpressionsanalysen zu erhalten, wurden 24 'wells' für Tag 5, je 12 'wells' für Tag 7, 8 und 10 und je 18 'wells' für Tag 12 und 14 lysiert und gepoolt. Für jeden Zeitpunkt wurden vier biologische Replikate, d. h. Zellen aus vier verschiedenen Perfusionen, aufbereitet. Bis zur Isolation der RNA konnten die Zelllysate bei -80 °C

aufbewahrt werden. Vor der RNA-Isolation wurden die Zelllysate durch QiaShredder-Säulen zentrifugiert, um die Proben zu homogenisieren, indem die gesamte Probe bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min zentrifugiert wurde. Die RNA-Isolierung wurde mittels des RNeasy® Mini Kits mit DNase-Verdau nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um eine Überladung der Säulen zu vermeiden, wurden mindestens zwei RNeasy® Mini Säulen pro Probe verwendet. Die Inkubationszeit für den DNase-Verdau betrug bei den primären proximalen Tubuluszellen statt 15 min nur 13 min.

Für die Isolation von RNA aus mit OTA behandelten rPTCs wurde wie oben beschrieben verfahren, allerdings erfolgte die Isolation an Tag 1, 3, 5 und 7 nach der Behandlung mit 10 bzw. 20 μM OTA.

Nach der Isolation wurde die RNA bis zur Weiterverarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Bestimmung der Qualität und der Quantität der RNA erfolgte mit dem Bioanalyzer und dem RiboGreen™ RNA Quantitation Kit. Je Säule wurde mit $2 \times 30\ \mu\text{l}$ eluiert.

2.2.3.1.2 NRK-52E-Zellen

Für die Genexpressionsanalysen mit den NRK-52E-Zellen wurden drei biologische Replikate angefertigt. Um genügend Zellen für die RNA-Isolation zu erhalten, wurden die NRK-52E-Zellen auf 6-'well'-Platten mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen für 24 h und 2×10^5 Zellen für 72 h ausgesät. Die Zellen wurden mit 20 μM OTA behandelt und die Kontrollen mit der entsprechenden Menge des Vehikels DMSO inkubiert. Je drei 'wells' einer 6-'well'-Platte wurden für eine Probe gepoolt: Vor der Lyse zum entsprechenden Zeitpunkt wurde jedes mit 1-2 ml PBS gewaschen. Pro 'well' wurden 350 μl Lysepuffer hinzugegeben und das Zelllysate bis zur weiteren Verarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Das Lysat wurde dann ebenfalls zuerst zwecks Homogenisierung über eine QiaShredder-Säule gegeben, wobei bis zu dreimal durch die gleiche Säule zentrifugiert werden konnte. Danach wurde mit den Proben wie im Handbuch des RNeasy® Mini Kits mit DNase-Verdau beschrieben weiter verfahren. Die Elution der RNA erfolgte mit $2 \times 30\ \mu\text{l}$ je Säule. Die Bestimmung der Qualität und der Quantität erfolgte durch Messung mit dem Bioanalyzer und mit dem RiboGreen™ RNA Quantitation Kit (s 2.2.4.1; 2.2.4.2).

2.2.3.1.3 HK-2-Zellen

Für die Genexpressionsanalysen mit OTA wurden die HK-2-Zellen mit 7×10^5 Zellen pro 'well' auf 6-'well'-Platten ausgesät. Sie wurden anschließend für 24 h und 72 h mit der entsprechenden Konzentration an OTA bzw. Medium mit Vehikel inkubiert. Je drei unabhängige Versuche, d. h. verschiedene Passagen, wurden als Replikate verwendet. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden alle 'wells' mit 1-2 ml PBS einmal gewaschen und je Probe drei 'wells' nach der Zugabe von 350 μl Lysepuffer in einem Eppendorfgefäß vereint.

Anschließend konnten die Proben bis zur Isolierung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden. Die Homogenisierung erfolgte durch eine QiaShredder Säule und die anschließende RNA-Aufreinigung über zwei Mini Säulen nach dem vom Hersteller beschriebenen Protokoll. Die Elution erfolgte ebenfalls mit $2 \times 30\text{ }\mu\text{l}$ je Säule. Wiederum erfolgte die Qualitäts- und Quantitätsüberprüfung durch Bioanalyzer und RiboGreen.

Für die Versuche mit den anderen Nephrokarzinogenen (AA, NNM, 2NF, KBrO_3) wurden je 'well' einer 6-'well'-Platte nur 5×10^5 Zellen eingesetzt, da sich das Wachstumsverhalten der Zellen im Laufe der Zeit veränderte.

2.2.3.1.4 Humane PTCs

Die Behandlung der humanen primären proximalen Tubuluszellen (hPTCs) erfolgte an der medizinischen Universität Innsbruck durch Dr. Paul Jennings im Labor von Prof. Walter Pfaller. Die primären Zellen waren zuvor durch die Isolation kortikaler tubulärer Fragmente aus drei verschiedenen Individuen gewonnen, einmal passagiert und in flüssigem Stickstoff gelagert worden. Nach der Behandlung mit Medium und Vehikel oder Medium und OTA wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert und in $250\text{ }\mu\text{l}$ RNALater aufgenommen und am nächsten Tag bei RT versandt (zur Bayer Healthcare AG in Wuppertal). Zu diesen Proben wurden anschließend $500\text{ }\mu\text{l}$ PBS gegeben und bei $2300 \times g$ für 2 min zentrifugiert. Die Zellen stammten aus zwei 'wells' einer 6-'well'-Platte und wurden nach der Zentrifugation in $700\text{ }\mu\text{l}$ Lysepuffer bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Am Tag der Aufreinigung wurden die Proben durch eine Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit für 2 min durch die QiaShredder Säulen homogenisiert. Die Aufreinigung der RNA erfolgte je Probe durch eine Säule des RNeasy® Mini Kit und Elution mit $2 \times 30\text{ }\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser pro Säule.

2.2.3.2 RNA-Isolation aus Gewebe

2.2.3.2.5 Niere

Alle Eppendorfgefäße für die Gewebehomogenisierung wurden zu Beginn mit einer 7 mm großen, hitzesterilisierten Stahlkugel befüllt und ins Trockeneis gestellt. Das Abwiegen musste möglichst rasch erfolgen, um das Auftauen des Gewebes zu vermeiden und somit eine gute RNA-Qualität zu gewährleisten. Für die RNA-Isolation wurden 50 bis 100 mg Gewebe in das vorgekühlte Gefäß eingewogen und nach der Zugabe von 1 ml Lysepuffer für 12 bis 18 min bei 30 Hz in einer Schwingmühle homogenisiert. Eine Zentrifugation für fünf Minuten bei $16000 \times g$ trennte die nicht lysierbaren Gewebestückchen von den lysierten Anteilen ab, die wiederum in ein neues Gefäß überführt wurden. Jede RNeasy® Mini Säule konnte mit Lysat aus 30 mg Gewebe für die RNA-Isolierung beladen werden.

Die Aufreinigung der RNA erfolgte danach wie im RNeasy® Mini Kit mit DNase-Verdau beschrieben und die RNA wurde mit $2 \times 30 \mu\text{l}$ je Säule eluiert.

2.2.3.2.6 Leber

Die Isolation der RNA aus Lebergewebe wurde ähnlich wie bei der Niere beschrieben durchgeführt, allerdings erfolgte die Homogenisierung des Gewebes bei 30 Hz für drei Minuten. Anschließend wurde das Homogenisat 10-mal durch eine 21G Kanüle geschert und letztlich nur 7 mg auf eine RNeasy® Mini Säule gegeben.

2.2.3.2.7 Herz

Die Isolation der RNA aus Herzmuskelgewebe wurde ebenfalls ähnlich wie oben beschreiben durchgeführt, allerdings wurden zwei 5 mm große Stahlkugeln für die Homogenisierung verwendet, die für 10 min bei 30 Hz stattfand. Außerdem erforderte diese einen zusätzlichen Proteinase-K-Verdau, indem $300 \mu\text{l}$ geschertes Lysat, das höchstens 30 mg Gewebe enthielt, zu $590 \mu\text{L}$ RNase freiem Wasser und $10 \mu\text{l}$ Proteinase K (20 mg/ml) gegeben und anschließend gut mit einer Pipette durchmischt wurden. Nach einer Inkubation bei $55 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 min folgte eine Zentrifugation bei $10000 \times g$ für 3 min. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem dann wie im RNeasy® Mini Kit mit DNase-Verdau beschrieben verfahren wurde.

2.2.4 Qualitätskontrolle und Quantifizierung der RNA

2.2.4.1 Qualitätsüberprüfung der RNA mittels Bioanalyzer

Die Qualität der isolierten Total-RNA wurde mit Hilfe einer Gelelektrophorese im Nanomaßstab überprüft. Die Messung erfolgte in einem Bioanalyzer 2100 von Agilent unter Verwendung des RNA 6000 Nano Lab Chip® Kit nach den Angaben des Herstellers. Mit Hilfe dieser Messung ist es möglich degradierte RNA zu erkennen und gegebenenfalls solche Proben von den weiteren Versuchen auszuschließen. Dazu wurde das Verhältnis der 28S zur 18S rRNA als Reinheitskriterium bestimmt. Dieser Quotient sollte bei RNA nicht unter 1,8 liegen. Des Weiteren wurde in einer neueren Version der Software die RNA Integrity Number (RIN) berechnet, die mit einem Wert von vollständig degradiert (1) bis völlig intakt (10) angegeben wird und nicht unter sieben liegen sollte.

2.2.4.2 Quantifizierung der RNA

Die Quantifizierung der RNA erfolgte fluorimetrisch unter Verwendung des RNA-interkalierenden Farbstoffs RiboGreen™. Das 'RiboGreen Quantitation Kit' enthielt sowohl den Farbstoff als auch den dazugehörigen RNA-Standard. Der Standard wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: $1 \mu\text{g/ml}$, $0,5 \mu\text{g/ml}$, $0,1 \mu\text{g/ml}$ und $0,02 \mu\text{g/ml}$.

Durch eine entsprechende Verdünnung der Proben (ca. 1:2000) und eine Messung bei Ex/Em 500/525 nm im Cytofluor II konnte die Menge der RNA bestimmt und somit das einzusetzende Volumen für die weiteren Versuche berechnet werden.

2.2.5 Real-Time-PCR

Die Taqman® Real-time-PCR dient zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Zuerst muss die zu messende RNA in einer Probe durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) überführt werden. Während der PCR wird die Menge eines bestimmten DNA-Fragmentes, das durch die Sequenz des für die Amplifikation benutzten Primerpaares bestimmt wird, pro PCR-Zyklus verdoppelt. Je nach Ausgangsmenge der entsprechenden mRNA in der untersuchten Probe überschreitet die Menge des entstehenden PCR-Produkts die Detektionsgrenze in einem früheren oder späteren PCR-Zyklus. Diese Zyklenzahl wird als C_T -Wert angegeben. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zur Menge des PCR-Produktes zu. Entweder wird die Fluoreszenz mit Hilfe einer Sonde oder mittels eines DNA-interkalierenden Farbstoffs, z. B. SYBR® Green ermittelt. Die Sonde, die komplementär zur Sequenz des zu detektierenden Gens ist, ist sowohl mit einem Quencher als auch mit einem Reporter-Farbstoff markiert, der erst während der Extensionsphase durch die Hydrolyse mittels der 5'-3'-Exonukleaseaktivität fluoreszieren kann. Alle 'Taqman® Assays on demand' enthielten eine Sonde, in allen anderen Taqman®-Analysen wurde das PCR-Produkt mittels SYBR® Green detektiert.

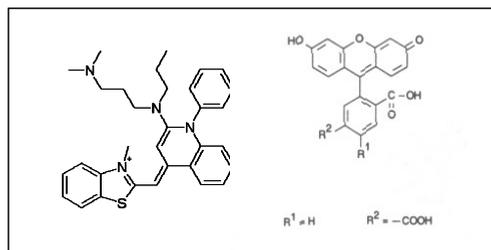


Abb. 7: Strukturformel des SYBR® Greens (links) und des Reporterfarbstoffs FAM (rechts)

Dem Reaktionsansatz werden zwei Primer hinzugegeben, die an beiden Enden des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ansetzen und anschließend durch das Enzym verlängert werden, so dass gezielt die Kopienzahl des zu amplifizierenden Abschnitts erhöht wird.

2.2.5.1 Reverse Transkription

Für die folgende PCR-Reaktion wurde die isolierte RNA mittels des 'Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR Kit' zuerst in cDNA umgeschrieben. Als Primer für die Reverse Transkriptase wurden 'random' Hexamere, d. h. Oligonukleotide mit Zufallssequenzen, verwendet. Für den Mastermix der Reversen Transkriptionsreaktion wurden folgende Bestandteile mit der für den Reaktionsansatz angegebenen Endkonzentrationen für den Reaktionsansatz benötigt:

Komponente	Endkonzentration im Reaktionsansatz
Random-Hexamer	1,25 ng/µl
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	12,5 ng/µl
PCR-Puffer ohne MgCl ₂	1 ×
MgCl ₂	5 mM
dNTP-Mix	0,5 mM
DTT	10 mM
Superscript SSII	1,25 U/µl
RNase-freies Wasser	gleiche Menge wie MgCl ₂

Zu 15 µl dieses Mastermixes wurden 5 µl Template, d. h. in diesem Fall die RNA, hinzugegeben, so dass eine Endkonzentration von 5 ng/µl erreicht wurde, und bei folgendem Programm im Thermocycler (PTC-200) in cDNA revers transkribiert:

Hybridisierungsphase für 10 min bei 25 °C; Elongationsphase für 50 min bei 42 °C und Inaktivierung für 15 min bei 70 °C. Die umgeschriebene cDNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei – 20 °C gelagert. Diese sollte aber höchstens dreimal aufgetaut werden.

2.2.5.2 Taqman-PCR mit SYBR Green Detektion

Für die weitere Taqman®-Analyse wurde ein PCR-Mastermix mit dem SYBR®-Reaktionspuffer hergestellt, in dem die 18S Primer in einer Konzentration von 0,625 pmol/µl und alle anderen verwendeten Primer in einer Konzentration von 2,5 pmol/µl vorlagen. Zu 20 µl Mastermix wurden 2,2 µl der umgeschriebenen cDNA in je ein 'well' der 96-'well'-Platte pipettiert. Pro Probe und Gen wurden mindestens vier technische Replikate angefertigt. Anschließend wurde die 96-'well'-Platte mittels einer Folie fest verschlossen, 1 min bei 5292 × g in einer 4K15C zentrifugiert und bis zur Messung lichtgeschützt aufbewahrt. Bei entsprechender 'Annealing'-Temperatur konnte die Reaktion im ABI Prism® 7900HT gestartet werden.

Das Temperatur-Zeit-Schema unterschied sich zwischen den Messungen nur in der 'Annealing'-Temperatur der Primer für das entsprechende Gen. Diese sind in Tabelle 3

angegeben. Auf eine anfängliche Initialphase von 50 °C für zwei Minuten folgte eine Denaturierungsphase bei 95 °C für 10 min. Die Amplifikation wurde in 40 Zyklen wiederholt mit einer Denaturierungsphase bei 95 °C für 15 Sekunden und einer Elongationsphase bei Primer abhängigen °C für 60 Sekunden.

2.2.5.3 Taqman-PCR mit 'Assays on demand'

Der Mastermix für die Reaktion setzte sich je 'well' wie folgt zusammen: 1,11 µl 'Assay on demand', 7,79 µl RNase freies Wasser, 2,2 µl cDNA und 11,1 µl 2 × Universal Mastermix. Das Temperatur-Zeit-Schema für die Reaktion ergab sich somit aus den oben genannten Schritten mit einer 'Annealing'-Temperatur von 60 °C für 60 Sekunden da alle 'Assays on demand' die gleiche 'Annealing'-Temperatur besaßen.

Sowohl mit der SYBR®-Green- als auch der 'Assay on demand'-Methode wurde immer 18S als Standard-Gen parallel gemessen, um Unterschiede im Ausgangsmaterial gegebenenfalls später korrigieren zu können.

2.2.5.4 Auswertung der Taqman®-Ergebnisse: *In-vitro*-Modellcharakterisierung

In jedem Lauf wurde eine Standardkurve erstellt, für die die gemessenen C_T -Werte gegen die vier bekannten relativen Konzentrationen aufgetragen wurden. Der relative Gehalt an genspezifischer mRNA wurde durch Vergleich des C_T -Wertes (Mittelwert aus vier technischen Replikaten) mit der Standardkurve ermittelt. Zur Berechnung der Expressionsderegulation eines Gens zwischen rPTCs *in vitro* und Nierenkortex *in vivo* wurde der relative Gehalt eines Gens zu einem bestimmten Zeitpunkt der Kultur *in vitro* durch den mittleren relativen Gehalt in den vier unbehandelten Nierenkortexproben geteilt. Der mittlere relative Gehalt wurde nach Logarithmierung der Einzelwerte ermittelt, analog zur Berechnung der Deregulationsfaktoren aus den Microarray-Daten. Um potentiell unterschiedliche Ausgangsmengen zu korrigieren, wurden die Ergebnisse noch auf den relativen Gehalt an 18S rRNA normiert.

2.2.5.5 Auswertung der Taqman®-Ergebnisse: NRK-52E-Zellen und rPTCs nach OTA-Behandlung und HK-2-Zellen nach der Behandlung mit den Nephrokarzinogenen

In diesem Versuch wurden zunächst alle C_T -Werte der sechs (vier bei den HK-2-Zellen) technischen Replikate auf der Platte gemittelt. Anschließend wurden die C_T -Werte der behandelten Proben auf die C_T -Werte der 18S Proben bezogen, der in jeder Probe separat bestimmt worden war, um erneut eventuelle Unterschiede des Ausgangsmaterial auszugleichen. Daraus konnte dann der $\Delta\Delta C_T$ -Wert bestimmt werden, der sich aus folgender Formel ergibt:

$(C_{T_MW_Ktrl_GenX}/C_{T_MW_Probe_GenX}) - (C_{T_MW_Ktrl_18S}/C_{T_MW_Probe_18S})$, wobei

Ktrl die Kontrolle bedeutet und MW der Mittelwert aus den entsprechenden Replikaten. Der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert ergibt dann den Deregulationsfaktor zwischen den behandelten Proben und den Kontrollproben.

2.2.6 Molekularbiologische Arbeiten zur Genexpressionsanalyse

Das Prinzip der Genexpressionsanalyse (s. Abb. 8) mittels Microarrays der Firma Affymetrix, genannt GeneChips®, beruht darauf, dass die Ausgangs-RNA letztlich in biotinmarkierte cRNA umgeschrieben wird und somit an die für verschiedene Gene spezifischen Oligonukleotide auf einem Microarray hybridisiert.

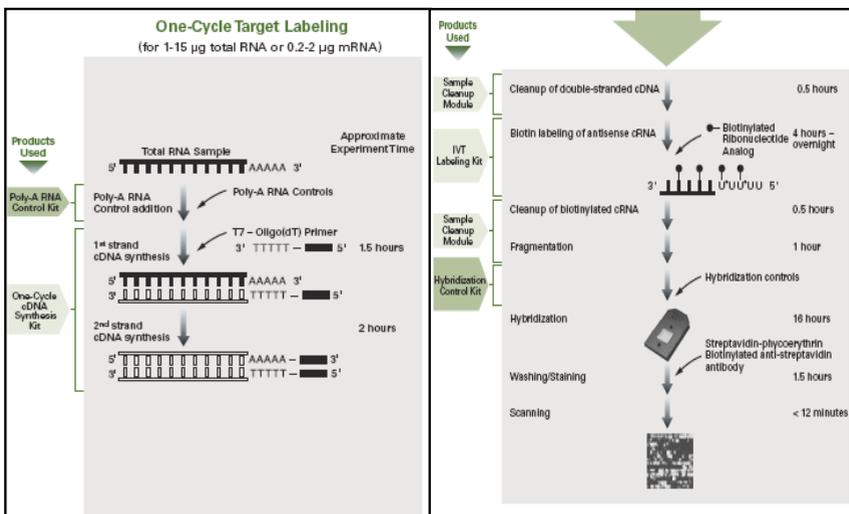


Abb. 8: Schema zum Ablauf der Microarray-Hybridisierung

Durch die Biotinmarkierung kann die hybridisierte cRNA über Fluoreszenz-Farbstoff gekoppeltes Streptavidin, das an Biotin bindet, quantitativ ausgewertet werden. Zuerst wird die isolierte RNA während der Erststrangsynthese mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Während dieser Erststrangsynthese findet der Einbau eines T7-Promotors statt, der die später folgende *in-vitro*-Transkription ermöglicht. Im Anschluss an die Erststrangsynthese findet die Doppelstrangsynthese statt.

Nach der Aufreinigung wird die cDNA in einer *in-vitro*-Transkriptionsreaktion unter Einbau biotinylierter Nukleotide mit Hilfe von bakterieller T7-Polymerase in cRNA transkribiert. Die entstehende cRNA wird anschließend fragmentiert und in einem definierten Hybridisierungsmix auf den Microarray aufgebracht. Die ursprünglich in der

Probe exprimierte messenger RNA (mRNA)-Population, die bestimmte Gene repräsentiert, hybridisiert dann während der folgenden Inkubation in Form markierter cRNA mit den Oligonukleotiden, die die entsprechenden Gensequenzen enthalten. In der folgenden „Färbung“ an einer 'Fluidics'-Station bindet das phycoerythringekoppelte Streptavidin an den Stellen des Microarrays, an denen die cRNA hybridisiert hat. Die Fluoreszenz des an bestimmte Oligos gebundenen Streptavidins wird dann in einem hochauflösenden Scanner gemessen.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle entsprechend zweier verschiedener Kits verwendet. Das Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) – Protokoll wurde für die *in-vivo*-Versuche verwendet, die auf den RAE230A GeneChip® hybridisiert wurden. Für die *in-vitro*-Versuche wurde nach dem One_Cycle_Affx-Kit (16 h) – Protokoll, das eine Weiterentwicklung des Enzo Protokolls darstellt, verfahren. Bei den *in-vitro*-Versuchen wurden für die Proben der Ratten ebenfalls die RAE230A GeneChips® und für die humanen Proben die HGU133 Plus2 GeneChips® verwendet. Beide Protokolle sind im Folgenden detailliert beschrieben.

2.2.6.1 Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) - Reverse Transkription

Für das Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA wurden zunächst 5 µg RNA und 1 µl T7-Oligo(dt)-Primer mit RNase freiem Wasser auf 12 µl aufgefüllt und für 10 min bei 70 °C inkubiert. Der Primer enthält die Promotorsequenz für die bakterielle T7-RNA-Polymerase, die für die *in-vitro*-Transkription benötigt wird. Die Einzelstrangsynthese erfolgte dann mittels der Zugabe von

Komponente	Menge (µl)	Endkonzentration
1st Strand Puffer (5 ×)	4	1 ×
DTT (0,1 M)	2	0,01 M
dNTP Mix (10 mM)	1	0,5 mM
Gesamt	7	

Nach 2 min Inkubation bei 42 °C wurde 1 µl Superscript II Reverse Transkriptase hinzugefügt und für die Erststrang-Synthese für 1 h bei 42 °C inkubiert. Die anschließende Doppelstrangsynthese erfolgte für 2 h bei 16 °C. Folgende Komponenten wurden hinzugefügt:

Komponente	Menge (μ l)	Endkonzentration
RNase freies Wasser	91	
2nd Strand Puffer (5 \times)	30	1 \times
dNTP Mix (10 mM)	3	0,2 mM
DNA-Ligase (10 U/ μ l)	1	10 U
<i>E.coli</i> DNA-Polymerase I (10 U/ μ l)	4	40 U
RNase H (2 U/ μ l)	1	2 U
Einzelstrangsynthese	20	
Gesamt	150	

Nach dieser Inkubationszeit wurden noch 2 μ l T4-DNA-Polymerase (10 U) hinzugefügt, die während einer Inkubation von 5 min bei 16 °C durch eine Auffüllreaktion die überhängenden Enden geglättet. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 10 μ l EDTA (0,5 M) dazugegeben und das Reaktionsgemisch konnte bei -20 °C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden.

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA erfolgte mittels des 'GeneChip® Sample Cleanup Module' von Affymetrix/Qiagen. Die Elution der cDNA wurde mit 14 μ l Elutionspuffer vorgenommen.

2.2.6.2 Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) – *In-vitro*-Transkription

Das Eppendorfgefäß, in dem sich die cDNA befand, wurde mit 10 μ l Wasser ausgespült. Unter Zugabe der folgenden Komponenten konnte die *in-vitro*-Transkription durchgeführt werden:

Komponente	Menge (μ l)	Endkonzentration
cDNA	22	
RNase freies Wasser	10	
HY Reaktion Puffer (10 \times),	4	1 \times
DTT (10 \times)	4	1 \times
Biotinmarkierte Ribonukleotide (10 \times)	4	1 \times
RNase Inhibitor (10 \times)	4	1 \times
T7-RNA-Polymerase (20 \times)	2	1 \times
Gesamt	40	

Durch die Inkubation für 4 h bei 37 °C fand der Einbau biotinylierter Nukleotide mit Hilfe der T7-Polymerase statt, deren Promotorsequenz schon bei der Doppelstrangsynthese eingebaut worden war.

Die Aufreinigung der doppelsträngigen cDNA wurde ebenfalls mittels des 'GeneChip® Sample Cleanup Module' von Affymetrix/Qiagen durchgeführt. Die cRNA wurde einmal mit 11 µl RNase freiem Wasser und einmal mit 10 µl RNase freiem Wasser eluiert.

Für die quantitative und qualitative Vermessung der cRNA wurde sie zunächst 1:10 mit RNase freiem Wasser verdünnt. Mittels des Bioanalyzer 2100 von Agilent wurde eine Gelektrophorese durchgeführt. Nach einer weiteren 1:10 Verdünnung wurde die RNA-Konzentration im SpektraMax Plus 384 UV-Spektrometer quantifiziert ($OD_{260} = 1$ entspricht 40 µg/ml).

2.2.6.3 Affy_One_Cycle_Enzo (4 h) - Hybridisierung der Microarrays

15 µg der cRNA und 8 µl Fragmentierungspuffer (5 ×) wurden mit RNase freiem Wasser auf ein Volumen von 40 µl aufgefüllt und in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß für 35 min bei 94 °C inkubiert. Die RNA wird dabei in dem stark basischen Milieu in Fragmente bestimmter Länge gespalten, die von dem pH-Wert des Puffers beeinflusst wird. Die Fragmentierung erhöht die Effizienz der Hybridisierung an die Oligos auf dem Microarray. Zu Beginn wurde der 20 × Hybridisierungskontrolle/Oligo B2-Mix für fünf Minuten bei 65 °C erwärmt. Zu der fragmentierten cRNA wurden folgende Komponenten pipettiert:

Komponente	Menge (µl)
RNase freies Wasser	84
Oligo B2 (3 nM) + 20 × Hybridisierungskontrolle	20
Heringssperma (10 mg/ml)	3
acetyliertes BSA (50 mg/ml)	3
MES Puffer (2 ×)	150
Fragmentierte cRNA	40
Gesamt	300

Gegebenenfalls konnte der Hybridisierungsmix bei -80 °C aufbewahrt werden. Bei sofortiger Verwendung oder nach dem Auftauen wurde der Hybridisierungsmix für fünf Minuten bei 99 °C, weitere fünf Minuten bei 45 °C erhitzt und danach bei 13000 × g fünf Minuten lang abzentrifugiert. Während der Fragmentierung oder während des Erhitzens konnten die RT warmen GeneChips® mit 200 µl MES-Puffer (1 ×) gefüllt und für 10 min bei 45 °C und 60 rpm prähybridisiert werden. Nun folgte der Austausch der 200 µl

MES-Puffer gegen 200 µl Hybridisierungsmix. Die Hybridisierung fand in einem speziellen Hybridisierungssofen für 16 h bei 45 °C und 60 rpm statt.

2.2.6.4 One_Cycle_Affx-Kit (16 h) - Protokoll

Für die *in-vitro*-Studien wurde das One_Cycle_Affx-Kit (16 h) von Affymetrix für die Synthese biotinmarkierter cRNA verwendet. Hierfür wurden ebenfalls 5 µg RNA als Ausgangsmaterial eingesetzt. Der wesentliche Unterschied zu der oben beschriebenen Vorgehensweise lag darin, dass die *in-vitro*-Transkription für 16 h statt 4 h inkubiert wurde und deshalb über Nacht direkt nach der Doppelstrangsynthese angesetzt werden konnte:

Komponente	Menge (µl)
aufgereinigte cDNA	12
RNase freies Wasser	8
IVT Labeling Puffer (10 ×)	4
IVT Labeling NTP Mix	12
Labeling Enzym-Mix	4
Gesamt	40

Für die Fragmentierung änderte sich der Einsatz der zu fragmentierenden cRNA, da man in diesem Protokoll davon ausging, dass letztlich nur 80 % der eingesetzten cDNA zu cRNA umgeschrieben wurden. Der Hybridisierungsmix setzte sich demnach wie folgt zusammen:

Komponente	Menge (µl)
DEPC Wasser	64
Oligo B2 (3 nM),	5
Hybridisierungskontrolle	15
Heringssperma (10 mg/ml)	3
acetyliertes BSA (50 mg/ml)	3
MES Puffer (2 ×)	150
DMSO	3
Fragmentierte cRNA	30
Gesamt	300

Die Hybridisierung der Chips erfolgte analog zur obigen Beschreibung.

2.2.6.5 Färben und Scannen der Microarrays

In einer 'GeneChip® Fluidics Station 400' wurden die hybridisierten Microarrays gemäß des Protokolls EukGE_WS2v4 gefärbt und gewaschen. Die Färbung erfolgte über ein phycoerythringekoppeltes Streptavidin (SAPE), welches lichtempfindlich ist und an die zuvor eingebauten biotinylierten Nukleotide bindet. Zusätzlich wurde durch ein Antikörperfärbepuffer, der biotinylierte Antikörper gegen das Streptavidin enthielt, das Signal verstärkt. Diese Signale wurden mit dem konfokalen 'Gene Array Scanner' erfasst, der mit einem Argonlaser ausgestattet ist und die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Die Emission wurde bei 570 nm gemessen.

2.2.7 Auswertung der Microarrays

2.2.7.1 Qualitätskontrolle der Microarrays und „Kondensierung“ der Daten

Auf den Affymetrix Microarrays (oder GeneChips®) sind pro Gen bzw. 'Probe set' 11 genspezifische Sonden für den RAE230A und HGU133 Plus2 GeneChip® (25mer Oligonukleotide, die genau der jeweiligen Gensequenz entsprechen: 'perfect matches' (PM)) photolithographisch aufgebracht, zu denen jeweils ein 'mismatch' (MM)-Oligo existiert, das in der Mitte ein ausgetauschtes Nukleotid enthält und als Kontrolle für die Hintergrundhybridisierung dient.

Folgende Dateitypen wurden nach dem Scannen der Daten und weiterer Bearbeitung mit der GCOS-'Software' von Affymetrix und der 'Refiner Software' von Genedata erhalten:

- „DAT“: Diese Datei enthält die Rohdaten. Die Fluoreszenz der Bereiche, genannt 'features', die mit Oligos einer bestimmten Sequenz bestückt sind, z. B. einem PM- oder MM-Oligo, ist in 36 Pixelintensitäten angegeben.
- „CEL“: Wird aus der DAT-Datei mittels der GCOS-'Software' berechnet. Dabei werden die 36 Pixels pro 'feature' gemittelt, und es erfolgt eine Hintergrundsubtraktion nach einem bestimmten Schema unter Berücksichtigung der Pixel zwischen den Stellen, an denen sich keine Oligos befinden.
- „CHP“: Wird aus der CEL-Datei mit Hilfe der GCOS-'Software' berechnet. Die Intensitäten aller PM- und MM-Oligos eines 'Probe sets' werden nach dem MAS5-Algorithmus zu einer Intensität verrechnet. Diesen Vorgang nennt man Kondensierung. Aus der Berechnung des Verhältnisses der Hybridisierungsintensitäten der PM- zu den MM-Oligos resultiert eine Intensität und ein p-Wert, der die Wahrscheinlichkeit angibt, ob das entsprechende Gen, das von dem 'Probe set' repräsentiert wird, wirklich exprimiert ist. Bei $p \leq 0,04$

bezeichnet man ein 'Probe set' als 'present', also wirklich exprimiert, bei einem p-Wert zwischen 0,04 und 0,06 als marginal exprimiert, und bei $p \geq 0,06$ als 'absent'. Für einige 'Housekeeping'-Gene (GAPDH, Hexokinase und β -Actin), die mehr oder weniger in jeder Probe exprimiert werden, sind auf dem Microarray 'Probe sets' für das 5'-Ende, die Mitte und das 3'-Ende dieser Gene aufgebracht. Das 3'/5' Verhältnis der Intensitäten ist somit ein Qualitätsmerkmal, wie gut die cDNA-Synthese vom 3'- bis zum 5'-Ende des Gens stattgefunden hat. Dabei ist ein Verhältnis zwischen 1 (optimal) und ca. 2,5 akzeptabel. Nach der Kondensierung kann der Median aller Intensitäten (nach Abzug der oberen und unteren 2 %) noch auf einen bestimmten Wert, genannt 'Target intensity' (TGT) von z. B. 100 eingestellt werden. Dieses erleichtert den Vergleich mit weiteren Chipdaten. Die Qualitätsparameter der CHP-Datei (% 'present', 3'/5'-cDNA-Synthese) wurden für eine erste Qualitätsbeurteilung genutzt.

- Genedata „CoBi INS“-file: Dieser file, der mit der Genedata 'Refiner Software' von der CEL-Datei ausgehend erstellt wird, entspricht der CHP-Datei der 'GCOS'-Software. Jedoch erfolgt vorher eine Qualitätskontrolle mit Korrekturmöglichkeit.

Für die Diagnose und Korrektur der Microarray-Qualität wurden die CEL-Dateien in die 'Refiner Software' der Firma Genedata AG eingeladen. Da immer mindestens 12 Microarrays gleichzeitig prozessiert wurden, war es der 'Software' möglich, dunkle oder helle Punkte, Gradienten und generelle Intensitätsstörungen pro Microarray festzustellen und im Vergleich zu einem Referenzexperiment, das aus den eingeladenen Microarray-Daten virtuell berechnet wurde, zu korrigieren. Besonders drastische Abweichungen konnten maskiert werden. Danach erfolgte die Kondensierung der Daten zu einem Intensitätswert und einem Qualitäts-p-Wert pro 'Probe set' mit den auch im Refiner implementierten MAS5-Algorithmien. MAS5 ('Microarray Analysis Suite', Version 5.0) wurde in allen Studien als Kondensierungs-Algorithmus verwendet. Außerdem wurden die Daten noch auf eine TGT von 100 normalisiert.

2.2.7.2 Analyse der Genexpressionsdaten

Die Analyse der Daten erfolgte mittels der 'Software' 'Expressionist Analyst' der GeneData AG. Im Folgenden werden die verschiedenen Methoden zur Qualifizierung und statistischen Auswertung und Darstellung der Daten vorgestellt.

2.2.7.2.1 Box Plot Analyse

Bei diesem Vergleich der absoluten Expressionsdaten befinden sich in der sog. 'Box' 50 % der gemessenen Werte. Die Mitte der 'Box' entspricht dem Medianwert der

Datenverteilung. Die sich außerhalb befindenden Fehlerbalken machen die Streuung der Daten kenntlich. Diese Art der Analyse dient dem ersten Überblick über die Versuchsreihe.

2.2.7.2.2 Hauptkomponentenanalyse (PCA = Principal Component Analysis)

In dieser Analyse werden die Expressionsdaten in einem 3-dimensionalen Raum dargestellt, auf den die n-dimensionalen Daten projiziert werden. Die Ähnlichkeit der Expressionsdatensätze untereinander ist umso höher, je näher sie beieinander liegen bzw. 'clustern'. Diese Berechnung wird anhand einer möglichst geringen Anzahl an Hauptkomponenten durchgeführt. Diese Hauptkomponenten werden wiederum als lineare Kombination von n-veränderten Genen so berechnet, dass die daraus resultierende Reduktion der n-dimensionalen Streuung ohne Informationsverlust erfolgt. Man kann anhand dieser Darstellung schon sehr früh Ausreißer und dosis- bzw. zeitabhängige Verläufe feststellen (Butte, 2002).

2.2.7.2.3 Histogramm

In dieser zweidimensionalen Darstellungsmethode wird die Expressionsintensität der Gene einer vorher ausgewählten Gengruppe pro Experiment bzw. Datensatz nebeneinander dargestellt. Wenn es sich um normalisierte Datensätze handelt, können auch Deregulationsfaktoren dargestellt werden.

2.2.7.2.4 N-Way ANOVA

Mit dieser Methode ist es möglich Unterschiede zwischen einer Reihe von Proben bezüglich mehrerer Parameter statistisch zu erfassen. Sie überprüft, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen, jeweils bezüglich eines bestimmten Parameters. Da alle replikaten Proben, die sich zwar hinsichtlich bestimmter Faktoren unterscheiden, nicht aber in dem, der statistisch evaluiert werden soll, in einer Gruppe für diese Analyse vereinigt werden können, ist die Anzahl an Replikaten höher, was eine statistische Analyse zuverlässiger macht. Je kleiner der p-Wert ist, desto signifikanter ist die Deregulation der Gene zwischen zwei Gruppen bezogen auf den ausgewählten Parameter. In den meisten Analysen wurde das 2-Way ANOVA verwendet, um die Unterschiede zwischen den behandelten und unbehandelten Proben hinsichtlich der Behandlung und der Zeitpunkte zu evaluieren.

2.2.7.2.5 Unpaired t-Test

Der t-Test dient zur Identifikation differentiell exprimierter Gene zwischen zwei Gruppen von Datensätzen, z. B. Gruppen von biologischen Replikaten behandelter und unbehalteter Tiere. Voraussetzung für den Test ist die Normalverteilung der

Expressionsdaten der miteinander verglichenen Gruppen. Dieser Test geht von der Annahme aus, dass die Mittelwerte zweier Datensätze gleich sind.

2.2.7.2.6 Paired t-Test

Dieser t-Test wird für sogenannte „gepaarte“ Proben verwendet, z. B. bei Zellkulturproben, bei denen die Kontrolle und die dazugehörigen behandelten Proben von der gleichen Zellkulturpassage stammen, oder bei primären Zellkulturen, die von dem gleichen Tier entnommen wurden. So werden größere Variationen z. B. zwischen Passagen nicht in die Berechnung des p-Wertes miteinbezogen.

2.2.7.2.7 Welch-t-Test

Der Welch-t-Test vergleicht ebenfalls nur zwei Gruppen, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren. Zwar geht er von einer Normalverteilung der Daten aus, wie der t-Test, allerdings benötigt dieser nicht die Gleichheit der Varianzen in beiden Gruppen.

2.2.7.2.8 Self-organizing maps (SOM-Analyse)

Mit Hilfe der Self-organizing maps ist es möglich eine Vielzahl an Genen aufgrund ihres Expressionsprofils zu ordnen. Diese Methode kann sowohl mit den Relativdaten, d. h. auf die entsprechenden Kontrollen normalisiert, als auch mit den Absolutdaten erfolgen. Am besten eignete sich entweder das euklidische oder 'positive correlation' Distanzmaß. Bei Ersterem werden die Daten zu einer Gruppe geordnet, die sich im Verlauf des Profils und der Richtung der Deregulation ähneln. Unter Verwendung der zweiten Methode werden auch ähnliche Profile in einer Gruppe zusammengestellt, allerdings ohne Berücksichtigung der absoluten Deregulationsrichtung.

2.2.7.2.9 Hierarchical 'Clustering'

In dieser Analyse werden die Expressionsprofile der Gene bezüglich ihrer Ähnlichkeit angeordnet. Diese Methode, die mittels verschiedener Algorithmen berechnet werden kann, z. B. 'nearest neighbour method' oder 'average-linkage clustering', beruht auf einem iterativen Verfahren. Die Berechnung der 'cluster' beginnt zunächst mit zwei Genen, deren Expressionsprofil sehr ähnlich ist. Zu diesem 'cluster' werden dann die nachfolgenden Gene zugeordnet, bis durch eine stetige Umverteilung alle Gene vollständig zugeordnet sind (Quackenbusch, 2001). In dieser Arbeit wurden stets die Relativdaten zur Darstellung der Gene im 'cluster' verwendet, welches die hochregulierten Daten in rot und die herunterregulierten Daten in grün darstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der *in-vivo*-Studien mit den Nephrokarzinogenen

Für die *in-vivo*-Versuche wurden männliche 6-7 Wochen alte Wistar-Ratten mit Aristolochiasäure (9,6 mg/kg KG/d), Kaliumbromat (30, 60 und 90 mg/kg KG/d) und N-Nitrosomorpholin (12 mg/kg KG/d) für 3, 7 und 14 Tage behandelt. Ochratoxin A (3 mg/kg KG/d) wurde Tieren mit einem Gewicht von ca. 200 g für 1, 3 und 7 Tage verabreicht. Für die Studie mit 2-Nitrofluoren (44 mg/kg KG/d) wurden 8-12 Wochen alte männliche Ratten bis hin zu 14 Tage mit dem Nierenkarzinogen behandelt.

3.1.1 Histopathologie

Nach der Behandlung mit den verschiedenen Nephrokarzinogenen wurden von den Ratteninnieren Gewebeschnitte angefertigt und angefärbt. Die Befundung erfolgte durch Fr. Dr. Bach und Fr. Dr. Hartmann. Für jeden Dosis-Zeitpunkt wurden drei oder fünf Replikate verwendet (s. 2.2.1).

Bei den Ratten, die mit 12 mg/kg KG/d N-Nitrosomorpholin (NNM) behandelt wurden, konnten zu keinem Zeitpunkt, d. h. an Tag 3, 7 und 14, Veränderungen in der Niere festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu war nach 7- und 14-tägiger Gabe von 9,6 mg/kg KG/d Aristolochiasäure (AA) eine häufige und zum Teil auch stärker ausgeprägte interstitielle Infiltration mit mononukleären Zellen nachweisbar (Abb. 9 C, D und E).

Die Applikation von 30 mg/kg KG/d Kaliumbromat (KBrO₃) resultierte in einer Schwellung der Epithelzellen des proximalen Tubulus bei einem Tier nach 7-maliger Gabe und bei vier von fünf Tieren nach 14-maliger Gabe (Abb. 9 B). Die betroffenen Nierenkanälchen fielen durch eine stärkere Eosinophilie auf. Ihr Zytoplasma wirkte aufgelockert und enthielt vereinzelt Proteineinschlüsse.

Die Applikation von 60 und 90 mg/kg KG/d zeigte ähnliche unspezifische Resultate. Eine sehr geringgradige (Grad 1) Schwellung der proximalen Tubuli war bei drei von fünf Tieren nach 7-maliger Gabe von 90 mg/kg KG zu erkennen. Die Dosierung von 60 mg/kg KG Kaliumbromat war zu diesem Untersuchungszeitpunkt ohne Befunde. Nach 14-maliger Gabe von 60 oder 90 mg/kg KG lag eine Tubulusschwellung bei allen Ratten vor. Der Schweregrad variierte zwischen Grad 1 und Grad 2. Die betroffenen Nierenkanälchen fielen ebenfalls durch eine etwas stärkere Eosinophilie auf. Ihr Zytoplasma wirkte aufgelockert und enthielt vereinzelt winzige Proteineinschlüsse oder Vakuolen. Dieser Minimalbefund wurde als adaptiver und nicht als adverser Effekt beurteilt.

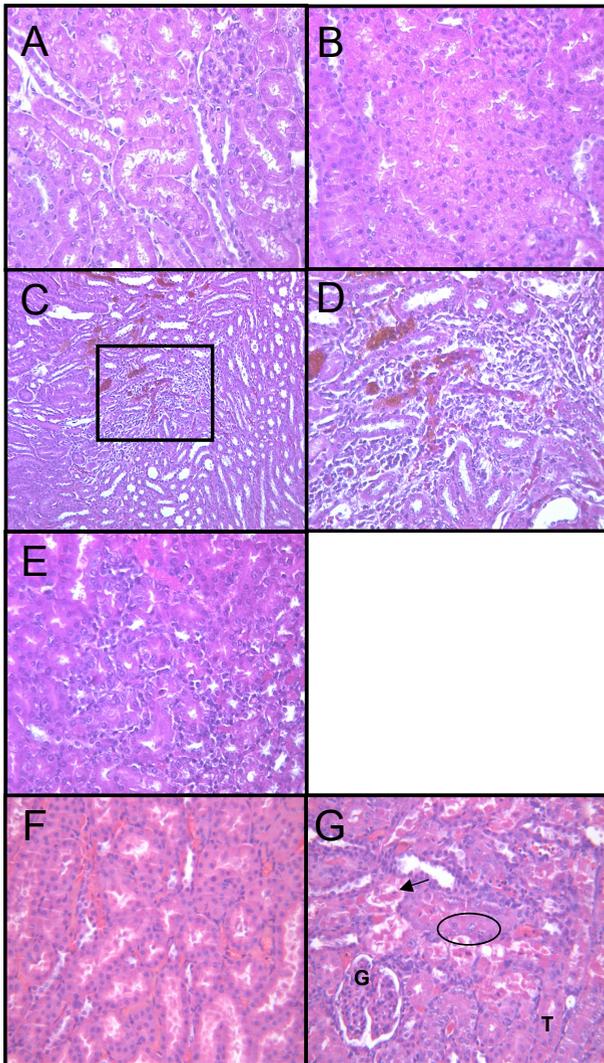


Abb. 9: Hämatoxylin- und Eosinfärbung von Gewebeschnitten aus Nieren von Ratten, die mit verschiedenen Nephrokarzinogenen behandelt wurden

A) zeigt einen Gewebeausschnitt aus der Niere eines Kontrolltiers. B) zeigt die Niere nach 14-tägiger Behandlung mit Kaliumbromat (KBrO_3). Eine deutliche Schwellung der Tubuli ist zu erkennen. C) lässt die Einwanderung von mononukleären Zellen nach der Applikation von Aristolochiasäure (AA) nach 14 Tagen erkennen. D) zeigt den in C) markierten Ausschnitt vergrößert. E) zeigt ebenfalls die Infiltration von Zellen in einem weiteren Tier nach 14-tägiger Behandlung mit AA. F) Gewebeschnitt aus der Niere eines Kontrolltiers zu den mit OTA behandelten Tieren. G) zeigt beispielhaft die verstärkt auftretenden Nekrosen (mit einem Pfeil markiert) und das Vorkommen von pleiomorphen Zellkernen (mit einem Kreis markiert), die auf eine verstärkte Aktivität nach 7-tägiger OTA-Behandlung schließen lassen (G = Glomerulum; T = Tubulus). Bild C wurde mit einer 10-fachen Vergrößerung aufgenommen, alle anderen Bilder mit einer 25-fachen Vergrößerung.

