

**Genexpressionsanalyse zur Untersuchung des Wirkmechanismus  
ausgewählter Nephrotoxine in vivo und in vitro mit Hilfe von Mikroarrays**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
**Anke Lühe**  
aus Worms

Frankfurt am Main, 2004  
(DF1)

Vom Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften der  
Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe  
1. Gutachter: Prof. Dr. T. Dingermann  
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-W. Vohr  
Datum der Disputation: 05.05.2004

*meiner Oma*

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>4</b>
---------------------------	----------

---

<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>10</b>
------------------------------	-----------

---

<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>13</b>
----------------------------	-----------

---

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>15</b>
------------------------------	-----------

---

<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>16</b>
---------------------	-----------

---

<b>1.1 DIE ÄRA DER „-OMICS“ TECHNOLOGIEN</b>	<b>16</b>
--	-----------

1.1.1 DIE VERSCHIEDENEN „-OMICS“-TECHNOLOGIEN	17
---	----

1.1.2 TOXICOGENOMICS: METHODEN	18
--------------------------------	----

1.1.2.1 Offene Systeme	18
------------------------	----

1.1.2.2 Geschlossene Systeme	19
------------------------------	----

1.1.3 TOXICOGENOMICS: EINSATZGEBIETE	24
--------------------------------------	----

1.1.3.1 Mechanistische Analyse	24
--------------------------------	----

1.1.3.2 Prädiktion von Toxizität	25
----------------------------------	----

1.1.3.3 Risikoabschätzung und Schwellenwertdefinition	26
---	----

1.1.3.4 Untersuchung genetischer Polymorphismen	26
---	----

1.1.3.5 Extrapolation tierexperimenteller Daten auf den Menschen	27
--	----

1.1.3.6 Untersuchung der toxischen Auswirkungen von Substanzgemischen	27
---	----

1.1.4 TOXICOGENOMICS: GRENZEN	28
-------------------------------	----

<b>1.2 DIE NIERE</b>	<b>29</b>
----------------------	-----------

1.2.1 KURZER ÜBERBLICK ÜBER DIE ANATOMIE	29
--	----

1.2.2 DIE NIERE ALS ZIELORGAN FÜR TOXINE	31
--	----

1.2.3 VERSCHIEDENE AUSPRÄGUNGEN VON NEPHROTOXIZITÄT	32
---	----

1.2.3.1 Akutes Nierenversagen	33
-------------------------------	----

1.2.3.2 Chronisches Nierenversagen	34
------------------------------------	----

1.2.3.3 Veränderungen im Flüssigkeits- und Elektrolyt-Haushalt	34
--	----

1.2.3.4 Nierenkarzinogenese	35
-----------------------------	----

1.2.4	AKTUELLER STAND IN DIAGNOSTIK UND MECHANISTISCHER UNTERSUCHUNG VON NEPHROTOXIZITÄT	35
1.2.4.1	Enzymmessungen	36
1.2.4.2	In vitro Modelle	37
1.2.5	WELCHE NEUEN PERSPEKTIVEN ERÖFFNET TOXICOGENOMICS?	39
<b>1.3</b>	<b>NEPHROTOXINE</b>	<b>40</b>
1.3.1	OCHRATOXIN A (OTA)	40
1.3.2	QUECKSILBER-(II)-CHLORID	41
1.3.3	PARAQUAT DIHYDROCHLORID	44
1.3.4	PUROMYCIN	45
<b>1.4</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG UND ZIELE DER ARBEIT</b>	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>50</b>
<b>2.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>50</b>
2.1.1	CHEMIKALIEN	50
2.1.2	VERBRAUCHSMATERIAL	52
2.1.3	KITS	53
2.1.4	ARBEITSGERÄTE	53
2.1.5	PUFFER UND LÖSUNGEN	54
2.1.6	KULTURMEDIEN	58
2.1.7	ENZYME	59
2.1.8	ANTIKÖRPER	59
2.1.9	VERSUCHSTIERE	59
2.1.10	SYNTHETISCHE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	60
2.1.11	SOFTWARE	60
<b>2.2</b>	<b>ZELLBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>61</b>
2.2.1	ISOLATION UND KULTIVIERUNG PROXIMALER TUBULUSZELLEN DER RATTE	61
2.2.2	ISOLATION UND KULTIVIERUNG PROXIMALER TUBULUSZELLEN DES MENSCHEN	62
2.2.3	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL WÄHREND DER KULTIVIERUNG	62
2.2.4	BESTIMMUNG DER VITALITÄT	63
2.2.5	IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNGEN VON PT-ZELLEN	63
2.2.6	BEHANDLUNG MIT NEPHROTOXINEN	63
<b>2.3</b>	<b>BIOCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>64</b>
2.3.1	QUANTITATIVE BESTIMMUNG DER LACTATDEHYDROGENASE (LDH)-AKTIVITÄT	64
2.3.2	HISTOCHEMISCHE BESTIMMUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE (AP)-AKTIVITÄT	64
<b>2.4</b>	<b>DURCHFÜHRUNG DER IN VIVO-STUDIEN</b>	<b>65</b>
2.4.1	BEHANDLUNG DER RATTEN	65