Da die Proben mit der Verabreichung von 44 mg/kg KG/d 2-Nitrofluoren (2NF) für 3, 7 und 14 Tage aus einer Studie zur Lebertoxizität stammten, gab es keine histopathologischen Untersuchungen der Niere.

Nach eintägiger Applikation von 3 mg/kg KG/d Ochratoxin A (OTA) waren kaum Veränderungen in der Niere festzustellen. Hingegen waren nach drei Tagen Einzelzellnekrosen (unilateral) des Grades 1-2 und Übergangszell-Hyperplasien Grad 1 zu sehen. Weitere Veränderungen zeigten sich zum späteren Zeitpunkt (Abb. 9 G) und resultierten in mittelgradigen tubulären Nekrosen im Kortex. Außerdem wurde eine vermehrte Anzahl von Mitosen in den kortikalen Tubuli festgestellt. Des Weiteren zeigten sich vergrößerte Nuklei in den kortikalen Tubuli wie auch basophile Tubuli mit inflammatorischer Infiltration.

3.1.2 Vergleich der Genexpressionsprofile genotoxischer Nephrokarzinogene

3.1.2.1 Qualitätsüberprüfung und statistische Analyse

Die Analyse der Microarray-Daten wurde mit Hilfe der Software 'Expressionist Analyst' [GeneData AG, Basel, Schweiz] durchgeführt.

Um zunächst einen Überblick über die Qualität der Expressionsdaten zu erhalten und die Qualität der Microarrays miteinander vergleichen zu können, wurden alle Microarray-Datensätze, die zu einem Experiment gehörten, in einem Box Plot nebeneinander dargestellt. Da die Mitte der 'Box' dem Medianwert der Datenverteilung entspricht, konnte so die Qualität aller Microarrays überprüft werden, und erste Ausreißer aufgrund dieser erkannt werden. In Abb. 10 ist beispielhaft zu einem Datensatz das Ergebnis der Box-Plot-Analyse gezeigt. In dieser Analyse werden die Gene miteinbezogen, die gemäß des MAS5-Algorithmus als 'present' bezeichnet werden ($p = 0,04$).

Um einen ersten Überblick über die Verteilung der Daten zu erlangen, eignet sich eine Hauptkomponentenanalyse (PCA). In dieser Analyse werden die verschiedenen Proben als Kugeln dargestellt und in Abhängigkeit zu ihrem Genexpressionsprofil im dreidimensionalen Raum verteilt. Mittels der PCA ist es möglich, ohne jegliche statistische Analysen eine zeit- oder dosisabhängige Wirkung zu erkennen. Für die genotoxischen Nephrokarzinogene ist beispielhaft eine PCA von Proben aus den Nieren der mit Aristolochiasäure behandelten Ratten dargestellt (Abb. 11). Des Weiteren konnten Ausreißer sehr schnell im Vergleich zu den anderen Proben dargestellt werden, da alle Experimente gleichzeitig in einer Graphik abgebildet wurden und ein vollkommen anderes Expressionsprofil einer Probe zu einer räumlichen Separierung von den übrigen Proben führt.

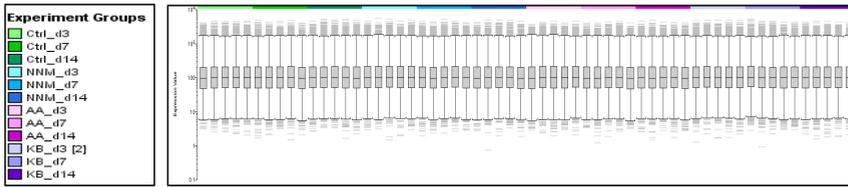


Abb. 10: Box-Plot-Analyse

Der Box Plot, hier beispielhaft aus der Studie mit NNM, AA und KBrO_3 (abgekürzt als KB), ist bei einem p-Wert von 0,04 gezeigt, der alle 'present' Gene gemäß des MAS5-Algorithmus einschließt. Für die Genexpressionsanalysen *in vivo* wurde der RAE230A GeneChip® verwendet und die Expressionswerte wurden auf eine mittlere Targetintensität (TGT) von 100 eingestellt. Man kann gut erkennen, dass alle Microarray-Daten qualitativ sehr ähnlich sind (Ctrl = Kontrolle; d = Tag).

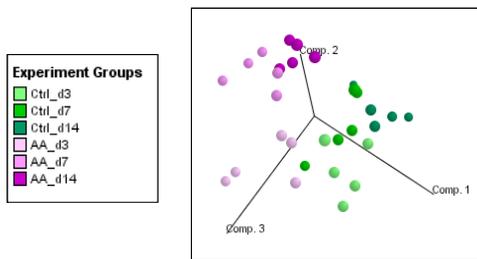


Abb. 11: PCA am Beispiel der Aristolochiasäure

Die PCA, in der jede Kugel dem Expressionsdatensatz einer Probe entspricht, zeigt die zeitabhängige Separierung der verschiedenen Proben unter Verwendung der sog. 'present' Gene ($p = 0,04$). Als Kugeln in verschiedenen Grüntönen sind die Kontrollen (Ctrl) zu den angegebenen Zeitpunkten ($d = \text{Tag}$) dargestellt und in verschiedenen Pinktönen die mit Aristolochiasäure (AA) behandelten Proben, ebenfalls zu den entsprechenden Zeitpunkten.

Als nächstes wurden verschiedene statistische Methoden durchgeführt, um die signifikant deregulierten Gene zwischen den entsprechenden Kontrollen und den behandelten Proben zu identifizieren. Im Fall der genotoxischen Nephrokarzinogene wurde jeweils ein N-Way ANOVA mit einem p-Wert von 10^{-3} für die Faktoren Behandlung und Zeit, und ein t-Test pro Zeitpunkt mit $p = 10^{-3}$ durchgeführt. Durch das N-Way ANOVA können Unterschiede zwischen einer Reihe von Proben bezüglich mehrerer Parameter statistisch erfasst werden, da diese Methode überprüft, ob die Varianz zwischen den Gruppen größer ist als die Varianz innerhalb der Gruppen, jeweils bezüglich eines bestimmten Parameters. Der t-Test hingegen dient zur Identifikation differentiell exprimierter Gene zwischen 2 Gruppen von Datensätzen, z. B. Gruppen von biologischen Replikaten behandelter und unbehaltener Tiere.

Nach der Vereinigung beider Gruppen, die aus den statistischen Tests resultierten, wurden nur die Gene selektiert, die $\geq 1.7 \times$ zur Kontrolle dereguliert waren, d. h. hoch- oder

herunterreguliert, und eine Intensität > 20 besaßen, da die Gene in dem unteren Bereich mit einer Intensität < 20 meist sehr variable Expressionsprofile besitzen. Daraus ergaben sich für die genotoxischen Nephrokarzinogene folgende Gengruppen: Für NNM wurden 32 Gene, für AA 117 Gene und für 2NF 137 Gene als statistisch signifikant unter den genannten Bedingungen selektiert. Die Vereinigungsmenge aus allen Gengruppen der genotoxischen Nephrokarzinogene ergab 247 Gene. Die entsprechenden Genlisten mit den Expressiondaten, der in der Diskussion aufgegriffenen Gene, befinden sich im Anhang. Um aus den identifizierten Genen eine Information zum Mechanismus der Substanzwirkungen zu bekommen, wurde zuerst eine Kategorisierung im Hinblick auf die biochemische und zelluläre Funktion der Gene bzw. der Proteine, für die die deregulierten Gene kodieren, durchgeführt. Dafür wurden auf Informationen aus verschiedenen Datenbanken, wie SwissProt, Proteome, PubMed und NetAffx von Affymetrix zurückgegriffen. Das heißt, dass in den folgenden Abschnitten der Begriff Gen im Normalfall, für das Protein, das durch das jeweilige Gen kodiert wird, steht. Die Vorgehensweise ist im Folgenden an einem Beispiel verdeutlicht: 'Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A' (*p21*) wurde aufgrund der in den Datenbanken verfügbaren Informationen den folgenden biochemischen Kategorien mit der entsprechenden Sub-Kategorie zugeordnet: *Regulation von Proliferation – Checkpoint, Zellzyklus/Proliferation - Cdk Inhibitoren, Oxidativer Stress – DNA-Schädigung*. Dieses Gen war nach den genotoxischen Nephrokarzinogenen in der Niere hochreguliert. Da *p21* zu den *p53*-Zielgenen gehört und bekannt ist, dass der Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor *p53* nach DNA-Schädigung induziert wird, wurde *p21* anschließend zu der toxikologischen Kategorie *Oxidativer Stress/DNA-Schädigung* geordnet. Das heißt, dass zunächst die biochemische Funktion bestimmt wurde und anschließend unter Berücksichtigung der Richtung der Regulation (hoch- oder herunterreguliert) in den behandelten Proben versucht wurde, die Folge für die Niere bzw. das Nierengewebe aufgrund entsprechender Veränderung der Expression des Gens zu eruieren.

3.1.2.2 Mechanistische Analyse der genotoxischen Nephrokarzinogene

Allgemein konnte man feststellen, dass die Analyse der Studie mit NNM nur sehr wenige Gene bei dem gleichem cut-off, der auch bei der Analyse der anderen Nephrokarzinogenen verwendet worden war, ergab. Dies steht im Einklang mit den histopathologischen Befunden, da dort ebenfalls keine Veränderungen der Niere zu sehen waren. Um alle genotoxischen Nephrokarzinogene miteinander vergleichen und Gemeinsamkeiten und Unterschiede nebeneinander darstellen zu können, wurde ein hierarchisches 'Clustering' gewählt.

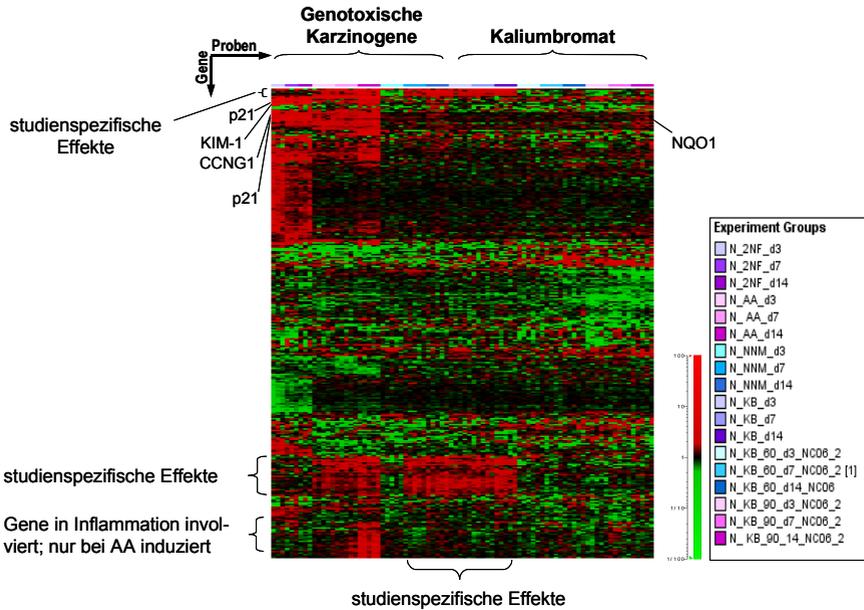


Abb. 12: Hierarchisches 'Cluster' mit den *in vivo* verwendeten Nephrokarzinogenen

Dieses 'Cluster' zeigt die auf die entsprechenden Kontrollen normalisierten Genexpressionsdaten. Rot bedeutet hochreguliert und grün bedeutet herunterreguliert in Bezug zur Kontrolle. Die Expressionsprofile sind in aufsteigender Reihenfolge der Zeitpunkte Tag 3, 7 und 14 (d = Tag) für folgende Nephrokarzinogene von links nach rechts dargestellt: 2NF, AA, NNM, KBrO₃ (KB) (30 mg/kg KG/d), KBrO₃ (60 mg/kg KG/d) und KBrO₃ (90 mg/kg KG/d). Für das 'Cluster' wurden alle Gengruppen der gezeigten Nephrokarzinogene zusammengefasst. Dies resultierte in 318 Genen.

Anhand dieses 'Clusters' (Abb. 12) fielen bestimmte Bereiche mit Genen auf, die durch die verschiedenen Nephrokarzinogene gemeinsam induziert oder herunterreguliert wurden oder aber auch eine gegensätzliche Deregulierung erkennen ließen, die im Folgenden erläutert werden. Die Vergleichbarkeit wird anhand der wichtigsten toxikologischen Kategorien, die bei der Analyse der genotoxischen Nephrokarzinogene auftraten, dargelegt, indem die dazugehörigen biochemischen Kategorien/Funktionen kursiv und die toxikologischen Kategorien kursiv und fett gedruckt sind. Zuerst werden die Kategorien beschrieben, die hochregulierte Gene beinhalteten, anschließend diejenigen, in denen die herunterregulierten Gene zusammengefasst wurden. Auf einzelne Gene aus den verschiedenen Kategorien wird anschließend in der Diskussion eingegangen.

Im oberen Teil des 'Clusters' zeigten sich einige hochregulierte Gene, die in *oxidativem Stress*, *DNA-Metabolismus* und der *Regulation der Proliferation* eine Rolle spielten. Darunter waren einige *p53*-Zielgene, wie z. B. *p21* und *Cyclin G1 (CCNG1)*.

Diese Gene waren durch NNM nur zum Teil, aber durch 2NF und AA deutlich induziert worden und wurden in der toxikologischen Kategorie **Oxidativer Stress/DNA-Schädigung** zusammengefasst. Gene, die im *Proteinmetabolismus* eine Rolle spielen und schon zu einem frühen Zeitpunkt stark induziert wurden, stellten die toxikologische Kategorie **Oxidativer Stress/Proteinschädigung** dar. Einige Gene wurden in der toxikologischen Kategorie **Oxidativer Stress/Detoxifizierung** vereint, da sie in Prozessen wie *Biotransformation* und *GSH-Metabolismus* involviert waren, von denen bekannt ist, dass sie als gegenregulatorische Maßnahme bei oxidativen Stress eine Rolle spielen.

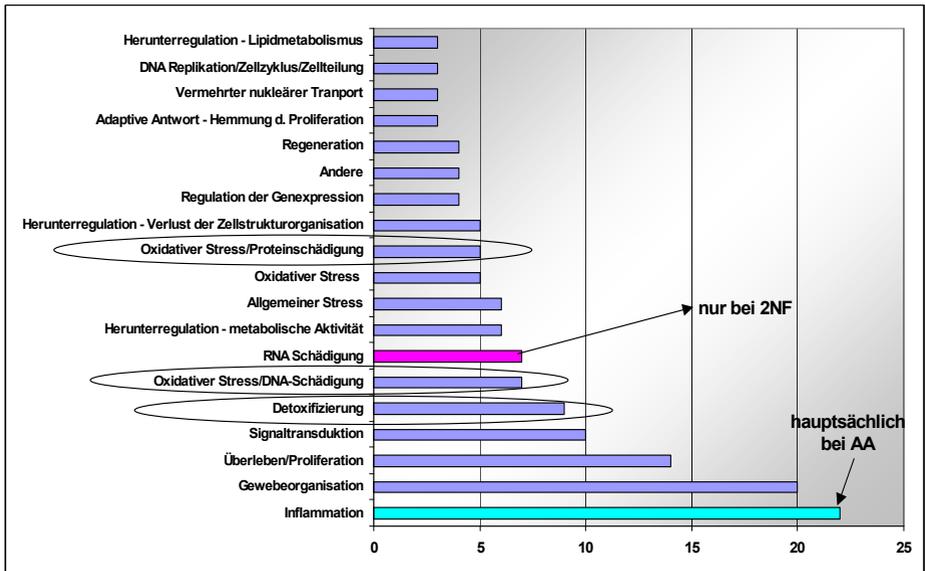


Abb. 13: Verteilung der Gene in den toxikologischen Kategorien

Nach der Analyse der Microarray-Daten, der mit den genotoxischen Nephrokarzinogenen 2NF, AA und NNM behandelten männlichen Wistar-Ratten, wurden die Gene hinsichtlich ihrer biochemischen Funktion kategorisiert. Unter Berücksichtigung der Deregulationsrichtung wurden sie in sog. toxikologische Kategorien eingeteilt, die die zellulären und organhomöostasebetreffenden Folgen für das Nierengewebe wiedergeben sollen. Dargestellt sind die toxikologischen Kategorien, die mehr als zwei Gene enthalten. NNM erzeugte insgesamt wenige Veränderungen der Expression im Nierengewebe. Einige Gene, die zu oxidativem Stress, oxidativem Stress/DNA- oder Proteinschädigung und Detoxifizierung geordnet wurden, wurden sowohl nach Applikation von 2NF als auch AA induziert. Auffällig zeigten sich die Gene, die als RNA-Schädigung zusammengefasst wurden und nur nach 2NF induziert waren, sowie die Inflammationsgene, die fast ausschließlich nach der Behandlung mit AA induziert waren.

Weitere Gene, die für die Metabolisierung von Substanzen wichtig sind, wurden in der Kategorie **Detoxifizierung** zusammengefasst. Eine weitere Kategorie bildeten Gene, die als Signal des **Überlebens und der Proliferation der Zellen** angesehen werden können.

Darunter fielen Gene, die für die *Regulation der Proliferation*, aber auch z. B. für den *Metabolismus von Nucleotiden und Nucleosiden* von Bedeutung sind. Ein mehr oder weniger stark verändertes Expressionsprofil zeigten Gene, die im *Zytoskelett* oder der *Zelladhäsion* eine Rolle spielen, welche zusammenfassend in der Kategorie **Gewebeorganisation** vereint wurden. Außerdem zeigten noch einige Gene, die als **allgemeiner Stress** und **Signaltransduktion** bezeichnet wurden, eine Induktion in mindestens einem Dosis-Zeitpunkt. Bei diesen war das 'Kidney-injury molecule 1' (*KIM-1*), das in die Kategorie **allgemeiner Stress** eingeordnet wurde, in den Nieren von 2NF und AA behandelten Ratten stark induziert.

Durch 2NF wurde eine Reihe von Genen induziert, die im oberen Drittel der Abb.12 ganz links zu sehen sind, und welche hauptsächlich in **Überleben/Proliferation**, **DNA-Replikation/Zellzyklusprogression/Zellteilung**, **RNA-Schädigung** und in der **Gewebeorganisation** eine Rolle spielen. Hingegen wurden hauptsächlich an Tag 14 durch AA Gene induziert, die in **Inflammation** involviert sind, d. h. mit der Immunabwehr in Verbindung stehen. Diese Induktion der Gene bestätigte die in der Histopathologie beobachtete Einwanderung von mononukleären Zellen. Diese Gene sind in der Abb. 12 unten links durch eine Klammer gekennzeichnet.

Neben den hochregulierten Genen, gab es auch einige Gene, die aufgrund der Behandlung mit den Nephrokarzinogenen in Bezug zur Kontrolle herunterreguliert waren. Darunter waren hauptsächlich Gene, die mit biochemischen Funktionen wie *Membrantransport*, *Zelladhäsion* und *Zytoskelett*, aber auch mit allgemeinen metabolischen Prozessen der Zelle wie *Lipid-* und *Aminosäuremetabolismus* assoziiert waren. Dies könnte eine unspezifische Antwort nach Behandlung mit einem Toxin sein. Die Verteilung aller toxikologischen Kategorien, die mehr als zwei Gene enthielten, ist auch in der Abb. 13 zu sehen. Die auffälligsten Kategorien sind durch eine Umkreisung gekennzeichnet.

Da in dem dargestellten 'Cluster' nicht nur die genotoxischen Nephrokarzinogene abgebildet sind, sondern auch die Proben der Nieren von den mit Kaliumbromat behandelten Tieren, kann man deutlich noch ein weiteres 'Cluster' erkennen, dass in allen Proben der Studie, in der parallel Tiere mit AA, NNM und KBrO_3 (30 mg/kg KG/d) behandelt wurden, auftrat. Diese Gene wurden für den weiteren Verlauf der Arbeit als studienspezifische Effekte bezeichnet, da sie nur in dieser Studie induziert wurden und mit dem allgemeinen Zustand der Tiere in Verbindung stehen könnten, und von den anderen durch die Nephrokarzinogene selbst deregulierten Gene separiert. Auffällig bei den Genen dieser Gruppe war, dass die meisten mit der *Regulation von Genexpression* assoziiert waren, d. h. es waren viele Transkriptionsfaktoren darunter. Weitere vereinzelt Gene konnten den biochemischen Kategorien wie *Zytoskelett*, *Proteinmetabolismus* und *Signaltransduktion* zugeordnet werden.

3.1.2.3 Mechanistische Analyse genotoxischer Marker-Gene in verschiedenen Geweben am Beispiel von 2NF

Das 2-Nitrofluoren kann als Modells substanz der sog. Nitroarene bezeichnet werden. Es wird sowohl als genotoxisches Nephrokarzinogen als auch als genotoxisches Hepatokarzinogen beschrieben. Daher wurden den Ratten, denen wie oben beschrieben 44 mg/kg KG/d 2NF bis zu 14 Tage lang verabreicht worden war, nicht nur die Nieren, sondern auch die Leber und das Herz entnommen. Zusätzlich zur Niere, deren Analyse oben bereits beschrieben wurde, wurden ebenfalls die Leber und das Herz zu den entsprechenden Zeitpunkten mittels Microarrays untersucht und miteinander verglichen. Dadurch sollte herausgefunden werden, ob Gemeinsamkeiten bezüglich der Gene oder bestimmter Signalwege in den Organen vorliegen, in denen nach Behandlung mit 2NF Tumoren entstehen. Das Herz sollte somit als Nicht-Zielorgan dienen und keine spezifischen Veränderungen in der Genexpression zeigen.

Die statistische Analyse zur Selektion differentiell deregulierter Gene erfolgte für die Niere und die Leber separat, unter Verwendung folgender Tests für die Niere: T-Test mit $p = 10^{-3}$ und ein N-Way ANOVA mit $p = 10^{-4}$, 1,7-facher Deregulation und alle Gene mit einer Intensität > 20 . Die Analyse der Leber erfolgte ähnlich, allerdings wurden für den Vergleich nur die drei toxikologischen Kategorien *oxidativer Stress*, *oxidativer Stress/DNA-Schädigung* und *Überleben/Proliferation* aus einer *in-vivo*-Studie, die sich mit Leberkarzinogenen befasste, verwendet (Ellinger *et al.*, 2004, 2005). In einem hierarchischen 'Cluster' (Abb. 14) wurden dann die in der Niere als statistisch signifikant deregulierten Gene mit den Microarray-Datensätzen der Leber und des Herzens verglichen. Umgekehrt wurden die Gene der oben genannten toxikologischen Kategorien, die aufgrund von Microarray-Datensätzen der Leber generiert wurden, mit den Microarray-Datensätzen der Niere und des Herzens verglichen (Abb. 14). In beiden Fällen konnte man gut erkennen, dass im Herz so gut wie keine Veränderung der Genexpression stattgefunden hat. Die in der Leber oder Niere entsprechend hoch- oder herunterregulierten Gene zeigten keine entsprechende Deregulation in den Herz-Proben. Im Gegensatz dazu weisen Niere und Leber mit beiden Gengruppen Gemeinsamkeiten im Expressionsprofil auf. So wurden Gene wie z. B. *p21* und *CCNG1*, die in *oxidativem Stress/DNA-Schädigung* eine Rolle spielen, in beiden Organen induziert. Aber auch Gene, die mit *oxidativem Stress* und *Überleben/Proliferation* assoziiert sind, waren in beiden Organen dereguliert. Dies spricht dafür, dass durch genotoxische Karzinogene in den unterschiedlichen Zielgeweben ähnliche Vorgänge ablaufen, was letztlich zur Aufklärung der frühen Effekte von Karzinogenen beitragen könnte.

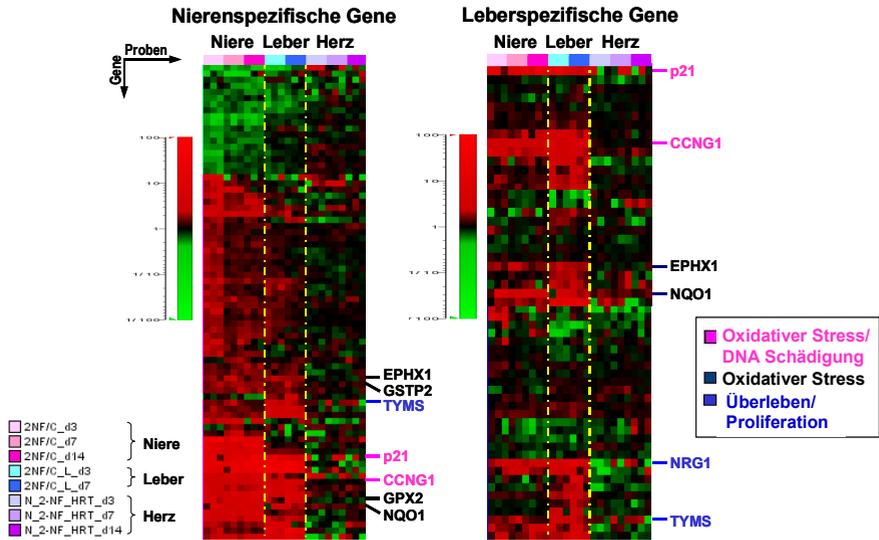


Abb. 14: Vergleich der Genexpression nach Behandlung mit 2NF in verschiedenen Geweben

Dargestellt sind zwei hierarchische 'Cluster', wobei der Mittelwert der drei Replikate auf den Mittelwert der drei Kontrollen normalisiert wurde. Herunterregulierte Gene sind grün und hochregulierte Gene rot gekennzeichnet. In beiden 'Clustern' sind die jeweiligen Zeitpunkte in aufsteigender Reihenfolge gezeigt, d. h. Tag 3, 7 und 14 für die Niere, Tag 3 und 7 für die Leber und Tag 3, 7 und 14 für das Herz. Das *linke* 'Cluster' zeigt die Gene, die nach statistischer Analyse in der Niere nach 2NF-Behandlung dereguliert waren und das *rechte* 'Cluster' zeigt die Gene, die in der Leber nach 2NF-Behandlung verändert waren. In beiden Darstellungen sind vergleichbare Veränderungen auf Genexpressionsebene in der Leber und der Niere, nicht aber im Herzen zu sehen. (d = Tag; L = Leber; HRT = Herz)

3.1.2.4 Mechanistische Analyse von nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen

In dieser Arbeit wurden Ochratoxin A (OTA) und Kaliumbromat (KBrO₃) als nicht-genotoxische Nephrokarzinogene verwendet. Die Applikation von sowohl 30 mg/kg KG/d als auch 60 mg/kg KG/d und 90 mg/kg KG/d Kaliumbromat für je 3, 7 und 14 Tage zeigten im Vergleich zu OTA nur sehr wenige Veränderungen in der Genexpression. Die statistische Analyse wurde für jede Dosisgruppe separat durchgeführt und ist in einem Flussdiagramm (Abb. 15) dargestellt.

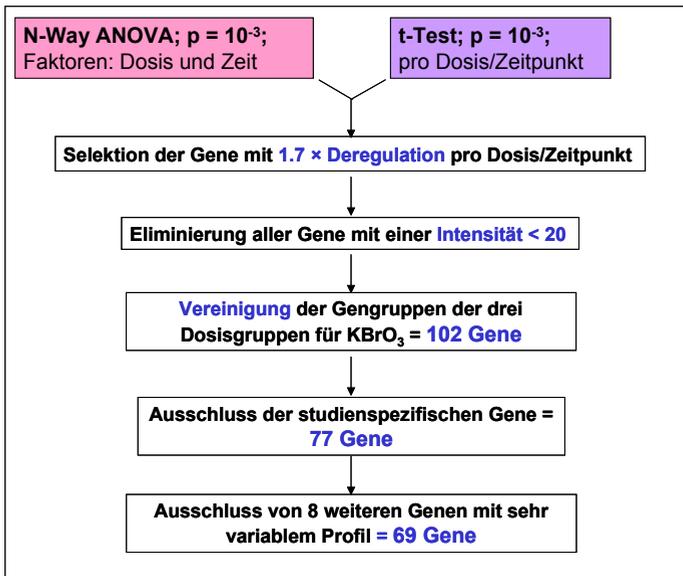


Abb. 15: Schematische Darstellung der Selektion der durch KBrO_3 veränderten Gene

Unter diesen 69 Genen waren allerdings nur vereinzelt Gene in bestimmte Signalwege involviert, so dass keine spezifische Zuordnung erfolgen konnte. Diese unspezifischen Expressionsänderungen stehen im Einklang mit den unspezifischen Veränderungen, die in den histopathologischen Gewebeschnitten zu sehen waren.

Im Gegensatz dazu verursachte OTA sehr zahlreiche und deutliche Veränderungen (Abb. 17). Für die statistische Analyse wurden deshalb stringenter Auswahlkriterien gewählt, um die Anzahl der deregulierten Gene und die Zahl an Falsch-Positiven zu reduzieren. Als statistische Methode wurde ein N-Way ANOVA mit einem p-Wert von 10^{-4} gewählt, wobei anschließend nur die Gene selektiert wurden, die ≥ 2 -fach dereguliert waren und eine Intensität > 20 besaßen. Zuletzt wurden noch alle Gene, die komplett unbekannt waren, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Daraus ergaben sich 1055 Gene, die durch OTA unter den oben genannten Kriterien dereguliert waren.

Aufgrund der großen Unterschiede in der Zahl der deregulierten Gene konnte ein direkter Vergleich zwischen beiden nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen nicht als sinnvoll angesehen werden (Abb. 16). OTA veränderte sehr viele Gene und verursachte sehr spezifische Veränderungen in der Niere, wohingegen KBrO_3 nur sehr wenige Veränderungen erkennen ließ.

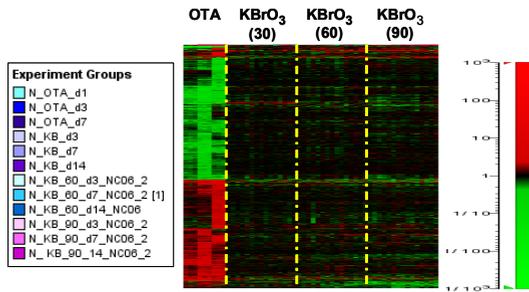


Abb. 16: Vergleich zwischen den nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen OTA und KBrO₃

Gezeigt sind die 1123 Gene, die mindestens von einer Substanz signifikant dereguliert wurden, unter dem im Text genannten cut-off. Von links nach rechts sind die Substanzgruppen in aufsteigender Reihenfolge der Zeitpunkte (d = Tag), normalisiert zur entsprechenden Zeitpunkt-Kontrolle, dargestellt, d. h. links außen sieht man das Genexpressionsprofil von Ochratoxin A (OTA) gefolgt von den verschiedenen Dosisgruppen des Kaliumbromats (KB = KBrO₃).

Um die vielen Gene, die nach OTA verändert worden waren, schneller in charakteristische Expressionsprofile einordnen zu können, wurde eine SOM-Analyse unter Verwendung der Relativdaten, d. h. auf den Mittelwert der Kontrollen normalisiert, und einem euklidischen Distanzmaß durchgeführt. In dieser Analyse wurden die verschiedenen Gene aufgrund ihres Expressionsprofil sortiert, d. h. hochregulierte Gene mit einem ähnlichen Profil über die Zeit wurden in die gleiche Gruppe geordnet, ebenso wurde mit den herunterregulierten Genen verfahren. Danach wurden die Gene wie schon in Kapitel 3.1.2.1 beschrieben in biochemische Kategorien und Subkategorien eingeteilt und wiederum zuletzt in sog. toxikologischen Kategorien zusammengefasst, die im Hinblick auf Funktion und Richtung der Deregulation die Folge für die Niere beschreiben sollten. Die wichtigsten toxikologischen Kategorien (*fett, kursiv*) und die darin am häufigsten enthaltenen biochemischen Kategorien (*kursiv*) werden im folgenden Abschnitt aufgelistet. Einzelne Gene werden dann in der Diskussion beschrieben (Genliste siehe Anhang).

Die wichtigsten toxikologischen Kategorien, die an Tag 1 und 3 induzierte Gene enthielten, waren mit *Stress*, *oxidativem Stress*, *Gewebeorganisation*, *Inflammation* und *Energielieferung für Anabolismus* und vereinzelt mit *Signaltransduktion*, *Proliferation* und metabolischen Prozessen assoziiert. Zur Kategorie allgemeiner *Stress* wurden hauptsächlich 'Immediate early response' Gene und auch einige Gene, die sofort an Tag 1 stark induziert wurden, zugeordnet. Unter *oxidativem Stress* wurden Gene zusammengefasst, die auf oxidative Schädigungen der DNA und der Proteine schließen lassen und in biochemischen Funktionen wie z. B. *Regulation von Proliferation*, *Proteinmetabolismus*, *DNA-Metabolismus* und *Oxidativem Stress* eine Rolle spielen. Die

Kategorie **Gewebeorganisation** wurde zum größten Teil von Genen repräsentiert, die mit dem **Zytoskelett** und der **Zelladhäsion/Migration** assoziiert sind. Gene, die in der **Immunabwehr** wichtig sind, wurden entsprechend dem Oberbegriff **Inflammation** zugeordnet, wenn sie nach OTA induziert wurden. Viele Gene wiesen ein Expressionsprofil auf, das erst an oder bis hin zu Tag 7 anstieg. Gene mit diesem Profil waren hauptsächlich in biochemische Kategorien wie **DNA- und RNA-Metabolismus**, **Zellzyklus/Proliferation**, **Signalkaskaden**, **Apoptose**, **Differenzierung/Organogenese**, **Proteinmetabolismus**, **Zytoskelett** und **Zelladhäsion/migration** involviert. In den folgenden toxikologische Kategorien wurden diese verschiedenen biochemischen Kategorien hinsichtlich ihres Expressionsprofil zusammengefasst: **Signaltransduktion**, **DNA-Replikation/Zellzyklusprogression und Zellteilung**, **Überleben/Proliferation**, **Gewebeorganisation** und **Regeneration**, wobei alle in dieser späten Phase hochregulierten Gene bzw. deren Folge als regenerative Prozesse bezeichnet werden könnten, die der Schädigung des Nierengewebes entgegenwirken.

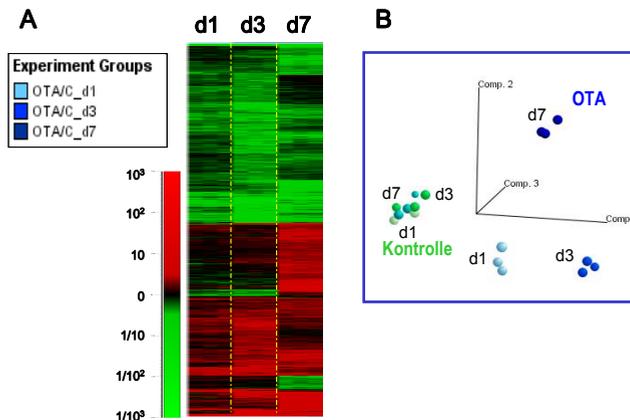


Abb. 17: Genexpressionsanalyse des Nephrokarzinogens Ochratoxin A (OTA)

A) zeigt das hierarchische 'Cluster' der 1055 Gene, die nach der statistischen Analyse in der Rattenniere durch OTA verändert waren. Die Zeitpunkte sind in aufsteigender Reihenfolge gezeigt (d = Tag). B) zeigt die Auftrennung nach Genexpressionsprofilen in einer PCA. Eine zeitabhängige Veränderung der Genexpression ist deutlich zu erkennen.

Die herunterregulierten Gene wurden in dem Oberbegriff **Dedifferenzierung** zusammengefasst, da viele Gene unterschiedlicher biochemischer Funktionen, darunter viele metabolische Prozesse und nierenspezifische Membrantransportprozesse, betroffen waren, und die Zellen ihre differenzierte Form und Funktionalität aufgrund der Wirkung von OTA verloren hatten. Wichtige biochemische Kategorien, die Gene enthielten, die durch OTA herunterreguliert wurden, waren **Signalkaskaden**, **Membrantransport**,

mitochondriale und ribosomale Gene, Protein-, Lipid-, und Aminosäuremetabolismus und Biotransformation. Unter den herunterregulierten Genen befanden sich demnach wichtige metabolische Funktionen, die für die Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts und anderen funktionellen Aufgaben der Niere eine Rolle spielen. Durch die Herunterregulation einer Reihe dieser Gene wird die normale ursprüngliche Funktionalität der Niere eingeschränkt, was auch durch die Befunde der Histopathologie bestätigt wird.

3.2 *In-vitro*-Modelle der Niere

Aus ethischen Gründen und aus Kosten- und Zeitersparnisgründen wäre die Entwicklung aussagekräftiger *in-vitro*-Modelle wünschenswert. Neben den vielen in der Literatur beschriebenen *in-vitro*-Modellen für die Niere, wie Gewebeschnitte, Nephronsegmente und isolierte Tubuli, haben sich primäre Zellkulturen und permanente Zelllinien als sehr nützlich erwiesen. In dieser Arbeit wurden als *in-vitro*-Modell für die Niere primäre proximale Tubuluszellen der Ratte (rPTCs) isoliert und auf Genexpressionsebene mit der Rattenniere *in vivo* verglichen, um die Vergleichbarkeit des *in-vitro*-Modells relativ zu *in vivo* aufzeigen zu können. Durch die Genexpressionsanalyse konnte eine umfassende Charakterisierung des *in-vitro*-Modells vorgenommen werden.

3.2.1 Antikörperfärbungen zur Charakterisierung der rPTCs

Um die eindeutige Identifizierung der aus der Niere der Ratte isolierten Zellen zu gewährleisten, wurde eine Antikörperfärbung der Zellen vorgenommen.

Die Immunfluoreszenzfärbung mittels des N-Cadherin-Antikörpers bestätigte, dass es sich in der primären Zellkultur um proximale Tubuluszellen der Ratte handelte, da das Vorkommen von N-Cadherin in den proximalen Tubuli nachweislich bekannt ist und sich auf diese beschränkt (Prozialek *et al.*, 2004). Somit kann es als charakteristisches Merkmal der entsprechenden Zellen dienen. In Abb. 18 ist die Färbung der Zellmembran mit dem Antikörper gut zu erkennen. Die dazu entsprechend mit Bisbenzimid angefärbten Zellkerne sind ebenfalls dargestellt. Im Einklang dazu bestätigen die gezeigten Negativkontrollen (Abb. 18 D und H) ebenfalls die spezifische Markierung der Zellen in der Monolayerschicht.

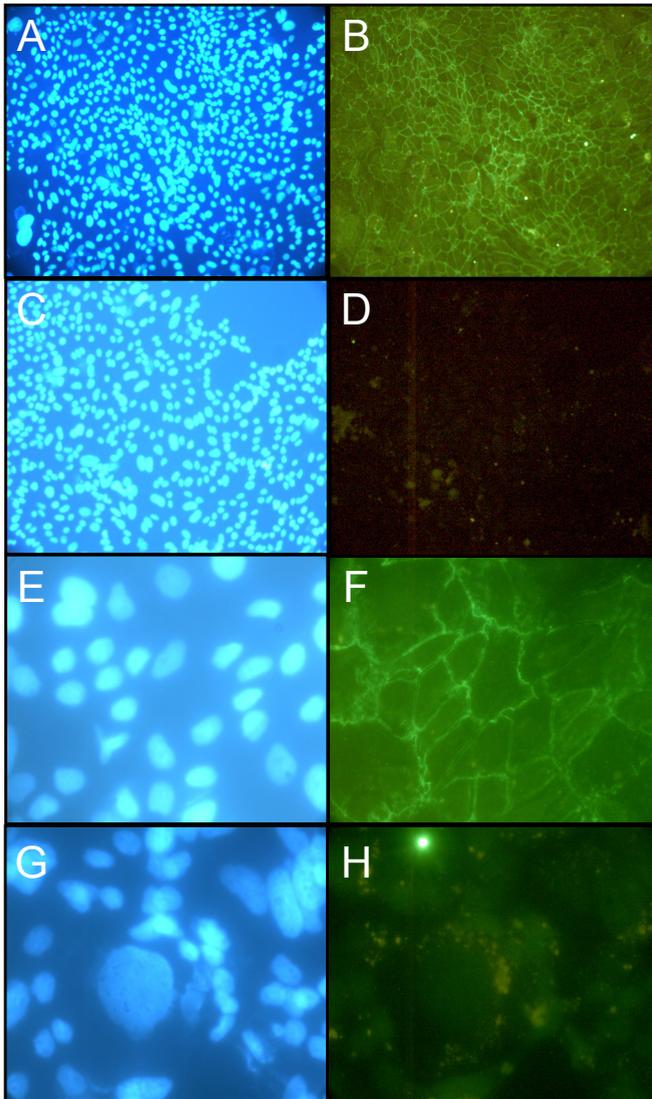


Abb. 18: Immunfluoreszenzfärbung der primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte
 Die Zellen wurden mittels eines N-Cadherin-Antikörpers angefärbt. A), C), E) und G) zeigen die Anfärbung der Zellkerne mit Bisbenzimid der in den rechten Bildern gezeigten Areale der Monolayerschicht. Die entsprechenden mit dem N-Cadherin-Antikörper (1:500 verdünnt) angefärbten Ausschnitte sind in B) und F) zu sehen. D) und H) zeigen die zugehörigen Negativkontrollen ohne N-Cadherin-Antikörper. Die ersten vier Bilder wurden mit einem 10-fach Objektiv angefertigt, die weiteren vier mit einem 100-fach Objektiv.

3.2.1.1 Zellzahlbestimmung

Wie in Abb. 19 zu sehen ist, konnte die mikroskopisch beobachtete Zunahme der Zellzahl während der Kultur über 12 Tage durch die Messungen mittels des Casy® I Cell Counters bestätigt werden. Dafür wurden Zellen aus sechs perfundierten Nieren gewonnen, die aus sechs verschiedenen Tieren stammten, und nach der Kultivierung in Collagen I beschichteten 24-'well'-Platten zu den jeweiligen Zeitpunkten abgelöst und gezählt. Der

daraus errechnete Mittelwert und die dazugehörige Standardabweichung sind in der Graphik dargestellt.

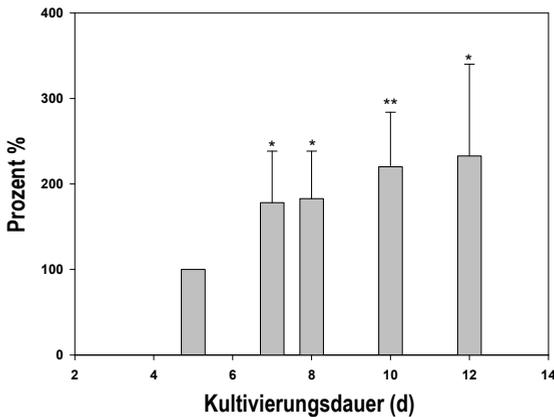


Abb. 19: Zunahme der Zellzahl in Primärzellkulturen während der Kultivierungsdauer

Die Zellzahl aus sechs Perfusionen von Rattennieren wurde gemittelt und als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Unter Verwendung eines gepaarten zweiseitigen t-Tests konnte die signifikante Erhöhung der Zellzahl gegenüber Tag 5 bestimmt werden (* \triangleq $p < 0,05$; ** \triangleq $p < 0,01$; d = Tag).

3.2.2 Vergleich zwischen rPTCs und der Rattenniere *in vivo* mittels Genexpressionsanalyse

Zur Charakterisierung des *in-vitro*-Modells wurden sechs verschiedene Zeitpunkte der Zellkultur für die Hybridisierung der Microarrays verwendet, und jeweils vier Replikate aus verschiedenen Perfusionen angefertigt. Um die differentiell exprimierte Gene zwischen den *in-vivo*-Nierenkortexproben, ebenfalls vier Replikate, und den verschiedenen Zellkulturzeitpunkten zu selektieren, wurde ein Welch-t-Test mit einem p-Wert von 0,0005 durchgeführt. Des Weiteren wurden nur die Gene selektiert, die eine Deregulierung ≥ 3 in der Kultur gegenüber der Rattenniere *in vivo* besaßen. Außerdem wurden alle Gene ausgeschlossen, bei denen die Expressionsintensität in mindestens einem Replikat < 20 lag. Diese Analyse ergab 1483 Gene, die differentiell *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* exprimiert waren. Unabhängig von diesem ersten statistischen Test wurde zusätzlich ein N-Way ANOVA bei einem p-Wert von 0,0005 zwischen Tag 5 und 14 durchgeführt. In dieser Analyse wurden alle Gene, die ≥ 2 -fach dereguliert waren und wiederum eine Intensität > 20 besaßen selektiert. Dadurch konnten 571 Gene identifiziert werden. Beide Gengruppen wurden vereinigt unter Ausschluss völlig unbekannter Gene. Insgesamt

resultierten daraus 1395 Gene, die in der Kultur der primären Rattenzellen unterschiedlich zu den Nierenkortexproben exprimiert waren. Die Gengruppe gliederte sich in 718 hochregulierte Gene und 677 herunterregulierte Gene. Die Verteilung der Proben aufgrund ihres Expressionsprofils zeigte sich in der PCA (Abb. 20).

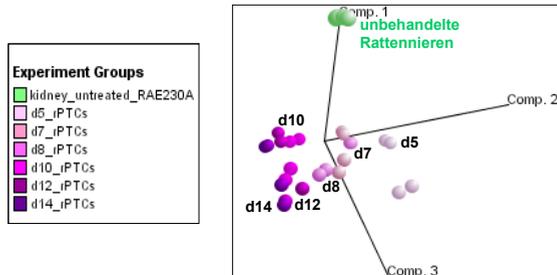


Abb. 20: Vergleich primärer proximaler Tubuluszellen der Ratte mit der Rattenniere

In der PCA sind die vier Replikate der Rattenniere in grün dargestellt. Alle vier Replikate, die zu einem Kulturzeitpunkt der Primärzellkultur gehören, zeigen die gleiche Rosa- bis Lilafärbung. Die Zeitpunkte sind zusätzlich beschriftet (d = Tag). Eine deutliche Separierung aller Zeitpunkte in Kultur von den Rattennieren *in vivo* ist zu erkennen.

Auffallend war, dass sich das Genexpressionsprofil zwar während der Kultivierungsdauer der Zellen veränderte, die Unterschiede zwischen den verschiedenen Proben der Zellkultur und der Rattenniere *in vivo* aber deutlich größer waren. Die funktionelle Analyse der 1395 Gene erfolgte analog zu der bei den *in-vivo*-Versuchen beschriebenen Kategorisierung der Gene. Allerdings wurden in dieser Studie keine toxikologischen Kategorien erstellt, da es sich um unbehandelte primäre Zellen handelte. Um die Fülle der Gene etwas übersichtlicher zu gestalten, wurden für die verschiedenen biochemischen Kategorien übergeordnete Kategorien erstellt. Diese übergeordneten Kategorien dienen der Interpretation der Deregelung der Gene in dieser Studie. Des Weiteren wurde versucht, die Folgen der Deregelung dieser Kategorien für dieses Zellsystem zu eruieren. Auch bei den *in-vitro*-Versuchen und deren Genexpressionsanalyse steht der Begriff Gene, wenn er im Zusammenhang mit der Kategorisierung auftritt, für die Proteine, die durch die Gene kodiert werden und in bestimmten Stoffwechselwegen involviert sind.

Da der Metabolismus eine wichtige Eigenschaft differenzierter Nierenzellen darstellt, könnte die Herunterregulation der Gene, die metabolische Enzyme kodieren, eine Dedifferenzierung *in vitro* und den Verlust der entsprechenden metabolischen Aktivitäten bedeuten. Im Folgenden sind alle übergeordneten Kategorien (fett, kursiv) und ihre entsprechenden biochemischen Kategorien (kursiv) kurz beschrieben. Die Interpretation auf Gen-Ebene findet sich dann in der Diskussion (Genliste siehe Anhang).

Alle Gene, die in der Synthese oder Degradierung von Aminosäuren eine Rolle spielen, wurden zur übergeordneten Kategorie **Aminosäuremetabolismus** sortiert. Phase I und Phase II assoziierte Gene wurden als **Biotransformation** zusammengefasst, wobei nur 5 von 30 Genen hochreguliert waren. Ungefähr 50 % der Gene, die in den **Kohlenhydratstoffwechsel** involviert waren, zeigten eine deutlich geringere Expression *in vitro* als *in vivo*. 80 % der Gene, die in Verbindung mit dem **Fettstoffwechsel** standen, vor allem an der Fettsäuresynthese, der Oxidation und dem Transport wie auch in der Lipolyse und dem Phospholipid-/Glycolipidmetabolismus beteiligt sind, waren herunterreguliert. Ebenfalls herunterreguliert waren viele Gene, die sowohl mit der ATP Synthese als auch mit dem Elektronentransfer und somit mit dem **Energiemetabolismus** in Verbindung standen. Der Oberbegriff **Metabolismus** wurde für alle Gene gewählt, die in metabolischen Signalwegen mitwirkten, wie z. B. **Steroidmetabolismus**, **Metabolismus von Nukleotiden**, **Nucleosiden** und **Tetrapyrrolen** sowie dem **RNA-Metabolismus**, deren Expression auch im *in-vitro*-Modell herunterreguliert waren. Des Weiteren gab es noch herunterregulierte Gene in den Kategorien **Cofaktoren und Vitamine** und **Signaltransduktion**. Auffällig war die Herunterregulation von Genen des Glutathionstoffwechsels, was zu einer **reduzierten Kapazität** im Umgang mit **oxidativem Stress** führen könnte. Das Fehlen der Expression von Differenzierungsgenen könnte wiederum zur Dedifferenzierung der Zellen beitragen. Da zu den wichtigsten Eigenschaften der Nierenzellen die Exkretion wie auch die Absorption von Stoffen mittels bestimmter Transportsysteme und auch die Erhaltung des Ionen- und Wassergleichgewichtes gehört, ist die Herunterregulierung von Genen, die in der Regulation dieses empfindlichen Gleichgewichts eine Rolle spielen, ein großer Verlust dieser primären Nierenzellen, was deshalb als **Dedifferenzierung - Nierenfunktion** gedeutet werden kann. Unter den hochregulierten Genen befanden sich unter anderem Gene, die bei **Stress** eine Rolle spielen, die durch frühe oder Akut-Phasen-Antworten, aber auch durch Komponenten des NFκB- und MAPK-Signalweges repräsentiert wurden. Ebenso wurden Signale aufgrund **oxidativen Stresses** verzeichnet, die zur übergeordneten Kategorie **Stress - oxidativer Stress** zusammengefasst wurden. Des Weiteren fanden sich sowohl antiapoptotische als auch proapoptotische Gene, die in der Zellkultur induziert wurden. Diese gegensätzlichen Signale könnten sowohl aus ein und derselben Zelle, aber auch von zwei unterschiedlichen Zellen stammen. In beiden Kategorien befanden sich *p53*-Zielgene, die wiederum auf eine primäre Stressantwort hindeuten. Eine ganze Reihe von induzierten Genen ließ auf die Synthese und den Transport neuer Proteine schließen, die für die Anpassung an die neue Umgebung benötigt werden.

In der übergeordneten Kategorie **Metabolismus** wurden alle hochregulierten Gene, die in metabolische Prozesse involviert waren, wie z. B. **Biotransformation**, **Kohlenstoff – und**

zu erklären ist. Ebenso waren einige Gene in der primären Zellkultur hochreguliert, die in **Signalkaskaden** mitwirken, z. B. im Wnt-, PLC-PKC-, GPCR-Signalweg, aber auch Gene, die in der *Zellkommunikation* und *hormonellen Signalwegen* wichtig sind.

3.2.2.1 Verifizierung der Microarray-Daten mittels quantitativer Real-Time-PCR

Das Expressionsprofil von elf Genen, die aus der obigen Genexpressionanalyse herausgesucht wurden, wurde mittels der quantitativen Real-time-Polymerase-Kettenreaktion (QRT-PCR) unter Verwendung der Taqman®-Technologie verifiziert. Diese wurde für alle Replikate aller Zeitpunkte in Kultur und für alle Replikate der Nierenkortexproben durchgeführt. Damit die Ergebnisse mit denen der Affymetrix Microarrays vergleichbar waren, wurde die Deregulation *in vitro* im Vergleich zu *in vivo* aus dem logarithmischen Mittel errechnet, wobei die Proben auf die 18S-rRNA-Signale normalisiert wurden, um Unterschiede im Ausgangsmaterial auszugleichen. Das Ergebnis,

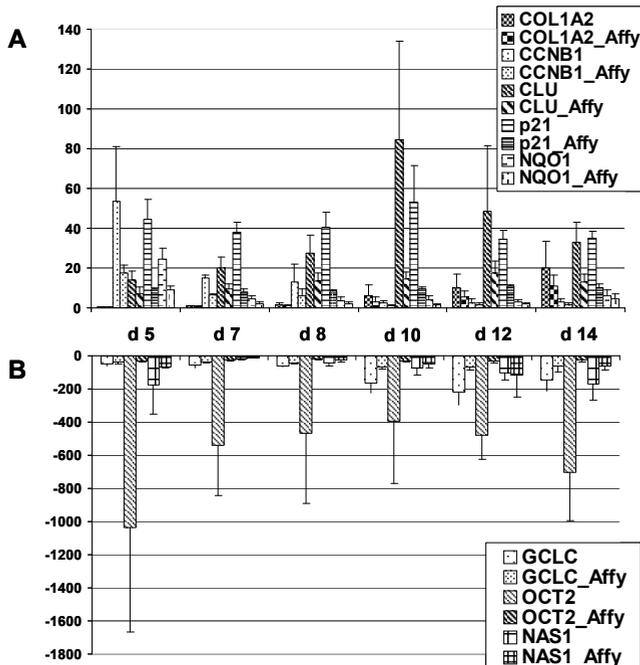


Abb. 22: Validierung der Genexpressionsdaten durch quantitative RT-PCR

Graphisch dargestellt sind die Mittelwerte der Expressionsderegulation (*in vitro* verglichen mit *in vivo*) und die dazugehörigen Standardabweichungen von vier biologischen Replikaten, die entweder durch Taqman® (ohne Suffix) oder Affymetrix (mit Suffix „Affy“) erhalten wurden, für die jeweils verschiedenen Zeitpunkte in Kultur (d = Tag). A) Hochregulierte Gene auf den Microarrays; B) Herunterregulierte Gene auf den Microarrays.

dargestellt in Abb. 22, zeigt, dass es zwischen Taqman®- und Affymetrix-Technologie eine gute Korrelation gibt. Allerdings lagen die Deregulationsfaktoren, die mit der Taqman®-Technologie gemessenen worden waren, wesentlich höher als die, die mit der Microarray-Technologie erhalten wurden. Dieses wurde schon in anderen Studien beobachtet (Ellinger-Z. *et al.*, 2004; Hamadeh *et al.*, 2002). Es konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,9 zwischen dem natürlichen Logarithmus der mittels QRT-PCR und Affymetrix-Technologie gemessenen Deregulationsfaktoren ermittelt werden. Dadurch konnte angenommen werden, dass die Werte, die mittels der Affymetrix GeneChips® erhalten wurden, ein semiquantitatives Bild der realen Deregulation abbilden und somit auch für die weitere Interpretation verwendet werden können.

3.2.3 Vergleich von *in vitro* und *in vivo* nach der Behandlung mit OTA

Da sich nun nach dem Vergleich der rPTCs mit der Rattenniere erhebliche Unterschiede zeigten, sollte das *in-vitro*-Modell zusätzlich nach der Behandlung mit dem Nephrokarzinogen OTA, das als Modell-Karzinogen für die Niere gilt, mit *in vivo* verglichen werden. Für diesen Vergleich wurden sowohl die primären proximalen Tubuluszellen aus der Rattenniere als auch die permanente Zelllinie NRK-52E, die ebenfalls aus der Rattenniere stammt, verwendet. Dadurch sollte sowohl die Vergleichbarkeit von *in vitro* mit *in vivo*, aber auch gleichzeitig die Vergleichbarkeit zwischen beiden Zellkultursystemen nach Einwirken eines Nierentoxins überprüft werden.

3.2.3.1 Konzentrationsbestimmung

Für die Festlegung einer geeigneten Konzentration mussten zunächst Zytotoxizitätstests durchgeführt werden, um anschließend in den Microarray-Experimenten die Konzentration zu nehmen, die zwar schon Veränderungen in der Zelle bewirkte, aber die Zellen weitestgehend noch nicht so sehr schädigte, dass sie nicht mehr überlebensfähig waren. Unter diesen Voraussetzungen wurde die Konzentration gewählt, die noch eine Vitalität mittels MTT-Test um 80 % an Tag 3 erkennen ließ (Abb. 23), da an Tag 1 und Tag 3 die Veränderungen in der Genexpression überprüft werden sollten.

Beide Zeitpunkte wurden auch im *in-vivo*-Experiment verwendet. Wie in der Graphik zu sehen ist, zeigten sich 15 oder 20 μM OTA als angemessene Konzentration für die Behandlung der NRK-52E-Zellen. Bei den rPTCs wurden zunächst 10 μM OTA (Daten nicht gezeigt) als geeignete Konzentration gewählt. Zuerst wurde aber eine Taqman®-Analyse mit den 24 und 72 h Proben der NRK-52E-Zellen, die sowohl mit 15 als auch 20 μM OTA behandelt worden waren und mit den 24, 72 und 120 h Proben der rPTCs, die

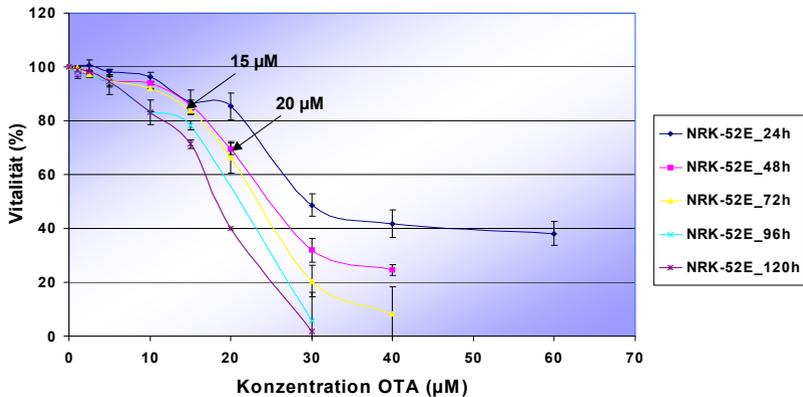


Abb. 23: Zytotoxizitätskurve am Beispiel der NRK-52E-Zellen

Die erhaltenen Vitalitäten sind gegen die verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, mit jeweils einer Kurve pro Zeitpunkt. Der Mittelwert und die dazugehörigen Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Versuchen kalkuliert.

mit 10 µM OTA behandelt wurden, durchgeführt. Dazu wurden die Hämoxxygenase (*HO-1*) und der 'cyclin-dependent kinase inhibitor 1A' (*p21*) aus den hochregulierten Genen des *in-vivo*-Experiments mit OTA ausgewählt, da noch keine ausreichenden Daten zu der *in-vitro*-Induktion bestimmter Gene durch OTA vorlagen, und die *in-vitro*-Kulturen mit der zuvor beschriebenen *in-vivo*-Studie verglichen werden sollten. Da der durch OTA induzierte Mechanismus noch nicht aufgeklärt ist, wurden diese Gene, von denen eines bei oxidativem Stress eine Rolle spielt (*HO-1*), und das andere eher durch genotoxische direkte DNA-Schädigung induziert wird (*p21*), ausgewählt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt. Die NRK-52E-Zellen wurden mit 20 µM OTA für die Genexpressionsanalysen inkubiert, da bei dieser Konzentration eine deutlich stärkere Induktion der beiden Gene gemessen wurde. Die Zugabe von 10 µM OTA zu den rPTCs zeigte auch nach fünf Tagen Inkubation nur eine leichte Induktion der Gene, obwohl diese Konzentration den Zytotoxizitätstests zufolge am besten geeignet erschien.

Da die primären Zellen aus allen weiteren Perfusionen allerdings in einem weniger sensitiven, möglicherweise besseren Zustand waren, mußte erneut eine Konzentrationsoptimierung vorgenommen werden. Nach weiteren Optimierungen konnten nun die Zellen nach einer Aussaat mit $3,5 \times 10^5$ Zellen/'well' in eine 24-'well'-Platte mit 10 und 20 µM OTA für 1, 3, 5 und 7 Tage inkubiert und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden.

Parallel zu den Inkubationsversuchen, aus denen die RNA für die Microarrays gewonnen wurde, wurden bei beiden Zellkulturmodellen MTT-Tests durchgeführt, um über diesen

Weg den Verlauf des Experiments zu überprüfen und gegebenenfalls ein Experiment auszuschließen, für das die Viabilität zu hoch oder zu niedrig war.

Tabelle 7: Induktion von *HO-1* und *p21* in den primären proximalen Tubuluszellen der Ratte und den NRK-52E-Zellen

Berechnet wurde die Induktion mittels einer Standardkurve (Std-kurve), relativ zum 18S-Gehalt in den Proben und mittels des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Wert.

Probenbezeichnung	18S			HO-1			p21		
	Induktion via Std-kurve	Induktion via Std-kurve	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Induktion via Std-kurve relativ zu 18S	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	Induktion via Std-kurve relativ zu 18S	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
NRK-52E_24h_15µM_OTA	0,93	1,32	1,42	1,42	-0,59	1,51	3,13	-1,81	3,51
NRK-52E_24h_20µM_OTA	0,91	3,8	4,17	4,17	-2,44	5,41	5,34	-2,7	6,48
NRK-52E_72h_15µM_OTA	1,03	0,67	0,65	0,65	0,53	0,69	2,56	-1,55	2,93
NRK-52E_72h_20µM_OTA	0,93	0,75	0,81	0,81	0,24	0,84	8,16	-3,36	10,3
rPTCs_d1_10µM_OTA	1,42	1,88	1,32	1,32	-0,44	1,36	1,78	-0,85	1,8
rPTCs_d3_10µM_OTA	0,91	1,79	1,96	1,96	-1,12	2,17	1,3	-0,49	1,4
rPTCs_d5_10µM_OTA	0,6	1,47	2,43	2,43	-1,49	2,82	1,72	-0,84	1,8

3.2.3.2 Vergleich der Genexpression *in vitro* und *in vivo* nach OTA

Nach der Konzentrationsbestimmung wurden je vier Replikate der rPTCs nach Behandlung mit 10 und 20 μM OTA und je drei Replikate der NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit 20 μM OTA pro Zeitpunkt (und Konzentration) angefertigt. Die Kontrollen wurden mit der entsprechenden Menge DMSO inkubiert. Für die folgende Analyse und Darstellungen der Daten wurden nur die Proben der rPTCs verwendet, die mit 20 μM OTA inkubiert worden waren, da so gut wie keine Veränderungen im Expressionsprofil der mit 10 μM OTA inkubierten Proben auftraten (Daten nicht gezeigt). Für die *in-vitro*-Analysen ist es also sehr wichtig, die geeignete Dosis für die Microarray-Experimente zu verwenden. Um einen ersten Einblick in die Daten zu erhalten, wurde zunächst eine PCA erstellt (Abb. 24). In der PCA konnte man gut erkennen, dass die Veränderungen durch OTA in allen Systemen in die gleiche Richtung gingen. Außerdem war zu sehen, dass die Zellkultursysteme zwar näher aneinander lagen, aber beide dennoch weit weg von den *in-vivo*-Daten erschienen. Eine weitere Auffälligkeit war, dass der Unterschied zwischen den beiden *in-vitro*-Systemen und dem *in-vivo*-System größer war als der Einfluss der Behandlung an sich, da die Kontrollen und die behandelten Proben näher beieinander 'clustern' als die Systeme zueinander. Um nun *in vivo* direkt mit *in vitro* vergleichen zu können, wurden die 1055 Gene, die wie in Kapitel 3.1.2.4 beschrieben im *in-vivo*-Versuch nach OTA-Applikation selektiert wurden, mit den beiden

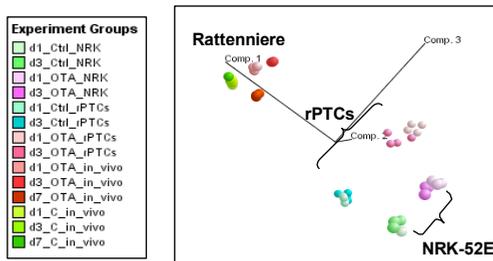


Abb. 24: PCA zum Vergleich der *in-vivo*- und *in-vitro*-Genexpression nach OTA-Behandlung

Die Abbildung zeigt die Verteilung der Proben hinsichtlich ihres Genexpressionsprofils. In Grüntönen sind jeweils die Kontrollen, in Rot- und Rosatönen die mit OTA behandelten Proben dargestellt. (rPTCs: primäre proximale Tubuluszellen der Ratte; NRK-52E: permanente Rattennieren-Zelllinie; d = Tag; Ctrl = Kontrolle)

in-vitro-Systemen in einem hierarchischen 'Cluster' verglichen (Abb. 25). Diese Gene waren zwar signifikant differentiell *in vivo* exprimiert, müssen aber nicht zwingend auch *in vitro* signifikant dereguliert in den behandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle sein. Dennoch können tendenziell gleiche Richtungen durch eine gleiche Farbgebung

festgestellt werden, auch wenn die Gene, z. B. wegen einer größeren Variabilität innerhalb der *in-vitro*-Replikate, durch die Statistik nicht selektiert worden wären. Diese Art der Darstellung zeigt demnach eher einen qualitativen, jedoch keinen quantitativen Vergleich. Die Abb. 25 zeigt, dass sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den drei Systemen auftraten. Die Gemeinsamkeiten beschränkten sich im Wesentlichen auf das obere Drittel des 'Clusters'. Dort zeigten sich Gene sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach OTA-Behandlung induziert, die *in vivo* den toxikologischen Kategorien oxidativer Stress/DNA-Schädigung und Proteinschädigung, Signaltransduktion, Gewebeorganisation und der Immunabwehr - vor allem Antigenpräsentation und angeborene Immunität - zugeordnet werden konnten.

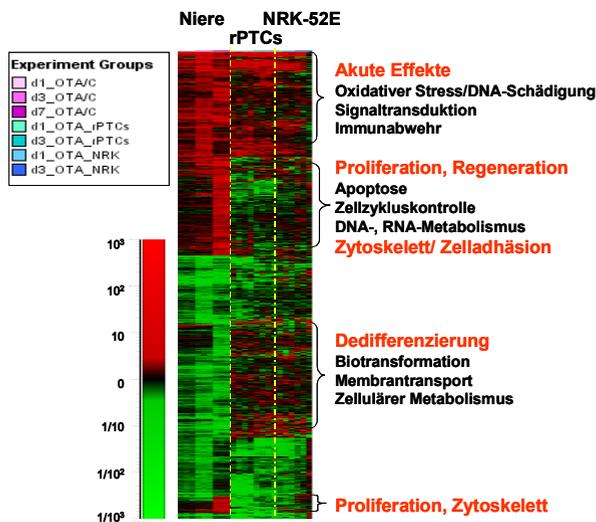


Abb. 25: Vergleich des Genexpressionsprofils von *in vivo* mit *in vitro* nach OTA-Behandlung
Dargestellt von links sind folgende Proben nach OTA-Behandlung: *in vivo* (Niere) Tag 1, 3 und 7; primäre proximale Tubuluszellen der Ratte (rPTCs) Tag 1 und 3; permanente Nierenzelllinie (NRK-52E) Tag 1 und 3. Alle Genexpressionsdaten sind auf die entsprechende Vehikel-Zeit-Kontrolle normalisiert. Rot bedeutet Induktion der Gene und grün bedeutet Herunterregulation der Gene in Bezug zur Kontrolle. Rechts sind die wichtigsten biochemischen Funktionen (schwarz) der in diesem Abschnitt des Clusters gezeigten Gene mit der dazugehörigen Interpretation (rot) gelistet.

Dies ließ darauf schließen, dass hauptsächlich akute Effekte sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch OTA induzierbar waren. Allerdings zeigten sich auch prägnante Unterschiede, denn durch OTA *in vivo* waren viele Gene sehr stark an Tag sieben induziert worden, die vor allem *in vivo* in biochemische Kategorien wie Zytoskelett/Zelladhäsion, DNA- und RNA-Metabolismus und Zellzykluskontrolle und Proteinmetabolismus involviert waren. Diese Gene könnten *in vivo* zur Regeneration der Niere und zum Überleben der Zellen als

Gegenregulation zur Schädigung beitragen. Die gleichen Gene wurden *in vitro* durch OTA aber nicht verändert. Auch eine längere Inkubationszeit bis hin zu sieben Tagen (Daten nicht gezeigt), welche dem *in-vivo*-Zeitpunkt der regenerativen Phase entsprechen würde, zeigte keine Veränderungen in der Expression dieser Gene. Ein weiterer Unterschied zu *in vivo* zeigte sich bei den herunterregulierten Genen. Viele Gene, die durch OTA *in vivo* herunterreguliert wurden, waren mit dem zellulären Metabolismus, der Biotransformation und dem Membrantransport assoziiert. Wichtige Gene, die in der Niere für Stoffwechselprozesse benötigt wurden, fielen also aus und führten zur Dedifferenzierung der Zelle. Diese Veränderung in der Genexpression, die *in vivo* auf den Verlust der Funktionalität der Niere hinwies, konnte *in vitro* nicht beobachtet werden. Denn die meisten Gene, die in metabolischen Prozessen eine Rolle spielen, waren schon *in vitro* (s. 3.2.2) in unbehandelten primären Nierenzellen der Ratte herunterreguliert. Diese wurden als Teil des Dedifferenzierungsprozesses der Zellen *in vitro* angesehen und konnten deshalb wahrscheinlich nicht noch zusätzlich durch die Behandlung verändert werden. Allerdings zeigte sich interessanterweise auch eine Überlappung zwischen einigen herunterregulierten Genen nach OTA-Behandlung *in vivo* und *in vitro*. Allen drei Systemen gemeinsam war die Herunterregulation von einigen Genen, die für mitochondriale ribosomale Proteine kodieren, und deshalb im Proteinmetabolismus und der Organellenstruktur und Funktion eine Rolle spielen.

Die Zellkultursysteme untereinander wiesen keine auffälligen Unterschiede auf, d. h. man konnte aus diesem Versuch nicht schließen, welches der beiden Zellkultursysteme ein besseres *in-vitro*-Modell der Niere darstellt.

3.2.4 Vergleich von verschiedenen *in-vitro*-Modellen nach der Behandlung mit OTA

In-vitro-Verfahren bieten die Möglichkeit, einen direkten Vergleich zwischen tierischem und humanem Zellmaterial herzustellen und damit potentiell die Risikoabschätzung für den Menschen zu verbessern. Deshalb sollten nicht nur *in-vitro*-Modelle der Ratte für die Niere verwendet und weiterentwickelt werden, sondern auch humane *in-vitro*-Systeme etabliert und optimiert werden. In einem weiteren Versuch sollte ein Vergleich zwischen humanen *in-vitro*-Systemen erfolgen, die dann im nächsten Schritt mit den zuvor beschriebenen *in-vitro*-Modellen der Ratte verglichen werden konnten.

3.2.4.1 Humane *in-vitro*-Modelle

3.2.4.1.1 Konzentrationsbestimmung

Als humane *in-vitro*-Modelle wurden in dieser Arbeit zum einen primäre humane

proximale Tubuluszellen verwendet, die an der Universität in Innsbruck aus tubulären isolierten Fragmenten vermehrt, einmal passagiert und kryokonserviert wurden, und zum anderen die humane Nierenzelllinie HK-2. Bei den HK-2-Zellen sollte wie bei den Rattenzellen vorgegangen werden, d. h. dass zunächst Konzentrationsbestimmungsexperimente den Microarray-Versuchen vorangestellt wurden. Für die Konzentrationsoptimierungen wurden für die HK-2-Zellen die Resazurin-Reduktion und die MTT-Reduktion gemessen. Abb. 26 zeigt die erhobenen Daten, indem jeweils der Mittelwert des angegebenen Tests mit der entsprechenden Standardabweichung nach 72-stündiger Inkubation der entsprechenden Konzentrationen errechnet wurde. Die Werte sind jeweils als Prozentzahlen im Verhältnis zur Kontrolle berechnet, die gleich 100 gesetzt wurde. Anhand der Graphik kann man einen konzentrationsabhängigen Abfall der Vitalität erkennen. Analog zu den vorherigen Versuchen sollte wieder die Konzentration für die Microarray-Experimente verwendet werden, die eine Viabilität um 80 % nach 72 h aufwies. Eine Inkubation mit Triton X-100 (1:1000 verdünnt) für zwei bis fünf Minuten sollte als Positivkontrolle für die Messung dienen, bei der alle Zellen abgetötet wurden, und demnach keine Reduktion des Indikatorfarbstoffs mehr erfolgen konnte.

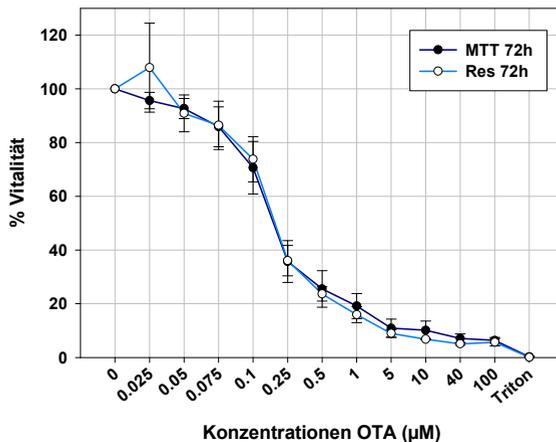


Abb. 26: Auswertung der Inkubation von HK-2-Zellen mit OTA für 72 h

Die Mittelwerte \pm Standardabweichung sind jeweils für den MTT-Test und den Resazurin-Test (Res) aus drei unabhängigen Replikaten nach 72 h Inkubation kalkuliert und gegen die verschiedenen OTA-Konzentrationen aufgetragen, die in aufsteigender Reihenfolge in μM angegeben sind. Eine Viabilität um 80 % konnte nach der Zugabe von $0,075 \mu\text{M}$ OTA beobachtet werden.

Die Konzentration von $0,075 \mu\text{M}$ OTA nach 72h wurde als geeignet bestimmt, da in beiden Tests noch eine Viabilität der Zellen von ca. 80 % gegeben war. Als Vergleich mit

einer weiteren höheren Konzentration wurden die Zellen zusätzlich noch mit 0,5 μM OTA inkubiert, da sich bereits in den Experimenten mit den Rattenzellen gezeigt hatte, dass bei einer zu niedrigen Konzentration keine Veränderungen im Genexpressionsprofil zu erkennen waren (Daten nicht gezeigt; 10 μM OTA rPTCs).

Für die primären Zellen wurden 5 μM OTA als Konzentration festgelegt, da aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit der Zellen keine detaillierte Konzentrationsfindung durchgeführt werden konnte. Drei unabhängige Replikate, d. h. Zellen von verschiedenen Donoren konnten angefertigt werden. Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit 5 μM OTA wurde ein leichter Anstieg der LDH Freisetzung und eine leichte Abnahme der Zellviabilität gemessen. Hingegen konnte nach 72 h ein deutlicher Anstieg (im Mittel um 4 fach) der LDH Freisetzung, aber ebenfalls nur eine leichte Abnahme der Zellviabilität bestimmt werden (Daten nicht gezeigt). Eine Wiederholung der Versuche war aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit nicht möglich.

3.2.4.1.2 Genexpressionsanalyse

Es wurden je drei Replikate für jeden Dosis-Zeitpunkt beider Modelle angefertigt. Im Vergleich der beiden humanen Zell-Modelle miteinander wurde festgestellt, dass sich die Behandlungseffekte zwar in beiden Modellen in die gleiche Richtung auswirkten, aber auch, dass der Unterschied zwischen den beiden Modellen ebenso groß war wie der Behandlungseffekt an sich (Abb. 27).

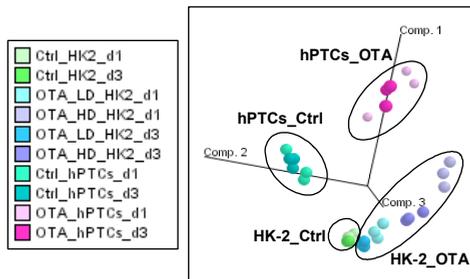


Abb. 27: PCA der humanen Nierenzell-Modelle nach OTA-Behandlung

Im oberen Bereich der Graphik 'clustern' die primären humanen proximalen Tubuluszellen, d. h. sowohl die Kontrollen (hPTCs_CTRL) in grün als auch die mit OTA behandelten Proben (hPTCs_OTA) in pink und rosa. Im unteren Bereich verteilen sich zum einen die Kontrollen der HK-2-Zellen (HK-2_CTRL) in grün und zum anderen die mit OTA behandelten HK-2 Proben (HK-2_OTA, LD = low dose, HD = high dose) in blau. Der Unterschied zwischen den beiden Zell-Modellen und zwischen den behandelten Proben und den Kontrollen sind vergleichbar groß. Die PCA wurde mit Genexpressionsdaten des HGU133 Plus2 Affymetrix Microarrays bei einem p-Wert = 0,04 durchgeführt.

Für die Selektion der differentiell deregulierten Gene wurde zunächst eine statistische Analyse mit einem N-Way ANOVA $p = 10^{-4}$ und einem paired t-Test $p = 10^{-3}$ durchgeführt. Anschließend wurden alle Gene selektiert, die ≥ 3 -fach gegenüber der Kontrolle zu wenigstens einem Zeitpunkt hoch- oder herunterreguliert waren. Durch eine weitere Filterung der Gene, die eine Intensität > 20 hatten und eine Eliminierung der Gene, die absolut unbekannt waren, ergaben sich 1590 Gene für die hPTCs und 2898 Gene für die HK-2-Zellen. Wegen der Fülle der Daten wurden nur die Gene detaillierter annotiert und für die weitere Auswertung verwendet, die einen p-Wert $\leq 10^{-5}$ im Behandlungseffekt des N-Way ANOVAs besaßen und durch die niedrige Konzentration von OTA ($0,075 \mu\text{M}$) in den HK-2-Zellen verändert wurden. Daraus ergaben sich für die hPTCs 1347 Gene und für die HK-2-Zellen 672 Gene.

Diese Gene wurden dann in verschiedene biochemische Kategorien eingeteilt. Anschließend wurde die Anzahl der in der gleichen Kategorie vorkommenden Gene addiert und der prozentuale Anteil der Kategorie an der Gesamtheit der kategorisierten Gene berechnet. So konnten die durch OTA bewirkten Veränderungen in beiden Modellen anhand der biochemischen Funktionen, die vermehrt hoch- bzw. herunterreguliert wurden, verglichen werden (Abb. 28). Wie man in Abb. 28 sehen kann, sind in beiden Modellen ähnliche Kategorien mit ähnlich häufigem Vorkommen nach OTA Einwirkung betroffen. Im Gegensatz zu diesem Vergleich gab es auf der Gen-Ebene keine große Übereinstimmung. Nur wenige Gene im Hinblick auf die Gesamtzahl der veränderten Gene, die im Folgenden mit der entsprechenden Kategorie genannt sind, waren sowohl bei den hPTCs als auch bei den HK-2-Zellen nach der Inkubation mit OTA signifikant hochreguliert: Intrazellulärer Transport (*RAB22A*, *VAPB*, *APPBP2*, *SPG20*, *VAPA*, *APIS2*, *APPBP2*), Proteinmetabolismus ((Translation: *RPS15*, *EIF2S1*, *RPS20*, *RPL37*, *SUI1*, *MRPS22*), Degradation (*UBE2L3*, *PSMC2*, *UBE2Q*, *FBXW2*, *NEDD4L*)), RNA-Metabolismus (*CROP*, *WBP11*, *ELAVL1*, *DDX5*), Organellenstruktur und Funktion (*HIST1H2BE*, *HIST1H2BC*, *HIST1H2BD*, *SYNCOILIN*, *HIST1H2BK*). Unter den herunterregulierten Genen konnten ebenfalls einige gemeinsame Gene gefunden werden, allerdings waren die übereinstimmenden Gene im Verhältnis zur Gesamtheit der selektierten Gene sehr gering, so dass sie an dieser Stelle nicht aufgelistet werden.

Auffällig in diesen beiden Humanmodellen war, dass in den meisten Fällen gleiche biochemischen Funktionen etwa zu gleichen Teilen sowohl hochregulierte als auch herunterregulierte Gene enthielten. Diese Tatsache erschwerte die biologische Interpretation, da substanzspezifische Veränderungen in den Zellen erwartet, aber in diesen beiden humanen Modellen nicht nachgewiesen werden konnten.

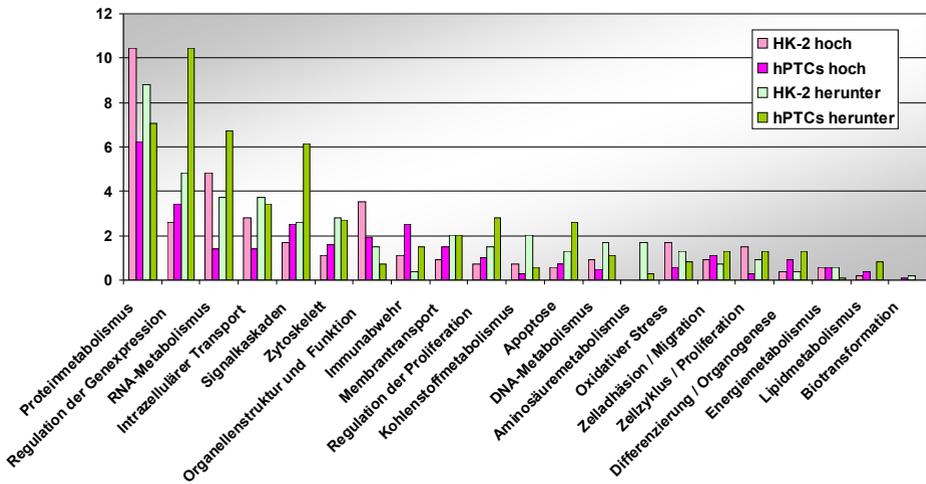


Abb. 28: Vergleich der durch OTA induzierten Veränderungen in beiden humanen Zell-Modellen

Das Balkendiagramm zeigt den Anteil der Gene prozentual zur Gesamtzahl der kategorisierten Gene, die jeweils verschiedenen biochemischen Funktionen zugeordnet wurden. Hochregulierte Gene sind durch rote Balken (HK-2 hoch, hPTCs hoch), herunterregulierte Gene durch grüne Balken (HK-2 herunter; hPTCs herunter) gekennzeichnet.

3.2.4.2 Vergleich von humanen *in-vitro*-Modellen mit *in-vitro*-Modellen der Ratte nach OTA-Behandlung

Nachdem nun der Vergleich zwischen beiden humanen *in-vitro*-Modellen erfolgt war, der auf der Gen-Ebene nicht sehr viele Gemeinsamkeiten zeigte, und nachdem der Vergleich der Signalwege auch keine Rückschlüsse auf die spezifische Wirkung von OTA zuließ, sollten nun die humanen Modelle der Niere mit denen der Ratte verglichen werden.

Auch in diesem Fall erwies sich ein Vergleich der Signalwege wieder als besser geeignet als der Vergleich gemeinsamer Gene. Deshalb wurde in jedem Modell die Anzahl der Gene in den jeweiligen Kategorien ermittelt und der prozentuale Anteil zur Gesamtheit der Gene errechnet und in einem Balkendiagramm nebeneinander aufgetragen. Zur graphischen Darstellung wurden nur die elf biochemischen Kategorien, die die meisten Gene enthielten, verwendet.

Wie man in Abb. 29 erkennen kann, waren zwar in allen *in-vitro*-Modellen die meisten biochemischen Kategorien mit einer ähnlichen Häufigkeit vertreten, aber auch hier tritt das im vorigen Kapitel beschriebene Problem auf, dass ähnliche Signalwege sowohl durch hoch- als auch herunterregulierte Gene betroffen waren. Dadurch wurde die Interpretation der Daten erschwert.

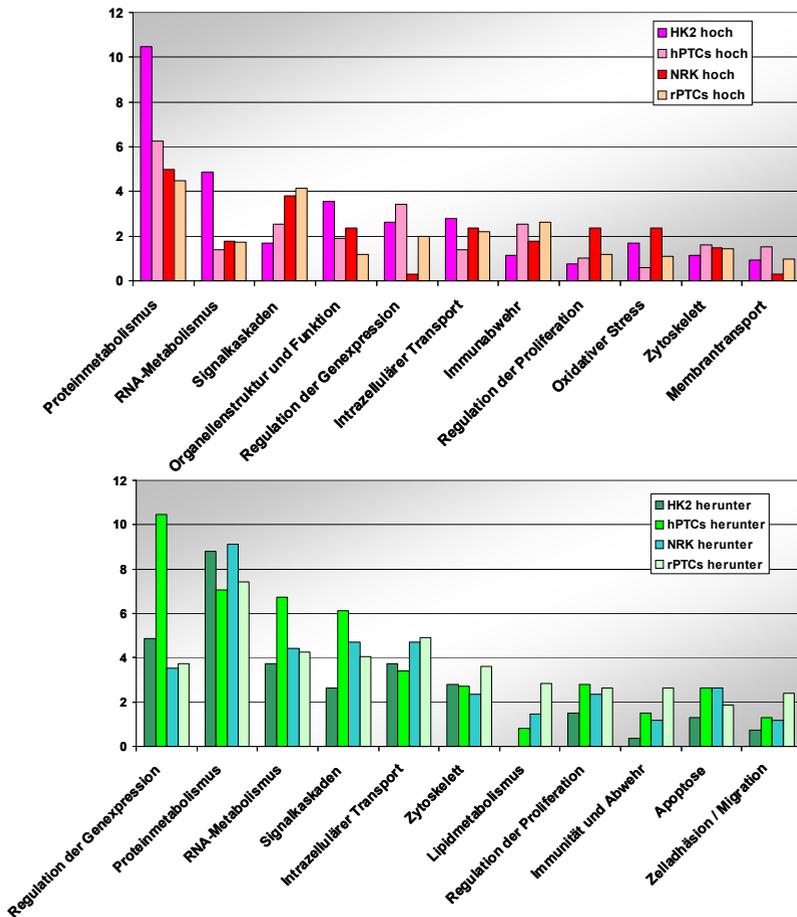


Abb. 29: Verteilung der biochemischen Kategorien in *in-vitro*-Modellen für die Niere nach OTA-Behandlung

Dargestellt sind die biochemischen Kategorien, die die meisten Gene enthielten und nach der Inkubation mit OTA für 1 und 3 Tage gegenüber der Kontrolle verändert waren. A) zeigt die hochregulierten Kategorien. B) zeigt die herunterregulierten Kategorien. Beide verdeutlichen von links nach rechts die Deregulation in folgenden Zellmodellen: die humane permanente Zelllinie HK-2, primäre humane proximale Tubuluszellen (hPTCs), die permanente Rattennierenzelllinie NRK-52E und primäre proximale Tubuluszellen der Ratte (rPTCs).

Da beim Vergleich der Daten des *in-vivo*-Versuchs und der beiden *in-vitro*-Modelle der Ratte deutlich wurde, dass manche *in vivo* beeinflussten Gene oder Signalwege auch *in vitro* nach Karzinogenbehandlung betroffen waren, andere aber nicht, wurden nun in einem nächsten Schritt beispielhaft Gene bestimmter Signalwege auf dem Humanchip gesucht und im Vergleich mit allen Daten, d. h. sowohl von Human als auch von der Ratte,

dargestellt. Dabei wurden sowohl Gene aus Signalwegen verwendet, die *in vivo* und *in vitro* ähnlich gewesen waren, aber auch von Genen, die *in vivo* und *in vitro* unterschiedlich dereguliert gewesen waren. Daraus resultierten 58 Gene, deren Expression nun zwischen allen *in-vitro*-Modellen und dem *in-vivo*-Versuch verglichen wurde. In der Abb. 30 fällt auf den ersten Blick auf, dass die Deregulation zwischen *in vivo* Ratte und *in vitro* Ratte ähnlicher ist, als zwischen *in vivo* Ratte und den humanen Zellmodellen. Sehr auffällig war, dass die höhere Dosis in den HK-2-Zellen auch mit einer Verstärkung der Deregulation der meisten Gene einhergeht, was wiederum belegt, dass die in der Zellkultur eingesetzte Konzentration einen großen Einfluss auf die Veränderungen im Expressionsprofil hat. Jedoch ging die höhere Konzentration auch mit einer drastischen

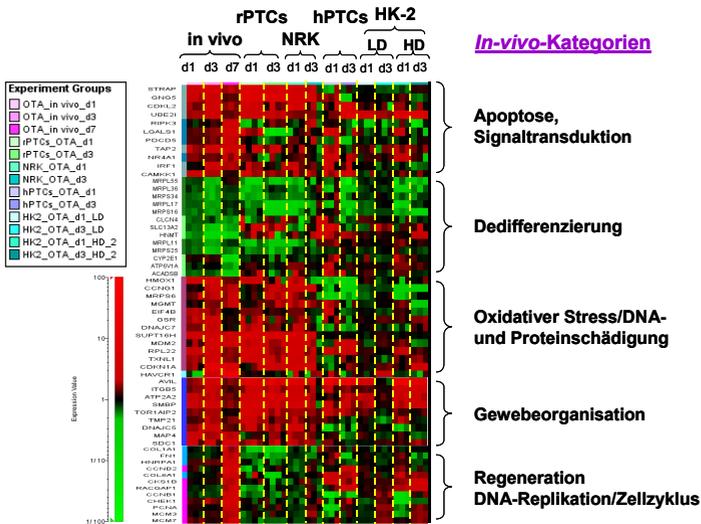


Abb. 30: Vergleich der verschiedenen *in-vitro*-Modelle mit *in vivo* nach OTA-Behandlung
 Eine Auswahl an Genen aus dem *in-vivo*-Versuch nach OTA-Behandlung wurde sowohl mit den beiden *in-vitro*-Modellen der Ratte als auch mit den beiden humanen *in-vitro*-Modellen verglichen. Die Gene wurden *in vivo* in toxikologische Kategorien eingeteilt, deren Bezeichnungen rechts am Bildrand angegeben sind. Von links nach rechts sind folgende Proben im hierarchischen Cluster dargestellt: *in vivo* Ratte Tag 1-7; primäre proximale Tubuluszellen der Ratte (rPTCs) Tag 1 und 3; Nierenzelllinie der Ratte (NRK-52E) Tag 1 und 3; primäre humane proximale Tubuluszellen (hPTCs) Tag1 und 3; humane Nierenzelllinie (HK-2) Tag 1 und 3 nach Inkubation mit der niedrigen Konzentration (LD) OTA; humane Nierenzelllinie (HK-2) Tag 1 und 3 nach Inkubation mit der hohen Konzentration (HD) OTA. Alle Daten sind normalisiert auf den Mittelwert der jeweiligen Kontrollen.

Verminderung der Vitalität einher, was normalerweise ein Ausschlusskriterium für *in-vitro*-Genexpressionsuntersuchungen wäre. Die Dedifferenzierung durch OTA *in vivo* konnte durch kein Modell gezeigt werden, ebenso waren die regenerativen Prozesse kaum

in den *in-vitro*-Modellen zu sehen. Jedoch waren einige wenige Gene, wie *CCNB2*, *CKS1B*, *RACGAP1* und *COL6A1* *in vivo* zu den regenerativen Prozessen gezählt worden und ebenfalls in den primären humanen proximalen Tubuluszellen und den HK-2-Zellen, die mit der höheren OTA Konzentration inkubiert worden waren, hochreguliert. Allerdings waren im Gegensatz zu den *in-vitro*-Modellen der Ratte bei den humanen Modellen die akuten Effekte weniger korrelierbar.

3.2.5 Vergleich weiterer Nephrokarzinogene mittels eines humanen Zellmodells für die Niere

In dem EU-Projekt *Predictomics* wurde die humane permanente Nierenzelllinie HK-2 als *in-vitro*-Modell für die Niere verwendet. Deshalb wurde im Rahmen des Projektes diese Zelllinie mit den schon *in vivo* verwendeten Nephrokarzinogenen Aristolochiasäure (AA), 2-Nitrofluoren (2NF), N-Nitrosomorpholin (NNM) und Kaliumbromat (KBrO₃) für 24 und 48 h behandelt und die Genexpressionsdaten miteinander verglichen. Im Anschluss konnten die *in vitro* erhobenen Daten mit den *in-vivo*-Daten verglichen werden, um Gemeinsamkeiten und Differenzen in der Veränderung von Genen oder aber auch bestimmter Signalwege mit *in vitro* durch diese Nephrokarzinogene zu zeigen.