2.4.2	HISTOPATHOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	66
<b>2.5</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>66</b>
2.5.1	ISOLATION VON RNA AUS ZELLEN	66
2.5.2	ISOLATION VON RNA AUS CORTIKALEM NIERENGEWEBE	67
2.5.3	QUALITÄTSBESTIMMUNG UND QUANTIFIZIERUNG DER RNA	67
2.5.4	REVERSE TRANSKRIPTION UND PROZESSIERUNG DER CDNA FÜR DIE HYBRIDISIERUNG AUF CDNA-MIKROARRAYS	68
2.5.4.1	Direktes Verfahren	68
2.5.4.2	Indirektes Verfahren	69
2.5.5	HYBRIDISIERUNG UND SCANNEN VON CDNA-MIKROARRAYS	70
2.5.6	REVERSE TRANSKRIPTION UND PROZESSIERUNG DER CDNA FÜR DIE HYBRIDISIERUNG AUF OLIGONUKLEOTID-MIKROARRAYS	71
2.5.6.1	Reverse Transkription – Erststrangsynthese	71
2.5.6.2	Herstellung doppelsträngiger DNA	72
2.5.6.3	In vitro Transkription – cRNA-Synthese	73
2.5.7	HYBRIDISIERUNG, FÄRZEN UND SCANNEN DER OLIGONUKLEOTID-MIKROARRAYS	74
2.5.7.1	Hybridisierung	74
2.5.7.2	Färben und Scannen der Oligonukleotid-Mikroarrays	74
2.5.8	HERSTELLUNG EINES CDNA STANDARDS FÜR DIE QUANTITATIVE ECHT-ZEIT PCR	75
2.5.9	PRIMER-VALIDIERUNG FÜR TAQMAN <sup>®</sup> PCR	76
2.5.10	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE IM PRÄPARATIVEN MASSSTAB	78
2.5.11	SEQUENZIERUNG VON TAQMAN <sup>®</sup> PCR AMPLIFIKATEN	78
2.5.12	VERIFIZIERUNG VON MIKROARRAY-EXPRESSIONSDATEN MIT QUANTITATIVER TAQMAN <sup>®</sup> - PCR	79
2.5.13	AUSWERTUNG DER TAQMAN <sup>®</sup> -PCR ERGEBNISSE UNTER VERWENDUNG DER $\Delta\Delta C_T$ -METHODE	80
<b>2.6</b>	<b>MATHEMATISCHE METHODEN</b>	<b>81</b>
2.6.1	QUALITÄTSBEURTEILUNG DER CDNA-MIKROARRAYS	81
2.6.2	QUALITÄTSBEURTEILUNG DER OLIGONUKLEOTID-MIKROARRAYS	82
2.6.3	STATISTISCHE AUSWERTUNGSMETHODEN	83
2.6.3.1	Histogramm	83
2.6.3.2	Box Plot Analyse	83
2.6.3.3	Hauptkomponentenanalyse	84
2.6.3.4	Cluster-Analysen	84
2.6.3.5	K-means-Algorithmus	85
2.6.3.6	Hierarchisches clustering	85
2.6.3.7	Self organizing map (SOM)	86

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>87</b>
<hr/>		
<b>3.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG EINER PRIMÄREN PT ZELLKULTUR FÜR DIE DURCHFÜHRUNG VON GENEXPRESSIONSSTUDIEN</b>	<b>87</b>
3.1.1	ZELLZAHL UND VITALITÄT	87
3.1.2	FÄRBUNGEN	89
3.1.3	GENEXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTIVIERUNGSDAUER (RATTEN-PTC)	92
3.1.4	GENEXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTIVIERUNGSDAUER (HUMAN-PTC)	94
3.1.5	GENEXPRESSION IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KULTIVIERUNGSDAUER: ECHT-ZEIT-PCR (TAQMAN <sup>®</sup> PCR)	95
3.1.5.1	Expression von „PTC-Markergenen“	96
3.1.5.2	Expression von „Zellkultur-Alterungsgenen“	97
3.1.6	EINFLUSS VON DMSO AUF DIE GENEXPRESSION IN PTC	98
<b>3.2</b>	<b>EXPERIMENTE ZUR DOSISFINDUNG FÜR DIE BEHANDLUNG VON PTC MIT NEPHROTOXINEN</b>	<b>101</b>
<b>3.3</b>	<b>VERGLEICH VON DIREKTEM UND INDIREKTEM VERFAHREN ZUR FLUORESZENZMARKIERUNG VON CDNA</b>	<b>107</b>
<b>3.4</b>	<b>GENEXPRESSION IN VIVO UND IN VITRO NACH BEHANDLUNG MIT OTA</b>	<b>111</b>
3.4.1	KORRELATION VON EXPRESSIONSDATEN IN VIVO UND IN VITRO (RATTE)	112
3.4.2	DOSIS- UND ZEITABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION (RATTE)	115
3.4.3	VERIFIZIERUNG DER ERGEBNISSE MIT QUANTITATIVER ECHT-ZEIT PCR	118
3.4.4	HISTOPATHOLOGIE DER NIERENGEWEBESCHNITTE AUS DEN OTA-BEHANDELTEN RATTEN	119
3.4.5	DOSIS- UND ZEITABHÄNGIGE VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN HUMANEN PTC	120
<b>3.5</b>	<b>PLATTFORMVERGLEICH: CDNA-MIKROARRAYS VERSUS OLIGO-MIKROARRAYS</b>	<b>122</b>
<b>3.6</b>	<b>GENEXPRESSIONSANALYSE IN VIVO UND IN VITRO NACH BEHANDLUNG MIT VERSCHIEDENEN NEPHROTOXINEN</b>	<b>125</b>
3.6.1	HISTOPATHOLOGIE	126
3.6.1.1	Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Quecksilber-(II)-chlorid	126
3.6.1.2	Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Paraquat	128
3.6.1.3	Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Puromycin	128
3.6.2	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IM NIERENCORTEXGEWEBE DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT QUECKSILBER-II-CHLORID	129
3.6.2.1	Proteinmetabolismus	131
3.6.2.2	Auswirkungen auf Immunabwehr, Akutphasereaktionen, Zelladhäsion und Zytoskelett	133
3.6.2.3	Signaltransduktionswege	136