3.2.5.1 Konzentrationsbestimmung

In Analogie zu den vorherigen Inkubationsversuchen mussten auch zu diesen Versuchen zuerst Experimente zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Es sollte die Dosis genommen werden, die gerade zu einem Anstieg der LDH-Freisetzung führte, aber noch keine oder sehr geringe Zytotoxizität erkennen ließ, die durch eine Reduktion des Resazurins gemessen werden konnte. Allerdings wurde für die Vitalitätsmessung der HK-2-Zellen, die mit 2NF inkubiert wurden, der MTT-Test verwendet, da es offensichtlich zu Interaktionen zwischen dem Resazurin und dem 2NF gekommen war. Es konnte keine Abnahme der Vitalität der Zellen mit Hilfe des Resazurin-Tests gemessen werden, wohingegen die gleichzeitige Messung mit dem MTT-Test auf eine hohe Zytotoxizität schließen ließ.

Zunächst wurden verschiedene Konzentrationen in 96-'well'-Platten zu verschiedenen Zeitpunkten ausgetestet, welche dann auf das 6-'well'-Format übertragen werden sollten. Für die Genexpressionsanalysen sollten die Zeitpunkte Tag 1 und Tag 2 mit je drei unabhängigen Replikaten analysiert werden. Da aber die festgelegten Konzentrationen im 6-'well' keine zu den 96-'well' vergleichbaren Ergebnisse lieferten, wurde die Konzentrationsoptimierung für alle weiteren Versuche in 6-'well'-Platten vorgenommen und vor der Hybridisierung der Microarrays nochmal eine Taqman®-Analyse für *p21* mit

den 48 h Proben der genotoxischen Nephrokarzinogene durchgeführt (Daten nicht gezeigt), da bei diesen eine Induktion des Gens auftreten müsste. Für Kaliumbromat wurden anhand der Ergebnisse der beiden Tests (LDH und Resazurin) zwei Konzentrationen bestimmt. Die Taqman®-Analyse für *p21* ergab, dass ein Anstieg um 1,9- und 1,4-fach bei 50 und 20 μM AA und um 2,4- und 3-fach bei 80 und 100 mM NNM erfolgte. Bei 2NF zeigte sich erst bei der höchsten Konzentration von 50 μM , die schon mit einer hohen Zytotoxizität einherging, ein leichter Anstieg (1,5 fach) der Expression des Gens. Daraus ergaben sich letztendlich zwei Konzentrationen für alle Nephrokarzinogene, die zwar z. T. eine Freisetzung des LDHs bewirkten, aber nur kaum oder keinen Abfall der Vitalität verursachten (Abb. 31).

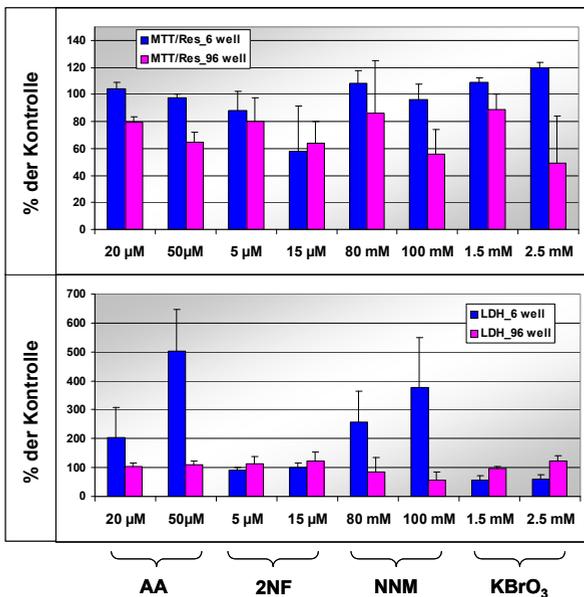


Abb. 31: Differenzen in der Konzentrationsbestimmung in 96- und 6'-well'-Platten mit HK-2-Zellen

Dargestellt sind alle Ergebnisse des Resazurin- bzw. MTT- (für 2NF) und des LDH-Assays nach 48 h Inkubation mit den angegebenen Konzentrationen der Nephrokarzinogene. Bei den 96'-well'-Platten wurden für die Berechnung der Mittelwerte vier unabhängige Replikate der HK-2-Zellen \pm Standardabweichung, bei den 6'-well'-Platten drei unabhängige Replikate für die Berechnung der Mittelwerte \pm Standardabweichung verwendet.

In der gezeigten Abb. 31 kann man sehen, dass sich das Verhältnis zwischen MTT/Resazurin- und LDH-Assay verschoben hatte und die Freisetzung an LDH z. T. sehr hoch war, aber noch keine Zytotoxizität zu sehen war. Zwei Konzentrationen wurden gewählt, da sich schon in den vorigen Experimenten gezeigt hatte, dass das

Zellkultursystem sehr empfindlich auf eine etwas höhere bzw. niedrigere Konzentration der Substanz reagiert. Bei einer zu geringen Konzentration könnte es durchaus sein, dass man die spezifischen Antworten im Expressionsprofil nicht sieht. Wählt man die Konzentration aber zu hoch, könnte eine zu zytotoxische Konzentration die spezifischen Effekte „überlagern“. Die Proben für die Analyse des Genexpressionsprofils sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tabelle 8: Konzentrationen, Zeitpunkte und Anzahl der Replikate für die *in-vitro*-Analysen

Substanz (Abkürzung; CAS Nummer)	Konzentration	Anzahl der Replikate	
		Tag 1	Tag3
Aristolochiasäure (AA; AA I: 313-67-7; AA II: 475-80-9)	20 µM	3	3
	50 µM	3	3
2-Nitrofluoren (2NF; 607-57-8)	5 µM	3	3
	15 µM	3	3
N-Nitrosomorpholine (NNM; 59-89-2)	80 mM	3	3
	100 mM	3	3
Kaliumbromat (KBrO ₃ ; 7758-01-2)	1,5 mM	3	3
	2,5 mM	3	3

Für AA und 2NF wurde jeweils dieselbe Kontrolle (DMSO), und für NNM und KBrO₃ die Kontrolle, die für die entsprechenden Zeitpunkte nur mit Medium inkubiert wurde, für die Microarrays verwendet.

3.2.5.2 Genexpressionsanalyse

Der erste Einblick in die Daten erfolgte auch hier mittels einer PCA (Abb. 32). In dieser dreidimensionalen Darstellung war zu erkennen, dass im Versuch mit 2NF kaum Veränderungen in der Genexpression stattgefunden hatten, da die mit 2NF behandelten Proben mit den Kontrollen zusammen 'clustern'. Die zeit-, aber mehr noch die konzentrationsabhängigen Veränderungen des Genexpressionsprofils nach der Inkubation mit AA waren dagegen deutlich zu erkennen. Bei den Versuchen mit NNM beobachtete man eher eine konzentrationsabhängige Veränderung, erkennbar daran, dass die Zeitpunkte der beiden Konzentrationen sehr nah beieinander lagen. Des Weiteren wurde festgestellt, dass ein kompletter Versuch der mit NNM behandelten Proben, das Experiment B, als Ausreißer betrachtet werden muss, da diese sehr nah an den Kontrollen 'clusterten', was für eine geringe Veränderung gegenüber der Kontrolle spricht. Bei KBrO₃ konnte man eine Veränderung sowohl mit der Zeit als auch mit der Konzentration erkennen.

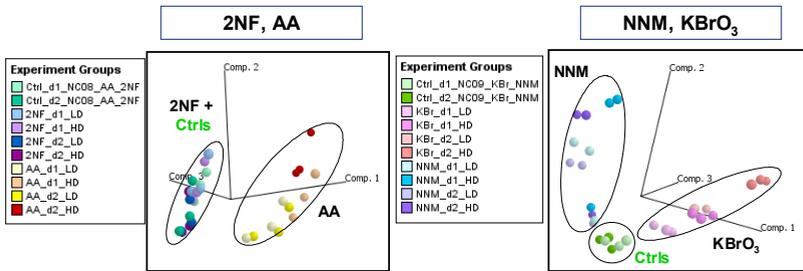


Abb. 32: PCA der HK-2-Zellen, die mit vier verschiedenen Nephrokarzinogenen behandelt wurden

In der linken PCA sind die Kontrollen (Ctrls) mit 2NF und AA behandelten Proben der HK-2-Zellen zu sehen. Man kann eine deutliche Veränderung des Profils aufgrund der Behandlung mit AA erkennen, wohingegen durch 2NF kaum eine Veränderung zu sehen ist. In der rechten PCA sind die Kontrollen (Ctrls) mit den NNM und KBrO₃ (KBr) behandelten Proben der HK-2-Zellen dargestellt. Durch KBrO₃ und NNM erfolgte eine Änderung des Genexpressionsprofils, allerdings clustert ein Experiment mit NNM sehr nah an der Kontrolle, d.h. in diesem Experiment hat die NNM-Behandlung kaum zur Veränderung der Genexpression geführt. In beiden PCA sind die verschiedenen Zeitpunkte (d = Tag) und Konzentrationen (LD = low dose, HD = high dose) farblich unterschiedlich gekennzeichnet.

Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mittels N-Way ANOVA mit $p = 0,0001$ für die Faktoren Zeit und Behandlung, einem gepaarten t-Test mit $p = 0,001$ pro Konzentration und Zeitpunkt zwischen Kontrollgruppe und behandelter Gruppe und einer zweifachen Deregulation gegenüber der Kontrolle für AA, 2NF und KBrO₃ durchgeführt. Es ergaben sich nach der Eliminierung aller Gene mit einer Intensität < 20 und aller vollkommen unbekanntes Gene folgende Gengruppen: 3587 Gene für AA, 34 Gene für 2NF und 1715 Gene für KBrO₃. Wie oben beschrieben unterschied sich das Experiment B von den mit NNM behandelten Proben deutlich von den anderen beiden Replikaten, und die Veränderungen waren nur konzentrationsabhängig und nicht zeitabhängig. Deshalb wurde hier zwar auch ein N-Way ANOVA mit $p = 10^{-4}$ durchgeführt, dabei jedoch die Option 'min. Occupation = 2' ausgewählt, da sich nun in jeder Experimentgruppe nur noch je zwei Replikate befanden und normalerweise immer mindestens drei Replikate verwendet wurden. Anschließend wurde ein Welch-t-Test bei $p = 10^{-3}$ mit den beiden Replikaten, die sich weitaus mehr von der Kontrolle unterschieden, durchgeführt. Dafür wurden jeweils Tag 1 und 2 mit niedriger Dosis (LD) und Tag 1 und 2 mit hoher Dosis (HD) behandelt zusammengefasst. Daraus ergaben sich 1153 Gene, die durch NNM in den HK-2-Zellen verändert wurden.

Mechanistische Analyse

Aufgrund der Vielzahl der Gene, die durch die Behandlung der HK-2-Zellen mit den Nephrokarzinogenen verändert waren, wurden die *in-vitro*-Daten mit den vorhandenen Daten der *in-vivo*-Versuche aus den Kurzzeit-Tierstudien verglichen. Dieser Vergleich schien sinnvoll, da die derzeitigen Richtlinien sich nach den Ergebnissen und Befunden der *in-vivo*-Studien richten, und man noch keine ausreichende Erfahrung auf dem *in-vitro*-Gebiet mit Expressionsprofil-Veränderungen nach einer Behandlung mit diesen Nephrokarzinogenen hat. Außerdem zeigten sich in den *in-vivo*-Studien Gemeinsamkeiten zwischen den genotoxischen Karzinogenen, die ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit darstellten und von denen überprüft werden sollte, ob diese auch im *in-vitro*-System induzierbar sind. Deshalb wurden die im *in-vivo*-Versuch identifizierten Gene auf dem Human-Chip gesucht und deren Expressionsprofil innerhalb der genotoxischen Nephrokarzinogene AA, 2NF und NNM *in vitro* verglichen. Funktionell bedeutende Gruppen bzw. toxikologische Kategorien, aus denen die wichtigsten Gene für den Vergleich selektiert wurden, waren folgende: Oxidativer Stress/DNA-Schädigung (hauptsächlich *p53*-Zielgene), Oxidativer Stress/Proteinschädigung, Oxidativer Stress/Detoxifizierung, generelle Detoxifizierung (Biotransformation Phase I, II, III), Inflammation (waren *in vivo* nur durch AA induziert worden) und allgemeiner Stress.

Eine deutliche Induktion von Genen wie *MGMT*, *CDKN1A*, *MDM2*, *BCCIP* und *CCNG1* zeigte sich nach der Behandlung mit den genotoxischen Nephrokarzinogene *in vivo*, wobei viele der Gene nach NNM erst an Tag 14 hochreguliert waren. Diese Gene stehen für eine Antwort auf oxidativen Stress und das Auftreten von DNA-Schädigung (Abb. 33). Im Gegensatz dazu sah man deutlich, dass die meisten dieser Gene *in vitro* gar nicht oder nur durch eines der Nephrokarzinogene induziert wurden. Vergleichbar mit *in vivo* schienen nur *p21* und *BCCIP*, die ebenfalls durch AA *in vitro* induzierbar waren. *CCNG2* wurde zwar nicht *in vivo* induziert, gehört aber ebenfalls zu den Genen, die in oxidativem Stress eine Rolle spielen. Dieses Gen wurde *in vitro* durch AA und NNM induziert. Interessanterweise zeigten die verschiedenen 'Probe-Sets' von *CCNG2* ein gegensätzliches Expressionsprofil. Diese Veränderungen sind dadurch zu erklären, dass die oberen drei 'Probe-Sets' zu einer anderen Spleiß-Variante gehören als die unteren beiden.

Beim Vergleich der Gene, die auf Proteinschädigung hindeuteten, konnte keine konsistente Veränderung der Gene, die *in vivo* durch die Nephrokarzinogene auftrat, festgestellt werden. Zu den Genen, die mit oxidativem Stress/Detoxifizierung assoziiert sind, zählten vor allem *GSTA2*, *GSTP1*, *GPX2*, *NQO1* und *EPHX1*. Die meisten dieser Gene, die als Antwort auf oxidativen Stress induziert werden, sind 'antioxidant response element' Zielgene (ARE Target Gene) und Teil einer akuten Stressantwort, die ebenfalls *in vitro*

durch AA und NNM gezeigt werden konnte. Hingegen zeigten die Gene, die *in vivo* als Detoxifizierung zusammengefasst und deutlich nach 2NF und AA *in vivo* induziert wurden, *in vitro* kaum spezifische Veränderungen des Genexpressionsprofils. Nur *ABCC2* wurde deutlich nach AA Behandlung hochreguliert. Eine leichte Hochregulierung zeigten *GSTM1* und *ABCC3* am zweiten Tag nach NNM, wobei letzteres auch leicht durch AA induziert wurde. Die für AA *in vivo* als spezifisch differentiell deregulierten Inflammationsgene wurden *in vitro* nicht durch AA verändert. Einige Gene, die auf generellen Stress im Gewebe nach der Behandlung hinwiesen, wurden mit allen Proben, d. h. AA, 2NF, NNM und KBrO_3 , verglichen. *In vivo* zeigte sich in mit 2NF und zum Teil AA und NNM behandelten Proben eine generelle Stressantwort (Abb. 34). *Per1* wurde auch durch die niedrige Dosis KBrO_3 induziert. Diese generellen "Stressgene" wiesen *in vitro* durch AA, NNM und KBrO_3 , aber nicht 2NF ebenfalls eine Induktion auf. In keinem der Vergleiche wurden die ausgesuchten Gene durch 2NF stark verändert, was auch in den beiden Abbildungen gut zu erkennen ist. Dies bestätigte auch die in der PCA gezeigte Ähnlichkeit der behandelten Proben zu den entsprechenden Kontrollen. Aufgrund dieser Befunde kann angenommen werden, dass 2NF als Substanz für die Zellkultur nicht geeignet ist, da möglicherweise die Aktivierung fehlt.

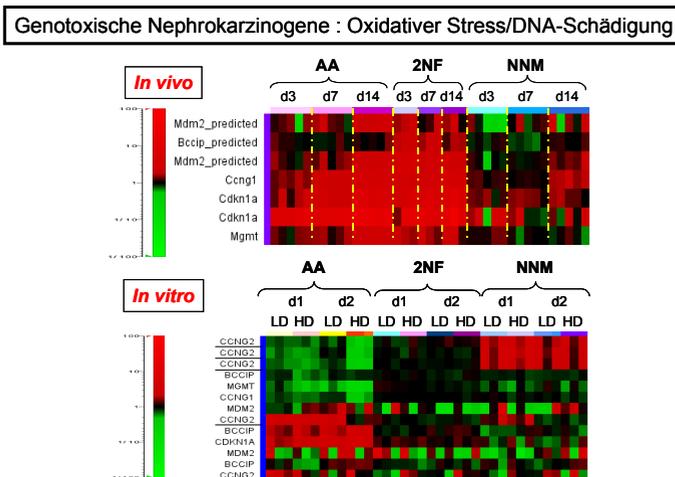


Abb. 33: Vergleich *in vivo* und *in vitro*: Oxidativer Stress/DNA-Schädigung

Der Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* zeigte nur eine mäßige Übereinstimmung hinsichtlich der Deregulation von Genen bestimmter Funktionskategorien. Die Gene, die im oberen 'Cluster' gezeigt sind, wurden mehr oder weniger *in vivo* nach den genotoxischen Nephrokarzinogenen dereguliert, und repräsentieren die toxikologische Kategorie Oxidativer Stress/DNA-Schädigung. Diese wurden auf dem humanen HGU133 Plus2 GeneChip® anhand des Gennamens zugeordnet. Das untere 'Cluster' zeigt die Deregulation dieser Gene in den HK-2-Zellen, die mit den gleichen Nephrokarzinogenen *in vitro* behandelt wurden.

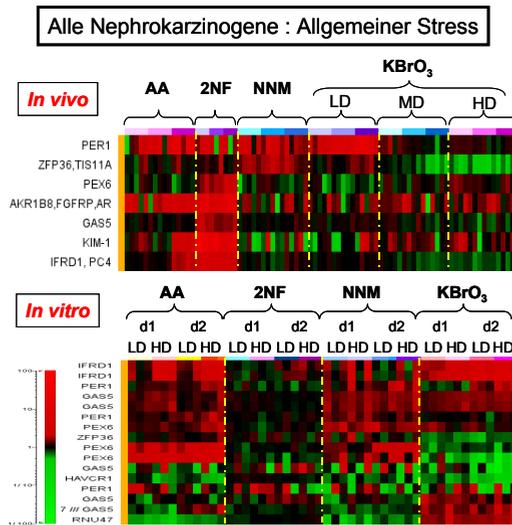


Abb. 34: Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro*: Allgemeiner Stress

Die *in vivo* signifikant deregulierten Gene der Kategorie „allgemeiner Stress“ wurden entsprechend auf dem HGU133 Plus2 GeneChip® identifiziert. Anschließend wurde deren Deregulation zwischen allen *in vitro* verwendeten Nephrokarzinogenen verglichen. *In vivo* kann man eine deutliche Hochregulation durch AA und 2NF erkennen, aber nur teilweise in den NNM- und KBrO₃-Proben. Diese allgemeinen Stressantworten sind ebenfalls gut *in vitro* zu erkennen.

Ein weiterer direkter Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* eines Gens, das *in vivo* offensichtlich durch die Nephrokarzinogene 2NF, AA, OTA und sogar tendenziell durch KBrO₃ (nicht statistisch signifikant) verändert wurde, zeigte deutliche Unterschiede. *KIM-1* ('kidney injury molecule 1'), das auch *HAVCR1* ('hepatitis A virus receptor 1') genannt wird, gehört zu den Zelladhäsionsmolekülen und steht in Verbindung mit der Regeneration der Nierenzellen, da es erst nach einer Schädigung jener im proximalen Tubulus vermehrt auftritt. Dieses Gen scheint demnach ein Marker für die geschädigte Niere *in vivo* zu sein. Da dieses Gen *in vitro* nie unter den signifikant deregulierten Genen - weder bei den humanen noch bei den Modellen der Ratte - war, wurde die Expression des Gens auf dem Absolut-Level in allen Modellen verglichen. Wie man in der Abb. 35 erkennen kann, ist dieses Gen sowohl in den primären proximalen Tubuluszellen (rPTCs) als auch in der humanen permanenten Zelllinie HK-2 schon in der Kontrolle sehr stark exprimiert. Es fand keine weitere Steigerung nach der Einwirkung der Nephrokarzinogene statt. In den primären Zellen der Ratte übertraf der Level der Expression in den Kontrollen sogar den Level, den das Gen nach der Behandlung mit OTA *in vivo* erreicht hatte, wobei eine extreme Induktion des Gens aus der OTA-Behandlung *in vivo* resultierte. Bei den humanen primären Zellen (hPTCs) war der absolute Expressionslevel ebenfalls schon sehr

hoch in den Kontrollen und dazu noch sehr variabel zwischen den einzelnen Proben. Die Expression von *KIM-1/HAVCR1* ließ sich nach der Inkubation mit OTA nicht noch weiter in diesen Zellen steigern. Die NRK-52E-Zellen hatten zwar insgesamt eine eher mit *in vivo* vergleichbare Expression des Gens, die aber auch nach der Inkubation mit OTA nicht verändert wurde.

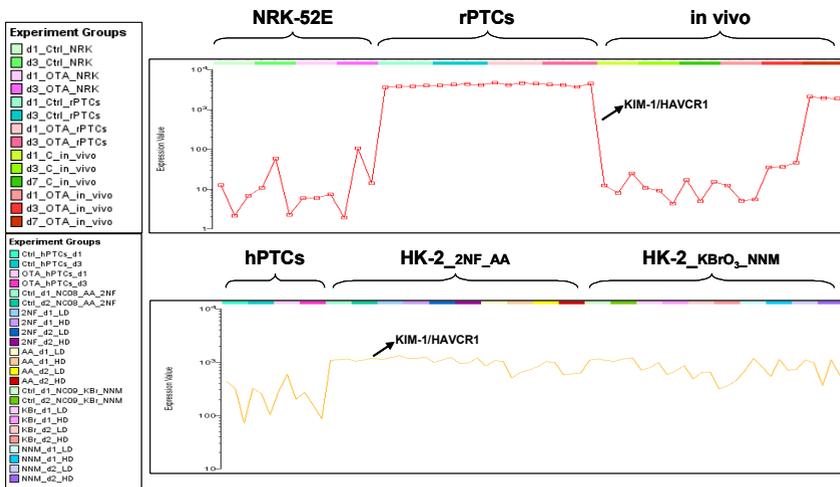


Abb. 35: Vergleich des absoluten Expressionsprofils von *KIM-1/HAVCR1*

Im oberen Teil ist die absolute Expression von *KIM-1/HAVCR1* in den Ratten-Proben, im unteren Teil in den humanen Proben nach der Behandlung mit einem (OTA bei NRK-52E, rPTCs, *in vivo*, hPTCs) bzw. mehreren Nephrokarzinogenen (HK-2-Zellen mit 2NF, AA, KBrO₃, NNM) dargestellt. Die Expression in den primären proximalen Tubuluszellen der Ratte (rPTCs) und des Menschen (hPTCs) und in den HK-2-Zellen ist schon in den Kontrollen (grün) deutlich erhöht gegenüber der Expression in der Rattenniere *in vivo*.

Im Gegensatz zu den genotoxischen Nephrokarzinogenen führt der Vergleich der Daten des Kaliumbromats (KBrO₃) mit den entsprechenden *in-vivo*-Daten zu keinem sinnvollen Ergebnis, da die *in-vivo*-Daten zu KBrO₃ keine spezifischen Änderungen erkennen ließen. Deshalb sollte mittels eines 'Pathway'-Programms versucht werden, Aufschluss über die *in-vitro*-Wirkung des KBrO₃ zu geben. Dazu wurde das Programm Ingenuity verwendet, in welches man die durch die Affymetrix-Technologie gefundenen 1715 Gene mit den dazugehörigen Expressionsdaten einladen konnte. Das Programm berechnet aufgrund einer kuriierten Datenbank verschiedene Netzwerke und verknüpft die Gene entsprechend ihrer wechselseitigen Beziehung zueinander. Die Anzahl der Netzwerke beruht letztlich auf der Anzahl der in der Datenbank vorhandenen Gene und der in der Datenbank beschriebenen Beziehung der Gene untereinander.

Zwei der 'Cluster' zeigten ein interessantes Netzwerk einiger Gene, die durch Kaliumbromat verändert wurden, und werden nun im Folgenden kurz beschrieben. Das erste der in Abb. 36 gezeigten Netzwerke verdeutlichte die Induktion von Genen, die mit oxidativem Stress, der auch schon in der Literatur im Zusammenhang mit der Wirkungsweise des Kaliumbromats beschrieben ist, zusammenhängen. Dieses Netzwerk zeigte zum einen zwei Untereinheiten der γ -Glutamyl-cysteinyl-Synthetase, die in der Glutathion-Synthese eine wichtige Rolle spielt, und zum anderen eine Reihe von Genen, die ebenfalls auf das Vorkommen von oxidativem Stress in den Zellen schließen lassen. Darunter fielen sowohl einige Hitzeschock-Proteine als auch die NADH:NADPH Diaphorase.

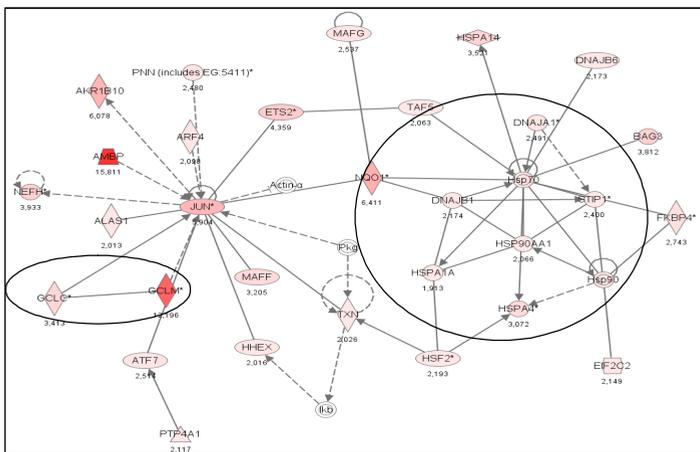


Abb. 36: KBrO₃: Netzwerk oxidativer Stress

Verschiedene Gene, die durch KBrO₃ in der Zellkultur verändert wurden, konnten mittels des Programms 'Ingenuity' in Zusammenhang gebracht werden. Beziehungen von Genen, die mit oxidativem Stress in Verbindung stehen, konnten in diesem Netzwerk abgebildet werden.

Das zweite Netzwerk (Abb. 37) hingegen zeigte durch KBrO₃ veränderte Gene, die alle durch *p21/CDKN1A* reguliert werden und in der Zellzyklusregulation und Proliferation eine wichtige Rolle spielen. Zwar wurde *p21* auch durch die genotoxischen Nephrokarzinogene induziert, allerdings traten noch weitere Gene zusätzlich auf, die auf eine DNA-Schädigung schließen ließen. In diesem Netzwerk sind jedoch eher Zellzyklusprogressions- und Proliferationsgene zu sehen. Ein weiteres Netzwerk zeigte einige Gene, die in RNA-Schädigung und Reparatur involviert waren.

Insgesamt konnten bei KBrO₃ *in vitro* zwar viele Veränderungen gefunden werden, *in vivo* aber nicht, was auf eine homöostatische Regulation *in vivo* hindeuten könnte oder auf einen Konzentrationseffekt *in vitro*, da die Zellen nicht mehr im Zellverband des intakten

Organs vorliegen.

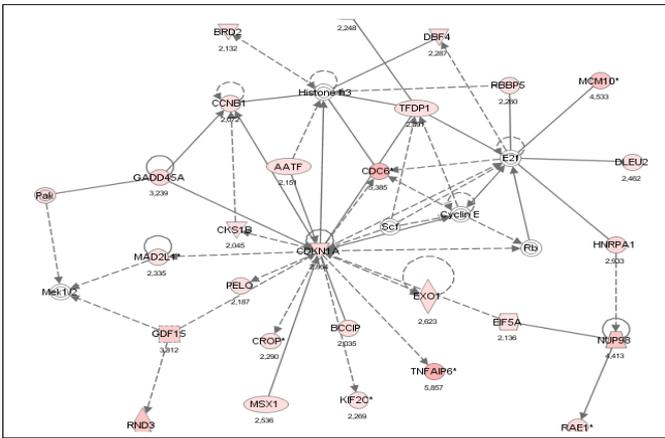


Abb. 37: KBrO₃: Netzwerk Zellzyklusregulation und Proliferation

Gene, die durch KBrO₃ in der Zellkultur verändert wurden, konnten mittels des Programms 'Ingenuity' in Zusammenhang gebracht werden. Beziehungen von Genen, die mit Zellzyklusregulation und Proliferation in Verbindung stehen, konnten in diesem Netzwerk abgebildet werden. Viele Gene in diesem Netzwerk werden durch *p21* reguliert.

Die Genlisten mit den Expressionsdaten der in der Diskussion aufgegriffenen Gene befinden sich im Anhang. Die vollständigen Genlisten sind auf Anfrage bei der Autorin erhältlich.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zunächst genotoxische und nicht-genotoxische Nephrokarzinogene nach *in-vivo*-Kurzzeitstudien mittels Genexpressionsanalyse miteinander verglichen. Dieser Vergleich konnte zur Aufklärung der Mechanismen von frühen Effekten von genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen beitragen. Dies könnte die Möglichkeit der Klassifizierung der Nephrokarzinogene, und die Einschätzung des Gefahrenpotentials der Stoffe für den Menschen eröffnen. Bislang wird der Langzeit-*in-vivo*-Test für die Klassifizierung von Substanzen und deren kanzerogenem Potential verwendet. Um nun frühe Veränderungen in den Organen aufzuspüren, die im Zusammenhang mit der Karzinogenese stehen könnten, wurden in dieser Arbeit Ratten mit in der Literatur beschriebenen genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen bis zu 14 Tagen behandelt und anschließend drei verschiedene Zeitpunkte mittels Genexpressionsanalyse untersucht. Dies gab zum einen einen Hinweis darauf, dass schon aus Kurzzeitstudien Voraussagen des Ergebnisses von Langzeitstudien möglich sind und zum anderen, dass nach kurzer Zeit schon prägnante Veränderungen im Gewebe auftreten, die den genotoxischen oder nicht-genotoxischen Mechanismen zugrunde liegen bzw. helfen könnten diese aufzuklären.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein *in-vitro*-Modell für die Niere, primäre Nierenzellen der Ratte, durch einen Vergleich mit dem Nierenkortex *in vivo* charakterisiert, um zu untersuchen, welche Signalwege *in vitro* noch vorhanden sind. Dies könnte in Zukunft helfen, die Ergebnisse von Versuchen mit diesem Modell zu interpretieren. Außerdem wurden verschiedene *in-vitro*-Modelle - sowohl human als auch von der Ratte - mit Nephrokarzinogenen behandelt und anschließend mit *in-vivo*-Daten verglichen, da diese die komplexen Zusammenhänge am vollständigsten widerspiegeln. Dies gab zum Teil Aufschluss darüber, welche von den *in vivo* betroffenen Funktionen und Signalwegen auch *in vitro* beeinflusst werden.

Da derzeit auch ein prädiktiver Einsatz von Toxicogenomics für sowohl *in vivo* als auch *in vitro* diskutiert wird, sind weitere Erkenntnisse zum Mechanismus *in vivo* und die Etablierung von *in-vitro*-Modellen gleichermaßen sehr wichtig.

4.1 Vergleich genotoxischer Nephrokarzinogene *in vivo*

Der Vergleich zwischen den genotoxischen Nephrokarzinogenen in dieser Arbeit zeigte, dass durchaus Gemeinsamkeiten auf der Genexpressionsebene vorhanden waren. Der

genaue Mechanismus der einzelnen Substanzen ist nicht ganz aufgeklärt, so dass der Einblick in die Genexpression in der Niere aufgrund der Toxinapplikation neue Erkenntnisse über den Wirkmechanismus zulassen könnte.

GEMEINSAME EFFEKTE DER GENOTOXISCHEN NEPHROKARZINOGENE

Bei dem Vergleich der Genexpression der Nieren nach der Einwirkung der drei genotoxischen Nephrokarzinogene Aristolochiasäure (AA), 2-Nitrofluoren (2NF) und N-Nitrosomorpholin (NNM) und der Kategorisierung der deregulierten Gene bezüglich ihrer biochemischen Funktion, konnten anschließend toxikologische Kategorien gebildet werden, die die Richtung der Genderegulation miteinbeziehen. Auffallend war, dass *p53*-Zielgene, wie *p21* (*CDKN1A*), *MGMT* und *MDM2*, die beim Signalweg oxidativer Stress/DNA-Schädigung eine Rolle spielen, durch alle genotoxischen Nephrokarzinogene induziert wurden, jedoch am stärksten durch 2NF und AA. Der Tumorsuppressor *p53*, z. B. durch DNA-Schädigung aktiviert, spielt eine große Rolle im Zellzyklus-Checkpoint, bei der DNA-Reparatur und bei der Apoptose, was zum Teil durch *p21* (Zellzyklus-Checkpoint) und *MGMT* (DNA-Reparatur) vermittelt wird (Amundson *et al.*, 2001). Die Induktion dieser Gene könnte somit darauf schließen lassen, dass DNA-Addukte durch eine direkte Schädigung der DNA durch die genotoxischen Nephrokarzinogene entstanden sind, was ein Merkmal für genotoxische Karzinogene darstellt. Einige Studien beschäftigen sich mit der Bildung von DNA-Addukten dieser genotoxischen Nephrokarzinogene. Bei der Aristolochiasäure kommt es durch die Metabolisierung im Körper zur Entstehung von Lactamen durch Nitroreduktion, wobei die direkte Korrelation von der Entstehung der Addukte und der Initiation der Tumorentstehung nicht gegeben ist, da auch in Nicht-Zielorganen Addukte zu messen sind (Arlt *et al.*, 2002). Allerdings konnten bestimmte Addukte identifiziert werden, die durch die Aktivierung mittels Peroxidasen, die vermehrt im urothelialen System vorkommen, entstanden sein müssen (Schmeiser *et al.*, 1997). DNA-Addukte wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels P³²-Markierung von Stiborova *et al.* (1994) identifiziert, deren Arbeitsgruppe in einer späteren Studie die Aktivierung durch die Prostaglandin-H-Synthetase zeigen konnten (Stiborova *et al.*, 2001). Ebenso spielen diese Addukte, die in den Geweben von 'Aristolochic Acid Nephropathy' (AAN)-Patienten gefunden wurden, wahrscheinlich doch eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren des Urothelialsystems (Schmeiser *et al.*, 1996; Gillerot *et al.*, 2001; Lord *et al.*, 2001), da sie auch in Ratten nach AA-Exposition gefunden wurden (Pfau *et al.*, 1990).

In der Literatur findet man ebenfalls einige Untersuchungen zu spezifischen DNA-Addukten, die nach der Behandlung mit 2NF auftraten. Eine derartige Studie erbrachte

neue Erkenntnisse über das sogenannte (dG(N²)-AAF), welches auch in einer *in-vivo*-Studie mit 2NF von Cui *et al.* (1999) neben drei weiteren Addukten identifiziert wurde. Es stellte sich heraus, dass dieses (dG(N²)-AAF) Addukt wahrscheinlich deswegen so lange in der DNA bestehen bleibt, weil es nur minimal stört, eine erhöhte Thermostabilität besitzt und deshalb nur ein schwaches Substrat für den 'nucleotide excision repair' darstellt (Zaliznyak *et al.*, 2006).

Neben den Genen, die eine Schädigung der DNA unterstützen, wurden außerdem auch Gene in dieser Arbeit selektiert, die für Proteine kodieren, die in oxidativen Stress/Proteinschädigung und -/Detoxifizierung involviert sind, wie *CUL2* und *NQO1* oder *GPX2*. Nach Behandlung mit den genotoxischen Substanzen waren diese Gene, von denen man weiß, dass sie nach oxidativem Stress verstärkt exprimiert werden (Kamura *et al.*, 2000; Dhakshinamoorthy und Jaiswal, 2001; Nishimura *et al.*, 2007), hochreguliert. Interessanterweise konnte von *NQO1* gezeigt werden, dass es in der Lage ist, die Nitrogruppe von AA zu reduzieren, und demnach an der Entstehung von AA-Addukten beteiligt sein könnte (Stiborova *et al.*, 2003). Ebenso fiel eine ganze Reihe von Genen auf, die in die Kategorie Überleben/Proliferation sortiert wurden, wie z. B. *NRG1*, welches zur Aktivierung von Mitgliedern der EGFR-Familie führt (Sweeney *et al.*, 2001), ebenso wie *SNK*, die zu den Serin/Threonin-Kinasen der Zellzyklus assoziierten Kinasen gehört (Kauselmann *et al.*, 1999). Diese Hochregulierung könnte als Gegenregulierung zur Schädigung der Zellen vonstatten gehen. Gleichermäßen könnte es aber auch bedeuten, dass diese Signale verstärkt in Zellen mit bereits geschädigter DNA vorkommen, was dann wiederum zum Überleben dieser Zellen und damit auch von mutierten Genomen führen würde. Die Gene, die mit der Organisation der Zellstruktur assoziiert sind, könnten auch als Antwort auf Stress zu deuten sein, der durch die Toxine hervorgerufen wird. Eine verstärkte Expression dieser Gene könnte letztendlich auch der Schädigung des Gewebes entgegenwirken. Dazu gehörten beispielsweise *TNFRSF12A* und *CAECAMI*. *TNFRSF12A* führt zur Stimulation des NFκB Signalweges, der u.a. in Verbindung mit Stress steht. *CAECAMI* lässt sich außerdem in die Gruppe der Tumorsuppressorgene einordnen und steht im Zusammenhang mit einem tumorfreien Überleben bei Melanomen und 'non-small cell lung carcinoma' (Kammerer *et al.*, 2004).

Die zahlenmäßig weniger herunterregulierten Gene zeigten sich in verschiedene Kategorien involviert, so dass die Interpretation ihrer genauen Bedeutung schwer fällt. Allerdings könnte beispielsweise eine Herunterregulation der Gene, die normalerweise an der Aufrechterhaltung der Zellstruktur beteiligt sind, zu einer Auflösung der organisierten Zellstruktur führen, wie es in geschädigtem Gewebe der Fall ist. Außerdem könnten metabolische Funktionen oder verschiedene Signalwege ausfallen, wenn Gene mit einer

solchen Funktion nicht mehr exprimiert werden, und folglich zur Dedifferenzierung der Zellen führen.

SPEZIFISCHE EFFEKTE DER GENOTOXISCHEN NEPHROKARZINOGENE

Nach 14-tägiger Applikation der Aristolochiasäure wurde eine verstärkte Induktion von Genen in den Nieren gefunden, die in die Immunabwehr involviert sind. Dieser Befund steht im Einklang mit der histopathologischen Beobachtung der Einwanderung von mononukleären Zellen. Diese Einwanderung der Zellen könnte möglicherweise der in der Literatur beschriebenen interstitiellen Fibrose und Tubulusatrophie vorausgehen. Nach 2NF-Gabe waren außerdem Gene hochreguliert, die mit dem RNA-Metabolismus assoziiert sind. Darunter fielen Gene wie z. B. *SMG1*, welches am Abbau von 'Nonsense'-RNA beteiligt ist (Yamashita *et al.*, 2001) und *DAZAPI*, das als physiologisches Substrat von ERK1/2 erkannt wurde, die zu den mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs) gehört und schon mit genotoxischem Stress in Zellkulturen in Verbindung gebracht wurde (Yadavilli *et al.*, 2007). So könnte *SMG1* durch eine Schädigung der RNA zusammen mit den weiteren Genen, die hochreguliert waren und für die Entstehung und Stabilität von RNA zuständig sind, induziert worden sein. Die Expression von *DAZAPI* könnte, ebenfalls wie einige andere oben genannte Gene, ein Zeichen von Stress sein.

Allgemein wurden durch die Behandlung mit 2NF und AA mehr Gene in der Niere dereguliert als durch NNM, wobei auch die Stärke der Deregulation durch beide wesentlich deutlicher war. Generell scheint die Alkylierung der DNA ein wichtiges Ereignis in der Karzinogenität von Nitrosaminen zu sein (Ashby und Lefevre, 1989), allerdings kommen bei NNM Einzel- und Doppelstrangbrüche der Kern-DNA (Stewart, 1981), wie auch Strangbrüche der mitochondrialen DNA in der Leber hinzu (Wilkinson *et al.*, 1975). Eine weitere Studie zur Schädigung der DNA zeigte, dass die 'unscheduled DNA synthesis' (UDS) sowohl in der Leber als auch in den proximalen Tubuluszellen der Niere nach NNM-Applikation vermehrt auftrat (Korr *et al.*, 2001). Weitere Anhaltspunkte zum Mechanismus der Tumorentstehung durch NNM gibt es beispielsweise in der Studie von Matsumoto *et al.* (1992), die herausfanden, dass keine Punktmutation des Codons 12, 13 oder 61 der *ras* Familie in renalen Geweben nach der Behandlung mit NNM vorlag, welche in anderen Tumorentstehungen involviert zu sein scheint. Bannasch *et al.* (1986) unterschieden nach Experimenten mit NNM und Streptozotocin zwischen drei verschiedenen tubulären Läsionstypen, wobei die chromophoben und basophilen Tubuli aus den proximalen Tubuli und die oncocystischen Tubuli aus den distalen Nephronen entstanden waren. Dass in der NNM-Studie dieser Arbeit weniger Gene und diese auch nicht so stark im Vergleich zu AA und 2NF dereguliert waren, könnte auf die Dosis und

die relativ kurze Dauer der Applikation zurückzuführen sein. Ein Versuch aus einer anderen Studie mit 35 mg/kg KG/d zeigte deutlichere Signale (Daten nicht gezeigt), wobei dort die Tiere frühzeitig verstarben. Dass aber einige Gene tendenziell in die gleiche Richtung verändert waren wie bei AA und 2NF spricht dafür, dass NNM seine Kanzerogenität wie die beiden anderen Nephrokarzinogene über einen genotoxischen Mechanismus ausübt.

Insgesamt konnten viele Gene identifiziert werden, die auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus der genotoxischen Nierenkarzinogene schließen lassen. Es konnten ähnliche Effekte, wie oxidativer Stress/DNA-Schädigung, Detoxifizierung und Einfluß auf Überleben/Proliferation und Organisation der Zellstruktur, nach der Einwirkung dieser genotoxischen Nierenkarzinogene beobachtet werden. Solche Effekte schienen ebenfalls nach AA-Gabe in der Niere von Eker- und Wildtyp-Ratten (Stemmer *et al.*, 2007), aber auch in der Leber nach Einwirkung bestimmter Leberkarzinogene in Kurzzeit-*in-vivo*-Studien, darunter auch 2NF (Ellinger *et al.*, 2004), involviert zu sein.

VERGLEICH DER GENEXPRESSION IN UNTERSCHIEDLICHEN ORGANEN NACH 2NF

Die Ähnlichkeit der genotoxischen Mechanismen in der Leber und in der Niere wurde in dem Experiment mittels Genexpressionsanalyse nach Einwirkung von 2NF auf die Leber, die Niere und das Herz bestätigt. Da 2NF ein Leber- und Nierenkarzinogen ist, sollte das Herz als Nicht-Zielorgan dienen, was auch im Vergleich der Genexpressionsprofile gut zu erkennen war. Dort zeigte sich, dass im Herz keine Veränderungen stattgefunden hatten, jedoch in der Leber und Niere zum Teil ähnliche Gene in gleicher Weise dereguliert waren. Das schon erwähnte *p21* und *CCNG1* gehören beide zu den *p53*-Zielgenen und wurden deshalb der toxikologischen Kategorie oxidativer Stress/DNA-Schädigung zugeordnet. Beide waren in der Leber und der Niere nach 2NF deutlich induziert. Des Weiteren waren auch Gene, die nach oxidativem Stress induziert werden, in beiden Organen hochreguliert. Dazu gehörten *EPHX1* und *NQO1*, die in der Phase I der Biotransformation aktiv sind, *GSTP2*, die im Phase-II-Metabolismus eine Rolle spielt und *GPX2*, die im Gluthationstoffwechsel wichtig ist. Zu den Genen, die in die toxikologische Kategorie Überleben/Proliferation sortiert wurden, gehörten unter anderem *NRG1* und *TYMS*, die in beiden Organen hochreguliert waren. Es wurde festgestellt, dass *NRG1* Proliferation induzieren kann und dadurch das Überleben beispielsweise von kardialen Myozyten fördert (Zhao *et al.*, 1998). *TYMS* spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Synthese und -Reparatur und ist so folglich auch wichtig für die Proliferation und das Überleben der Zellen, aber auch ein Angriffspunkt für Chemotherapeutika (Ladner, 2001). Dieser Versuch zeigte, dass die Mechanismen, die der genotoxischen Wirkung von 2NF

und eventuell der daraus folgenden Tumorentstehung zugrunde liegen, in verschiedenen Organen vergleichbar sind. Die unveränderte Genexpression im Herzen bestätigte, dass in Nichtzielorganen bezüglich der Tumorentstehung die entsprechenden Gene nicht dereguliert sind. Dies könnte vermutlich darauf zurückzuführen sein, dass 2NF im Gegensatz zum Herzen in der Leber und der Niere metabolisiert wird. Da nun auch viele Gemeinsamkeiten im Genexpressionsprofil der Nieren von mit den oben beschriebenen genotoxischen Nephrokarzinogenen behandelten Ratten festgestellt wurden, gibt diese Arbeit einen neuen Einblick in die molekularen Mechanismen der genotoxischen Nephrokarzinogene.

4.2 Vergleich nicht-genotoxischer Nephrokarzinogene *in vivo*

Neben den genotoxischen Nephrokarzinogenen wurden außerdem nicht-genotoxische Nephrokarzinogene in dieser Arbeit mittels Microarray-Technologie untersucht. Bisher wurden wenige Studien zur Genexpression von nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen durchgeführt. Allerdings existieren Studien zu Leberkarzinogenen, die zeigen, dass auch bei nicht-genotoxischen Substanzen die Aufklärung auf molekularer Ebene wichtig ist, um deren Wirkungsmechanismus aufzudecken. Elrick *et al.* (2005) beschäftigten sich mit der Rolle von metabolischem und oxidativem Stress, um einen Aufschluss über die nicht-genotoxische Wirkung von Phenobarbital in der Rattenleber zu bekommen, die mit der Niere ein wichtiges Ziel von Karzinogenen darstellt. Eine weitere Studie von Ellinger *et al.* (2005) zeigte, dass genotoxische Leberkanzerogene eine Induktion von Genen bewirkten, die mit DNA-Schädigung und Proliferation assoziiert waren, wohingegen nicht-genotoxische Leberkanzerogene eher Gene induzierten, die vermutlich durch oxidative Schädigungen von DNA und Proteinen induziert wurden oder in Prozesse wie Regeneration und Zellzyklusprogression involviert waren.