3.6.2.4	Biotransformation	138
3.6.2.5	Transport	140
3.6.3	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN PTC ZELLEN DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT QUECKSILBER-II-CHLORID	142
3.6.4	VERGLEICH DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IN DER RATTE IN VIVO UND IN VITRO NACH BEHANDLUNG MIT QUECKSILBER-(II)-CHLORID	145
3.6.5	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IM NIERENCORTEXGEWEBE DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT PARAQUAT	146
3.6.5.1	Lipidmetabolismus, oxidativer Stress, Proteinmetabolismus und Signaltransduktion	149
3.6.5.2	Immunabwehr und Akutphasereaktion	151
3.6.5.3	Transport	152
3.6.6	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN PTC ZELLEN DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT PARAQUAT	153
3.6.7	VERGLEICH DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IN DER RATTE IN VIVO UND IN VITRO NACH BEHANDLUNG MIT PARAQUAT	157
3.6.8	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IM NIERENCORTEXGEWEBE DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT PUROMYCIN	158
3.6.9	VERÄNDERUNGEN DER GENEXPRESSION IN PTC ZELLEN DER RATTE NACH BEHANDLUNG MIT PUROMYCIN	163
3.6.10	VERGLEICH DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IN DER RATTE IN VIVO UND IN VITRO NACH BEHANDLUNG MIT PUROMYCIN	168
<b>3.7</b>	<b>VERGLEICH DER GENEXPRESSIONSPROFILE VON DREI VERSCHIEDENEN NEPHROTOXINEN IM NIERENCORTEX DER RATTE</b>	<b>168</b>
<b>4</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>173</b>
<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG EINES MODELLS ZUR KULTIVIERUNG VON PTC DER RATTE</b>	<b>173</b>
4.1.1	ALLGEMEINE EIGENSCHAFTEN (ZELLZAHL/VITALITÄT)	173
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG DER ZELLKULTUR	174
4.1.3	CHARAKTERISIERUNG FÜR DEN EINSATZ IN GENEXPRESSIONSANALYSEN	176
<b>4.2</b>	<b>VERÄNDERUNGEN IN DER GENEXPRESSION NACH EINWIRKUNG VON OCHRATOXIN A</b>	<b>177</b>
4.2.1	MODELL-ABHÄNGIGE GENEXPRESSIONSVERÄNDERUNGEN NACH BEHANDLUNG MIT OTA	177
4.2.2	DOSIS- UND ZEIT-ABHÄNGIGE REGULIERUNGEN	180
4.2.2.1	Akutphase-Reaktionen und Entzündung	180
4.2.2.2	DNA Schädigung, Reparatur und Apoptose	181
4.2.2.3	Zellulärer Stoffwechsel und Entgiftung	182
4.2.2.4	Oxidativer Stress	182

<b>4.3</b>	<b>PLATTFORM-VERGLEICH: CDNA-MIKROARRAYS VERSUS OLIGONUKLEOTID-MIKROARRAYS</b>	<b>184</b>
<b>4.4</b>	<b>VERÄNDERUNGEN IN DER GENEXPRESSION NACH EINWIRKUNG VON QUECKSILBER-II-CHLORID</b>	<b>186</b>
4.4.1	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON HgCl <sub>2</sub> IN VIVO	187
4.4.1.1	Proteinmetabolismus	187
4.4.1.2	Biotransformation	189
4.4.1.3	Immunabwehr, Zelladhäsion, Zytoskelett und Signaltransduktion	190
4.4.1.4	Transport	196
4.4.2	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON HgCl <sub>2</sub> IN VITRO – VERGLEICH MIT IN VIVO	197
<b>4.5</b>	<b>VERÄNDERUNGEN IN DER GENEXPRESSION NACH EINWIRKUNG VON PARAQUAT</b>	<b>198</b>
4.5.1	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON PARAQUAT IN VIVO	198
4.5.1.1	Oxidativer Stress und Lipidmetabolismus	199
4.5.1.2	Transport	200
4.5.2	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON PARAQUAT IN VITRO – VERGLEICH MIT IN VIVO	201
<b>4.6</b>	<b>VERÄNDERUNGEN IN DER GENEXPRESSION NACH EINWIRKUNG VON PUROMYCIN</b>	<b>202</b>
4.6.1	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON PUROMYCIN IN VIVO	202
4.6.2	POTENZIELLER TOXISCHER WIRKMECHANISMUS VON PUROMYCIN IN VITRO – VERGLEICH MIT IN VIVO	203
<b>4.7</b>	<b>GEMEINSAME EXPRESSIONSPROFILE UND UNTERSCHIEDE ZWISCHEN QUECKSILBER-II-CHLORID, PARAQUAT UND PUROMYCIN</b>	<b>204</b>
<b>4.8</b>	<b>ABSCHLIESSENDE BEMERKUNGEN UND AUSBLICK</b>	<b>206</b>
<b>5</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b><u>210</u></b>
<b>6</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b><u>212</u></b>
<b>7</b>	<b><u>LEBENS LAUF</u></b>	<b><u>228</u></b>
<b>8</b>	<b><u>PUBLIKATIONEN UND POSTER</u></b>	<b><u>229</u></b>
<b>9</b>	<b><u>DANKSAGUNG</u></b>	<b><u>230</u></b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABB. 1: DIE „-OMICS“ TECHNOLOGIEN UND IHRE BEZIEHUNG ZUEINANDER IM ÜBERBLICK.	17
ABB. 2: HERSTELLUNG UND HYBRIDISIERUNG VON CDNA-ARRAYS .....	21
ABB. 3: HERSTELLUNG UND HYBRIDISIERUNG VON OLIGONUKLEOTID-ARRAYS .....	23
ABB. 4: LÄNGSSCHNITT DURCH EINE GESUNDE HUMANE NIERE.....	29
ABB. 5: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINES NEPHRONS.....	30
ABB. 6: STRUKTURFORMEL OCHRATOXIN A .....	40
ABB. 7: MOLEKÜLSTRUKTUR PARAQUAT .....	44
ABB. 8: MOLEKÜLSTRUKTUR PUROMYCIN .....	46
ABB. 9: ELEKTROPHEROGRAMM EINER RNA MIT OPTIMALER QUALITÄT ERSTELLT IM AGILENT 2100 BIOANALYZER.....	68
ABB. 10: PT-ZELLZAHL .....	88
ABB. 11: VITALITÄT DER PTC .....	88
ABB. 12: ANTIKÖRPERFÄRBUNG DES $Na^+/H^+$ -AUSTAUSCHERS UND <i>BLUE STAIN</i> DER ZELLKERNE.....	90
ABB. 13: ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON N-CADHERIN .....	91
ABB. 14: ANTIKÖRPERFÄRBUNG VON E-CADHERIN.....	91
ABB. 15: FÄRBUNG DER ALKALISCHEN PHOSPHATASE.....	92
ABB. 16: DARSTELLUNG DER INDUKTIONSFAKTOREN VON 700 RATTEN-GENEN MIT ZUNEHMENDER KULTIVIERUNGSDAUER IN ABHÄNGIGKEIT VON TAG 7.....	93
ABB. 17: DARSTELLUNG DER INDUKTIONSFAKTOREN VON 313 HUMAN-GENEN MIT ZUNEHMENDER KULTIVIERUNGSDAUER IN ABHÄNGIGKEIT VON TAG 7.....	95
ABB. 18: EXPRESSION VON „PTC-MARKERGENEN“ IN ABHÄNGIGKEIT VON TAG 5 .....	96
ABB. 19: EXPRESSION VON „ALTERUNGSGENEN“ IN ABHÄNGIGKEIT VON TAG 5 .....	97
ABB. 20: TRANSKRIPTIONELLE VERÄNDERUNGEN IN PTC NACH DMSO-BEHANDLUNG.....	100
ABB. 21: ANZAHL DER SIGNIFIKANT DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE NACH DMSO- BEHANDLUNG .....	100
ABB. 22: AKTIVITÄT DER LDH WÄHREND DER BEHANDLUNG VON RATTEN-PTC MIT NEPHROTOXINEN .....	103
ABB. 23: VITALITÄT VON RATTEN-PTC NACH FÜNFTÄGIGER NEPHROTOXIN-BEHANDLUNG... .....	104
ABB. 24: AKTIVITÄT DER LDH WÄHREND DER BEHANDLUNG VON HUMAN-PTC MIT NEPHROTOXINEN .....	105
ABB. 25: VITALITÄT VON HUMAN-PTC NACH FÜNFTÄGIGER NEPHROTOXIN-BEHANDLUNG. ... .....	106
ABB. 26: VERFAHREN ZUM DIREKTEN EINBAU VON FLUOROPHOREN IN CDNA .....	108
ABB. 27: VERFAHREN ZUM INDIREKTEN EINBAU VON FLUOROPHOREN IN CDNA .....	109
ABB. 28: VERGLEICH VON DIREKTER UND INDIREKTER FLUORESCENZMARKIERUNG VON CDNA.....	110