In dieser Arbeit wurden Ochratoxin A (OTA) und Kaliumbromat (KBrO_3) als nicht-genotoxische Nephrokarzinogene eingesetzt. Zwar war ein Vergleich der beiden Substanzen nicht möglich, da durch KBrO_3 kaum Veränderungen im Genexpressionsprofil auftraten, aber die Analyse der Ochratoxin-A-Daten erlaubte einen detaillierten Einblick in die Veränderungen der Genexpression, wie im folgenden aufgeführt.

GENEXPRESSIONSANALYSE NACH APPLIKATION VON OTA

Zur Wirkungsweise von OTA existiert eine Reihe von Studien und Theorien, beispielsweise beschrieben Zanic'-Grubisic' *et al.*, (2000), dass OTA, aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Phenylalanin, die Biosynthese von Phenylalanin hemmt und

somit die Proteinsynthese zum Erliegen bringt. Eine genotoxische Wirkungsweise und die Bildung von Addukten konnte bisher nur in Arbeiten einer Gruppe gezeigt werden (Castegnaro *et al.*, 1998). Die Bildung dieser Addukte wurde aber in einigen Studien widerlegt (Gautier *et al.*, 2001; Mally *et al.*, 2004). Ebenfalls kontrovers scheinen die Ergebnisse über die Mutagenität von OTA, die außer bei wenigen Studien (Obrecht-Pflumio *et al.*, 1999) eher negative Ergebnisse lieferten. Auch die Akkumulation von $\alpha_2\mu$ -Globulin wurde als möglicher Mechanismus ausgeschlossen (Rasonyi *et al.*, 1999). Zur Metabolisierung von OTA findet man in der Literatur viele verschiedene Ansätze, wie etwa eine Dechlorinierung, die eine Formierung des Hydrochinonderivates ermöglicht (Gillman *et al.*, 1999) oder die Bildung des hydroxylierten Ochratoxin A (Storen *et al.*, 1982).

Bei der Analyse der Microarrays, die mit der Nieren-RNA von Tieren, die mit 3 mg/kg KG OTA pro Tag behandelt und nach einem, drei und sieben Tagen hybridisiert wurden, konnten folgende Veränderungen festgestellt werden: Unter den schon an Tag 1 oder 3 hochregulierten Genen befanden sich ebenfalls einige Gene, die auch schon im Zusammenhang mit den genotoxischen Nephrokarzinogenen beschrieben wurden, wie z. B. die *p53*-Zielgene *p21*, *MDM2*, *MGMT*, die auf eine DNA-Schädigung hindeuten. Da *p53* aber auch durch oxidativen Stress aktiviert werden kann und 'oxidative stress responsive' Gene wie *BTG2* und *PAG608* hochreguliert waren, kann eine oxidative DNA-Schädigung nach OTA-Behandlung angenommen werden (Higashi *et al.*, 2002; Dandrea *et al.*, 2004). Außerdem waren einige Gene, die die Zelle vor oxidativem Stress schützen, wie die beiden Untereinheiten der γ -Glutamylsynthetase *GCLC* und *GCLM*, aber auch *GGT1* und *MSRA*, herunterreguliert, was dafür spricht, dass der aufgetretene oxidative Stress noch verstärkt wurde. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus anderen Studien, in denen oxidativer Stress als möglicher Mechanismus für die OTA induzierte Toxizität in Betracht gezogen wurde (Mally *et al.*, 2005; Stemmer *et al.*, 2007). Ebenso waren einige HSPs hochreguliert, die durch die oxidative Schädigung von Proteinen induziert worden sein könnten. Unter den Genen, die auf eine allgemeine Stressantwort schließen lassen und ebenfalls schon zu den früheren Zeitpunkten induziert waren, befanden sich Gene, wie beispielsweise *IEX1*, *HIF1A*, *JUN* und *CTNNB1*. Auch waren mehrere Gene, die in die Organisation der Gewebestruktur involviert sind, nach kurzer Zeit hochreguliert. Neben den genannten Genen waren außerdem noch Gene wie z. B. *CASP3*, *CASP8*, *LGALS1* und *PDCD5*, die mit Apoptose assoziiert sind, hochreguliert. Die Expression dieser Gene korreliert mit den histopathologischen Befunden, die Einzelzellnekrosen erkennen ließen. Lühe *et al.* (2003) konnten ebenfalls zeigen, dass nach der Behandlung von sowohl Ratten *in vivo* als auch von primären

proximalen Tubuluszellen der Ratte in Kultur eine erhöhte Expression von Genen erfolgte, die in DNA-Schädigung, Apoptose und oxidativen Stress involviert sind.

Außerdem war *SMP30* (Regucalcin), das für die intrazelluläre Calciumhomöostase zuständig ist und auch schon durch andere Nephrotoxine inhibiert wurde (Misawa und Yamaguchi, 2001), herunterreguliert, was auf eine Störung der Calciumhomöostase schließen lässt. Auffällig waren bei OTA sehr viele Gene, die erst an Tag sieben sehr stark induziert waren. Unter diesen waren Gene, die vor allem mit DNA-Replikation/Zellzyklusprogression/Zellteilung, Gewebeorganisation, RNA- und Proteinmetabolismus sowie Überleben/Proliferation zusammenhängen und für diese Prozesse wichtig sind. Deshalb wurden diese Signale als Regeneration bzw. regenerative Proliferation gedeutet. Diese Gegenregulation nach zytotoxischen Ereignissen im Nierengewebe durch die Einwirkung von OTA könnte einer Hyperplasie vorausgehen und letztlich zur neoplastischen Transformation führen (Dietrich und Swenberg, 1991). Die verstärkte Expression von *PCNA*, *MCM3*, *CCNB1*, *CCNB2*, *TOP2A* und *TUBB5*, die in der DNA-Replikation, dem Zellzyklus oder der Spindelbildung aktiv sind, könnte mit der in der Histopathologie beobachteten Mitose einhergehen. Solche regenerativen Antworten könnten ein Merkmal für nicht-genotoxische Karzinogene sein, da sie auch schon bei Ellinger *et al.* (2005) nur für die nicht-genotoxischen Karzinogene der Leber identifiziert wurden. Diese Gene wurden in dieser Arbeit nicht durch die genotoxischen Nephrokarzinogene induziert, sondern nur durch OTA.

Gleichzeitig zu diesen hochregulierten Genen waren fast ebenso viele Gene herunterreguliert. Da so viele herunterregulierte Gene in metabolische Prozesse, wie der Biotransformation (u.a. verschiedene *CYPs*, *ALDH1A1*, *GNMT*, *GSTA1*, *GSTA2*), dem Aminosäure-, Lipid- und Kohlenstoffmetabolismus und der Synthese von Makromolekülen wie Proteinen und Steroiden involviert sind, wurde das Fehlen ganzer biochemischer Signalwege als Dedifferenzierung bezeichnet. Weil für die ausdifferenzierten Nierenzellen ihre metabolische Funktion essentiell ist, kann das Fehlen der Enzyme dieser Prozesse das Nierengewebe schädigen, was auch schon aus den histopathologischen Beurteilungen hervorgeht. Ein weiteres charakteristisches Merkmal für ausdifferenzierte Nierenzellen ist das Vorkommen vieler spezieller Transportprozesse. Durch OTA wurden viele Gene, die beim Membrantransport wichtig sind, herunterreguliert. Beispielsweise war der *NPT2*-Transporter, der wichtig für die Resorption von Phosphat durch den Bürstensaum der Nierentubuli ist (Prie *et al.*, 2001), herunterreguliert, so auch der *NBC*-Transporter, der den Cotransport von Natrium und Bikarbonat im proximalen Tubulus regelt (Aalkjaer *et al.*, 2004). Weitere wichtige Transporter für die Niere stellen der *NAS1*-Transporter, der den natriumabhängigen

Sulfattransport regelt, der *SDCT1*-Transporter, der für den Zitratgehalt des Urins zuständig ist, aber auch der *OATK1*-Transporter dar, ein nierenspezifischer Transporter für organische Anionen (Masuda, 2003). Durch die Herunterregulation dieser Transporter wird die physiologische Funktion der Nieren beeinträchtigt und es kommt zur Schädigung der Niere. Zu diesen sehr wichtigen Genen wurden außerdem noch Gene vermindert exprimiert, die in der Gewebeorganisation eine Rolle spielen, was zum Verlust der Aufrechterhaltung dieser Strukturen führen und somit mit dem beobachteten Zerfall der normalen Nierenstruktur in der Histologie einhergehen könnte.

Gleichzeitig befanden sich unter den selektierten Genen einige, die in der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) und in der Entstehung von Fibrosen eine Rolle spielen, wie z. B. *PLAU*, *MEPIA*, *TGFBI+2*, *NOTCH2* und *AMBP*, die ebenfalls in einer Studie von Stemmer *et al.* (2007) durch OTA in Ratten dereguliert waren. *DCN*, *FNI* und *Claudine* wurden in einer Studie zur interstitiellen Fibrose bei Mäusen entdeckt (Sadlier *et al.*, 2004), ebenso wurden sie in dieser Arbeit nachgewiesen.

In einer interessanten Studie von Marin-Kuan *et al.* (2006), in der Ratten 300 µg/kg KG OTA pro Tag bis zu zwei Jahre erhielten, stellten die Autoren die Inhibierung von Signalwegen, die durch *HNF4α* und *Nrf2* reguliert werden, als plausiblen Mechanismus in der OTA induzierten Karzinogenese dar. Damit würden einige Wege der zellulären Abwehr außer Kraft gesetzt und folglich eine Steigerung von oxidativem Stress bewirkt werden, was letztlich in der Entstehung von Krebs endet. *HNF4A* war auch in der OTA-Studie dieser Arbeit herunterreguliert, und auch die Deregulation einiger anderer Gene stimmt überein, so dass man zumindest daraus schließen kann, dass die Veränderungen, die in beiden Studien beobachtet wurden, nur bedingt konzentrationsabhängig und für die Aufklärung des möglichen Wirkungsmechanismus von OTA in den Nieren wichtig sind. Einen wiederum anderen Weg der Wirkungsweise erforschte die Gruppe von Rached *et al.* (2006). Sie beobachteten, dass OTA den Übergang zwischen Meta- und Anaphase blockiert, so dass veränderte 'Giant'-Zellen mit vergrößerten oder vermehrten Zellkernen auftraten. Außerdem wurde *NfκB* aktiviert, welches zur vorzeitigen Mitosebeendigung führen könnte mit einer blockierten oder asymmetrischen Zellteilung, die dann zu zytogenetischen Veränderungen und Tumorformationen führt. Ähnliche vergrößerte Zellkerne wurden auch im Rahmen dieser Arbeit beobachtet, die mit dieser Theorie erklärt werden könnten.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit viele Gene verändert, die auf DNA-Schädigungen durch oxidativen Stress nach der Einwirkung von OTA schließen lassen. Des Weiteren waren Gene hochreguliert, die mit Zellzyklusprogression, DNA-Replikation und Überleben/Proliferation assoziiert wurden. Diese Veränderungen wurden als

regenerative Prozesse zusammengefasst, die nur durch OTA und nicht durch die genotoxischen Nephrokarzinogene induziert wurden. Die herunterregulierten Gene, die zum größten Teil für Proteine kodieren, die für metabolische Prozesse und Membrantransport wichtig sind, wurden als Dedifferenzierung der Nierenzellen interpretiert, da vermutet werden kann, dass wichtige Funktionen der Niere dadurch beeinträchtigt wurden.

GENEXPRESSIONSANALYSE NACH APPLIKATION VON KBrO_3

Zu Kaliumbromat wurden drei verschiedene Dosen untersucht - 30, 60 und 90 mg/kg KG pro Tag -, wobei durch keine der Dosen starke Veränderungen im Expressionsprofil auftraten. Die Gene, die nach der statistischen Analyse selektiert wurden, waren an sehr unterschiedlichen Signalwegen beteiligt und ließen somit keine eindeutigen Rückschlüsse auf die molekularen Ereignisse zu, die durch KBrO_3 aufgetreten sein müssten. Diese unspezifischen Veränderungen bestätigen die in der Histopathologie befundenen unspezifischen Veränderungen der Nierentubuli. Dies könnte an der Dosis liegen, wobei in der Literatur auch schon mit einer geringeren Dosis das Vorkommen von Tumoren stieg. Allerdings wurden andere Rattenstämme verwendet, wodurch die Tumorzinidenzen nicht direkt vergleichbar sind. So waren beispielsweise nach einer Applikation von 38 mg/kg KG pro Tag für bis zu 100 Wochen bei 12 von 43 Fischer-Ratten renale Tumore erkennbar (Matsushima *et al.*, 1986). In einer weiteren Studie wurden Fischer-Ratten ebenfalls 104 Wochen lang bis zu 43 mg/kg KG Kaliumbromat im Trinkwasser verabreicht. Daraus resultierten tubuläre Adenome und Karzinome in 9 von 20 Tieren (Kurokawa *et al.*, 1986). Außerdem entstammen diese Befunde aus *in-vivo*-Studien, die über einen viel längeren Zeitraum stattgefunden haben, was im Falle von KBrO_3 bedeuten könnte, dass nach der kurzen Zeit, die in dieser Arbeit festgelegt wurde, noch keine prägnanten Veränderungen zu erkennen sind. Viele Studien zu KBrO_3 befassten sich mit der Rolle von oxidativem Stress und der daraus resultierenden DNA-Schädigung als möglichen Mechanismus der Karzinogenität (Chipman *et al.*, 1998; Murata *et al.*, 2001). Die Entstehung von 8-Oxodeoxyguanosin (8-oxodG) durch oxidativen Stress wurde ebenfalls in einigen Studien untersucht (Umemura *et al.*, 2004; Ballmaier und Epe, 2006, Kawanashi und Murata, 2006), wobei das letztlich DNA schädigende Molekül noch nicht bestimmt wurde. Eine Induktion von Genen assoziiert mit dem Glutathionmetabolismus wurde in einer Studie von Delker *et al.* (2006) nur nach Verabreichung der hohen Dosis (400mg/l) beobachtet, nicht jedoch nach der niedrigen Dosis (20mg/l), wobei dies mit der Sättigung durch anfängliche hohe intrazelluläre Sauerstoffradikale erklärt werden könnte. Die intraperitoneale Applikation von 125 mg/kg KG KBrO_3 bei Wistar-Ratten verursachte eine

Reduktion des renalen Glutathionlevels (Khan und Sultana, 2005), was durch die schnelle Oxidationsreaktion zwischen dem Glutathion und den durch oxidativen Stress entstandenen Oxidantien zu erklären sein könnte. In der Studie dieser Arbeit waren nur *FKBP5* und *p21* mit einer konsistenten Induktion durch die höchste Dosis (90 mg/kg KG pro Tag) hochreguliert, die auf oxidativen Stress entweder durch DNA-Schädigung oder Proteinschädigung deuten lassen. Die *in-vivo*-Studien in dieser Arbeit lassen keine Aussage über den Mechanismus von Kaliumbromat in den Nieren von Ratten zu.

4.3 Proximale Tubuluszellen der Ratte als Beispiel für ein *in-vitro*-Modell der Niere

Unter dem Aspekt der '3 R's' 'Reduction', 'Refinement' and 'Replacement' sollten nun in einem weiteren Teil der Arbeit *in-vitro*-Modelle der Niere optimiert bzw. etabliert werden. Zunächst sollte ein *in-vitro*-Modell für die Niere – primäre proximale Tubuluszellen der Ratte – im unbehandelten Zustand direkt mit dem Rattennierenkortex *in vivo* auf molekularer Ebene bezüglich exprimierter Funktionen und Signalwege verglichen werden. Deshalb wurden die proximalen Tubuluszellen der Ratte bis zu 14 Tage in Kultur gehalten und mit dem Rattenkortex *in vivo* mittels Genexpressionsanalyse verglichen. Die Niere besteht zwar aus 15-20 verschiedenen Zelltypen, wie z. B. mesangiale, interstitielle und epitheliale Zellen, die alle sehr spezialisierte Funktionen besitzen (Kriz und Bankir, 1988). Es hat sich aber in verschiedenen Studien herausgestellt, dass die proximalen Tubuluszellen eine entscheidende Rolle in der Nephrotoxizität und Karzinogenese spielen. Daher ist es sinnvoll, diese Zellen als *in-vitro*-Nierenmodell einzusetzen. Einige Unterschiede, die sich zwischen den Zellen und dem Kortex ergeben, können demnach auch auf die unterschiedliche Zusammensetzung zurückgeführt werden, allerdings stellen die Mehrheit der Zellen des Kortex die proximalen Tubuluszellen dar (Haschek und Rousseaux, 1991; Pfaller 1982), was diesen Vergleich durchaus sehr sinnvoll erscheinen lässt. Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Expression bestimmter Marker des proximalen Tubulus *in vivo* ebenfalls *in vitro* differentiell exprimiert waren.

Nach der funktionellen Kategorisierung konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede zwischen den primären Zellen und dem Nierenkortex *in vivo* festgestellt werden. Es zeigte sich eine Reihe metabolischer Signalwege, die herunterreguliert waren, die somit auf eine Dedifferenzierung der Zellen bezüglich *in vivo* vermuten ließen. Im Gegensatz dazu enthielten die Kategorien, wie Zelladhäsion/Migration, Zytoskelett und Proliferation, Gene, die deutlich stärker induziert waren gegenüber dem Kortex, was wahrscheinlich als eine Anpassung an die neue Umgebung zu deuten ist (Abb. 38). Einzelne Signalwege werden im Folgenden genauer diskutiert.

DEDIFFERENZIERUNG

Alle herunterregulierten Gene, die in metabolischen Prozessen eine Rolle spielen, wurden als Dedifferenzierung interpretiert, da ihr Ausfall, vor allem wenn viele Gene eines gleichen Signalweges betroffen sind, ein Verlust der metabolischen Aktivität bedeutet, die essentiell für die Niere ist. Davon waren vor allem Signalwege, wie Aminosäure-, Kohlenstoff-, Lipid- und Vitaminmetabolismus betroffen. Einige der Signalwege und spezifische Gene werden in den nächsten Abschnitten aufgeführt.

BIOTRANSFORMATION

Eine wichtige metabolische Aktivität der Niere ist die Biotransformation von endogenen und exogenen Substanzen, einschließlich der Phase-I- und Phase-II-Reaktionen. Da über 80 % der deregulierten Gene, die mit Biotransformation assoziiert waren, im Vergleich zum Nierenkortex herunterreguliert waren, lässt dies ebenfalls auf eine Dedifferenzierung *in vitro* schließen. Die verminderte Expression von *CYP4A3* beispielsweise könnte die homöostatische Funktion der Niere beeinträchtigen, da die *CYP4A*-Enzyme die Entstehung von 20-Hydroxyeicosatetraensäure (20-HETE) katalysieren, die wiederum Effekte auf die renale Blutversorgung und den Ionentransport ausübt (Zou *et al.*, 1994). Außerdem konnte eine vermehrte Induktion des *CYP4*-Enzymsystems in hypertensiven Ratten nachgewiesen werden (Kroetz *et al.*, 1997). Durch die Herunterregulation dieser Gene wird das Vermögen sowohl zur Entgiftung als auch zur Bioaktivierung herabgesetzt, welches bei einer Behandlung der Zellen mit Toxinen, die z. B. normalerweise eine Bioaktivierung benötigen, in Betracht gezogen werden sollte.

DIFFERENZIERUNG/ORGANOGENESE

Hierunter wurden Gene zusammengefasst, die entweder mit der renalen Differenzierung selbst oder aber mit der generellen Entwicklung in Verbindung standen. Die renal-spezifische Oxidoreduktase (*RSOR*) spielt in der Tubulogenese der kortikalen Tubuli eine wichtige Rolle (Kanwar *et al.*, 2002). Die herunterregulierte Expression *in vitro* könnte eine Anpassung an das zweidimensionale *in-vitro*-System sein, in dem die Gene, die in der Organogenese wichtig sind, abgeschaltet werden. Das Homolog zum Angiotensin-Konversions-Enzym 2 (*ACE2*), Collectrin (*TMEM27*), wurde ausschließlich in der Niere entdeckt (Zhang *et al.*, 1999) und ist dort auf der luminalen Oberfläche und im Zytoplasma des Sammelrohrs (Zhang *et al.*, 2001) zu finden. Deshalb könnte die verminderte Expression auf das Fehlen des entsprechenden Zelltyps in der Kultur der proximalen Tubuluszellen zurückzuführen sein.

OXIDATIVER STRESS

Einige Gene des GSH-Syntheseweges, wie z. B. die Untereinheiten der γ -Glutamylcysteinyl-Synthetase *GCLC* und *GCLM*, und noch weitere Gene, die für die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies zuständig sind, wie die Superoxiddismutase 2 (*SOD2*), Kupfer-Zink-Superoxiddismutase (*SOD3*) und die Katalase (*CAT*), waren in den Zellen der Zellkultur deutlich weniger exprimiert im Vergleich zu *in vivo*. Dieses könnte sich auf den Umgang von oxidativem Stress derart auswirken, dass das Zellsystem nicht mehr in der Lage ist den oxidativen Stress zu bewältigen.

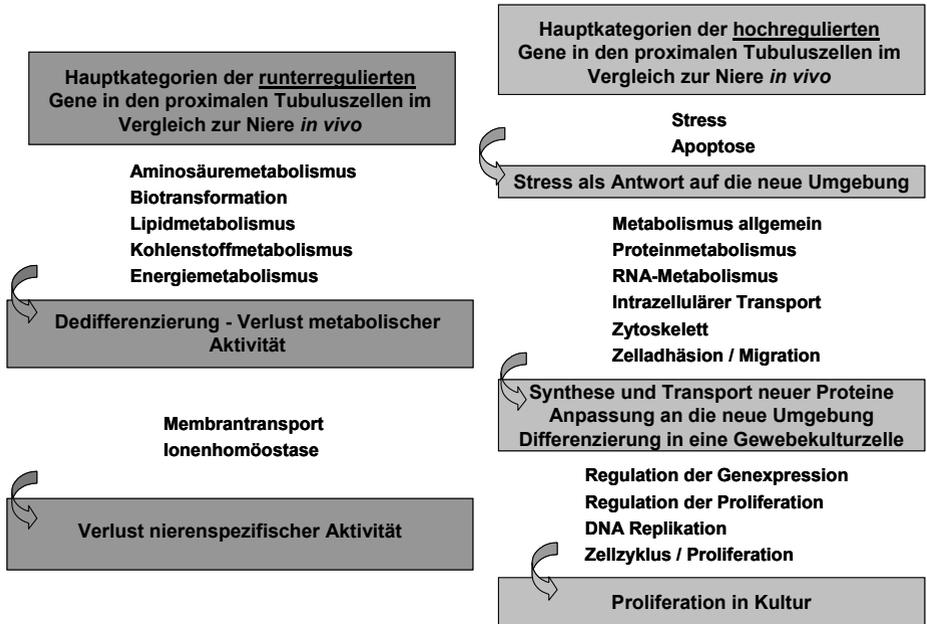


Abb. 38: Proximale Tubuluszellen aus der Niere von Ratten im Vergleich zur Rattenniere *in vivo* – Gen-Kategorien

Interpretation und Überblick über die wichtigsten herunter- und hochregulierten Signalwege *in vitro* verglichen mit *in vivo*.

PROTEINMETABOLISMUS

Zu diesen herunterregulierten Genen gehörten Gene, die an der Degradation und der Modifikation von Proteinen beteiligt sind. Darunter befanden sich auch das 'kidney-derived aspartic protease-like protein' (*KDAP*) und die Glutamylaminopeptidase (*EAP*). Beide Gene sind ein Beispiel für herunterregulierte Gene, deren normale Funktion sehr bedeutend für die Niere *in vivo* ist. Für *KDAP* wurde nachgewiesen, dass es sehr wichtig

für die physiologische Funktion von Mausnieren ist und vorwiegend in der Pars recta des proximalen Tubulus vorkommt (Mori *et al.*, 1997), abhängig vom Stadium der Nephrogenese (Mori *et al.*, 2001). Außerdem ist ein verminderter Level an ausgeschiedenem Protein im Urin ein Anzeichen für eine Dysfunktion der Niere (Schauer-Vukasinovic *et al.*, 2001). *EAP* spielt eine essentielle Rolle in der Niere bei der Konversion des Angiotensin II zu Angiotensin III (Hus-Citharel *et al.*, 1999) und ist somit an der Regulation des Blutdrucks beteiligt.

SIGNALTRANSDUKTION

Die Herunterregulation des CaM-KII-Inhibitor-Protein (*CAMK2N1*) steht im Einklang mit der verstärkten Induktion der Calcium/Calmodulin abhängigen Proteinkinase Kinase 2, beta (*CAMKK2*). Da beide transient und gegensätzlich nur während früher Zeitpunkte dereguliert sind, könnte man darauf schließen, dass eine transiente Störung des Ca²⁺-Signalweges vorliegt. Des Weiteren wurden Gene, die in hormonelle Signalwege involviert sind, *in vitro* wesentlich weniger exprimiert, so auch der Prolaktinrezeptor (*PRLR*) und das 'kidney androgen-regulated protein' (*KAP*). Das Fehlen dieser hormonellen Signalwege ist wahrscheinlich durch die *in-vitro*-Umgebung bedingt, da hier im Gegensatz zum intakten Organ keine hormonellen Einflüsse vorliegen.

DEDIFFERENZIERUNG – VERLUST DER NIERENSPEZIFISCHEN FUNKTIONEN

75 % der Membrantransporter wie z. B. der organische Kationentransporter 2 (*OCT2*), der exzitatorische Aminosäuretransporter 3 (*EAAT3*), und der renale Natrium/Sulfat-Cotransporter (*NAS1*) waren in den proximalen Tubuluszellen herunterreguliert im Vergleich mit *in vivo*. Da Membrantransporter in der Niere eine entscheidende Rolle spielen, bedeutet diese Herunterregulation eine weitere Limitierung des Zellmodells. Auch beim Versuch des Aufschlusses von Toxizitätsmechanismen mit Toxinen könnte der Verlust von Membrantransportern, die für den Export und die Aufnahme von Toxinen notwendig wären, die Sensitivität des Modells stark beeinträchtigen. Im Zusammenhang mit den Membrantransportern ist noch eine weitere Gruppe von Genen zu nennen, die mit der Energieerzeugung in Verbindung stehen, und herunterreguliert waren, da viele Transportprozesse auch gleichzeitig energieabhängige Prozesse darstellen. Außerdem übernehmen die Gene, die verantwortlich für das Ionengleichgewicht sind, eine wichtige Rolle in der Niere, da sie den Wasser- und Ionenhaushalt der Niere regeln. Die meisten dieser Gene waren ebenfalls sehr niedrig in den Zellen exprimiert, wie beispielsweise die carbonische Anhydrase II (*CA2*) und das 'iron-responsive element binding protein 1' (*IRE-BP1*). Zusammenfassend konnte man feststellen, dass die primären Nierenzellen

gegenüber der Niere *in vivo* dedifferenzieren und große Teile ihrer natürlichen und für das intakte Organ essentiellen Funktionen verlieren, was möglicherweise daran liegt, dass diese Funktionen *in vitro* nicht benötigt werden.

Im Folgenden werden die *in vitro* stärker exprimierten Gene diskutiert.

STRESS AUFGRUND DER NEUEN UMGEBUNG

Die isolierten Zellen zeigten eine Reihe von stressinduzierten Genen, die mit generellem Stress, oxidativem Stress, Apoptose und Überleben assoziiert waren. Zum Beispiel waren mehrere 'immediate early response' Gene einschließlich dem TWEAK-Rezeptor (*TNFRSF12A*) (Meighan-Mantha *et al.*, 1999), dem 'radiation-inducible immediate-early gene' (*IEX1*), dem 'early growth response protein 1' (*EGR1*) (Kharbanda *et al.*, 1993) und der MAPK-Phosphatase-1 (*MKPI*) (Ryser *et al.*, 2004) zu allen Zeitpunkten hochreguliert – alle Gene, die rapide nach der Zugabe von Wachstumsfaktoren oder Stress induziert werden. Um die schnelle Expression von *IEX1* in Stresssituationen zu gewährleisten, wird es gleich von mehreren verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie *p53*, *NFκB* und *c-Myc* reguliert (Wu, 2003), was auch die Induktion in der Zellkultur erklärt. *EGR1* (Bauer *et al.*, 2005) und *MKPI* (Ryser *et al.*, 2004) dagegen werden durch die Aktivierung von ERK induziert, die zu den sogenannten mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAPKs) gehört. Des Weiteren wurden hochregulierte Gene wie Ceruloplasmin (*CP*) und Fibrinogen alpha (*FGA*) (Caglar *et al.*, 2002; Lühe *et al.*, 2003; Thukral *et al.*, 2005; Uriu-Adams *et al.*, 2005) in der Niere während einer Inflammation oder oxidativem Stress detektiert. Lipocalin 2 (*LCN2*), das ebenfalls durch *NFκB* unter bestimmten Bedingungen (Cowland *et al.*, 2003) hochreguliert wurde, konnte auch als prädiktiver Marker für akute Nierenschäden, z. B. nach einer Nierentransplantation, identifiziert werden (Mishra *et al.*, 2005, 2006). Neben diesen allgemeinen Stress-Genen zeigten sich auch typische Gene, die durch oxidativen Stress induziert werden, *in vitro* hochreguliert. Dazu zählen die Hämoxygenase (*HO-1*), die NADPH-Quinon-Oxidoreduktase (*NQO1*), die Glutathionperoxidase 2 (*GPX2*), Metallothionein (*MT-II*) (Andrews, 2000) und einige HSPs, die im *in-vitro*-Modell stärker exprimiert waren als *in vivo*. *HO-1* und *NQO1* stellen Zielgene des Transkriptionsfaktors *NRF2* dar (Hayes und McMahon, 2001), der eine wichtige Rolle in der Regulation von ARE-Genen besitzt. Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass die *in-vitro*-Umwelt (oxidativen) Stress auf die Zellen ausübt. Dass allerdings auch einige Gene, die in den GSH-Metabolismus involviert sind, herunterreguliert waren, könnte mit der Herunterregulation verschiedener Transkriptionsfaktoren zusammenhängen, die wiederum mit der Dedifferenzierung der Zellen in Kultur einhergeht.

STRESS, APOPTOSE, ÜBERLEBEN

Da sowohl pro- als auch antiapoptotische Gene induziert wurden, und sich darunter in beiden Gruppen *p53*-Zielgene befanden, sind diese Veränderungen wahrscheinlich in erster Linie ebenfalls auf Stress zurückzuführen. In verschiedenen Prozessen, wie Apoptose, DNA-Reparatur und Zellzyklusarrest übt *p53* eine wichtige Regulationsfunktion aus (Amundson *et al.*, 2001), aber auch bei diversen Stresseinwirkungen (Erster and Moll, 2005). Proapoptotische *p53*-Zielgene waren u.a. Bcl2-assoziiertes X-Protein (BAX) und 'four and a half LIM domains 2' (*FHL2*), antiapoptotische *p53*-Zielgene waren dagegen die Ubiquitin-E3-Ligase (*MDM2*), die ihrerseits wiederum zum Abbau von *p53* führt (Khosravi *et al.*, 1999). Die Hochregulation von *p53* selbst führte außerdem noch zu der vermehrten Expression von Zellzyklusarrest-Genen wie 'cyclin-dependent kinase inhibitor 1A' (*CDKN1A*) und 'B-cell translocation gene 2' (*BTG2*). Fraglich ist, ob apoptotische Gene wie Caspase 3 (*CASP3*), 'programmed cell death 5' (*PDCD5*) und antiapoptotische Gene wie 'apoptosis inhibitor survivin' (*BIRC5*) (Deveraux and Reed, 1999; Yan *et al.*, 2005) und Clusterin (*CLU*) (Miyake *et al.*, 2002) in derselben Zelle gleichzeitig hochreguliert oder ob diese Antworten in getrennten Zellen ablaufen. Durch diese Gene wird klar, dass auf die Zellen verschiedene Stresseinwirkungen nach der Isolation und während der Kultivierung einwirken, die wiederum durch verschiedene Signalwege, wie *p53*, *NFκB* und *ERK*, ihren Lauf nehmen.

SYNTHESE UND TRANSPORT NEUER PROTEINE – ANPASSUNG AN DIE NEUE UMGEBUNG

Gleichzeitig zur oben beschriebenen Dedifferenzierung fand eine Differenzierung der Zellen in eine Zellkulturzelle statt, die durch die Induktion vieler Gene gekennzeichnet war. Die Kategorien der hochregulierten Gene werden im Folgenden erläutert.

METABOLISMUS, METABOLISMUS – ANABOLISMUS, METABOLISMUS - ENERGIEZUFUHR

Unter den wenigen hochregulierten Genen, die in Metabolismus involviert waren, konnten fünf Gene mit Biotransformation assoziiert werden. Darunter war z. B. *CYP1A1*, das auch in isolierten Hepatozyten im Vergleich zur Leber *in vivo* hochreguliert ist (Boess *et al.*, 2003). Ein Grund für die Induktion könnte ebenfalls die schon beobachtete stressinduzierte Expression sein (Loaiza-Perez *et al.*, 2004; Roos *et al.*, 2004), außerdem fehlt *in vitro* die hormonelle Regulation desselben. *AKR1B4* und *AKR1B8* könnten mit erhöhtem osmotischem Druck, der in der Kultur vorherrscht, in Zusammenhang stehen, da sie Hexosen zu osmolytischem Sorbitol reduzieren können (Bagnasco *et al.*, 1987) und für beide nachgewiesen wurde, dass sie bei hyperosmotischem Stress induziert werden können (Cao *et al.*, 1998). Weitere „Metabolismus“-Gene, die *in vitro* hochreguliert gegenüber *in*

in vivo vorlagen, waren die Asparaginsynthetase (*ASNS*) und die 'delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase' (*PYCS*), die an der Argininsynthese beteiligt ist. Interessanterweise war auch der 'high-affinity cationic amino acid transporter' (*CATI*) in dem Zellsystem hochreguliert, der hauptsächlich für den Transport von Arginin verantwortlich ist. Zager und Johnson (2001) stellten fest, dass durch eine direkte und systemische Schädigung der Tubuli der renale kortikale Cholesterolgehalt ansteigt, der wiederum zum Anstieg der Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase (*HMGCR*) führt, einem limitierenden Enzym in der Cholesterolsynthese. Dieses könnte ebenfalls das Aufkommen von Stress *in vitro* bestätigen. Eine erhöhte Expression der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (*G6PD*), die für die Produktion von Ribose-5-Phosphat für die Nukleotidbiosynthese sehr wichtig ist und außerdem noch Reduktionsäquivalente liefert, wurde festgestellt. Des Weiteren waren fünf Gene, die für glycolytische Enzyme kodieren, verstärkt exprimiert, so dass man annehmen könnte, dass die Energiezufuhr für anabolische Prozesse im *in-vitro*-System hauptsächlich durch die ATP-Synthese während der Glykolyse erfolgt. Dieses könnte auf die anaeroben Bedingungen in der Zellkultur zurückzuführen sein. Es ist bekannt, dass die Oxygenierung in der Zellkultur ein Problem ist (Doyle *et al.*, 1995), da der Sauerstoff über eine größere Distanz durch das Zellkulturmedium diffundieren muss, verglichen mit den Zellen *in vivo*, die in Kontakt mit den sauerstofftransportierenden Erythrozyten stehen. Durch die Expression von *G6PD* und glykolytischen Enzymen werden energieverbrauchende biosynthetische Vorgänge stattfinden, was ebenfalls durch die hochregulierte anorganische Pyrophosphatase (*PPAI*), die für die Hydrolyse von Pyrophosphat sorgt, deutlich wird.

MEMBRANTRANSPORT

Nur 24 % der deregulierten Gene dieser Kategorie waren in der Zellkultur stärker exprimiert verglichen mit dem Kortex *in vivo*. Darunter befand sich auch der Glukosetransporter Typ 1 (*GLUT1*), von dem schon nachgewiesen wurde, dass er in den Nephronen vorkommt (Chin *et al.*, 1997; Linden *et al.*, 2006) und sehr wichtig für den Glukosetransport ist. Mit der gesteigerten Expression des *GLUT1* könnte auch ein erhöhter Verbrauch an Glukose einhergehen, der schon durch die vermehrte Expression von Enzymen, die an der Glykolyse beteiligt sind, vermutet werden konnte. Der ebenfalls hochregulierte Monocarboxylattransporter 3 (*MCT3*) könnte deshalb für den Transport der Endprodukte der Glykolyse - Pyruvat und Laktat - verantwortlich sein. Dies scheint ein generelles Phänomen der Zellkulturen zu sein, da *MCT3* auch schon in MDCK und NBL-1 Zellen nachgewiesen wurde (Nagasawa *et al.*, 2003; Deora *et al.*, 2005), was wiederum mit der anaeroben Atmosphäre aufgrund der Sauerstofflimitierung in der Zellkultur einhergeht.

Die gesteigerte Expression von 'multidrug resistance protein 1' (*MRP1*) and 'multidrug resistance 2' (*MDR2*) kann in Zusammenhang mit Stress gebracht werden, da sie ähnlich wie *CYP1A1* als Antwort auf Xenobiotika induziert werden und eine Rolle in der Detoxifizierung haben (Roch-Ramel, 1998; Leslie *et al.*, 2005; Conseil *et al.*, 2006).

RNA-METABOLISMUS, PROTEINMETABOLISMUS, INTRAZELLULÄRER TRANSPORT

Eine Reihe von Genen, die zur Synthese von mRNA beitragen, zeigte eine erhöhte Expression im *in-vitro*-Modell gegenüber *in vivo*, wie z. B. die heterogenen nuklearen Ribonukleoproteine (hnRNPs), die für den Transport und das Spleißen von RNA verantwortlich sind, aber auch RNA-Helikasen, die für die Transkription und Prozessierung von t-RNA sorgen. Viele Gene, die in der Translation, Proteinfaltung und posttranslationaler Modifikation agieren, waren im Zellkulturmodell hochreguliert. Außerdem waren noch einige Gene, die für den intrazellulären Transport der neuen Proteine benötigt wurden, induziert sowie Karyopherin beta-1 (*KPNB1*) und Exportin 1 (*XPO1*), die in nukleären Transportprozessen agieren. Diese *in vitro* induzierten Gene scheinen sowohl in der Redifferenzierung der Zellen und in der Proliferation eine Rolle zu spielen.

ZELLADHÄSION/MIGRATION, ZYTOSKELETT

Die Mehrheit der Gene in dieser Kategorie waren meist von Tag fünf an oder bis zu Tag 14 deutlich stärker exprimiert im Vergleich zu *in vivo*. In der Kategorie Zelladhäsion/Migration waren hauptsächlich Gene enthalten, die mit der extrazellulären Matrix (ECM) assoziiert sind wie Kollagene (*COL1A2*, *COL1A1*, *COL12A1*, *COL3A1*), Laminin gamma 1 (*LAMC1*) und Fibronectin 1 (*FNI*). Einige Zelladhäsionsmoleküle wie Cadherin-11 (*CDH11*) und 'intercellular adhesion molecule-1' (*ICAM1*) waren ebenfalls hochreguliert. Durch die verstärkte Expression dieser Gene wurde deutlich, dass die Zellen eine neue Matrix entwickeln, um sich an die zweidimensionalen Zellkultur anzupassen. Ebenso wurden vermehrt Gene des Zytoskeletts hochreguliert, wie die Intermediärfilamente Vimentin (*VIM*) und Zytokeratin 8 (*KRT8*), aber auch Tubuline. Alle diese Gene spiegeln vermutlich die Transdifferenzierung in eine Zellkultur-Zelle wider.

PROLIFERATION IN KULTUR

Diverse Gene, die in der Proliferation mitwirken, konnten in der Zellkultur als hochreguliert identifiziert werden. In den Kategorien Nukleotidsynthese, DNA-Replikation, Zellzyklusprogression und Regulation der Proliferation befanden sich Gene, die ein wellenförmiges Expressionsprofil aufwiesen, d. h. sie waren entweder zu den

früheren Zeitpunkten oder zu den späteren Zeitpunkten exprimiert, was dafür spricht, dass zwei Zellteilungen stattgefunden haben. Zu den Genen, die auf eine aktive DNA-Synthese schließen ließen, gehörten die DNA-Replikationsproteine (*MCM3*, *MCM4*, *MCM6*, *MCM7*), das 'Proliferating cell nuclear antigen' (*PCNA*), das 'primase polypeptide 1' (*PRIMI*), die Replikationsfaktoren (*RFC2*, *RFC3*, *RFC4*), die DNA-Polymerase alpha 2 (*POLA2*) und die DNA-Ligase I (*LIG1*). Des Weiteren zeigten sich die DNA-Reparaturgene DNA-Polymerase beta (*POLB*) und O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (*MGMT*) in der Zellkultur zu allen Zeitpunkten erhöht, die entweder gleichzeitig mit der Replikation der DNA induziert oder erneut aufgrund von Stress hochreguliert wurden.

Der Zellzyklus gliedert sich in verschiedene Phasen, nämlich in die G1-Phase, die der S-Phase, in der die DNA repliziert wird, vorausgeht und in die G2-Phase, in der die Chromosomen ausgerichtet und für die letztendliche Mitosephase (M-Phase) vorbereitet werden. Unter den hochregulierten Genen befanden sich mehrere Gene, die in den genannten Phasen agieren. Zu den früheren Zeitpunkten (Tag 5-8) wurden eher Gene verstärkt exprimiert, die in der G2/M-Phase eine Rolle spielen, wie z. B. Cyclin-abhängige Kinase 1 (*CDK1*) mit ihrer regulatorischen Untereinheit Cyclin B1 (*CCNB1*), dem Kinetochorprotein *Spc25*, das für die Anlagerung der kondensierten Chromosomen an die Spindelmikrotubuli sorgt (McClelland *et al.*, 2004), wie auch der 'kinesin family member C1' (*KIFC1*), der bei der Organisation der Spindelpole wichtig ist (Zhu *et al.*, 2005). Im Gegensatz dazu waren an Tag 8-14 eher Cyclin D2 (*CCND2*) und Cyclin-abhängige Kinase 4 (*CDK4*) exprimiert, was zu der Annahme führt, dass ein Teil der Zellen während der ersten Tage eine erste Zellteilung durchführt und nach Tag acht eine zweite durchläuft. Zusätzlich zu den aufgeführten Genen waren auch sogenannte Checkpoint-Regulatoren mit einem höheren Level *in vitro* exprimiert, die dafür sorgen, dass in den Zellen der richtige Ablauf koordiniert wird: 'checkpoint kinase 1' (*CHEK1*) and 'cell division cycle 20' (*CDC20*) (Zhao *et al.*, 2002; Wirth *et al.*, 2004).

SIGNALTRANSDUKTION

Diese Kategorie enthielt sowohl hoch- als auch herunterregulierte Gene, wobei die herunterregulierten Gene schon in einem der oberen Abschnitte unter Dedifferenzierung erläutert wurden. 'Transforming growth factor beta 2' (*TGFB2*) und 'mothers against decapentaplegic homolog 3' (*SMAD3*) sprechen für die Aktivierung des *TGFβ* Signalweges *in vitro*. Durch die Bindung an den Rezeptor, der aus einem Heterodimer von Serin/Threonin-Kinasen besteht, induziert *TGFB2* die Phosphorylierung von *SMAD3*, seine Dimerisation mit *SMAD4* und letztlich deren Lokalisation im Kern und die

Genexpression von *SMAD3* (Feng and Derynck, 2005). Außerdem wurde eine Rolle von *TGFB2* mit der ECM Akkumulation in Nierenkrankheiten beobachtet (Phanish *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.*, 1996), was zu der vermehrten Expression der ECM assoziierten Gene passt. Ein weiteres Mitglied der *TGFβ* Familie stellt der 'Growth differentiation factor 15' (*GDF15*) dar, der wiederum ein Teil der Stressantwort sein könnte, da er ebenfalls nach chirurgischen, ischämischen, toxischen und hyperoxischen Schädigungen der Niere auftrat (Zimmers *et al.*, 2005). Diese Signalkaskaden-Gene scheinen ebenfalls die Transdifferenzierung der isolierten Zellen in eine Zellkulturzelle zu unterstützen.

CHARAKTERISTISCHE GENE FÜR DEN PROXIMALEN TUBULUS

Im Gegensatz zu E-Cadherin, das nur in den distalen Tubuli der Niere vorkommt, ist N-Cadherin ein Marker für die proximalen Tubuli der Niere (Prozialeck *et al.*, 2004). Durch die Antikörperfärbung konnte die Expression des Gens in den primären Nierenzellen nachgewiesen werden und es wurde keine Herunterregulation durch die Genexpressionsanalyse verzeichnet.

Die γ -Glutamyltransferase 1 (*GGT1*), die im proximalen Epithel der Niere mit die höchste Aktivität besitzt, war 5-10-fach in den primären Zellen herunterreguliert. Auch wenn noch eine geringe Expression des Gens in der Niere zu messen war, bestätigt es dennoch die Dedifferenzierung der Nierenzellen *in vitro*.

Damit das Wasser entlang des osmotischen Gradienten durch die proximalen Tubuluszellen gelangen kann, sorgt Aquaporin 1 für die Bildung von wasser-spezifischen Kanälen in diesen Zellen (Yang *et al.*, 1999; Nielsen *et al.*, 2002). Auch dieses Gen war herunterreguliert und geht einher mit der Dedifferenzierung der Zellen in der Zellkultur.

Diese umfassende Charakterisierung der proximalen Tubuluszellen der Ratte vermag die Extrapolation von *in vitro* zu *in vivo* zu erleichtern und trägt zum besseren Verständnis der Ergebnisse mit diesem *in-vitro*-Modell bei. *In-vitro*-Modelle bleiben weiterhin sehr wichtig für die Aufklärung des Mechanismus von Substanzen, lassen aber wie oben beschrieben eine Korrelation aller Antworten nicht zu, da doch wesentliche Unterschiede zum intakten Organ bestehen.

4.4 Vergleich verschiedener Modelle der Ratte und vom Menschen nach OTA Behandlung

Außer dem proximalen Tubuluszellen-Modell gibt es noch weitere *in-vitro*-Modelle für die Niere sowohl von Ratten und anderen Nagern als auch von Menschen, wie in der Einleitung beschrieben. Ziele für die Entwicklung aussagekräftiger *in-vitro*-Modelle sind z. B. die Erforschung physiologischer Aspekte in der Nierenfunktion, Aufbau eines

einfachen Screeningssystemen für Nierentoxine, und mechanistische Fragestellungen nach Toxinbehandlung.

Der *in-vitro*-Teil dieser Arbeit wurde im Rahmen des *Predictomics*-Projekts durchgeführt, das sich ebenfalls mit der Erkennung früher Marker von Nierentoxizität und Nierenkanzerogenität *in vitro* befasst, um letztlich die Toxizität von Substanzen für die Niere vorauszusagen.