ABB. 29: <i>BOX PLOT</i> ANALYSE VON ALLEN ARRAYS MIT OTA-BEHANDELTEN RATTEN- PROBEN .....	112
ABB. 30: PCA VON OTA-BEHANDELTEN IN VIVO UND IN VITRO EXPERIMENTEN (RATTE)....	113
ABB. 31: HIERARCHISCHES <i>CLUSTERING</i> DER DISKRIMINIERENDEN GENE. ....	114
ABB. 32: VERGLEICH DER INDUKTIONSFAKTOREN AUS TAQMAN® PCR UND MIKROARRAY EXPERIMENTEN. ....	119
ABB. 33: HAEMATOXYLIN & EOSIN – FÄRBUNG VON RATTENNIEREN-PARAFFINSCHNITTEN NACH OTA-BEHANDLUNG.....	120
ABB. 34: H&E-GEFÄRBTER AUSSCHNITT AUS DEM INNEREN CORTEXBEREICH EINER KONTROLLNIERE.....	126
ABB. 35: HAEMATOXYLIN & EOSIN-FÄRBUNG VON NIERENCORTEX-PARAFFINSCHNITTEN NACH BEHANDLUNG MIT HGCL <sub>2</sub> .....	127
ABB. 36: HAEMATOXYLIN & EOSIN-FÄRBUNG VON NIERENCORTEX-PARAFFINSCHNITTEN NACH BEHANDLUNG MIT PARAQUAT .....	128
ABB. 37: HAEMATOXYLIN & EOSIN-FÄRBUNG VON NIERENCORTEX-PARAFFINSCHNITTEN NACH BEHANDLUNG MIT PUROMYCIN.....	128
ABB. 38: „ <i>RANKING</i> “ DER DURCH HGCL <sub>2</sub> -BEHANDLUNG IN DER RATTE VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> . ....	130
ABB. 39: HIERARCHISCHES <i>CLUSTERING</i> DER GENE MIT FUNKTION IM PROTEINMETABOLISMUS.....	131
ABB. 40: <i>K-MEANS CLUSTERING</i> VON GENEN AUS DEN KATEGORIEN „IMMUNABWEHR“, „ZELLADHÄSION“ UND „ZYTOSKELETT“ .....	134
ABB. 41: HIERARCHISCHES <i>CLUSTERING</i> VON GENEN AUS DER KATEGORIE „SIGNALTRANSDUKTION“.....	137
ABB. 42: HIERARCHISCHES <i>CLUSTERING</i> VON GENEN MIT FUNKTION IN DER BIOTRANSFORMATION. ....	139
ABB. 43: <i>K-MEANS CLUSTERING</i> VON GENEN MIT FUNKTION BEI TRANSPORTPROZESSEN.....	141
ABB. 44: <i>RANKING</i> DER DURCH HGCL <sub>2</sub> -BEHANDLUNG VON RATTEN-PTC VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> . ....	144
ABB. 45: <i>RANKING</i> DER DURCH PARAQUAT-BEHANDLUNG IN DER RATTE VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> . ....	148
ABB. 46: <i>K-MEANS CLUSTERING</i> DER GENE AUS DEN KATEGORIEN „LIPIDMETABOLISMUS“, „OXIDATIVER STRESS“, PROTEINMETABOLISMUS“ UND SIGNALTRANSDUKTION.....	149
ABB. 47: EXPRESSIONSPROFILE VON GENEN MIT FUNKTIONEN IN DER IMMUNABWEHR.....	151
ABB. 48: HIERARCHISCHES <i>CLUSTERING</i> VON GENEN MIT FUNKTIONEN BEI TRANSPORTPROZESSEN. ....	152
ABB. 49: „ <i>RANKING</i> “ DER DURCH PARAQUAT-BEHANDLUNG VON RATTEN-PTC VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> . ....	154
ABB. 50: EXPRESSIONSPROFILE DER IN RATTEN-PTC DURCH PARAQUAT REGULIERTEN GENE. .....	155