Eine weitere Möglichkeit der *in-vitro*-Modellcharakterisierung ist ein Vergleich nach Substanzbehandlung *in vitro* und *in vivo*. In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene *in-vitro*-Modelle daraufhin getestet, welche *in vivo* identifizierten Signalwege nach Toxinapplikation auch *in vitro* aktiviert werden bzw. welche Antworten insgesamt vom *in-vitro*-System gegeben werden können. Dafür wurde das Modell-Karzinogen Ochratoxin A (OTA) verwendet. Als *in-vitro*-Modell wurden primäre proximale Tubuluszellen der Ratte, die Ratten-Nierenzelllinie NRK-52E, primäre humane proximale Tubuluszellen und die humane Zelllinie HK-2 verwendet.

Zwischen den *in-vitro*- und *in-vivo*-Daten der Ratte konnten einige Gemeinsamkeiten, vor allem in akuten Antworten, festgestellt werden. Es zeigten sich Gene sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach OTA-Behandlung induziert, die *in vivo* den toxikologischen Kategorien oxidativer Stress/DNA-Schädigung und Proteinschädigung, Signaltransduktion, Gewebeorganisation und der Immunabwehr - vor allem Antigenpräsentation und angeborene Immunität – zugeordnet werden konnten. Kamp *et al.* (2005) untersuchten *in vitro* die Beteiligung von oxidativem Stress an der OTA-induzierten Toxizität und konnten dies ebenfalls bestätigen.

Neben diesen vergleichbaren akuten Antworten waren aber auch deutliche Unterschiede bei den Ergebnissen dieser Arbeit zu erkennen. Vor allem die regenerativen Antworten *in vivo* an Tag 7, die sich durch die Induktion von Genen auszeichnete, die in biochemische Kategorien wie Zytoskelett/Zelladhäsion, DNA- und RNA-Metabolismus und Zellzykluskontrolle und Proteinmetabolismus involviert waren, wurden *in vitro* nicht gesehen. Ein weiterer Unterschied war, dass die *in vivo* nach OTA-Behandlung beobachtete Herunterregulierung einiger Gene, die in für die Niere wichtige Funktionen wie allgemeine metabolische Prozesse, Biotransformation und Membrantransport involviert sind und die somit als Dedifferenzierung interpretiert wurde, *in vitro* nicht beobachtet wurde. Diese Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* könnten im Falle der primären proximalen Tubuluszellen, aber wahrscheinlich auch bei der Zelllinie NRK-52E, mit der unterschiedlichen basalen Expression dieser Gene *in vitro* erklärt werden. Denn beim Vergleich zwischen diesem *in-vitro*-Modell und der Rattenniere *in vivo* wurde deutlich, dass die Gene, die in Zytoskelett/Zelladhäsion, DNA- und RNA-Metabolismus

und Zellzykluskontrolle und Proteinmetabolismus in den kultivierten Zellen bereits deutlich induziert waren, so dass diese Funktionen durch Einwirkung von OTA nicht weiter beeinflusst, d. h. induziert werden konnten. Ebenso waren die Gene, die in metabolischen Prozessen und dem Membrantransport, also in physiologisch wichtigen Funktionen der Niere, eine Rolle spielen, schon weitestgehend *in vitro* abgeschaltet. So konnte ihre Herunterregulation *in vivo*, was *in vivo* als Dedifferenzierung durch OTA bezeichnet wurde, *in vitro* nicht mehr bewirkt werden. Diese Herunterregulation von Genen *in vitro*, die für metabolische Enzyme oder andere Differenzierungsmarker kodieren, wurden auch in Studien festgestellt, in denen isolierte Hepatozyten in Kultur mit intaktem Lebergewebe verglichen wurden, sowohl mit humanen Hepatozyten (Waring *et al.*, 2003) als auch mit Hepatozyten der Ratte (Baker *et al.*, 2001; Boess *et al.*, 2003).

Bei den humanen *in-vitro*-Modellen konnte man erkennen, dass nur wenige akute Antworten, wie *oxidativer Stress/DNA-* und *Proteinschädigung* mit dem *in-vivo*-Profil übereinstimmten. Dies könnte durch die Unterschiedlichkeit zwischen Mensch und Ratte zustande kommen und die größere Übereinstimmung zwischen den *in-vivo*- und *in-vitro*-Daten der Ratten erklären. Dafür zeigten einige Gene assoziiert mit den regenerativen Prozessen in der Niere *in vivo*, wie *CCNB2*, *CKS1B*, *RACGAP1*, und *COL6A1*, eine Induktion in den primären humanen proximalen Tubuluszellen und in den HK-2-Zellen, die mit der hohen Konzentration behandelt worden waren. Allerdings könnte die Induktion von *COL6A1 in vitro* auch mit Veränderungen des Zytoskeletts zusammenhängen und nicht unbedingt mit einem regenerativen Prozess. Nahezu allen Systemen gleich war die Herunterregulation der mitochondrialen ribosomalen Gene wie *MRPL55*, *MRPL11*, *MRPL17*, *MRPL36*, *MRPS16*, *MRPS25* und *MRPS34*, die nach der Behandlung/Inkubation mit OTA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* auftrat. Es gilt zu überprüfen, ob diese Gene möglicherweise durch einen gemeinsamen Transkriptionsfaktor reguliert werden, dessen Aktivität möglicherweise durch OTA verändert wird. Insgesamt waren nur wenige Gene in allen Modellen gleich reguliert, wobei festgestellt wurde, dass die HK-2-Zellen, die mit der niedrigen Konzentration OTA inkubiert wurden, weniger bzw. kaum deutliche Signale aufwiesen. Dies könnte bedeuten, dass die Konzentration insgesamt zu niedrig war oder das Modell weniger sensitiv auf die Inkubation mit OTA reagiert. Die höhere Konzentration zeigte zwar deutlichere Signale, allerdings ging diese Konzentration schon mit einer drastischen Verminderung der Zellvitalität (20-30 % Viabilität) einher, was eher gegen den Einsatz dieser Konzentration sprechen würde, da sie nicht *in vivo* relevante Expositionen widerspiegelt. Dies bestätigt die in dieser Arbeit beobachtete Problematik der Bestimmung der Konzentration, die für die Inkubation des jeweiligen *in-vitro*-Modells eingesetzt werden soll.

Die auf den ersten Blick größere Übereinstimmung der Ratten *in-vivo*-Daten und den *in-vitro*-Modellen der Ratte untereinander könnte zum einen daran liegen, dass diese Daten aus derselben Spezies stammen, zum anderen aber auch daran, dass nicht alle Gene aus dem *in-vivo*-Versuch auf dem Humanchip gesucht und anschließend miteinander verglichen wurden. In dem Vergleich aller Modelle wurde nur ein Teil der *in vivo* veränderten Gene verwendet, um einen ersten Einblick zu erlangen. Anhand dieses *in-vivo*- und *in-vitro*-Vergleichs mit allen Modellen wird aber schon deutlich, dass einige wichtige Prozesse nach der Behandlung der verschiedenen Modelle mit einem Nierenkarzinogen *in vitro* nicht angeschaltet werden können. Es konnten *in vitro* zwar ähnliche akute Stressantworten wie *in vivo* beobachtet werden, jedoch waren regenerative Vorgänge, die *in vivo* nach Nekrose-induzierenden Substanzen wie dem Nierentoxin OTA beobachtet werden, *in vitro* im Prinzip vollkommen abwesend. Diese Unterschiede müssen bei der Interpretation der *in-vitro*-Daten berücksichtigt werden. Auch zeigte eine Gegenüberstellung der biochemischen Funktionen, die in den verschiedenen *in-vitro*-Modellen hoch- bzw. herunterreguliert waren, dass nicht wie *in vivo* bestimmte unterschiedliche biochemische Funktionen nach Toxineinwirkung entweder induziert oder herunterreguliert wurden, sondern dass Gene ähnlicher Funktion sowohl hoch- als auch herunterreguliert worden waren.

4.5 Vergleich weiterer Nephrokarzinogene mittels eines humanen Zellmodells für die Niere

Der Vergleich von OTA *in vivo* und *in vitro* mittels verschiedener Zellsysteme für die Niere ließ sowohl Gemeinsamkeiten als auch Differenzen erkennen. Deshalb sollten in einem nächsten Experiment die deregulierten Gene nach Inkubation mit den anderen vier Nephrokarzinogenen AA, NNM, 2NF und KBrO₃, die schon *in vivo* mittels Genexpressionsanalyse untersucht worden waren, ebenfalls *in vitro* analysiert werden. Im Rahmen des EU-Projekts *Predictomics* wurde die humane Zelllinie HK-2 als *in-vitro*-System für die Niere gewählt.

Dieser Vergleich zwischen *in vivo* und *in vitro* erschien sinnvoll, da bisher die Klassifizierung von Substanzen und auch die Risikoabschätzungen für den Menschen mittels *in-vivo*-Studien vorgenommen werden. Dazu wurden aus dem *in-vivo*-Versuch bestimmte toxikologische Kategorien ausgewählt, aus denen beim Vergleich der *in-vivo*-Daten Gemeinsamkeiten hervorgingen und die als wichtigste Folgen der Einwirkung genotoxischer Substanzen auf die Niere angesehen wurden.

Auffällig bei der Betrachtung der Daten war, dass durch 2NF bei gleichen Versuchsbedingungen (Viabilität, Zytotoxizität) und Kriterien für die statistische Analyse

keine spezifischen Veränderungen auftraten. Dies steht nicht im Einklang mit den *in-vivo*-Daten und auch nicht zu den meisten *in-vitro*-Studien zur Genotoxizität von 2NF, die sowohl in Säugerzellen als auch in Bakterien ein positives Ergebnis zeigten (Beije und Möller, 1998). Dies könnte mit der Metabolisierung von 2NF zusammenhängen, da bekannt ist, dass es *in vivo* und *in vitro* hauptsächlich zu den C- und N-hydroxylierten 2-Acetylaminofluorenen metabolisiert wird, die dann *in vivo* als Konjugate mit dem Fäzes und dem Urin ausgeschieden werden. In Säugerzellen scheint die Nitroreduktion, die Ringoxidation oder eine Kombination aus beidem für die Mutagenität verantwortlich zu sein (Beije und Möller, 1988). Wahrscheinlich haben die HK-2-Zellen ihre Eigenschaft der Metabolisierung und Detoxifizierung oder zumindest bestimmte Enzyme, die für die Bioaktivierung von 2NF notwendig wären, verloren.

Die Inkubation mit den genotoxischen Nephrokarzinogenen AA und NNM zeigte *in vitro* ein paar Übereinstimmungen mit ausgewählten *in vivo* deregulierten Genen. Dennoch gab es auch Unterschiede zu den *in-vivo*-Daten, die zum einen auf den Unterschieden zwischen den Spezies beruhen könnte, zum anderen auch darauf, dass hier wie beim Vergleich der *in-vivo*- und *in-vitro*-Daten der Ratte einfach Unterschiede zwischen den basalen Expressionslevel bestimmter Gene/Proteine vorherrschen. Ein wichtiges Gen, das durch die *in vivo* untersuchten Nephrokarzinogene deutlich induziert worden war, war *p21* (*CDKN1A*). Dieses Gen *p21* und *BCCIP*, das nach 2NF *in vivo* dereguliert war, waren ebenfalls *in vitro* durch die genotoxischen Karzinogene hochreguliert. Dies würde dafür sprechen, dass eine akute Antwort auf die Schädigung der DNA in den HK-2-Zellen stattfindet, jedoch war die Anzahl der deregulierten Gene in diesem Signalweg *in vitro* geringer als *in vivo*. Die Signale der Gene, die *in vivo* als oxidativer Stress/Proteinschädigung zusammengefasst wurden, waren bis auf *FKBP5* *in vitro* gar nicht oder nur sehr schwach und inkonsistent vorhanden. Ebenso waren auch die Gene, die als allgemeine Detoxifizierung bezeichnet wurden, *in vitro* sehr variabel oder gar nicht dereguliert, was auch im Falle von 2NF die Vermutung unterstützen würde, dass jenes nicht durch die Zellen bioaktiviert werden konnte. Hingegen waren *NQO1*, *GSTA2*, *EPHX1* auch nach NNM und AA, sowie *GSTP1* nur nach AA, in den HK-2-Zellen und *in vivo* hochreguliert. Dies wiederum verdeutlicht, dass die HK-2-Zellen in der Lage sind, eine akute Stressantwort zu geben. Auch Gene, die als Antwort auf allgemeinen Stress bezeichnet wurden, wurden größtenteils auch *in vitro* dereguliert. Die oben genannten Gene und Kategorien geben allerdings bisher nur einen Teil der *in vivo* analysierten Daten wieder und ebenfalls nur einen Teil der *in-vitro*-Daten. Dies bedeutet, dass einerseits nur die wichtigsten Gen-Funktionsgruppen genauer untersucht wurden, die nach Behandlung mit Nephrokarzinogenen *in vivo* betroffen waren. Andererseits deutet dieser Vergleich

ähnlich wie im OTA *in-vivo/in-vitro*-Vergleich darauf hin, dass nicht alle Veränderungen *in vivo* mit den Veränderungen *in vitro* korrelieren und eher nur akute Antworten vom *in-vitro*-Modell zu erwarten sind.

Bei Kaliumbromat war ein Vergleich zu den *in-vivo*-Daten nicht möglich, da *in vivo* keine spezifischen Veränderungen festgestellt werden konnten. Im Gegensatz zu *in vivo* wurden aber durch die Inkubation der HK-2-Zellen *in vitro* mit KBrO_3 sehr viele Gene verändert. KBrO_3 verursachte auch bei Crosby *et al.* (2000) nach nur 4-12 h Inkubation von 'Fred-Pe'-Zellen eine Reihe von Veränderungen. Es wurde u.a. eine vermehrte Expression von Hämoxxygenase 1 und Hitzeschock-Proteinen festgestellt, was für eine adaptive Antwort nach oxidativem Stress spricht. Außerdem wurde eine verstärkte Induktion von Komponenten des Proteasom und der Transkription von Ubiquitin als Proteinschädigung interpretiert, was zusammen mit der Expression von *PLA2* aus der oxidativen Schädigung von DNA/RNA, Proteinen und Lipiden resultieren könnte. Nur ein Teil der Gene, die in der oben beschriebenen Studie als differentiell exprimiert identifiziert wurden, waren auch in den HK-2-Zellen dieser Arbeit verändert. Die Übereinstimmung der Induktion von *HO-1* und einiger anderer Gene, die nur in dieser Arbeit dereguliert waren, wie z. B. *GCLC*, *GCLM*, *NQO1* und HSPs, die auch schon in den vorigen Abschnitten genauer beschrieben wurden, ließen auf oxidativen Stress schließen. Nach KBrO_3 wurde *p21* sowohl bei Crosby *et al.* (2000) als auch in dieser Arbeit induziert, was auch auf oxidativen Stress zurückzuführen sein dürfte. Denn weitere Gene, die neben *p21* durch die genotoxischen Nephrokarzinogene induziert wurden, wie *MDM2* oder *MGMT*, waren nicht hochreguliert. Jedoch wurden Gene, wie *MCM10* und *CCNB1* induziert, die auf Proliferation schließen lassen, so wie es auch nach dem nicht-genotoxischen Nephrokarzinogen OTA der Fall gewesen war.

Dass *in vitro* so viele Veränderungen durch KBrO_3 hervorgerufen wurden und *in vivo* nicht, könnte durch die Beschaffenheit des *in-vitro*-Modells selbst bedingt sein. Da die HK-2-Zellen sich nicht wie in der Niere in einem engen Verband mit verschiedenen Zellen befinden, wirkt das Kaliumbromat nun direkt auf die isolierten Zellen der Zellkultur. Dadurch ist zum einen die Konzentration und der Weg der Einwirkung des Toxin anders als in der Niere und zum anderen könnte ein vermindert ausgeprägter Schutzmechanismus zu solchen starken Veränderungen in den Zellen führen. Deshalb bleibt es auch nicht ganz geklärt, ob der *in vitro* beobachtete Effekt des oxidativen Stresses auch *in vivo* in der gleichen Art und Weise abläuft. Dieses Problem des *in-vitro*-Systems könnte auch bei anderen nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen von Bedeutung sein.

Abschließend konnte aber bei der bisherigen Analyse der *in-vitro*-Daten gesehen werden, dass eher akute Effekte von den *in-vitro*-Systemen wiedergegeben werden konnten. Dies

könnte auch daran liegen, dass, wie bei den *in-vitro*-Modellen der Ratte, die Signalwege von akutem Stress weiterhin *in vitro* funktionieren, bestimmte Eigenschaften aber in der Kultur einfach verloren gehen, besonders die, die sich durch Interaktionen zwischen verschiedenen Zellen der Niere ergeben. Dadurch verhalten sich die Zellen anders als im Zellverband der Niere und zeigen auch andere Veränderungen im Expressionsprofil.

Wie auch der Vergleich zwischen den primären proximalen Tubuluszellen und der Rattenniere *in vivo* eine umfassende Charakterisierung des *in-vitro*-Modells zuließ und für die Interpretation von Versuchen mit diesem Zellmodell hilfreich sein wird, so könnte auch eine umfassende Charakterisierung der primären Humankulturen sehr sinnvoll sein. Diese konnte aber wegen der unzureichenden Verfügbarkeit von humanem Nierenmaterial nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt werden.

Da in dieser Arbeit nur ein Teil der *in-vitro*-Daten vollständig analysiert und kategorisiert werden konnte, wäre die weitere Analyse der übrigen Daten hilfreich. Jedoch zeigte die ausführliche Analyse der *in-vivo*- und *in-vitro*-Daten nach OTA, dass durchaus große Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* bestehen. Aufgrund dieses Vergleichs, der Publikationen zu isolierten Hepatozyten (Baker *et al.*, 2001; Boess *et al.*, 2003) und der *in-vivo*-/*in-vitro*-Vergleiche mit den vier Nephrokarzinogenen kann vermutet werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Zellmodelle nach der Inkubation mit den verwendeten Nephrokarzinogenen eher insgesamt nur akute Antworten zeigen. Da sie im Vergleich zum differenzierten Organ dedifferenziert sind, was auf die *in-vitro*-Umgebung zurückzuführen ist, sind sie vermutlich nicht in der Lage, die gleichen *in vivo* beobachteten funktionellen Antworten hervorzubringen. Deshalb erwiesen sich die untersuchten *in-vitro*-Modelle noch nicht als geeignete Screening-Modelle für Nephrokarzinogene. Ob sich dies durch veränderte Kulturbedingungen verbessern lässt, gilt zu klären.

4.6 Wichtige Aspekte der *in-vitro*-Systeme

In dieser Arbeit konnten einige wichtige Beobachtungen und Ergebnisse zu verschiedenen *in-vitro*-Modellen der Niere herausgearbeitet werden. Sowohl die Bestimmung von Zytotoxizitätsparametern *in vitro* als auch die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen ließen folgende grundsätzlichen Aussagen der in dieser Arbeit verwendeten *in-vitro*-Modelle zu:

- Zellkulturen besitzen einen von *in vivo* verschiedenen Phänotyp
- Wichtige Eigenschaften des differenzierten Organs können *in vitro* verloren gehen, sowohl bei primären Zellen als auch bei Zellkulturlinien

- Nicht alle Antworten des *in-vitro*-Systems korrelieren mit *in vivo* (Dedifferenzierung in der Niere durch Einwirken eines Toxins kann von den bereits dedifferenzierten Zellen *in vitro* nicht wiedergegeben werden)
- Regenerative Antworten sind nur schwer *in vitro* festzustellen, da viele Gene/Proteine, die z. B. mit DNA-Replikation, Zellzyklus und Proliferation assoziiert sind, im *in-vitro*-System bereits induziert sind, oder *in vivo* durch regulatorische Signale von anderen Zelltypen, die *in vitro* nicht vorhanden sind, aktiviert werden.
- Die Bestimmung der Konzentration in Relation zur *in-vivo*-Exposition ist ein sehr wichtiger, jedoch oft schwer erfüllbarer Aspekt, da das System sehr empfindlich auf unterschiedliche Konzentrationen reagiert. Dies hat letztlich einen großen Einfluss auf die Veränderungen in der Genexpression.
- Metabolisierung und somit Bioaktivierung oder Inaktivierung von Toxinen kann nicht mehr stattfinden, wenn die entsprechenden Enzyme nicht mehr exprimiert werden.
- Da die Zellen aus ihrem natürlichen Verband herausgelöst sind, sind möglicherweise verschiedene Schutzmechanismen nicht mehr aktivierbar. Außerdem könnte dies eine direkte Exposition zur Folge haben, die in dieser Weise im Zellverband *in vivo* möglicherweise nicht existiert.

4.7 Ausblick

Die *in-vivo*-Studien konnten Gemeinsamkeiten zwischen genotoxischen Nephrokarzinogenen und Unterschiede zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen aufdecken. Der Vergleich zwischen zwei nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen war nicht möglich, da in Studien mit dem einen dieser beiden Substanzen kaum Gene dereguliert waren. Deshalb würde die Untersuchung weiterer nicht-genotoxischer Nephrokarzinogene und der anschließende Vergleich noch weitere Einblicke in die molekularen Mechanismen zulassen, die sehr hilfreich für die Klassifizierung und Risikoabschätzung nicht-genotoxischer Karzinogene wären.

Ein Vergleich zwischen den primären humanen Zellen sowie der humanen Zelllinie mit der humanen Niere *in vivo* wäre sehr hilfreich und sinnvoll, um eine umfassende Charakterisierung der *in-vitro*-Modelle bezüglich der Genexpression zu erreichen. Einige Aspekte wurden in dieser Arbeit aufgegriffen und diskutiert, die die Etablierung und Benutzung von *in-vitro*-Modellen als durchaus sinnvoll erscheinen lassen. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass die verwendeten *in-vitro*-Modelle auch Nachteile und

Einschränkungen besitzen und deshalb nur dann eingesetzt werden können, wenn der oder die möglicherweise betroffenen Signalwege in den Zellen *in vitro* vorhanden und aktivierbar sind, was in manchen Fällen durch eine Optimierung erreicht werden könnte. Es könnten Einblicke in die Veränderungen durch Nephrokarzinogene *in vitro* gegeben werden, die jedoch noch einer detaillierten Bewertung bedürfen, da Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* bestehen und man die derzeitigen *in-vitro*-Modelle nicht ohne weiteres anstelle eines *in-vivo*-Modells verwenden kann. Die Bestimmung von sog. Surrogatmarkern, die nur in *in-vitro*-Modellen dereguliert sind, nicht aber *in vivo*, würden eine weitere Möglichkeit eröffnen, *in-vitro*-Modelle für verschiedene *in-vivo*-Endpunkte, wie z. B. die Induktion von Nierenkrebs, zu entwickeln. Für die Selektion dieser Surrogatmarker wären aber noch weitere Inkubationsexperimente mit einer größeren Anzahl von Nephrokarzinogenen nötig, als in dieser Arbeit beschrieben, da erst durch einen umfassenden Vergleich der daraus resultierenden Daten solche Marker aufgedeckt und validiert werden könnten. Für solche Marker, die kein *in-vivo*-Korrelat haben, gelten einige Bedingungen, z. B. dass entweder ein bestimmtes Gen-'Set' immer *in vitro* nach Inkubation mit Nephrokarzinogenen dereguliert wird, oder dass ganz bestimmte Signalwege (oder eine bestimmte Kombination von Signalwegen) *in vitro* nur durch Nephrokarzinogene angeschaltet werden.

5 Zusammenfassung

Die Niere übernimmt im Körper wichtige Aufgaben wie Exkretion und Resorption, die über die Aufnahme und Abgabe von Stoffen in bzw. aus dem Körper entscheiden, und stellt einen Angriffspunkt für Toxine und Karzinogene dar. Verschiedenste Stoffe können die Niere schädigen, insbesondere die proximalen Tubuli. Diese Veränderungen können zur Entstehung von Krebs führen. Man unterscheidet zwischen genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen, wobei bislang der Langzeit-*in-vivo*-Test für die Klassifizierung von Substanzen und deren kanzerogenem Potential verwendet wird. Unter dem Gesichtspunkt der '3 R's' 'Reduction', 'Refinement' und 'Replacement' wären zum einen Kurzzeit-*in-vivo*-Tests z. B. unter Einsatz von Toxicogenomics und zum anderen die Etablierung aussagekräftiger *in-vitro*-Modelle sehr hilfreich, um auf diese Weise frühe Veränderungen in den Organen beziehungsweise in den Zellen aufzuspüren, die im Zusammenhang mit der Karzinogenese stehen könnten.

Deshalb wurden in dieser Arbeit zunächst Kurzzeitstudien mit genotoxischen und nicht-genotoxischen Nephrokarzinogenen durchgeführt und drei verschiedene Zeitpunkte mittels Genexpressionsanalyse untersucht. Es konnten Gemeinsamkeiten zwischen den genotoxischen Nephrokarzinogenen und auch Unterschiede zu einem nicht-genotoxischen Nephrokarzinogen gezeigt werden. Es wurde festgestellt, dass durch die genotoxischen Nierenkanzerogene eher Gene induziert wurden, die für Proteine kodieren, die auf eine DNA-Schädigung aufgrund direkten Einwirkens der genotoxischen Nierenkanzerogene schließen lassen. Außerdem wurden Gene verändert, die für Proteine kodieren, die in oxidativem Stress/Detoxifizierung und -/Proteinschädigung, aber auch der Gewebeorganisation eine Rolle spielen. Im Gegensatz zu den genotoxischen Nierenkanzerogenen wurden durch das nicht-genotoxische Nierenkanzerogen OTA eher Gene induziert, die auf eine oxidative Schädigung der DNA und auf regenerative Prozesse, wie DNA-Replikation und Zellzyklusprogression zurückzuführen sind. Außerdem war eine Reihe von Genen herunterreguliert, die für Enzyme kodieren, die in metabolischen Prozessen sehr wichtig sind, was als Dedifferenzierung der Nierenzellen gedeutet wurde.

Ein weiterer Schwerpunkt gegenwärtiger Forschungsarbeiten in der investigativen Toxikologie ist die Etablierung geeigneter *in-vitro*-Modelle. In dieser Arbeit wurde eine umfassende Charakterisierung primärer proximaler Tubuluszellen der Ratte mittels Genexpressionsanalyse vorgenommen. Dort zeigte sich eine Dedifferenzierung der Zellen, die aus der verminderten Expression vieler metabolischer Funktionen resultierte. Außerdem zeigten die Zellen einen Verlust nierenspezifischer Funktionen durch verringerte Expression essentielle Membrantransporter. Des Weiteren konnte aber auch eine deutliche Induktion von Genen, die in Stress, RNA- und Proteinsynthese, intrazellulärem Transport, Proliferation, Zelladhäsion und Zytoskelettorganisation involviert waren, festgestellt werden. Diese Veränderungen ließen den Schluss zu, dass die Zellen in der Kultur eine Art Transdifferenzierung durchlaufen und sich an die neue Umgebung anpassen. Bei der Verwendung dieses Modells und der Interpretation der Ergebnisse sollte das berücksichtigt werden. Anschließend wurden verschiedene *in-vitro*-Modelle der Niere, sowohl der Ratte als auch des Menschen, mit dem Modell-Karzinogen OTA behandelt. Aus diesem Vergleich mußte geschlossen werden, dass das *in-vitro*-Modell nur teilweise in der Lage war, die gleichen Antworten wie das *in-vivo*-Modell zu geben. Die Gemeinsamkeiten beschränkten sich eher auf akute Antworten, wobei das Ausbleiben einiger Antworten mit der veränderten Basalexpression bestimmter Gene *in vitro* erklärbar war. Die Behandlung von HK-2-Zellen mit vier verschiedenen Nephrokarzinogenen zeigte ebenfalls nur wenige Übereinstimmungen mit *in vivo*. Daraus resultierte ebenfalls die Annahme, dass auch die Antworten dieser Zellen

nicht mit allen *in vivo* beobachteten Veränderungen nach Gabe der Karzinogene korrelieren und dass die jeweiligen Modelle nur für bestimmte Fragestellungen verwendet werden können. Die Bestimmung von sogenannten Surrogatmarkern bleibt zu klären, da eine viel größere Anzahl an Inkubationsexperimenten dafür erforderlich wäre.

Summary

The kidney plays a major role in excretory and re-absorptive processes, and is a target for a wide variety of drugs, environmental pollutants and metals causing nephrotoxicity or cancer. The kidney cortex consists primarily of proximal tubular cells, which are epithelial cells often involved in the induction and progression of various kidney diseases and therefore also in the development of cancer. There are genotoxic and non-genotoxic nephrocarcinogens whose carcinogenic potential is currently evaluated in long-term *in vivo* assays. With respect to the 3 R's, Reduction, Refinement and Replacement, the establishment of either short term *in vivo* assays using e.g. toxicogenomics or reliably applicable *in vitro* models would be very helpful to obtain insight into the early changes in organs or cells upon carcinogen treatment.

This study comprises a comparison of genotoxic and non-genotoxic nephrocarcinogens with short-term *in vivo* studies by using gene expression analyses at three different time points. There were similarities between the genotoxic nephrocarcinogens and differences between the genotoxic and non-genotoxic nephrocarcinogens. Genotoxic nephrocarcinogens induced genes coding for proteins involved in oxidative stress / DNA damage likely by directly attacking the DNA, oxidative stress / detoxification, - / protein damage and tissue organization. In contrast to the genotoxic nephrocarcinogens, the non-genotoxic nephrocarcinogen OTA induced genes coding for proteins associated with oxidative stress-induced DNA damage and genes involved in regenerative processes like DNA replication and cell cycle progression. Many downregulated genes upon OTA application were associated with metabolic activities which were interpreted as dedifferentiation.

Another issue of recent scientific research is the development of applicable *in vitro* systems. Therefore, a comprehensive characterization of an *in vitro* model, primary proximal tubular cells of the rat, was carried out in comparison to *in vivo* by gene expression analysis. A dedifferentiation of cells was observed resulting from the downregulation of genes coding for proteins involved in metabolic processes and in kidney specific-activities like membrane transport. Apart from that genes coding for proteins associated with stress, RNA and protein synthesis, intracellular transport, proliferation, cell adhesion and cytoskeleton were expressed at higher levels *in vitro* compared to *in vivo*. This may be due to transdifferentiation of the cells into a tissue culture cell. All these changes have to be taken into account when using this *in vitro* model and for interpretation of the results obtained with these cells.

In the following four different *in vitro* models from either rat or human were treated with the model nephrocarcinogen Ochratoxin A (OTA). The comparison of all four models with *in vivo* revealed that none of them was able to show all major changes upon OTA exposure *in vivo*. Only acute responses were clearly seen with the *in vitro* models, whereas regenerative processes could be hardly identified *in vitro*. The latter may be explained at least in case of the rat primary cells, but likely for the other used models, by the altered basal expression *in vitro* of genes involved in these pathways. Finally, HK-2 cells were incubated with the four nephrocarcinogens also used in the *in vivo* studies. The comparison of important gene changes *in vivo* with *in vitro* showed only slight similarities and again mainly acute effects were also seen *in vitro*. This leads to the assumption that *in vitro* expression changes upon treatment are not necessarily correlating with *in vivo* and that the used models may only be employed as *in vivo* replacement for well defined questions. For defining so called surrogate markers more treatment experiments with a much greater number of different nephrocarcinogens would be necessary.

6 Literaturverzeichnis

- Aalkjaer, C., Frische, S., Leipziger, J., Nielsen, S., Praetorius, J., 2004. Sodium coupled bicarbonate transporters in the kidney, an update. *Acta Physiologica Scandinavica* 181 (4), 505-512.
- Ames, B.N., McCann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Research* 31(6), 347- 364.
- Amundson, S.A., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J., Fornace, A.J., 2001. Physiological function as regulation of large transcriptional programs: the cellular response to genotoxic stress. Comparative biochemistry and physiology. Part B. *Biochemistry and Molecular Biology* 129 (4), 703–710.
- Andrews, G.K., 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology* 59 (1), 95– 104.
- Arlt, V.M., Stiborova, M., Schmeiser, H.H., 2002. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review. *Mutagenesis*.17 (4), 265-77.
- Ashby J., Lefevre P.A., 1989. The rat-liver carcinogen N-nitrosomorpholine initiated unscheduled DNA synthesis and induces micronuclei in the rat liver *in vivo*. *Mutation Research* 225, 143-147.
- Ashendel, C.L., 1985. The phorbol ester receptor; a phospholipid-regulated protein kinase. *Biochimia et Biophysica Acta* 822, 219-242.
- Bagnasco, S.M., Uchida, S., Balaban, R.S., Kador, P.F., Burg, M.B., 1987. Induction of Aldose Reductase and Sorbitol in Renal Inner Medullary Cells by Elevated Extracellular NaCl. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 84 (6), 1718–1720.
- Baker, T.K., Carfagna, M.A., Gao, H., Dow, E.R., Li, Q., Searfoss, G.H., Ryan, T.P., 2001. Temporal gene expression analysis of monolayer cultured rat hepatocytes. *Chemical Research in Toxicology* 14 (9), 1218–1231
- Ballmaier D., Epe B., 2006. DNA damage by bromate: Mechanism and consequences. *Toxicology* 221, 166-171.
- Bannasch, P., Mayer, D., Krech, R., 1979. Neoplastic and Preneoplastic Lesions in Rats After Oral Administration of a Single Dose of N-Nitrosomorpholine. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 94, 233-248.
- Bannasch, P., Hacker, H.J., Tsuda, H., Zerban, H., 1986. Aberrant regulation of carbohydrate metabolism and metamorphosis during renal carcinogenesis. *Advances in Enzyme Regulation* 25, 279-96.

- Bauer, I., Hohl, M., Al-Sarraj, A., Vinson, C., Thiel, G., 2005. Transcriptional activation of the Egr-1 gene mediated by tetradeca-noylphorbol acetate and extracellular signal-regulated protein kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 438 (1), 36–52.
- Beije B., Moller L., 1988. 2-Nitrofluorene and related compounds: prevalence and biological effects. *Mutation Research*. 196 (2), 177-209.
- Bendele A.M., Carlton W.W., Krogh P., Lillehoj E.B., 1985. Ochratoxin A carcinogenesis in the (C57BL/6J X C3H)F1 mouse. *Journal of the National Cancer Institute* 75 (4), 733-42.
- Blesa J., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J., 2006. Factors affecting the presence of ochratoxin A in wines. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46 (6), 473-8.
- Boess, F., Kamber, M., Romer, S., Gasser, R., Müller, D., Albertini, S., Suter, L., 2003. Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the *in vivo* liver gene expression in rats: possible implications for Toxicogenomics use of *in vitro* systems. *Toxicological Sciences* 73, 386–402.
- Boogaard, P.J., Nagelkerke, J.F., Mulder, G.J., 1990. Renal proximal tubular cells in suspension or in primary culture as *in vitro* models to study nephrotoxicity. *Chemico-Biological Interactions* 76 (3), 251–291.
- Boorman, G.A., McDonald, M.R., Imoto, S., Persing, R., 1992. Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicologic Pathology* 20 (2), 236-245.
- Borlak, J., 2005. Handbook of Toxicogenomics: Strategies and Applications (chapter 19). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 471–486.
- Borzelleca J., 2001. Principles and Methods of Toxicology: The Art, the Science, and the Seduction of Toxicology: An Evolutionary Development (chapter 1). 4. Edition, edited by A.W. Hayes, Taylor and Francis, Philadelphia
- Boulton S.J., 2006. Cellular functions of the BRCA tumour-suppressor proteins. *Biochemical Society Transaction* 34 (Pt 5), 633-45.
- Brüning, T., Lammert, M., Kempkes, M., Their, R., Golka, K., Bolt, H.M., 1997. Influence of polymorphisms of GSTM1 and GSTT1 for risk of renal cell cancer in workers with long-term high occupational exposure to trichloroethene. *Archives of Toxicology* 71 (9), 596-9.
- Brunnemann, K.D., Scott, J.C., Hoffmann, D., 1982. N-Nitrosomorpholine and other volatile N-nitrosamines in snuff tobacco. *Carcinogenesis* 3 (6), 693-696.
- Butte, A., 2002. The use and analysis of microarray data. *Nature Reviews Drug Discovery* 1 (12), 951-960.

-
- Caglar, K., Peng, Y., Pupim, L.B., Flakoll, P.J., Levenhagen, D., Hakim, R.M., Ikizler, T.A., 2002. Inflammatory signals associated with hemodialysis. *Kidney International* 62 (4), 1408–1416.
- Cao, D., Fan, S.T., Chung, S.S., 1998. Identification and characterization of a novel human aldose reductase-like gene. *The Journal of Biological Chemistry* 273 (19), 11429–11435.
- Castegnaro, M., Mohr, U., Pfohl-Leszkowicz, A., Esteve, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., Bartsch, H., 1998. Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *International Journal of Cancer* 77 (1), 70-5.
- Chang, J.C., Wooten, E.C., Tsimelzon, A., Hilsenbeck, S.G., Gutierrez, M.C., Elledge, R., Mohsin, S., Osborne, C.K., Chamness, G.C., Allred, D.C., O'Connell, P. 2003. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *The Lancet* 362 (9381), 362-369.
- Chin, E., Zamah, A.M., Landau, D., Gronbeck, H., Flyvbjerg, A., LeRoith, D., Bondy, C.A., 1997. Changes in facilitative glucose transporter messenger ribonucleic acid levels in the diabetic rat kidney. *Endocrinology* 138 (3), 1267–1275.
- Chipman, J., Davies, J., Parsons, J., Nair, J., O'Neill, G., Fawell, J., 1998. DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation? *Toxicology* 126, 93-102
- Conseil, G., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2006. Functional importance of three basic residues clustered at the cytosolic interface of Transmembrane Helix 15 in the Multidrug and Organic Anion Transporter Mrp1 (Abcc1). *The Journal of Biological Chemistry* 281 (1), 43–50.
- Cosyns, J.P., Dehoux, J.P., Guiot, Y., Goebbels, R.M., Robert, A., Bernard, A.M., van Ypersele de Strihou, C., 2001. Chronic aristolochic acid toxicity in rabbits: a model of Chinese herbs nephropathy? *Kidney International* 59 (6), 2164-2173.
- Cowland, J.B., Sorensen, O.E., Sehested, M., Borregaard, N., 2003. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *Journal of Immunology* 171 (12), 6630–6639.
- Crosby, L.M., Hyder, K.S., DeAngelo, A.B., Kepler, T.B., Gaskill, B., Benavides, G.R., Yoon, L., Morgan, K.T., 2000. Morphologic analysis correlates with gene expression changes in cultured F344 rat mesothelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 169 (3), 205-21.
- Cui, X.S., Eriksson, L.C., Moller, L., 1999. Formation and persistence of DNA adducts during and after a long-term administration of 2-nitrofluorene. *Mutation Research* 442 (1), 9-18.
-

- Cui, X.S., Torndal, U.B., Eriksson, L.C., Moller, L., 1995. Early formation of DNA adducts compared with tumor formation in a long-term tumor study in rats after administration of 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis* 16 (9), 2135-41.
- Dandrea, T., Hellmoldm H., Jonsson, C., Zhivotovsky, B., Hofer, T., Warngard, L., Cotgreave, I., 2004. The transcriptosomal response of human A549 lung cells to a hydrogen peroxide-generating system: relationship to DNA damage, cell cycle arrest, and caspase activation. *Free Radical Biology and Medicine* 36 (7), 881-896.
- DeAngelo, A.B., George, M.H., Kilburn, S.R., Moore, T.M., Wolf, D.C., 1998. Carcinogenicity of potassium bromate administered in the drinking water to male B6C3F1 mice and F344/N rats. *Toxicologic Pathology* 26 (5), 587-94.
- Deora, A.A., Philp, N., Hu, J., Bok, D., Rodriguez-Boulan, E., 2005. Mechanisms regulating tissue-specific polarity of monocarboxylate transporters and their Chaperone Cd147 in kidney and retinal epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 102 (45), 16245-16250
- De Kanter, R., Monshouwer, M., Meijer, D.K., Groothuis, G.M., 2002. Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Current Drug Metabolism* 3 (1), 39-59.
- De Larco, J.E., Todaro G.J, 1978. Epithelioid and Fibroblastic Rat Kidney Cell Clones: Epidermal Growth Factor (EGF) Receptors and the Effect of Mouse Sarcoma Virus Transformation. *Journal of Cell Physiology* 94 (3), 335-342.
- Delker, D., Hatch, G., Allen, J., Crissman, B., George, M., Geter, D., Kilburn, S., Moore, T., Nelson, G., Roop, B., Slade, R., Swank, A., Ward, W., DeAngelo, A., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress associated with bromate carcinogenicity. *Toxicology* 221 (2-3), 158-65.
- Deveraux, Q.L., Reed, J.C., 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes and Development* 13 (3), 239-252.
- Dhakshinamoorthy, S., Jaiswal, A.K., 2001. Functional characterization and role of INrf2 in antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Oncogene* 20 (29), 39063917.
- Dietrich, D.R., Swenberg, J.A., 1991. Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by nongenotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 248, 239-60.
- Doyle, A., Griffiths, J.B., Newell, D.G., 1995. Cell and tissue culture: laboratory procedures. In: Oxygenation (Part 8D:1). ECACC, Centre for Applied Microbiology and Research, Wiley, Porton Down, Salisbury, UK.
- Eling, T.E., Thompson ,D.C., Foureman, G.L., Curtis, J.F., Hughes, M.F., 1990. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annual Reviews of Pharmacology Toxicology* 30, 1-45.

-
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W., Ahr, H.J., 2004. Characteristic expression profiles induced by genotoxic carcinogens in rat liver. *Toxicological Sciences* 77 (1), 19-34.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W., Ahr, H.J., 2005. Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutation Research* 575 (1-2), 61-84.
- Elrick, M.M., Kramer, J.A., Alden, C.L., Blomme, E.A., Bunch, R.T., Cabonce, M.A., Curtiss, S.W., Kier, L.D., Kolaja, K.L., Rodi, C.P., Morris, D.L., 2005. Differential display in rat livers treated for 13 weeks with phenobarbital implicates a role for metabolic and oxidative stress in nongenotoxic carcinogenicity. *Toxicological Pathology* 33 (1), 118-26.
- Erster, S., Moll, U.M., 2005. Stress-induced p53 runs a transcription independent death program. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 331 (3), 843–850.
- Feng, X.H., Derynck, R., 2005. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 21, 659–693.
- Gant, T.W., Zhang, S.D., 2005. In pursuit of effective toxicogenomics. *Mutation Research* 575 (1-2), 4-16.
- Gautier, J., Richoz, J., Welte, D. H., Markovic, J., Gremaud, E., Guengerich, F.P., Turesky, R.J., 2001. Metabolism of ochratoxin A: absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chemical Research in Toxicology* 14 (1), 34-45.
- Gillerot, G., Jadoul, M., Arlt, V.M., van Ypersele De Strihou C., Schmeiser, H.H., But, P.P., Bieler, C.A., Cosyns, J.P., 2001. Aristolochic acid nephropathy in a Chinese patient: time to abandon the term "Chinese herbs nephropathy"? *American Journal of Kidney Diseases* 38 (5), E26.
- Gillman, I.G., Clark, T.N., Manderville, R.A., 1999. Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chemical Research in Toxicology* 12 (11), 1066-76.
- Grauer, G.F., 1996. Prevention of acute renal failure. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 26 (6), 1447–1459.
- Hall, A., 1994. A biochemical function for ras - at last. *Science* 264 (5164), 1413-1414.
- Hansen, R.J., Nagasubramanian, R., Delaney, S.M., Samson, L.D., Dolan, M.E., 2007. Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in protecting from alkylating agent-induced toxicity and mutations in mice. *Carcinogenesis* 28 (5), 1111-1116.
-

- Hamadeh, H.K., Bushel, P.R., Jayadev, S., Martin, K., DiSorbo, O., Sieber, S., Bennett, L., Tennant, R., Stoll, R., Barrett, J.C., Blanchard, K., Paules, R.S., Afshari, C.A., 2002. Gene expression analysis reveals chemical-specific profiles. *Toxicological Sciences* 67 (2), 219–231.
- Hamamura, M., Hirose, A., Kamata, E., Katoku, K., Kuwasaki, E., Oshikata, T., Nakahara, Y., Ema, M., Hasegawa, R., 2006. Semi-quantitative immunohistochemical analysis of male rat-specific alpha2u-globulin accumulation for chemical toxicity evaluation. *Journal of Toxicological Science* 31 (1), 35-47.
- Hara-Chikuma, M., Verkman, A.S., 2006. Aquaporin-1 facilitates epithelial cell migration in kidney proximal tubule. *Journal of the American Society of Nephrology* 17 (1), 39–45.
- Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., 1991. Urinary system. In: *Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press, San Diego, California, pp. 315–387 (chapter 15).
- Hayes, J.D., McMahon, M., 2001. Molecular basis for the contribution of the antioxidant responsive element to cancer chemoprevention. *Cancer Letters* 174 (2), 103-113.
- Henschler, D., 2006. The origin of hormesis: historical background and driving forces. *Human Experimental Toxicology* 25 (7), 347-351.
- Heussen, G.A., Post, J.G., Alink, G.M., 1990. Genotoxicity of benzo[a]pyrene, 2-nitrofluorene and airborne particulates in the DNA-repair host-mediated assay. *Mutation Research* 241 (1), 83-93.
- Higashi, Y., Asanuma, M., Miyazaki, I., Haque, M.E., Fujita, N., Tanaka, K., Ogawa, N., 2002. The p53-activated gene, PAG608, requires a zinc finger domain for nuclear localization and oxidative stress-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 277 (44), 42224-42232.
- Hook, J.B., Ford, S.M., 1983. Mechanisms of nephrotoxicity. *Journal of Toxicological Sciences* 8 (1), 1-14.
- Hus-Citharel, A., Gasc, J.M., Zini, S., Marchetti, J., Roques, B., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 1999. Aminopeptidase A activity and angiotensin III effects on [Ca²⁺]_i along the rat nephron. *Kidney International* 56 (3), 850–859.
- Hussain, S.P., Harris, C.C., 2006. p53 biological network: at the crossroads of the cellular-stress response pathway and molecular carcinogenesis. *Journal of Nippon Medical School* 73 (2), 54-64.
- International Agency for Research on Cancer (1978), IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 17, Some N-Nitroso Compounds, Lyon.
- International Agency for Research on Cancer (1978), IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 46, Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes, Lyon.