ABB. 51: „ <i>RANKING</i> “ DER DURCH PUROMYCIN-BEHANDLUNG VON RATTEN VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> IN DER NIERE.....	160
ABB. 52: PCA ALLER PUROMYCIN-EXPERIMENTE IN VIVO.....	161
ABB. 53: <i>K-MEANS</i> ANALYSE DER DURCH PUROMYCIN DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE.	162
ABB. 54: <i>RANKING</i> DER DURCH PUROMYCIN-BEHANDLUNG VON RATTEN-PTC VERÄNDERTEN BIOCHEMISCHEN <i>PATHWAYS</i> . ....	164
ABB. 55: EXPRESSIONSPROFILE DER DURCH PUROMYCIN IN RATTEN-PTC REGULIERTEN GENE AUS DEN KATEGORIEN 1-8.....	165
ABB. 56: ÜBERSCHNEIDUNGEN DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE DER DREI NEPHROTOXINE HGCL <sub>2</sub> , PARAQUAT UND PUROMYCIN. ....	169
ABB. 57: AKTIVIERUNG VON ARE DURCH NRF2.....	189
ABB. 58: POTENZIELLE MOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN IMMUNABWEHR, ZELLADHÄSION UND ZYTOSKELETT NACH HGCL <sub>2</sub> BEHANDLUNG. ....	194
ABB. 59: DURCH HG <sup>2+</sup> -BEHANDLUNG INDUZIERTER SIGNALTRANSDUKTIONSWEGE.....	195
ABB. 60: METABOLISMUS VON PARAQUAT UND FOLGEREAKTIONEN.....	200

## TABELLENVERZEICHNIS

TAB. 1: INDUKTIONSFAKTOREN VON „ZELLKULTUR-ALTERUNGSGENEN“ .....	94
TAB. 2: INDUKTIONSFAKTOREN VON „ZELLKULTUR-ALTERUNGSGENEN“ IN HUMANER PTC KULTUR.....	95
TAB. 3: SUBTOXISCHE UND TOXISCHE NEPHROTOXIN-KONZENTRATIONEN.....	107
TAB. 4: EINTEILUNG DER DISKRIMINIERENDEN GENE IN <i>CLUSTER</i> ENTSPRECHEND IHRER EXPRESSIONSPROFILE.....	115
TAB. 5: AKUT-PHASE RESPONSEN UND INFLAMMATION .....	116
TAB. 6: REAKTIONEN AUF DNA-SCHÄDIGUNG, DNA-REPARATUR UND APOPTOSE.....	117
TAB. 7: ZELLULÄRER STOFFWECHSEL, BIOTRANSFORMATION UND ENTGIFTUNG. ....	117
TAB. 8: OXIDATIVER STRESS. ....	118
TAB. 9: DOSISABHÄNGIG REGULIERTE GENE NACH BEHANDLUNG VON HUMANEN PTC MIT OTA.....	121
TAB. 10: ZEITABHÄNGIG REGULIERTE GENE NACH BEHANDLUNG VON HUMANEN PTC MIT OTA. ....	122
TAB. 11: VERGLEICH VON VERSCHIEDENEN TECHNISCHEN PLATTFORMEN. ....	124
TAB. 12: ANZAHL DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE (FC> 2 ) NACH HGCL <sub>2</sub> -BEHANDLUNG. ....	129
TAB. 13: DURCH HGCL <sub>2</sub> REGULIERTE GENE MIT VERSCHIEDENEN FUNKTIONEN IM PROTEINMETABOLISMUS.....	132
TAB. 14: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER IMMUNABWEHR, DER AKUTPHASEREAKTION, DER ZELLADHÄSION UND BEI AUFBAU UND REGULATION DES ZYTOSKELETTS.....	136
TAB. 15: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER SIGNALTRANSDUKTION. ....	138
TAB. 16: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER BIOTRANSFORMATION. ....	140
TAB. 17: GENE MIT FUNKTIONEN BEI TRANSPORTPROZESSEN. ....	142
TAB. 18: SIGNIFIKANT REGULIERTE GENE (FC> 2 ) NACH BEHANDLUNG VON PTC MIT HGCL <sub>2</sub> . 143	
TAB. 19: DURCH HGCL <sub>2</sub> -BEHANDLUNG <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIELL REGULIERTE GENE. ....	145
TAB. 20: PROZENTUALE ANTEILE UND SIGNIFIKANZ DER <i>IN VITRO</i> BZW. <i>IN VIVO</i> DURCH HGCL <sub>2</sub> DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IM JEWEILS ANDEREN MODELL.....	146
TAB. 21: ANZAHL DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE (FC> 1.7 ) NACH PARAQUAT-BEHANDLUNG. ....	147
TAB. 22: DURCH PARAQUAT REGULIERTE GENE MIT FUNKTIONEN IM LIPID- UND PROTEINMETABOLISMUS, IN DER SIGNALTRANSDUKTION UND IN DER REAKTION AUF OXIDATIVEN STRESS. ....	150
TAB. 23: DURCH PARAQUAT REGULIERTE GENE MIT FUNKTION IN DER IMMUNABWEHR. ....	152
TAB. 24: GENE MIT FUNKTIONEN BEI TRANSPORTPROZESSEN. ....	153
TAB. 25: SIGNIFIKANT REGULIERTE GENE (FC> 1.7 ) NACH BEHANDLUNG VON PTC MIT PARAQUAT. ....	154