-
- Kabanda, A., Jadoul, M., Lauwerys, R., Bernard, A., van Ypersele de Strihou, C., 1995. Low molecular weight proteinuria in Chinese herbs nephropathy. *Kidney International* 48 (5), 1571-1576.
- Kammerer, R., Riesenberger, R., Weiler, C., Lohrmann, J., Schleypen, J., Zimmermann, W., 2004. The tumour suppressor gene CEACAM1 is completely but reversibly downregulated in renal cell carcinoma. *Journal of Pathology* 204 (3), 258-267.
- Kamp, H.G., Eisenbrand, G., Schlatter, J., Wurth, K., Janzowski, C., 2005. Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology* 206, 413-425.
- Kamura, T., Sato, S., Iwai, K., Czyzyk-Krzeska, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., 2000. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 97(19), 10430-10435.
- Kanwar, Y.S., Yang, Q., Tian, Y., Lin, S., Wada, J., Chugh, S., Srivastava, S.K., 2002. Relevance of renal-specific oxidoreductase in tubulogenesis during mammalian nephron development. *American Journal of Physiology Renal Physiology* 282 (4), F752-F762.
- Kauselmann, G., Weiler, M., Wulff, P., Jessberger, S., Konietzko, U., Scafidi, J., Staubli, U., Bereiter-Hahn, J., Strebhardt, K., Kuhl, D., 1999. The polo-like protein kinases Fnk and Snk associate with a Ca²⁺- and integrin-binding protein and are regulated dynamically with synaptic plasticity. *The European Molecular Biology Organization Journal* 18 (20), 5528-5539.
- Kawanashi, S., Murata, M., 2006. Mechanism of DNA damage induced by bromate differs from general types of oxidative stress. *Toxicology* 221, 172-178.
- Kaya, F.F., Topaktas, M., 2007. Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes *in vitro*. *Mutation Research* 626 (1-2), 48-52.
- Kevekordes, S., Spielberger, J., Burghaus, C.M., Birkenkamp, P., Zietz, B., Paufler, P., Diez, M., Bolten, C., Dunkelberg, H., 2001. Micronucleus formation in human lymphocytes and in the metabolically competent human hepatoma cell line Hep-G2: results with 15 naturally occurring substances. *Anticancer Research* 21 (1A), 461-469.
- Kim, Y., Ton, T.V., DeAngelo, A.B., Morgan, K., Devereux, T.R., Anna, C., Collins, J.B., Paules, R.S., Crosby, L.M., Sills, R.C., 2006. Major carcinogenic pathways identified by gene expression analysis of peritoneal mesotheliomas following chemical treatment in F344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 214 (2), 144-151.
- Kirkland, D., M. Aardema, Müller, L., Makoto, H., 2006. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles. *Mutation Research* 608 (1), 29-42.
-

- Khan, N., Sultana, S., 2005. Modulatory effect of *Ficus racemosa*: diminution of potassium bromate-induced renal oxidative injury and cell proliferation response. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 97 (5), 282-288.
- Kharbanda, S., Saleem, A., Rubin, E., Sukhatme, V., Blenis, J., Kufe, D., 1993. Activation of the early growth response 1 gene and nuclear pp90rsk in human myeloid leukemia cells by 1-(beta-D-arabinofuranosyl)cytosine. *Biochemistry* 32 (35), 9137-9142.
- Khosravi, R., Maya, R., Gottlieb, T., Oren, M., Shiloh, Y., Shkedy, D., 1999. Rapid ATM-dependent phosphorylation of MDM2 precedes p53 accumulation in response to DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96 (26), 14973-14977.
- Klaasen, C.D., 2001. Casarett and Doull's Toxicology: the basic science of poisons. In: Schnellmann, R.G. (Ed.), Toxic Responses of the Kidney, sixth ed. The McGraw-Hill Companies Inc., pp. 491-514.
- Korr, H., Botzem, B., Schmitz, C., Enzmann, H., 2001. N-Nitrosomorpholine induced alterations of unscheduled DNA synthesis, mitochondrial DNA synthesis and cell proliferation in different cell types of liver, kidney and urogenital organs in the rat. *Chemico-biological Interactions* 134 (2), 217-233.
- Kovacic, P., Jacintho, J.D., 2001. Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer. *Current Medicinal Chemistry* 8 (7), 773-796.
- Kowaltowski, A.J., Vercesi, A.E., 1999. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 26 (3-4), 463-71.
- Kriz, W., Bankir, L., 1988. A standard nomenclature for structure of the kidney. The Renal Commission of the International Union of Physiological Sciences (IUPS). *Kidney International* 33(1), 1-7.
- Kroetz, D.L., Huse, L.M., Thuresson, A., Grillo, M.P., 1997. Developmentally regulated expression of the CYP4A genes in the spontaneously hypertensive rat kidney. *Molecular Pharmacology* 52 (3), 362-372.
- Kurokawa, Y., Aoki, S., Matsushima, Y., Takamura, N., Imazawa, T., Hayashi, Y., 1986. Dose-response studies on the carcinogenicity of potassium bromate in F344 rats after long-term oral administration. *National Cancer Institute* 77 (4), 977-982.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., Hayashi, Y., 1990. Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate - a new renal carcinogen. *Environmental Health Perspectives* 87, 309-335.
- Ladner, R.D., 2001. The Role of dUTPase and Uracil-DNA Repair in Cancer Chemotherapy. *Current Protein and Peptide Science* 2, 361-370.

- Leslie, E.M., Deeley, R.G., Cole, S.P., 2005. Multidrug Resistance Proteins: Role of P-Glycoprotein, Mrp1, Mrp2, and Bcrp (Abcg2) in Tissue Defense. *Toxicology and Applied Pharmacology* 204 (3), 216–237.
- Lijinsky, W., Kovatch, R.M., Riggs, C.W., Walters, P.T., 1988. Dose-response study with N-nitrosomorpholine in drinking water of F-344 rats. *Cancer Research* 48 (8), 2089-2095.
- Linden, K.C., DeHaan, C.L., Zhang, Y., Glowacka, S., Cox, A.J., Kelly, D.J., Rogers, S., 2006. Renal expression and localization of the facilitative glucose transporters GLUT1 and GLUT12 in animal models of hypertension and diabetic nephropathy. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 290 (1), F205–F213.
- Loaiza-Perez, A.I., Kenney, S., Boswell, J., Hollingshead, M., Hose, C., Linehan, W.M., Worrell, R., Rubinstein, L., Sausville, E.A., Vistica, D.T., 2004. Sensitivity of renal cell carcinoma to aminoflavone: role of CYP1A1. *The Journal of Urology* 171 (4), 1688–1697.
- Lock, E.A., Hard, G.C., 2004. Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information. *Critical Reviews in Toxicology* 34 (3), 211–299.
- Lord, G.M., Cook, T., Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Williams, G., Pusey, C.D., 2001. Urothelial malignant disease and Chinese herbal nephropathy. *The Lancet* 358 (9292), 1515-1516.
- Lord, P., G., Nie, A., McMillian, M., 2006. Application of genomics in preclinical drug safety evaluation. *Basic Clinical Pharmacology and Toxicology* 98 (6), 537-546.
- Lühe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T., Ahr, H.J., 2003. A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling *in vivo* and *in vitro* employing cDNA microarrays. *Toxicological Sciences* 73 (2), 315–328.
- Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Volkel, W., Dekant, W., 2004. Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chemical Research in Toxicology* 17 (2), 234-242.
- Mally, A., Pepe, G., Ravoori, S., Fiore, M., Gupta, R.C., Dekant, W., Mosesso, P., 2005. Ochratoxin A causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats. *Chemical Research in Toxicology* (18) 1253 -1261
- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., Bezencon, C., Piguët, D., Mansourian, R., Holzwarth, J., Grigorov, M., Delatour, T., Mantle, P., Cavin, C., Schilter, B., 2006. A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicological Sciences* 89 (1), 120-134.

- Marnett, L.J., 1981. Polycyclic aromatic hydrocarbon oxidation during prostaglandin biosynthesis. *Life Sciences* 29 (6), 531-546.
- Masuda, S., 2003. Functional characteristics and pharmacokinetic significance of kidney-specific organic anion transporters, OAT-K1 and OAT-K2, in the urinary excretion of anionic drugs. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 18 (2), 91-103.
- Matsumoto, K., Tsuda, H., Iwase, T., Ito, M., Nishida, Y., Oyama, F., Titani, K., Ushijima, T., Nagao, M., Hirono, I., 1992. Absence of ras family point mutations at codons 12, 13 and 61 in N-ethyl-N-hydroxyethylnitrosamine- or N-nitrosomorpholine-induced renal cell tumors in rats. *Japanese Journal of Cancer Research* 83 (9):933-936.
- Matsushima, Y., Takamura, N., Imazawa, T., Kurokawa, Y., Hayashi, Y., 1986. Lack of carcinogenicity of potassium bromate after subcutaneous injection to newborn mice and newborn rats. *Sci. Rep. Res. Inst. Tohoku Univ.*, 33, 22-26.
- Mayer, J., Doubek, M., Doubek, J., Horky, D., Scheer, P., Stepanek, M., 2002. Reduced nephrotoxicity of conventional amphotericin B therapy after minimal nephroprotective measures: animal experiments and clinical study. *Journal of Infectious Diseases* 186 (3), 379–388.
- McCann, J., Choi, E., Yamasaki, E., Ames, B.N., 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences in the USA* 72 (12), 5135-5139.
- McClain, R.M., 1989. The significance of hepatic microsomal enzyme induction and altered thyroid function in rats: implications for thyroid gland neoplasia. *Toxicological Pathology* 17(2), 294-306.
- McClelland, M.L., Kallio, M.J., Barrett-Wilt, G.A., Kestner, C.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Gorbsky, G.J., Stukenberg, P.T., 2004. The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. *Current Biology* 14 (2), 131–137.
- McMorrow, T., Gaffney, M.M., Slattery, C., Campbell, E., Ryan, M.P., 2005. Cyclosporine A induced epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Nephrology Dialysis Transplantation* 20 (10), 2215-2225.
- Meighan-Mantha, R.L., Hsu, D.K., Guo, Y., Brown, S.A., Feng, S.L., Peifley, K.A., Alberts, G.F., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Richards, C.M., Winkles, J.A., 1999. The mitogen-inducible Fn14 gene encodes a type I transmembrane protein that modulates fibroblast adhesion and migration. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (46), 33166–33176.
- Mengs, U., Lang, W., Poch, J.A., 1982. The carcinogenic action of aristolochic acid in rats. *Archives of Toxicology* 51 (2), 107-119.

- Mengs, U., 1983. On the histopathogenesis of rat forestomach carcinoma caused by aristolochic acid. *Archives of Toxicology* 52 (3), 209-220.
- Miller, C., Kennington, L., Cooney, R., Kohjimoto, Y., Cao, L.C., Honeyman, T., Pullman, J., Jonassen, J., Scheid, C., 2000. Oxalate toxicity in renal epithelial cells: characteristics of apoptosis and necrosis. *Toxicology and Applied Pharmacology* 162 (2), 132-141.
- Misawa, H., Yamaguchi, M., 2001. Involvement of nuclear factor-1 (NF1) binding motif in the regucalcin gene expression of rat kidney cortex: the expression is suppressed by cisplatin administration. *Molecular and Cellular Biochemistry* 219 (1-2), 29-37.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M.M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S.M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., Mori, K., Barasch, J., Devarajan, P., 2005. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *The Lancet* 365 (9466), 1231-1238.
- Mishra, J., Ma, Q., Kelly, C., Mitsnefes, M., Devarajan, 2006. Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation. *Pediatric Nephrology* 21 (6), 856-863.
- Miyake, H., Gleave, M.E., Arakawa, S., Kamidono, S., Hara, I., 2002. Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential. *Journal of Urology* 167 (5), 2203-2208.
- Monks, T.J., Anders, M.W., Dekant, W., Stevens, J.L., Lau, S.S., van Bladeren, P.J., 1990. Glutathione conjugate mediated toxicities. *Toxicology and Applied Pharmacology* 106 (1), 1-19.
- Mori, K., Ogawa, Y., Tamura, N., Ebihara, K., Aoki, T., Muro, S., Ozaki, S., Tanaka, I., Tashiro, K., Nakao, K., 1997. Molecular cloning of a novel mouse aspartic protease-like protein that is expressed abundantly in the kidney. *FEBS Letters* 401 (2-3), 218-222.
- Mori, K., Kon, Y., Konno, A., Iwanagam, T., 2001. Cellular distribution of napsin (kidney-derived aspartic protease-like protein, KAP) mRNA in the kidney, lung and lymphatic organs of adult and developing mice. *Archives of Histology and Cytology* 64 (3), 319-327.
- Murata, M., Bansho, Y., Inoue, S., Ito, K., Onishi, S., Midorikawa, K., Kawanashi, S., 2001. Requirement of glutathione and cysteine in guanine-specific oxidation of DNA by carcinogenic potassium bromate. *Chemical Research in Toxicology* 14, 678-685.
- Nagai, J., Takano, M., 2004. Molecular aspects of renal handling of aminoglycosides and strategies for preventing the nephrotoxicity. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics* 19 (3), 159-170.

- Nagasawa, K., Nagai, K., Ishimoto, A., Fujimoto, S., 2003. Transport mechanism for lovastatin acid in bovine kidney NBL-1 cells: kinetic evidences imply involvement of monocarboxylate transporter 4. *International Journal of Pharmaceutics* 262 (1-2), 63–73.
- Nielsen, S., Frokiaer, J., Marples, D., Kwon, T.H., Agre, P., Knepper, M.A., 2002. Aquaporins in the kidney: from molecules to medicine. *Physiological Reviews* 82 (1), 205–244.
- Nishimura, J., Dewa, Y., Muguruma, M., Kuroiwa, Y., Yasuno, H., Shima, T., Jin, M., Takahashi, M., Umemura, T., Mitsumori, K., 2007. Effect of fenofibrate on oxidative DNA damage and on gene expression related to cell proliferation and apoptosis in rats. *Toxicological Sciences* 97 (1), 44–54.
- Nortier, J.L., Deschodt-Lanckman, M.M., Simon, S., Thielemans, N.O., de Prez, E.G., Depierreux, M.F., Tielemans, C.L., Richard, C., Lauwerys, R.R., Bernard, A.M., Vanherweghem, J.L., 1997. Proximal tubular injury in Chinese herbs nephropathy: monitoring by neutral endopeptidase enzymuria. *Kidney International* 51 (1), 288–293.
- Nortier, J.L., Martinez, M.C., Schmeiser, H.H., Arlt, V.M., Bieler, C.A., Petein, M., Depierreux, M.F., De Pauw, L., Abramowicz, D., Vereerstraeten, P., Vanherweghem, J.L., 2000. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (*Aristolochia fangchi*). *The New England Journal of Medicine* 342 (23), 1686–1692.
- Obrecht-Pflumio, S., Chassat, T., Dirheimer, G., Marzin, D., 1999. Genotoxicity of ochratoxin A by Salmonella mutagenicity test after bioactivation by mouse kidney microsomes. *Mutation Research* 446 (1), 95–102.
- Pfaller, W., 1982. Structure function correlation on rat kidney Advances in Anatomic Embryologic Cell Biology, vol. 70. Springer, Berlin Heidelberg, New York, pp. 1–106.
- Pfaller, W., Gstraunthaler, G., 1998. Nephrotoxicity testing *in vitro*—what we know and what we need to know. *Environmental Health Perspectives* 106 (Suppl 2), 559–569.
- Pfau, W., Schmeiser, H.H., Wiessler, M., 1990. 32P-postlabelling analysis of the DNA adducts formed by aristolochic acid I and II. *Carcinogenesis* 11 (9), 1627–1633.
- Phanish, M.K., Wahab, N.A., Colville-Nash, P., Hendry, B.M., Dockrell, M.E., 2006. The differential role of Smad2 and Smad3 in the regulation of pro-fibrotic TGFbeta1 responses in human proximal-tubule epithelial cells. *The Biochemical Journal* 393 (Pt 2), 601–607.
- Prie, D., Couette, S., Fernandes, I., Silve, C., Friedlander, G., 2001. P-glycoprotein inhibitors stimulate renal phosphate reabsorption in rats. *Kidney International* 60 (3), 1069–1076.

-
- Prozialeck, W.C., Lamar, P.C., Appelt, D.M., 2004. Differential expression of E-cadherin, N-cadherin and beta-catenin in proximal and distal segments of the rat nephron. *BMC Physiology* 4, 10.
- Quackenbush, J., 2001. Computational analysis of microarray data. *Nature Reviews Genetics* 2 (6), 418-427.
- Rached, E., Pfeiffer, E., Dekant, W., Mally, A., 2006. Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics? *Toxicological Sciences*. 92 (1), 78-86.
- Rasonyi, T., Schlatter, J., Dietrich, D.R., 1999. The role of alpha2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicological Letters* 104 (1-2), 83-92.
- Reginster, F., Jadoul, M., van Ypersele de Strihou, C., 1997. Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrology Dialysis Transplantation* 12 (1), 81-86.
- Rhodes, D.R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N., Varambally, R., Ghosh, D., Barrette, T., Pandey, A., Chinnaiyan, A.M., 2004. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101 (25), 9309-9314.
- Robisch, G., Schimmer, O., Goggelmann, W., 1982. Aristolochic acid is a direct mutagen in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Research* 105 (4), 201-204.
- Roch-Ramel, F., 1998. Renal transport of organic anions. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 7 (5), 517-524.
- Roos, P.H., Tschirbs, S., Hack, A., Welge, P., Wilhelm, M., 2004. Different mechanisms of handling ingested polycyclic aromatic hydrocarbons in mammalian species: organ-specific response patterns of CYP1A1-induction after oral intake of PAH-contaminated soils. *Xenobiotica* 34 (9), 781-795
- Ruegg, C.E., 1994. Preparation of precision-cut renal slices and renal proximal tubular fragments. for evaluating segment-specific nephrotoxicity. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 31 (3), 125-133.
- Ruepp, S., Boess, F., Suter, L., de Vera, M.C., Steiner, G., Steele, T., Weiser, T., Albertini, A., 2005. Assessment of hepatotoxic liabilities by transcript profiling. *Toxicology and Applied Pharmacology* 207 (2 Suppl), 161-170.
- Ryan, M.J., Johnson, G., Kirk, J., Fuerstenberg, S.M., Zager, R.A., Torok-Storb, B., 1994. HK-2: an immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. *Kidney International* 45 (1), 48-57.
-

- Ryser, S., Massiha, A., Piuz, I., Schlegel, W., 2004. Stimulated initiation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 (MKP-1) gene transcription involves the synergistic action of multiple cis-acting elements in the proximal promoter. *The Biochemical Journal* 378 (Pt 2), 473–484.
- Sadlier, D.M., Connolly, S.B., Kieran, N.E., Roxburgh, S., Brazil, D.P., Kairaitis, L., Wang, Y., Harris, D.C., Doran, P., Brady, H.R., 2004. Sequential Extracellular Matrix-focused and Baited-global Cluster Analysis of Serial transcriptomic profiles identifies candidate modulators of renal tubulointerstitial fibrosis in murine adriamycin-induced nephropathy. *Journal of Biological Chemistry* 279 (28), 29670 -29680.
- Saleh, S., El-Demerdash, E., 2005. Protective effects of L-arginine against cisplatin-induced renal oxidative stress and toxicity: role of nitric oxide. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* 97 (2), 91–97.
- Santiago, M.F., Perez-Reyes, P.L., Lopez-Aparicio, P., Recio, M.N., Perez-Albarsanz, M.A., 2006. Differential effects of PCBs on the induction of apoptosis machinery and PKC α translocation in rat renal tubular cell cultures. *Toxicology Letters* 163 (2), 91–100.
- Schauer-Vukasinovic, V., Langen, H., Giller, T., 2001. Detection of immunoreactive napsin A in human urine. *Biochimica et Biophysica Acta* 1524 (1), 51–56.
- Schmeiser, H.H., Bieler, C.A., Wiessler, M., van Ypersele de Strihou, C., Cosyns, J.P., 1996. Detection of DNA adducts formed by aristolochic acid in renal tissue from patients with Chinese herbs nephropathy. *Cancer Research* 56 (9), 2025-2028.
- Schmeiser, H.H., Frei, E., Wiessler, M., Stiborova, M., 1997. Comparison of DNA adduct formation by aristolochic acids in various *in vitro* activation systems by 32P-post-labelling: evidence for reductive activation by peroxidases. *Carcinogenesis* 18 (5), 1055-1062.
- Schuetzle, D., 1983. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environmental Health Perspectives* 47, 65-80.
- Stemmer, K., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H.J., Dietrich, D.R., 2007. Carcinogen-Specific Gene Expression Profiles in Short-term Treated Eker and Wild-type Rats Indicative of Pathways Involved in Renal Tumorigenesis. *Cancer Research* 67 (9), 4052-4068.
- Stewart, B.W., 1981. Generation and persistence of carcinogen-induced repair intermediates in rat liver *in vivo*. *Cancer Research* 41, 3238-3243.
- Stiborova, M., Fernando, R.C., Schmeiser H.H., Frei, E., Pfau, W., Wiessler, M., 1994. Characterization of DNA adducts formed by aristolochic acids in the target organ (forestomach) of rats by 32P-postlabelling analysis using different chromatographic procedures. *Carcinogenesis* 15 (6), 1187-1192.

- Stiborova, M., Frei, E., Breuer, A., Wiessler, M., Schmeiser, H.H., 2001. Evidence for reductive activation of carcinogenic aristolochic acids by prostaglandin H synthase -- (32)P-postlabeling analysis of DNA adduct formation. *Mutation Research* 493 (1-2), 149-160.
- Stiborova, M., Frei, E., Sopko, B., Sopkova, K., Markova, V., Lankova, M., Kumstarova, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H., 2003. Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Carcinogenesis* 24, 1695-1703.
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T., Creppy, E.E., 2001. Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Veterinary Research Communications* 25 (3), 205-223.
- Storen, O., Holm, H., Stormer, F.C., 1982. Metabolism of ochratoxin A by rats. *Applied Environmental Microbiology* 44 (4), 785-789.
- Stout, D.L., Hemminki, K., Becker, F.F., 1980. Covalent binding of 2-acetylaminofluorene, 2-aminofluorene, and N-hydroxy-2-acetylaminofluorene to rat liver nuclear DNA and protein in vivo and in vitro. *Cancer Research* 40 (10), 3579-3584.
- Sweeney, C., Fambrough, D., Huard, C., Diamonti, A.J., Lander, E.S., Cantley, L.C., Carraway, K.L., 2001. Growth factor-specific signaling pathway stimulation and gene expression mediated by ErbB receptors. *Journal of Biological Chemistry* 276 (25), 22685-22698.
- Talley, D.L., Peppers, S.C., Ray, K., Schuler, J.B., Koch, M.P., Caple, M.V.. Development of a Sensitive, High Throughput, Cell Based Assay for Use in Validation of Powered Cell Culture Medium Blenders. Sigma-Aldrich Corporation. *Poster*
- Thukral, S.K., Nordone, P.J., Hu, R., Sullivan, L., Galambos, E., Fitzpatrick, V.D., Healy, L., Bass, M.B., Cosenza, M.E., Afshari, C.A., 2005. Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers. *Toxicologic Pathology* 33 (3), 343-355.
- Tune, B.M., 1997. Nephrotoxicity of beta-lactam antibiotics: mechanisms and strategies for prevention. *Pediatric Nephrology* 11 (6), 768-772.
- Turesky, R.J., 2005. Perspective: ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* 18 (7), 1082-1090.
- Ueda, O., Kitamura, S., Kubo, R., Yano, Y., Kanzaki, Y., Fujimoto, T., Tatsumi, K., Ohta, S., 2001. Metabolism of 2-nitrofluorene, 2-aminofluorene and 2-acetylaminofluorenes in rat and dog and the role of intestinal bacteria. *Xenobiotica* 31 (1), 33-49.

- Umar, A., Boyer, J.C., Thomas, D.C., Nguyen, D.C., Risinger, J.I., Boyd, J., Ionov, Y., Perucho, M., Kunkel, T.A., 1994. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *Journal of Biological Chemistry* 269 (20), 14367-14370.
- Umemura, T., Kitamura, Y., Kanki, K., Maruyama, S., Okazaki, K., Imazawa, T., Nishimura, T., Hasegawa, R., Nishikawa, A., Hirose, M., 2004. Dose-related changes of oxidative stress and cell proliferation in kidneys of male and female F344 rats exposed to potassium bromate. *Cancer Sciences* 95(5):393-8.
- Uriu-Adams, J.Y., Rucker, R.B., Comisso, J.F., Keen, C.L., 2005. Diabetes and dietary copper Alter 67cu metabolism and oxidant defense in the rat. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 16 (5), 312– 320.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., Telser, J., 2004. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 266 (1-2), 37-56.
- Van der Wees, C., Jansen, J., Vrieling, H., van der Laarse, A., Van Zeeland, A., Mullenders, L., 2007. Nucleotide excision repair in differentiated cells. *Mutation Research* 614 (1-2), 16-23.
- Vainio, H., Hemminki, K., Wilbourn, J., 1985. Data on the carcinogenicity of chemicals in the IARC Monographs programme. *Carcinogenesis* 6 (11), 1653-1665.
- Walker, R., 2002. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 504, 249-255.
- Walters, F.P., Wise, R.W., Lakshmi, V.M., Rice, J.R., Zenser, T.V., Davis, B.B., 1986. Metabolism of the renal carcinogen FNT by peroxidases. *Carcinogenesis* 7 (9), 1411-1414.
- Waring, J.F., Ciurlions, R., Jolly, R.A., Heindel, M., Gagne, G., Fagerland, J.A., Ulrich, R.G., 2003. Isolated human hepatocytes in culture display markedly different gene expression patterns depending on attachment status. *Toxicology in Vitro* 17, 693–701.
- Weiland, C., Ahr, H.J., Vohr, H.W., Ellinger-Ziegelbauer, H., 2007. Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicology in Vitro* 21 (3), 466-491.
- Wilkinson, R., Hawks, A., Pegg, A.E., 1975. Methylation of rat liver mitochondrial deoxyribonucleic acid by chemical carcinogens and associated alterations in physical properties. *Chemico-Biological Interactions* 9, 157-167.
- Williams, G.M., 2001. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. *Toxicology* 166 (1-2), 3-10.

-
- Wirth, K.G., Ricci, R., Gimenez-Abian, J.F., Taghybeeglu, S., Kudo, N.R., Jochum, W., Vasseur-Cognet, M., Nasmyth, K., 2004. Loss of the anaphase-promoting complex in quiescent cells causes unscheduled hepatocyte proliferation. *Genes and Development* 18 (1), 88–98.
- Wu, M.X., 2003. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis* 8 (1), 11–18.
- Xie, J., Shaikh, Z.A., 2006. Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology* 224 (1-2), 56-65.
- Yadavilli, S., Vijay, A., Deutsch, W., 2007. Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair* [Epub ahead of print]
- Yamamoto, T., Noble, N.A., Cohen, A.H., Nast, C.C., Hishida, A., Gold, L.I., Border, W.A., 1996. Expression of transforming growth factor-beta isoforms in human glomerular diseases. *Kidney International* 49 (2), 461–469.
- Yamashita, A., Ohnishi, T., Kashima, I., Taya, Y., Ohno, S., 2001. Human SMG-1, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinase, associates with components of the mRNA surveillance complex and is involved in the regulation of nonsense-mediated mRNA decay. *Genes and Development* 15 (17), 2215-2228.
- Yan, X., Cao, L., Li, Q., Wu, Y., Zhang, H., Saiyin, H., Liu, X., Zhang, X., Shi, Q., Yu, L., 2005. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes to Cells* 10 (6), 617–626.
- Yang, B., Folkesson, H.G., Yang, J., Matthay, M.A., Ma, T., Verkman, A.S., 1999. Reduced osmotic water permeability of the peritoneal barrier in aquaporin-1 knockout mice. *The American Journal of Physiology* 276 (1 Pt 1), C76–C81.
- Yang, Y., Blomme, E. A., Waring, J.F., 2004. Toxicogenomics in drug discovery: from preclinical studies to clinical trials. *Chemico-Biological Interactions* 150 (1), 71-85.
- Zager, R.A., Johnson, A.C., 2001. Renal cortical cholesterol accumulation: an integral component of the systemic stress response. *Kidney International* 60, 2229–2310.
- Zaliznyak, T., Bonala, R., Johnson, F., de Los Santos, C., 2006. Structure and stability of duplex DNA containing the 3-(deoxyguanosin-N2-yl)-2-acetylaminofluorene (dG(N2)-AAF) lesion: a bulky adduct that persists in cellular DNA. *Chemical Research in Toxicology* 19 (6), 745-752.
- Zanic´-Grubisic´, T., Zrinski, R., Cepelak, I., Petrik, J., Radic´, B., Pepeljnjak, S., 2000. Studies of Ochratoxin A-Induced Inhibition of Phenylalanine Hydroxylase and Its Reversal by Phenylalanine. *Toxicology and Applied Pharmacology* 167, 132-139.
-

- Zenser, T.V., Balasubramanian, T.M., Mattammal, M.B., Davis, B.B., 1981. Transport of the renal carcinogen 3-hydroxymethyl-1-([3-(5-nitro-2-furyl)allylidene]amino) hydantoin by renal cortex and cooxidative metabolism by prostaglandin endoperoxide synthetase. *Cancer Research* 41 (6), 2032-2037.
- Zimmers, T.A., Jin, X., Hsiaom, E.C., McGrath, S.A., Esquela, A.F., Koniaris, L.G., 2005. Growth differentiation factor-15/macrophage inhibitory cytokine-1 induction after kidney and lung injury. *Shock* 23 (6), 543-548.
- Zhang, H., Wada, J., Kanwar, Y.S., Tsuchiyama, Y., Hiragushi, K., Hida, K., Shikata, K., Makino, H., 1999. Screening for genes up-regulated in 5/6 nephrectomized mouse kidney. *Kidney International* 56 (2), 549-558.
- Zhang, H., Wada, J., Hida, K., Tsuchiyama, Y., Hiragushi, K., Shikata, K., Wang, H., Lin, S., Kanwar, Y.S., Makino, H., 2001. Collectrin, a collecting duct-specific transmembrane glycoprotein, is a novel homolog of Ace2 and is developmentally regulated in embryonic kidneys. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (20), 17132-17139.
- Zhao, Y. Y., Sawyer, D. R., Baliga, R. R., Opel, D. J., Han, X., Marchionni, M. A., and Kelly, R. A. 1998. Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes. Persistence of ErbB2 and ErbB4 expression in neonatal and adult ventricular myocytes. *Journal of Biological Chemistry* 273, 10261-10269.
- Zhao, H., Watkins, J.L., Piwnica-Worms, H., 2002. Disruption of the checkpoint Kinase 1/Cell Division Cycle 25a pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA* 99 (23), 14795-14800.
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Leverson, J.D., Bossy-Wetzel, E., Fan, J.B., Abraham, R.T., Jiang, W., 2005. Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using Rna interference. *Molecular Biology of the Cell* 16 (7), 3187-3199.
- Zou, A.P., Imig, J.D., Ortiz de Montellano, P.R., Sui, Z., Falck, J.R., Roman, R.J., 1994. Effect of P-450 omega-hydroxylase metabolites of arachidonic acid on tubuloglomerular feedback. *American Journal of Physiology* 266 (6 Pt 2), F934-F941.

7 Abkürzungsverzeichnis

AA	Aristolochiasäure
Abb.	Abbildung
Acc.no.	'Accession number'
ATCC	'American Type Culture Collection'
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
cDNA	komplementäre DNA
CsA	Cyclosporin A
CTGF	'Connective Tissue Growth Factor'
dest.	destilliert
DMEM	'Dulbecco's Modified Eagles Medium'
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EC	'European Commission'
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	'Epidermal Growth Factor'
EGFR	'Epidermal Growth Factor Receptor'
EGTA	Ethylenglykol-bis(b-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetat
EPA	'Environmental Protection Agency'
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Ex/Em	Extinktion/Emission
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	'Food and Drug Administration'
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9.81 m/s ²)
GB	'GeneBank'
G2/M	Gap2/Mitose-Phase
GSH	Glutathion
h	Stunde
HBSS	'Hank's Balanced Salts Solution'
HK-2	Humane Nierenzelllinie
hPTCs	humane proximale Tubuluszellen
Hz	Hertz
IARC	'International Agency for Research on Cancer'

Ig	Immunglobulin
KBrO ₃	Kaliumbromat
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
L	Liter
Lsg	Lösung
min	Minute
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
ml	Milliliter
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
2NF	2-Nitrofluoren
nm	Nanometer
NNM	N-Nitrosomorpholin
NRK	'normal rat kidney cells'
OECD	'Organisation for Economic Co-operation and Development'
OTA	Ochratoxin A
PBS	'Phosphate buffered saline solution'
PCA	Principal Component Analysis = Hauptkomponentenanalyse
PCR	Polymerasekettenreaktion
pmol	Picomol
P/S	Penicillin/Streptomycin
QRTPCR	quantitative Real-Time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rPTCs	Ratten proximale Tubuluszellen
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sec	Sekunde
sog.	sogenannt
Ta	'Annealing'-Temperatur
TGF	'Transforming Growth factor'
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
UV	ultraviolett
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

8 Danksagungen

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Vohr betreut und ich danke diesem ganz herzlich für die Anregungen und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. Eckard von Keutz danke ich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit bei der Bayer HealthCare AG in Wuppertal.

Herrn Dr. Dr. Hans-Jürgen Ahr danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Wunderlich, Abteilung für Molekulare Parasitologie der Heinrich-Heine-Universität, danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Heidrun Ellinger-Ziegelbauer für die Betreuung im Bereich Toxicogenomics, die gründliche Durchsicht des Manuskripts und Ihre ständige Hilfsbereitschaft bei Fragen rund um die Molekular- und Zellbiologie – nicht zu vergessen die netten Reisen zu diversen Meetings!

Herrn Prof. Dr. Pfaller und Herrn Dr. Paul Jennings von der medizinischen Universität Innsbruck danke ich herzlich für die Bereitstellung und Behandlung der primären humanen Proben.

Frau Dr. Wasinska-Kempka danke ich für die Einführung in die Zellkultur.

Frau Dr. Elke Hartmann und Frau Dr. Ute Bach danke ich für die histopathologischen Bewertungen und die Beantwortung meiner Fragen.

Herrn Dr. F. Krötlinger, Herrn Dr. R. Eiben, Herrn Andreas Brockes, Frau Botz und Frau Weinand danke ich für die Durchführung der *in-vivo*-Studien.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei all den lieben Mitarbeitern des Labors Dr. Ellinger-Z., Labor Dr. Freyberger und Labor Dr. Vohr, die mir den Laboralltag so sehr erleichtert haben und mich so nett in Ihre Gemeinschaft aufgenommen haben.

Besonders danke ich Nicole Hellwig für die Hilfe in der Zellkultur, Kerstin Lotz für die Hilfe rund um Microarrays & Co und Wibke D'Acquisto ebenfalls für die Beantwortung der Fragen rund um die Zellkultur. Bei Margot Thiel und Sabine Michel-Kaulmann möchte ich mich neben der Hilfe im Laboralltag auch noch sehr herzlich für die nicht-biologischen Gespräche und Ihre Aufbauarbeit bedanken.

Ich möchte mich bei Martina Weingarten bedanken, dass Sie mir bei allen Fragen rund um Bürokratie und Organisation von Reisen so sehr geholfen hat.

Ein Dank gilt auch den Menschen, mit denen ich mehr oder weniger regelmäßig die Mittagspause verbracht habe und die ein wenig Ablenkung brachten: Holger Spiecker, Martin Müller, Lydia Koeper, Martina Wingenroth, Michael Manthey und Lutz Lofink.

Danke an diejenigen, die das Manuskript nochmal sorgfältig durchgelesen haben.

Lilli Podola, ich möchte Dir ganz besonders für die vielen Gespräche und dafür, dass Du einfach da warst, danken. Ich wünsche Dir noch viel Durchhaltevermögen!

Tausend Dank an all meine Freunde, die ich leider nicht alle aufzählen kann und die mich ganz besonders in den stressigen Phasen meines Lebens unterstützt haben. DANKE!!!

Ein sehr großer Dank gilt meiner Familie und meinem Freund Josi für Ihre Liebe und Geduld, ihr Verständnis und für ihre Unterstützung, ohne die ich es nicht geschafft hätte.

Teile der Arbeit wurden im Rahmen des EU-Projekts *Predictomics* durchgeführt.

9 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christina Weiland
Geburtsdatum: 12.03.1979
Geburtsort: Trier
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

08/1985 – 07/1989 Ausonius Grundschule Trier
08/1989 – 06/1998 Hindenburg-Gymnasium Trier

Studium

10/1998 – 03/2004 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
seit 05/2004 Promotion an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die Laborarbeiten wurden in der Abteilung für Spezielle Toxikologie der Bayer HealthCare AG in Wuppertal durchgeführt.

10 Vorträge und Veröffentlichungen

Vorträge

- 04/2005 – 04/2007 EU- Projekt *Predictomics*: Halbjährlich: Vortrag über die Ergebnisse
- 09/2005 Toxicogenomics Meeting (Darmstadt, Merck):
'Mechanistic Investigations on Nephrocarcinogens: Analysis with Affymetrix RAE230A Genechips'
- 2006 18th Meeting of the European renal cell study group Dublin);
eSi Meeting (Alicante); 7th Annual ecopa Workshop (Brüssel):
'Characterization of a renal cell model by gene expression analysis'

Poster:

- 06/2005 Affymetrix User Group Meeting (Berlin):
'2-Nitrofluorene Induced Expression Changes in Rat Kidney on Affymetrix Chips (RAE230A)'

Paper:

Weiland, C., Ahr, H.J., Vohr, H.W., Ellinger-Ziegelbauer, H., 2007. Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicology in vitro* 21 (3), 466-491.

Einige Teile der Dissertation sind noch unveröffentlicht. Weitere Publikationen sind vorgesehen.

11 Anhang

Tabelle 9: Gene, die nach Einwirken der genotoxischen Nephrokarzinogene verändert und in der Diskussion näher beschrieben wurden. Angegeben sind die Accession Nummer, der Gennamen mit den entsprechenden Abkürzungen, die zugehörige toxikologische Kategorie und der Mittelwert der Deregelationsfaktoren aus den zugehörigen 'Probe Sets' und den fünf (NNM, AA) oder drei (2NF) Replikaten zu jedem Zeitpunkt (d = Tag).

GB Accno	Gennamen	Abkürzung	Toxikologische Kategorie	NNM d3	NNM d7	NNM d14	AA d3	AA d7	AA d14	2NF d3	2NF d7	2NF d14
U02323	NRG1 Neuregulin-1 (NDF Neu differentiation factor)(GGF Glial growth factor)	NRG1, NDF, GGF, SMDF	Überleben / Proliferation	1,02	1,08	1,26	1,19	1,39	1,46	2,28	2,03	2,66
NM_031821	SNK Serum-inducible kinase (PLK2)	SNK, PLK2	Überleben / Proliferation	1,14	1,05	1,22	1,70	1,88	2,54	3,79	4,03	5,13
NM_019179	TYMS Thymidylate synthase	TYMS	Überleben / Proliferation	0,8	0,96	1,01	1,00	1,32	1,51	1,61	2,08	1,26
NM_012861	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferase	MGMT	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,22	0,97	0,96	1,28	1,46	2,22	1,71	1,84	1,92
BF548539	MDM2 Ubiquitin E3 ligase Mdm2 (Mouse double minute 2)	MDM2	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	0,77	1,01	1,41	1,18	1,39	2,22	2,65	1,83	1,97
U24174	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	CDKN1A, p21, WAF1, CIP1	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	2,55	1,41	1,50	8,33	8,77	6,36	9,68	9,14	19,4
NM_012923	CCNG1 Cyclin G1	CCNG1, CCNG	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,2	1,06	1,69	1,80	2,02	3,27	2,79	2,84	3,45
BI295890	CULL2 Cullin 2	CUL2	Oxidativer Stress / Protein Schädigung	0,94	1,16	1,04	0,98	1,20	1,18	1,95	1,31	1,69
AA800587	GPX1 Glutathione peroxidase 2	GPX2	Oxidativer Stress Detoxifizierung	1,22	1,14	1,13	1,69	1,49	1,54	3,74	4,44	4,68
J02679	NQO1 NADPH-Quinone Oxidoreductase (DIA4 Diaphorase)	NQO1, NMOR1, DIA4	Oxidativer Stress Detoxifizierung	1,05	1,16	1,05	2,54	1,93	2,18	4,67	3,46	3,29
NM_012844	EPHX1 Epoxide hydrolase 1 (microsomal xenobiotic hydrolase)	mEH, EPHX1	Oxidativer Stress Detoxifizierung	0,99	1,03	1,12	1,79	1,72	1,84	1,77	2,20	1,57

Fortsetzung Tabelle 9

BI303379	TWEAK receptor (Type 1 transmembrane protein FN14)	TNFRSF12A, FN14	Gewebeorganisation - Zelladhäsion	1,04	1,34	1,13	0,97	1,01	1,51	3,43	1,57	1,95
BMB392373	CEACAM1 Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 (ATP-dependent taurocholate-carrier protein)	CAECAM1	Gewebeorganisation - Zelladhäsion	0,96	1,06	0,97	1,09	1,00	1,07	2,28	1,44	1,74
BMB384116	EST similar to PI-3-kinase-related kinase SMG-1 isoform 2	SMG1	RNA-Schädigung	0,89	0,89	1,00	0,95	0,78	0,95	1,96	1,60	1,88
AW918273	DAZAP1 DAZ associated protein 1	DAZAP1	RNA-Schädigung	1,04	1,07	1,03	1,2	1,05	0,97	2,1	1,58	1,57
NM_017124	CD37 antigen	CD37	Inflammation	1,13	0,91	1,02	1,2	1,13	1,72	0,73	0,76	0,47
X57523	TAP1 Antigen peptide transporter 1 (APT1)(MTP1)	ABCB2,TAP1	Inflammation	2,36	0,26	1,26	1,17	1,14	5,75	3,00	0,90	0,91
BI279526	MHC class II RT1.D beta 1 chain	RT1-Dblh	Inflammation	1,27	0,73	1,11	1,22	0,88	1,72	0,80	0,96	0,73
NM_013169	CD3D CD3 antigen delta polypeptide (I-E-cell receptor T3 delta chain)	CD3D, T3D	Inflammation	1,10	1,02	1,41	1,13	2,15	4,57	1,44	0,39	2,49
AI170387	SCYB9 Small inducible cytokine B9 (MIG) Monokine induced by gamma interferon)(CXCL9)	CXCL9, SCYB9, MIG	Inflammation	1,05	0,83	1,11	1,15	1,61	3,66	0,81	0,79	0,95
U22520	SCYB10 Small inducible cytokine B10 (CXCL10)(IP-10) Interferon inducible protein 10)	SCYB10,CXCL10, INP10,MOBI	Inflammation	1,06	0,73	1,05	1,04	1,54	3,22	1,14	0,92	1,01
NM_053372	SLPI Secretory leukocyte protease inhibitor	SLPI	Inflammation	1,30	1,18	0,99	1,33	1,14	2,47	1,02	0,81	0,89
NM_053538	LAPTM5 Lysosomal-associated protein transmembrane 5 (GCD-10 Granule cell death-10) (Retinoic acid-inducible E3 protein)	LAPTM5, GCD-10	Inflammation	1,15	0,95	0,99	1,11	1,62	2,18	1,16	1,00	0,95

Fortsetzung Tabelle 9

A1230180	SF3A1 Splicing factor 3A subunit 1	SF3A1, SAPI14	RNA-Schädigung	1,18	0,8	1,05	1,16	1,16	1,23	1,11	2,13	1,54
M29294	SNRPN Small nuclear ribonucleoprotein associated protein N (snRNP-N)(Sm-N)	SNRPN, HCERN3, SMN	RNA-Schädigung	0,76	0,92	0,95	0,82	0,50	0,79	2,07	0,85	0,56
NM_053525	DDX52 DEAD-box protein 52 (ATP-dependent RNA helicase ROK1 -like)	DDX52,ROK1	RNA-Schädigung	0,87	0,92	1,38	0,77	0,79	1,52	2,32	1,52	1,01
U25746	HEL117 RNA helicase of 117 kDa	HEL117, LOC245957	RNA-Schädigung	0,99	1,05	0,94	0,93	0,87	0,85	1,74	1,29	1,16

Tabelle 10: Gene, die nach Einwirken des nicht-genotoxischen Nephrokarzinogens OTA verändert und in der Diskussion näher beschrieben wurden. Angegeben sind die Accession Nummer, der Gennamen mit den entsprechenden Abkürzungen, die zugehörige toxikologische Kategorie und der Mittelwert der Deregelationsfaktoren aus den zugehörigen 'Probe Sets' und aus drei Replikaten zu jedem Zeitpunkt (d = Tag).

GB Accno	Gennamen	Abkürzung	Toxikologische Kategorie	OTA d1	OTA d3	OTA d7
U24174	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	CDKN1A, p21, WAF1, CIP1	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,65	37,62	15,38
BF548539	MDM2 Ubiquitin E3 ligase Mdm2 (Mouse double minute 2)	MDM2	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,55	6,98	3,01
NM_012861	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferas	MGMT	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,12	1,71	2,15
NM_053435	XRCC1 X-ray repair cross-complementing group 1 (DNA-repair protein XRCC1)	XRCC1	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	2,03	1,33	1,71
B1288701	BTG2 B-cell translocation gene 2 (NGF-inducible anti-proliferative protein PC3) (TIS21)	BTG2, PC3	Oxidativer Stress / DNA Schädigung	1,19	2,77	3,61
B1284349	MYD116 Myeloid differentiation primary response gene 116 (PEG-3 Progression elevated gene 3)	MYD116, PEG-3	Oxidativer Stress / DNA Schädigung Apoptose	1,35	3,18	2,56
J05181	GCLC g-glutamyl-L-cysteinyl-synthetase, catalytic subunit (GCS heavy chain)	GCLC, GLCLC, g-GCS HC	Dedifferenzierung – verstärkter Oxidativer Stress	0,65	0,29	0,44
NM_017305	GCLM g-Glutamyl-L-cysteinyl-synthetase, modifier subunit (GCS light chain)	GCLM, GLCLR, g-GCS LC	Dedifferenzierung – verstärkter Oxidativer Stress	0,39	0,12	0,39
NM_053840	GGT1 Gamma-glutamyl transferase 1 (GGTP Gamma-glutamyl transpeptidase)	GGT1, GGTP	Dedifferenzierung – verstärkter Oxidativer Stress	0,73	0,44	0,92

Fortsetzung Tabelle 10

NM_053307	MSRA Methionine sulfoxide reductase A	MSRA	Dedifferenzierung – verstärkter Oxidativer Stress	0,59	0,32	0,15
A1176519	EST highly similar to IEX-1 Radiation-inducible immediate-early gene	IEX3, IEX1, GLY96	Stress	1,22	4,39	3,31
NM_024359	HIF1a Hypoxia-inducible factor 1	HIF1A	Stress - Hypoxie	6,82	11,08	4,69
NM_053357	CTNNB1 Beta-catenin	CTNNB1	Stress	2,38	2,56	1,54
NM_021835	c-JUN proto-oncogene (JUN V-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homolog)	JUN, RJG-9	Stress	1,69	2,83	1,75
U84410	Caspase 3 (apopain)(SCA-1 SREBP cleavage activity 1)	CASP3, CPP32	Apoptose	1,21	6,38	7,35
NM_022277	CASP8 Caspase-8	CASP8	Apoptose	1,98	1,37	6,36
NM_019904	Galactin-1 (LGALS1 lectin, galactose binding, soluble 1)	LGALS1	Apoptose	1,36	1,65	3,71
BF408447	PDCD5 programmed cell death 5	PDCD5, TFAR19	Apoptose	1,32	1,48	2,18
NM_031546	SMP-30 (Regucalcin)	RGN, SMP-30	Apoptose	0,59	0,2	0,18
NM_022381	PCNA Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	1,17	1,05	2,51

Fortsetzung Tabelle 10

BM383428	EST similar to MCM3 Minichromosome maintenance deficient 3 (DNA replication licensing factor MCM3)	MCM3, MCM4, MCM5	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	1,03	1,26	2,18
X64589	CCNB1 Cyclin B1, G2/M-specific	CCNB1	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	0,76	0,75	3,98
AW253821	CCNB2 Cyclin B2, G2/M-specific	CCNB2	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	1,08	0,97	5,39
BI285440	TUBB5 Tubulin beta-5	TUBB5	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	1,15	1,33	3,46
BM385445	TOP2A DNA-topoisomerase 2-alpha	TOP2A	DNA Replikation / Zellzyklusprogression / Zellteilung	0,52	0,43	4,95
U48220	CYP2D18 Cytochrome P450 2D18 (P450 2D-29/2D-35)	CYP2D18	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,63	0,37	0,55
AF007107	CYB5 Cytochrome b5, microsomal	CYB5	Dedifferenzierung - Biotransformation	1	1,01	0,49
NM_031543	CYP2E1 Cytochrome P450 2E1 (ethanol-inducible) (P450-J)	CYP2E1	Dedifferenzierung - Biotransformation	1,21	1,39	0,11
NM_022407	ALDH1A1 Aldehyde dehydrogenase 1A1 (RALDH Retinal dehydrogenase)	ALDH1A1	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,96	0,8	0,29
NM_017084	GNMT Glycine-N-methyltransferase	GNMT	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,86	0,13	0,34
NM_031509	GSTA1 Glutathione-S-transferase A1 (Ya1)	GSTA1	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,95	0,92	0,13
NM_017013	GSTA2 Glutathione-S-transferase A2 (Ya2)	GSTA2	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,78	0,55	0,34

Fortsetzung Tabelle 10

AB013455	NPT2 Renal sodium-dependent phosphate transport protein 2(SLC34A1)(SLC17A2)	SLC17A2, SLC34A1, NPT2	Dedifferenzierung - Membrantransport	0,7	0,27	0,34
AI454619	NAS1 Renal sodium/sulfate cotransporter (SLC13A1)	SLC13A1, NAS1, NAS1	Dedifferenzierung - Membrantransport	0,39	0,23	0,35
AF210250	NBC Sodium bicarbonate cotransporter (SLC4A4)	SLC4A4, NBC	Dedifferenzierung - Membrantransport	0,45	0,35	0,21
U51153	SDCT1 Sodium/dicarboxylate cotransporter 1 (SLC13A2)	SLC13A2, SDCT1, NADC1	Dedifferenzierung - Membrantransport	0,59	0,34	0,42
AF445995	OATK1 Kidney-specific organic anion transporter (SLC21A4)	SLC21A4, OATK1	Dedifferenzierung - Membrantransport	0,47	0,28	0,42
NM_013085	uPA Urokinase-type plasminogen activator (PLAU)	PLAU	Dedifferenzierung – Verlust der Zellstruktur	0,55	0,44	0,55
NM_013143	MEP1A Meprin A alpha-subunit	MEP1A	Dedifferenzierung	0,85	0,53	0,31
NM_021578	TGFB1 Transforming growth factor beta 1	TGFB1	Überleben / Proliferation	1,78	3,92	14,47
NM_031131	TGFB2 Transforming growth factor beta 2	TGFB2	Signaling	2,25	3,61	4,29
AI011448	NOTCH2 Notch homolog 2 (Neurogenic locus notch homolog protein 2)	NOTCH2	Regeneration	1,07	1,09	2,04
NM_012901	AMBPA Alpha-1-microglobulin/bikunin precursor	AMBPA, HCP, ITI, ITIL, UTI	Inflammation	2,22	1,57	2,41
BM390253	DCN Decorin (Bone proteoglycan II) (DSPG Dermatan sulfate proteoglycan-II)	DCN	Gewebeorganisation	0,89	1,19	3,08

Fortsetzung Tabelle 10

AA893484	FNI Fibronectin 1	FNI	Gewebeorganisation	0,85	0,9	2,37
NM_131905	CLDN16 Claudin-16 (Paracellin-1)	CLDN16	Regeneration	1,6	2,38	2,14
AJ011811	CLDN7 claudin 7	CLDN7	Gewebeorganisation - Zelladhäsion	1,49	2,35	2,42
BI288517	HNF-4A Hepatocyte nuclear factor 4-alpha (NR2A1)	HNF4A, NR2A1, TCF14	Dedifferenzierung - verminderte Genexpression	0,34	0,22	0,16

Tabelle 11: Gene, die in den primären proximalen Tubuluszellen (rPTCs) im Vergleich zur unbehandelten Ratteniere *in vivo* verändert waren und in der Diskussion näher erläutert sind. Angegeben sind die Accession Nummer, der Genname, die zugehörigen Abkürzungen, die Kategorie und die Mittelwerte aus den vier Replikaten zu jedem Zeitpunkt (d = Tag).

GB Accno	Genname	Abkürzung	Kategorie	d5	d7	d8	d10	d12	d14	Regulation in vitro vs. in vivo
M33936	CYP4A3 Cytochrome P450 4A3 (Lauric acid omega- hydroxylase)	CYP4A3	Dedifferenzierung - Biotransformation	0,01	0,01	0,01	0,01	0,001	0,01	↓
AF230096	RSOR Renal-specific oxidoreductase (ALDRL6 Aldehyde reductase-like 6)	MIOX, ALDRL6, KSP32, RSOR	Dedifferenzierung - Differenzierung/ Organogenese	0,01	0,01	0,004	0,003	0,01	0,004	↓
NM_020976	TMEM27 Transmembrane protein 27 (Collectrin)(Collecting duct-specific transmembrane glycoprotein)	TMEM27, NX17	Dedifferenzierung - Differenzierung/ Organogenese	0,02	0,05	0,04	0,03	0,03	0,02	↓
J05181	GCLC g- glutamyl-cysteiny- synthetase. catalytic subunit (GCS heavy chain)	GCLC, GLCLC, g-GCS HC	Dedifferenzierung - oxidativer Stress	0,03	0,03	0,02	0,02	0,02	0,02	↓
NM_017305	GCLM g-Glutamyl-cysteiny- synthetase. modifier subunit (GCS light chain)	GCLM, GLCLR, g-GCS LC	Dedifferenzierung - oxidativer Stress	0,29	0,58	0,35	0,27	0,17	0,22	↓
BG671549	SOD2 Manganese-Superoxidedismutase 2. mitochondrial	SOD2, Mn-SOD	Dedifferenzierung - oxidativer Stress	0,29	0,28	0,28	0,3	0,25	0,35	↓
NM_012880	SOD3 Copper-zinc superoxide dismutase. extracellular	SOD3	Dedifferenzierung - oxidativer Stress	0,32	0,7	0,59	0,66	0,47	0,39	↓
NM_012520	CAT Catalase	CAT, CAS1	Dedifferenzierung - oxidativer Stress	0,13	0,19	0,13	0,17	0,11	0,17	↓
NM_031670	NAPSA Napsin A aspartic peptidase (KDAP Kidney-derived aspartic protease-like protein)	NAPSA, KDAP	Dedifferenzierung - Proteinmetabolismus	0,23	0,46	0,49	0,41	0,37	0,31	↓
AW144216	EAP Glutamyl aminopeptidase (ENPEP)	ENPEP, APA	Dedifferenzierung - Proteinmetabolismus	0,18	0,45	0,29	0,24	0,17	0,21	↓

Fortsetzung Tabelle 11

AI236027	CAMK2N1 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 1	CAMK2N1	Dedifferenzierung – Signaltransduktion	0,14	0,32	0,5	1,16	1,29	1,28	↓
BE099992	CAMKK2 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase 2 beta	CAMKK2	Dedifferenzierung – Signaltransduktion	2,58	1,72	1,59	1,21	1,5	1,25	↓
L48060	PRLR Prolactin receptor	PRLR	Dedifferenzierung – Signaltransduktion	0,06	0,1	0,1	0,05	0,07	0,06	↓
NM_052802	KAP Kidney androgen-regulated protein	KAP	Dedifferenzierung – Signaltransduktion	0,01	0,001	0,002	0,0003	0,0002	0,0002	↓
U39555	EAAT3 Excitatory amino acid transporter 3	SLC1A1, EAAT3, EAAC1	Dedifferenzierung – Verlust nierenspezifischer Funktionen	0,09	0,99	0,07	0,06	0,06	0,05	↓
NM_031584	OCT2 Organic cation transporter 2 (SLC22A2)	SLC22A2, OCT2	Dedifferenzierung – Verlust nierenspezifischer Funktionen	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	↓
A1454619	NAS1 Renal sodium/sulfate cotransporter (SLC13A1)	SLC13A1, NAS1I, NAS1	Dedifferenzierung – Verlust nierenspezifischer Funktionen	0,02	0,09	0,06	0,02	0,02	0,02	↓
A1408948	CA2 Carbonic anhydrase 2	CA2	Dedifferenzierung – Verlust nierenspezifischer Funktionen	0,28	0,5	0,35	0,37	0,21	0,2	↓
NM_017321	IRE-BP1 Iron-responsive element binding protein 1 (Aconitase)	ACO1, IREB1, IREBP	Dedifferenzierung – Verlust nierenspezifischer Funktionen	0,27	0,34	0,26	0,25	0,24	0,28	↓
BI303379	TWEAK receptor (Type 1 transmembrane protein FN14)(TNFRSF12A)	TNFRSF12A, FN14	Stress	32,74	26,57	28,76	34,06	31,94	26,82	↑
A1176519	EST highly similar to IEX-1 Radiation-inducible immediate-early gene	IER3, IEX1, GLY96	Stress	10,99	8,3	9,53	8,11	8,38	9,03	↑
NM_012551	EGR-1 Early growth response protein 1 (Krox-24) (NGFI-A)	EGR-1, NGFI-A, KROX24	Stress	7,01	6,5	8,01	5,9	7,02	12,8	↑

Fortsetzung Tabelle 11

BE110108	MKP1 MAP Kinase phosphatase-1 (PTPN16 Protein tyrosine phosphatase non-receptor type 16)	DUSP1, MKP1, PTPN16	Stress	2,22	3,06	2,31	2,68	2,58	3,42	↑
A1170362	NFKB2 Nuclear factor NF-kappa-B p100 subunit (NFKB p100)	NFKB2, p100, p52	Stress	3,68	1,55	2,04	1,78	1,51	1,7	↑
NM_012532	CP Ceruloplasmin	CP	Stress	0,71	4,67	4,62	11,11	11,33	11,33	↑
A1072045	FGA Fibrinogen alpha chain	FGA	Stress	2,34	12,94	6,27	4,47	4,69	9,77	↑
NM_130741	LCN2 Lipocalin 2 (NGAL Neutrophil gelatinase-associated lipocalin)	LCN2	Stress	82,05	122,3	150,98	133,53	120,25	81,02	↑
NM_012580	HO-1 Heme Oxygenase 1, microsomal	HMOX1, HO-1	Stress – Oxidativer Stress	15,36	5,14	3,3	3,77	7,9	12,67	↑
J02679	NQO1 NADPH-Quinone Oxidoreductase (DIA4 Diaphorase)	NQO1, NMOR1, DIA4	Stress–Oxidativer Stress	8,9	2,23	2,18	1,65	1,88	4,71	↑
AA800587	GPX2 Glutathione peroxidase 2	GPX2	Stress– Oxidativer Stress	3,11	2,55	2,48	1,63	1,52	1,49	↑
BM83531	MT2 MT-II Metallothionein-II	MT2	Stress–Oxidativer Stress	3,02	3,42	3,7	1,95	2,43	1,98	↑
NM_031970	HSP27 Heat shock protein 27 kDa	HSPB1, HSP27	Stress–Oxidativer Stress	4,26	4,84	4,34	3,06	2,79	3,52	↑
AF235993	BAX Bcl2-associated X protein	BAX	Stress - Apoptose	2,61	2,41	3,26	3,09	3,77	3,06	↑

Fortsetzung Tabelle 11

NM_031677	FHL2 Four and a half LIM domains 2 (SLIM3)	FHL2, SLIM3, DRAL	Stress- Apoptose	5,95	3,64	4,26	2,82	3,67	3,37	↑
U84410	Caspase 3 (apoptain)(SCA-1 SREBP cleavage activity 1)	CASP3, CPP32	Stress- Apoptose	6,22	4,06	5,17	4,43	4,47	4,1	↑
BF408447	PDCD5 programmed cell death 5	PDCD5, TFAR19	Stress- Apoptose	4,39	4,54	4,34	4,32	3,87	4,13	↑
BI296301	MDM2 Ubiquitin E3 ligase Mdm2 (Mouse double minute 2)	MDM2	Stress- Überleben	6,87	5,38	5,46	4,86	5,58	6,13	↑
NM_022274	BIRC5 Baculoviral IAP repeat-containing protein 5 (Apoptosis inhibitor survivin)	BIRC5, API4	Stress- Überleben	4,65	2,4	2,11	0,94	1,19	1,09	↑
AF314657	CLU Clusterin	CLU	Stress- Überleben	7,1	9,61	13,58	14,39	17,44	12,83	↑
AI010427	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	CDKN1A, WAF1, CIP1	Stress- Regulation der Proliferation	9,42	8,2	8,41	9,71	10,85	10	↑
BI288701	BTG2 B-cell translocation gene 2 (NGF-inducible anti-proliferative protein PC3)	BTG2, PC3	Stress- Regulation der Proliferation	11,91	8,77	8,1	8,67	8,47	6,99	↑
X00469	CYP1A1 Cytochrome P450 1A1 (aromatic compound-inducible)	CYP1A1	Metabolismus	13,59	3,84	2,83	2,44	1,59	1,86	↑
NM_012498	AKR1B4 Aldo-keto reductase IB4 (AKR1B1)(low Km aldose reductase: cytoplasmic)(ALDR1)	AKR1B1, ALDR1	Metabolismus	4,64	4,22	4,37	4,47	4,72	4,71	↑
AI233740	AKR1B8 Aldo-keto reductase IB8 (Aldose reductase-like protein)	AKR1B8, FGFRP, AR	Metabolismus	17,29	9,13	7,75	3,73	3,59	6,79	↑

Fortsetzung Tabelle 11

U07202	ASNS Asparagine synthetase [glutamine-hydrolyzing]	ASNS	Metabolismus - Anabolismus	12,96	11,16	8,19	6,61	6,77	9,4	↑
BG380693	EST highly similar to PYCS Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase	PYCS, PSCS	Metabolismus - Anabolismus	3,26	3,25	2,86	2,55	2,72	3,16	↑
AB066224	CAT1 High-affinity cationic amino acid transporter-1 (SLC7A1)	SLC7A1, CAT1	Membrantransport	4,43	3,17	3,3	3,31	2,72	3,22	↑
NM_013134	HMGCR 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMG-CoA-reductase)	HMGCR	Metabolismus - Anabolismus	3,13	2,7	3,45	2,87	2,72	2,19	↑
NM_017006	G6PD Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	G6PD	Metabolismus - Anabolismus	3,96	2,83	3,24	2,36	2,93	3,49	↑
A1412958	EST similar to IOPPP Inorganic pyrophosphatase (PPA1)	PPA1, IOPPP	Metabolismus	5	3,34	3,12	1,9	1,93	2,54	↑
B1284218	GLUT1 Glucose transporter type 1 erythrocyte/brain (SLC2A1)	SLC2A1, GLUT1	Membrantransport	4,2	2,4	2,78	2,42	3,53	3,87	↑
NM_030834	MCT3 Monocarboxylate transporter 3 (MCT4) (SLC16A3)	SLC16A3, MCT4, MCT3	Membrantransport	29,44	18,69	18,65	17,03	18,19	18,98	↑
A1059506	MRP1 Multiple drug resistance protein 1 (ABCC1)	ABCC1, MRP1	Membrantransport	2,15	1,95	2,55	2,19	3,04	2,7	↑
NM_012690	MDR2 Multidrug resistance 2 (P-glycoprotein 3)(ABCB4)	ABCB4, MDR2	Membrantransport	2,15	1,95	2,55	2,19	3,04	2,7	↑
AB046616	HNRNPC Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C	hnRNPC	RNA-Metabolismus	4,59	4,13	4,21	3,91	3,56	3,14	↑
NM_017063	KPNB1 Karyopherin beta-1 (Importin beta-1)	KPNB1, IMPNB	Intrazellulärer Transport	11,41	5,72	5,94	4,01	4,98	5,13	↑

Fortsetzung Tabelle 11

A W333924	XPO1 Exportin 1 (CRM1)	CRM1, XPO1	Intrazellulärer Transport	4,18	2,47	2,65	1,7	1,8	1,84	↑
B1285575	COL1A1 Collagen type I alpha 1	COL1A1	Zelladhäsion / Migration	0,45	0,9	1,534	4,03	7,95	14,34	↑
B1282748	COL1A2 Collagen type I alpha 2	COL1A2	Zelladhäsion / Migration	0,22	0,61	0,94	3,12	5,33	10,86	↑
B1275716	COL3A1 Collagen type III alpha 1	COL3A1	Zelladhäsion / Migration	0,08	0,24	0,37	0,9	2,09	3,83	↑
BE108345	COL12A1 Collagen type XII alpha 1	COL12A1	Zelladhäsion / Migration	0,49	0,92	0,86	1,18	1,12	1,79	↑
B1275624	LAMC1 Laminin gamma 1	LAMC1	Zelladhäsion / Migration	0,96	1,25	1,41	1,41	1,82	2,42	↑
AA893484	FN1 Fibronectin 1	FN1	Zelladhäsion / Migration	12,06	11,24	15,68	18,59	22,5	19,91	↑
B1296340	CDH11 Cadherin-11	CDH11	Zelladhäsion / Migration	0,15	0,44	0,56	2,17	2,43	3,42	↑
NM_012967	ICAM1 Intercellular adhesion molecule-1	ICAM1	Zelladhäsion / Migration	2,66	2,79	2,99	3,58	3,51	3,46	↑
NM_031140	VIM Vimentin	VIM	Zytoskelett	16,33	16,87	17,78	15,98	19,3	19,61	↑
BF281337	KRT8 Cytokeratin 8 (Keratin, type II cytoskeletal 8 K2C8)	KRT8	Zytoskelett	5,28	4,08	5,25	5,09	5,57	3,73	↑
BM383428	EST similar to MCM3 Minichromosome maintenance deficient 3	MCM3, MCMD, MCM3D3	DNA-Replikation	9,97	3,66	4,18	1,64	1,93	1,98	↑
A1145081	EST strongly similar to MCM4 Minichromosome maintenance deficient 4 (CDC21 homolog)	MCM4, CDC21	DNA-Replikation	5,85	3,23	2,65	1,24	1,41	1,75	↑
U17565	MCM6 DNA replication licensing factor (MCM6 Mini chromosome maintenance deficient 6)	MCM6, MCM6D6	DNA-Replikation	9,6	4,25	4,68	1,72	1,59	2,04	↑

Fortsetzung Tabelle 11

AI599678	EST highly similar to MCM7 Mini chromosome maintenance deficient 7	MCM7, MCM7, CDC47	DNA-Replikation	4,99	2,28	2,70	1,84	1,93	1,49	↑
NM_022381	PCNA Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	DNA-Replikation	2,3	1,29	1,09	0,61	0,61	0,75	↑
BEI08911	PRIM1 Primase polypeptide 1 (DNA primase p49 subunit)	PRIM1	DNA-Replikation	5,36	3,45	3,18	1,95	1,74	2,03	↑
BF283113	RFC2 Replication factor C subunit 2	RFC2	DNA-Replikation	2,58	1,23	1,51	0,96	1,11	1,02	↑
AI103093	EST strongly similar to RFC3 Replication factor C subunit 3 (RF-C 38 kDa subunit)	RFC3	DNA-Replikation	4,36	1,89	2,53	1,86	2,32	1,74	↑
BI291451	EST highly similar to RFC4 Replication factor C4 (Activator 1 37 kda subunit)	RFC4	DNA-Replikation	4,86	2,63	2,57	1,33	1,52	1,60	↑
NM_053480	POLA2 DNA polymerase alpha 2 (DNA polymerase subunit B)	POLA2	DNA-Replikation	1,80	1,05	0,97	0,63	0,55	0,5	↑
NM_030855	LIG1 DNA ligase I	LIG1	DNA-Replikation	3,74	2,37	2,54	1,54	1,51	1,7	↑
NM_017141	POLB DNA polymerase beta (Polymerase (DNA directed) beta)	POLB	DNA-Replikation	2,84	2,86	3,00	3,22	2,81	2,42	↑
NM_012861	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferase	MGMT	DNA-Replikation	2,13	3,44	3,49	4,65	4,58	4,17	↑
NM_019296	CDC2 Cell division cycle 2 protein kinase (CDK1 Cyclin dependent kinase I)	CDC2A, CDK1	Zellzyklus / Proliferation	8,63	3,93	3,52	1,12	1,4	1,79	↑
X64589	CCNB1 Cyclin B1, G2/M-specific	CCNB1	Zellzyklus / Proliferation	10,5	4,58	4,94	1,06	1,42	1,59	↑

Fortsetzung Tabelle 11

AI408269	Kinetochores protein Spe25 (AD024)	Spe25, AD024	Zellzyklus / Proliferation	9,26	4,13	3,63	1,32	1,81	1,73	↑
AW253880	KIF1C Kinesin family member C1 (KNSL2 Kinesin-like 2)(KRPI Kinesin-related protein 1)	KNSL2, KIF1C, HSET, KRPI	Zellzyklus / Proliferation	2,39	1,05	1,01	0,35	0,39	0,42	↑
L09752	CCND2 Cyclin D2. G1/S-specific	CCND2, VIN-1	Zellzyklus / Proliferation	0,78	1,43	2,06	4,19	5,54	7,83	↑
NM_053593	CDK4 Cyclin-dependent kinase 4	CDK4	Zellzyklus / Proliferation	3,29	2,54	3,12	2,76	3,23	2,62	↑
U05341	CDC20 Cell division cycle 20 (p55CDC)	CDC20	Zellzyklus / Proliferation	6,26	2,99	2,75	0,66	1,05	1,04	↑
NM_080400	CHEK1 Checkpoint kinase 1	CHEK1, CHK1, CTL	Zellzyklus / Proliferation	7,95	5,55	4,38	3,12	2,25	2,75	↑
BF420705	TGFB2 Transforming growth factor beta 2	TGFB2	Signaltransduktion	4,59	5,58	5,36	10,9	10,95	12,04	↑
BF552908	SMAD3 (MADH3 Mothers against decapentaplegic homolog 3)	SMAD3, MADH3	Signaltransduktion	2,39	3,93	3,81	3,46	3,25	3,08	↑
NM_019216	GDF15 Growth differentiation factor 15 (MIC-1 Macrophage inhibitory cytokine-1)	GDF15, MIC1, SIBF	Signaltransduktion	7,49	7,77	5,90	3,02	2,25	2,05	↑
NM_053840	GGT1 Gamma-glutamyl transferase 1 (GGTP Gamma-glutamyl transpeptidase)	GGT1, GGTP	Charakteristisch für die Niere	0,07	0,15	0,15	0,11	0,13	0,13	↓
L07268	AQP1 Aquaporin 1	AQP1, CHIP28	Charakteristisch für die Niere	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03	0,05	↓

Tabelle 12: Gene, die zwischen *in vivo* und allen *in-vitro*-Modellen nach OTA-Behandlung verglichen wurden. Angegeben sind die Accession Nummer, der Gennamen, die zugehörigen Abkürzungen und die Mittelwerte der Expressionswerte aus den zugehörigen 'Probe Sets' und den vier Replikaten (rPTCs) oder drei Replikaten zu jedem Zeitpunkt (d=Tag; LD = Low dose; HD = High dose).

GB Accno	Gennamen	Abkürzung	in vivo OTA d1	in vivo OTA d3	in vivo OTA d7	OTA rPTCs d1	OTA rPTCs d3	OTA NRK-52E d1	OTA NRK-52E d3	OTA hPTCs d1	OTA hPTCs d3	OTA HK2 d1 (LD)	OTA HK2 d3 (LD)	OTA HK2 d1 (HD)	OTA HK2 d3 (HD)
A1104523	UBE21 Ubiquitin conjugating enzyme E21 (SUMO-1-protein ligase)	UBE21, UBC9, UBC9E9	1,80	2,62	1,46	2,96	2,24	1,59	1,35	1,37	7,03	2,58	1,74	7,94	8,36
NM_024401	AVIL Advillin (Pervin)	AVIL	1,94	3,86	1,68	9,13	9,78	10,32	5,51	19,26	32,85	5,84	0,91	37,38	13,25
AF035963	KIM-1 Kidney injury molecule 1	KIM-1	0,50	4,91	163,20	1,17	0,98	1,44	1,30	1,68	0,84	1,01	2,49	0,78	0,80
U24174	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	CDKN1A, p21, WAF1, CIP1	1,65	37,62	15,38	1,72	3,27	4,71	5,00	0,73	1,48	1,05	1,54	1,29	3,66
A1412143	TXNL Thioredoxin-related protein	TXNL, TRP32	1,93	3,47	1,70	4,97	2,96	3,42	1,73	0,66	1,40	1,05	0,75	1,33	1,66
AA891681	STRAP Serine/threonine kinase receptor associated protein (UNRIP UNR-interacting protein) [predicted]	STRAP, UNRIP, MAWD	2,71	4,64	1,87	7,10	3,96	3,06	1,74	0,92	0,94	0,97	0,73	0,71	1,18
BM388545	SUPT16H suppressor of Ty 16 homolog (S. cerevisiae) [predicted]	SUPT16H, SPT16, CDC68	2,99	3,87	2,99	9,70	8,57	7,04	3,43	1,02	1,02	0,96	1,22	1,00	0,96
NM_024377	GNG5 Guanine nucleotide-binding protein gamma 5	GNG5, GNG15	2,12	2,30	1,37	8,07	8,27	3,37	3,34	1,74	0,58	1,00	0,99	1,29	0,71
BF548539	ESTs, Moderately similar to MDM2 Ubiquitin E3 ligase Mdm2 (Mouse double minute 2)	MDM2	1,55	6,99	3,01	3,16	2,64	4,26	2,62	1,20	4,32	0,85	1,30	1,50	0,59
A1233786	RPL22 Ribosomal protein L22	RPL22	2,60	3,33	1,74	5,82	2,00	5,58	1,70	3,31	2,72	1,23	1,08	2,24	1,32

Fortsetzung Tabelle 12

B1296499	EST highly similar (99%) to TM9SF3 Transmembrane 9 superfamily member 3 (SMBP SM-I1044 binding protein) (EP70-P-iso)	TM9SF3, SMBP	2,41	3,77	1,73	5,20	3,43	4,48	1,91	2,49	2,42	2,08	1,13	2,78	2,86
AF336872	ITGB5 Integrin beta 5 subunit	ITGB5	1,76	2,47	1,40	2,73	2,38	2,70	1,55	2,23	1,63	1,43	1,14	2,76	3,61
NM_017290	ATP2A2 Ca ⁺⁺ -ATPase, cardiac muscle, slow twitch 2	ATP2A2	2,32	2,36	1,55	3,93	4,77	2,90	2,08	1,19	2,63	2,34	1,27	3,04	2,54
BM392358	CDKL2 Cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase) (predicted)	CDKL2	1,63	2,82	1,73	2,86	1,96	4,48	1,25	2,16	4,95	1,26	0,88	1,51	1,17
NM_031662	CAMKK1 Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase 1 alpha	CAMKK1, CAMKKA	2,28	1,90	1,17	2,64	1,68	1,64	1,72	2,40	3,10	1,07	0,95	1,36	1,21
B1278862	TOR1AIP2 Torsin A interacting protein 2 (LULL1 Lumenal domain like LAP1)	TOR1AIP2, LULL1	1,71	2,08	1,09	4,37	2,24	2,04	1,73	2,72	2,14	1,44	0,86	1,48	1,20
NM_031044	HNMT Histamine N-methyltransferase	HNMT	0,49	0,15	0,22	2,35	5,32	1,43	3,97	2,58	2,35	1,18	1,24	1,11	2,77
NM_031543	CYP2E1 Cytochrome P450 2E1 (ethanol-inducible)(P450-J)	CYP2E1	1,20	1,39	0,11	0,87	0,79	0,87	0,92	2,83	0,86	1,25	0,70	2,25	1,10
B1289589	EST Highly similar to ATP6A1 Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A, ubiquitous isoform (ATP6V1A1)	ATP6V1A, ATP6V1A1, TP6A1, VPP2	0,79	1,00	0,43	1,25	1,00	1,93	1,08	2,43	1,23	1,15	1,13	1,95	1,41
NM_013084	ACADSB Acyl-Coenzyme A dehydrogenase short-branched chain	ACADSB, 2-MEBCAD, ACAD7, SBCAD	0,59	0,61	0,29	2,53	0,83	2,95	0,94	2,60	1,82	1,40	0,78	1,60	0,83
NM_022198	CLCN4 Chloride channel protein 4	CLCN4	0,60	0,65	0,45	4,34	1,70	1,05	2,28	1,86	0,59	1,53	0,95	0,96	0,76
U51153	SDCT1 Sodium/dicarboxylate cotransporter 1 (SLC13A2)	SLC13A2, SDCT1, NADCI	0,59	0,34	0,42	4,06	5,30	0,42	2,71	5,35	0,69	0,97	2,32	1,18	2,39

Fortsetzung Tabelle 12

NM_024388	NGF1B Nerve growth factor induced protein 1-B (Nur77)(NR4A1)	NR4A1, NGF1B, NUR77	1,57	1,45	2,01	1,15	0,96	1,34	0,95	2,79	1,62	1,12	1,22	2,39	0,98
A1598402	EST similar to COL6A1 collagen type VI alpha 1	COL6A1	0,96	1,08	3,06	1,42	0,43	0,89	1,09	3,09	2,34	1,11	1,06	2,22	1,92
AW253821	EST similar (75%) to CCNB2 Cyclin B2, G2/M-specific	CCNB2	1,08	0,97	5,39	0,47	1,06	0,68	1,21	0,93	3,19	1,23	0,99	1,55	0,96
A1407985	CKS1B CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B (Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 1)	CKS1, CKS1B, sid1334	1,07	1,18	2,28	1,17	0,72	1,08	1,08	2,48	2,24	1,08	1,29	1,88	3,43
A1409259	EST similar to RACGAP1 Rac GTPase-activating protein 1	RACGAP1	0,86	0,76	2,75	0,46	0,90	0,82	1,08	1,30	4,00	1,13	1,40	2,26	3,13
BF283488	MRPL11 Mitochondrial ribosomal protein L11	MRPL11	0,60	0,41	0,75	0,41	0,35	0,37	0,92	1,89	1,24	1,08	1,06	1,68	1,19
B1289416	MRPS25 Mitochondrial ribosomal protein S25 [predicted]	MRPS25	0,59	0,36	0,51	0,61	0,40	0,69	0,73	0,78	1,14	0,78	0,97	1,00	0,76
B1285575	COL1A1 Collagen type I alpha 1	COL1A1	0,91	0,85	2,13	0,45	0,20	0,83	1,03	1,29	1,11	0,91	0,93	1,01	1,03
AA893484	FNI Fibronectin 1	FNI	0,85	0,90	2,37	0,63	0,42	0,83	0,70	2,39	0,52	1,03	0,83	1,39	0,54
NM_019904	Galectin-1 (LGALS1 lectin, galactose binding, soluble 1)	LGALS1	1,37	1,65	3,71	3,10	0,17	0,90	1,22	4,57	1,26	0,93	0,92	1,80	0,75
BM383428	EST similar to MCM3 Minichromosome maintenance deficient 3 (DNA replication licensing factor MCM3)	MCM3, MCM2, MCM3	1,03	1,26	2,18	0,87	1,05	0,80	1,62	0,74	1,04	0,83	1,58	0,52	1,80
A1599678	EST highly similar to MCM7 Mini-chromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	MCM7, MCM2, CDC47	1,58	1,19	2,53	0,75	0,66	0,81	1,00	1,26	0,91	0,87	1,80	1,12	1,75

Fortsetzung Tabelle 12

BF408447	PDCD5 programmed cell death 5 [predicted]	PDCD5, FEAR19	1,32	1,48	2,18	0,92	0,73	1,32	1,42	1,12	0,56	0,92	0,88	0,93	0,97
BF396270	hnRNP A1 Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (HNRPA1)	HNRPA1	1,38	1,55	2,76	0,78	0,80	0,72	1,00	1,32	0,68	1,02	0,83	1,29	0,77
NM_053906	GSR Glutathione reductase	GSR	2,11	2,76	1,14	2,70	1,47	1,47	0,96	1,70	0,94	1,09	1,44	1,26	1,72
B1285682	CCRP Cytoplasmic CAR retention protein (DNAJC7)	DNAJC7, TPR2, TTC2	1,70	2,29	1,02	2,54	1,45	1,95	1,00	0,80	0,50	1,09	0,83	0,65	1,38
NM_032056	TAP2 Antigen peptide transporter 2 (APT2)(MTP2)	ABCB3, TAP2	1,94	3,07	2,73	2,99	2,27	1,52	0,91	2,05	1,01	1,37	1,24	1,83	1,47
BG375315	SYND1 Syndecan-1	SDC1, SYND1	2,99	3,03	3,92	2,18	2,71	2,38	1,66	1,54	0,87	0,93	1,33	1,24	1,86
NM_012591	IRF-1 Interferon regulatory factor 1	IRF1	1,02	2,58	1,88	1,77	1,25	1,92	1,22	2,28	1,56	1,03	0,85	0,86	0,67
A1172206	EIF4B Eukaryotic translation initiation factor 4B [predicted]	EIF4B	2,14	1,93	1,05	1,69	1,20	1,59	0,85	2,53	0,71	1,00	0,77	1,25	0,60
B1281753	TMP21 Transmembrane protein 21kD	TMP21	1,43	2,21	1,62	2,57	1,75	2,05	1,39	1,33	0,72	1,02	0,58	2,05	0,94
NM_012861	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferase	MGMT	1,12	1,71	2,15	1,24	1,88	2,34	2,12	2,49	1,02	0,83	1,05	1,50	0,41
A1230787	MAP4 Microtubule-associated protein 4	MAP4, MTAP4, LOC367171	2,41	2,12	2,36	0,99	1,43	2,00	1,42	1,19	0,56	1,23	0,78	1,19	0,66
BM386389	MRPL55 Mitochondrial ribosomal protein L55 (predicted)	MRPL55	0,70	0,37	1,26	0,25	0,36	0,32	0,77	0,78	0,17	0,82	0,93	0,34	0,34

Fortsetzung Tabelle 12

BF288120	MRPL36 Mitochondrial ribosomal protein L36 [predicted]	MRPL36	0,70	0,42	0,77	0,38	0,77	0,46	1,08	0,65	0,29	0,79	0,80	0,22	0,50
B1275958	MRPS34 Mitochondrial ribosomal protein S34 [predicted]	MRPS34, TCE2	0,58	0,42	0,69	0,37	0,57	0,50	0,83	1,57	0,64	0,77	1,00	0,55	0,66
A1105095	MRPL17 Mitochondrial ribosomal protein L17	MRPL17	0,62	0,44	0,82	0,55	0,17	0,23	0,79	0,77	0,34	0,62	0,96	0,21	0,80
A1230278	MRPS16 Mitochondrial ribosomal protein S16 [predicted]	MRPS16, RPMS16	0,56	0,44	0,73	0,83	0,25	0,31	0,81	1,13	0,33	0,59	0,72	0,41	0,16
NM_012580	HO-1 Heme Oxygenase 1, microsomal	HMOX1, HO-1	4,38	6,08	1,56	3,38	1,73	3,09	0,55	0,34	0,10	1,18	0,84	0,90	1,18
NM_012923	CCNG1 Cyclin G1	CCNG1, CCNG	1,13	2,66	2,08	1,04	2,30	2,77	2,60	0,61	0,16	0,74	0,77	0,18	0,27
A1639387	ESTs Highly similar to MRP-S6 Mitochondrial 28S ribosomal protein S6	MRPS6,RP MS6	1,92	2,20	2,17	1,04	2,62	1,92	0,91	0,27	0,32	0,69	1,10	0,35	0,88
AWS26756	DNAJC5 DnalJ (Hsp40) homolog C5 (CSP Cysteine string protein)	DNAJC5, CSP	2,26	2,46	1,47	2,65	2,25	3,67	1,47	0,31	0,61	1,00	1,05	0,44	0,92
AF036537	RIP-3 Receptor-interacting serine-threonine protein kinase 3 (HCYP2 Homocysteine respondent protein)	RIPK3, RIP3, HCYP2	1,01	1,20	2,65	0,58	1,39	0,87	1,53	1,14	0,53	0,51	0,71	0,98	0,38
X64589	CCNB1 Cyclin B1, G2/M-specific	CCNB1	0,76	0,75	3,98	0,60	0,87	0,73	1,22	0,12	0,37	1,15	1,80	0,15	1,31
NM_080400	CHEK1 Checkpoint kinase 1	CHEK1, CHK1, CIL	1,37	1,84	4,42	1,01	0,99	0,75	1,33	0,78	1,91	0,72	1,40	0,14	0,64
NM_022381	PCNA Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	1,17	1,06	2,50	0,97	1,17	0,81	1,34	0,20	1,21	0,86	1,88	0,63	1,64

Tabelle 13: Gene, die nach der *in-vitro*-Behandlung von HK-2-Zellen mit den vier Nephrokarzinogenen mit *in vivo* verglichen wurden. Angegeben sind die Accession Nummer, die Abkürzung mit den Gennamen und die Mittelwerte der Expressionswerte aus den zugehörigen 'Probe sets' und den drei Replikaten pro Zeitpunkt (d = Tag) nach Behandlung mit entweder der niedrigen Dosis (LD) oder der hohen Dosis (HD).

GB Accno	Abkürzung und Genname	HK-2 24h LD AA	HK-2 48h LD AA	HK-2 48h LD AA	HK-2 48h LD 2NF	HK-2 48h LD 2NF	HK-2 48h LD 2NF	HK-2 48h LD 2NF	HK-2 24h LD NNM	HK-2 24h LD NNM	HK-2 48h LD NNM	HK-2 48h LD NNM	HK-2 24h LD KBr	HK-2 24h LD KBr	HK-2 48h LD KBr	HK-2 48h LD KBr
NM_000392	ABCC2 MRP2, Multidrug resistance-associated protein 2	10,82	19,07	12,74	14,37	4,19	4,33	2,74	1,29	4,16	4,81	0,72	2,21	7,74	6,08	19,22
NM_000392	ABCC3, MRP3 Multidrug resistance-associated protein 3	1,30	1,37	1,32	1,56	0,95	1,04	1,03	1,02	1,32	1,00	1,56	0,68	0,72	0,77	0,70
A1373643	BCCIP BRCA2 and CDKN1A interacting protein (IOPK-1)	1,19	1,05	1,37	1,80	0,95	0,91	1,00	1,01	0,85	0,95	0,91	1,00	1,18	1,24	1,66
BC000196	CCNG1 Cyclin G1	0,77	0,66	0,84	0,50	0,98	1,00	1,00	0,97	1,02	0,93	0,98	0,85	0,99	0,88	0,83
AW134535	CCNG2 Cyclin G2	1,52	1,21	1,34	1,11	0,90	1,07	0,94	1,18	1,94	2,38	1,65	1,71	0,79	0,77	0,85
NM_000389	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21 ^{WAF1} /CIP1)	1,56	3,13	2,18	5,03	1,23	0,83	1,95	2,69	1,69	0,93	0,64	1,57	1,31	2,19	1,45
NM_000120	EPHX1 Epoxide hydrolase 1	1,08	1,36	1,15	1,71	1,04	1,04	1,01	0,96	1,78	1,64	1,33	1,62	1,50	1,72	2,05
AA020818	GASS Growth arrest specific 5	0,90	0,95	1,00	1,20	0,98	0,99	1,05	1,14	0,97	1,11	1,07	1,09	1,43	1,57	1,38
NM_000561	GSTM1 Glutathione-S-transferase M1	0,78	0,82	1,18	1,82	0,81	0,73	1,27	1,43	1,06	0,82	2,07	1,92	0,71	0,91	0,73
NM_000852	GSTP1 Glutathione-S-transferase P1, placental	1,06	1,01	1,26	1,54	0,95	0,98	0,96	0,99	0,82	0,73	0,68	0,62	1,01	1,05	1,21
NM_012206	HAVCR1, KIM-1 Kidney injury molecule 1	0,88	0,55	0,84	0,54	1,10	1,07	0,98	0,92	0,81	0,71	0,83	0,60	0,75	0,64	0,52
AA747426	IFRD1 Interferon-related developmental regulator 1 (NGF- inducible protein PC4)	1,30	3,95	1,48	3,55	0,92	0,97	1,26	1,29	1,34	2,94	0,86	1,49	1,77	2,53	4,08
NM_002412	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferase	0,74	0,51	0,52	0,18	1,12	1,02	0,94	0,89	0,81	0,73	0,97	0,78	0,99	0,92	0,80
NM_000903	NOO1 NADPH Oxidase (DIA4 Diaphorase)	0,79	1,37	0,66	1,66	1,04	1,08	1,08	1,08	2,61	2,27	2,01	2,52	2,62	3,29	5,78
AF022991	PER1 Period homolog 1	1,39	1,30	1,17	1,56	1,09	1,52	1,13	0,91	1,45	1,44	1,13	1,60	0,94	1,07	1,17
NM_000287	PEX6 Peroxisome assembly factor 2	1,88	2,28	2,06	3,44	0,98	0,89	1,00	0,93	1,69	1,42	1,79	1,90	1,06	0,81	0,78
NM_003407	ZFP36 Zinc finger protein 36 (TIS11A)	0,95	1,12	1,07	1,35	1,05	1,09	1,10	1,06	1,16	1,42	0,96	1,06	0,69	0,69	0,61

Tabelle 14: Gene, die nach der *in-vitro*-Behandlung von HK-2-Zellen mit *in vivo* verglichen wurden. Angegeben sind die Accession Nummer, die Abkürzung mit den Gennamen, die toxikologischen Kategorien und die Mittelwerte der Expressionswerte aus den zugehörigen 'Probe Sets' und den fünf (NNM, AA) bzw. drei (2NF) Replikaten pro Zeitpunkt (d = Tag).

GB Accno	Abkürzung und Genname	Toxikologische Kategorie	NNM d3	NNM d7	NNM d14	AA d3	AA d7	AA d14	2NF d3	2NF d7	2NF d14
NM_000392	ABCC2, MRP2 Multidrug resistance-associated protein 2	Detoxifizierung	1,07	1,08	1,02	1,82	1,64	2,05	9,75	6,43	7,68
AF072816	ABCC3, MRP3 Multidrug resistance-associated protein 3	Detoxifizierung	0,74	1,56	1,43	3,60	3,09	3,56	5,59	5,44	1,90
A1373643	BCCTP BRCA2 and CDKN1A interacting protein (TOK-1)	Oxidative stress / DNA-Schädigung	0,99	0,84	1,11	1,11	1,01	1,14	1,90	1,88	1,50
BC000196	CCNG1 Cyclin G1	Oxidative stress / DNA-Schädigung	1,20	1,06	1,69	1,80	2,02	3,27	2,79	2,84	3,45
NM_000389	CDKN1A Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21)(WAF1)(CIP1)	Oxidative stress / DNA-Schädigung	2,55	1,41	1,50	8,33	8,77	6,36	9,68	9,14	19,38
NM_000120	EPHX1 Epoxide hydrolase 1	Oxidativer Stress, Detoxifizierung	0,99	1,03	1,12	1,79	1,72	1,84	1,77	2,20	1,57
AA020818	GAS5 Growth arrest specific 5	Stress	0,97	0,99	1,17	1,02	1,02	1,06	1,94	1,61	1,70
NM_000561	GSTM1 Glutathione-S-transferase M1	Oxidativer Stress, Detoxifizierung	1,14	1,01	0,90	3,65	1,61	3,14	1,27	2,26	2,05
NM_000852	GSTP1 Glutathione-S-transferase P1, placental	Oxidativer Stress, Detoxifizierung	1,05	1,18	1,45	2,90	2,49	2,25	1,90	1,97	1,86
NM_012206	HAVCR1, KIM-1 Kidney injury molecule 1	Stress	0,76	2,05	1,27	1,33	0,96	2,85	39,94	15,56	9,75
AA747426	IFRD1 Interferon-related developmental regulator 1 (NGF-inducible protein PC4)	Stress	1,04	0,84	1,19	1,05	1,08	1,86	3,31	3,15	2,61
NM_002412	MGMT O6-methylguanine-DNA methyltransferase	Oxidativer Stress / DNA-Schädigung	1,22	0,97	0,96	1,28	1,46	2,22	1,71	1,84	1,92
NM_000903	NOO1 NADPH-Quinone Oxidoreductase (DIA4-Dianthorase)	Oxidativer Stress, Detoxifizierung	1,05	1,16	1,05	2,54	1,93	2,18	4,67	3,46	3,29
AF022991	PER1 Period homolog 1	Stress	2,10	3,14	1,70	1,75	4,25	10,57	2,93	2,50	1,54
NM_000287	PEX6 Peroxisome assembly factor 2	Stress	0,81	1,08	0,96	1,01	1,02	0,80	1,59	1,70	2,35
NM_003407	ZFP36 Zinc finger protein 36 (TIS1A)	Stress	1,62	1,82	1,53	1,12	0,98	1,20	1,20	1,38	1,09

Die Genlisten mit den Expressionsdaten der in der Diskussion aufgegriffenen Gene befinden sich im Anhang. Die vollständigen Genlisten sind auf Anfrage bei der Autorin erhältlich.