TAB. 26: GENE MIT FUNKTIONEN IM PROTEINMETABOLISMUS UND / ODER IN DER REAKTION AUF OXIDATIVEN STRESS. ....	156
TAB. 27: GENE MIT FUNKTION IN DER REGULATION DER GENEXPRESSION ODER IM RNA METABOLISMUS.....	156
TAB. 28: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER ZELLPROLIFERATION ODER DIFFERENZIERUNG. ....	157
TAB. 29: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER SIGNALTRANSDUKTION. ....	157
TAB. 30: PROZENTUALE ANTEILE UND SIGNIFIKANZ DER <i>IN VITRO</i> BZW. <i>IN VIVO</i> DURCH PARAQUAT DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IM JEWEILS ANDEREN MODELL. ....	158
TAB. 31: ANZAHL DER DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE (FC> 1.7) NACH PUROMYCIN-BEHANDLUNG. ....	159
TAB. 32: GENE MIT CHARAKTERISTISCHEM EXPRESSIONS-ZEIT-PROFIL NACH PUROMYCIN-BEHANDLUNG. ....	163
TAB. 33: SIGNIFIKANT REGULIERTE GENE (FC> 1.7) NACH BEHANDLUNG VON PTC MIT PUROMYCIN. ....	164
TAB. 34: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER ZELLPROLIFERATION, ZELLDIFFERENZIERUNG, REGULATION DER GENEXPRESSION UND ZELLADHÄSION. ....	166
TAB. 35: GENE MIT FUNKTIONEN IM PROTEINMETABOLISMUS, BEI DER BEANTWORTUNG VON OXIDATIVEM STRESS UND IN DER SIGNALTRANSDUKTION. ....	167
TAB. 36: GENE MIT FUNKTIONEN IN DER IMMUNABWEHR.....	167
TAB. 37: PROZENTUALE ANTEILE UND SIGNIFIKANZ DER <i>IN VITRO</i> BZW. <i>IN VIVO</i> DURCH PUROMYCIN DIFFERENZIELL REGULIERTEN GENE IM JEWEILS ANDEREN MODELL. ....	168
TAB. 38: GEMEINSAM REGULIERTE GENE VON JEWEILS ZWEI NEPHROTOXINEN. ....	170
TAB. 39: MARKER-GENE FÜR DIE JEWEILIGEN NEPHROTOXINE. ....	171
TAB. 40: UNTERSCHIEDE ZWISCHEN CDNA MIKROARRAYS UND OLIGONUKLEOTID-MIKROARRAYS.....	184

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abkürzung	Originallaut
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Abk.	Abkürzung
b	Basen
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw	beziehungsweise
C	Cytidin
EST	Expressed sequence tag
FC	Fold Change (Induktionsfaktor)
FCS	Foetal Calf Serum
G	Guanin
g	Gramm
GSH	Glutathion
h	Stunden
Hg	Quecksilber
kb	kilobasen
L	Liter
min	Minuten
mL	Milliliter
MW	Mittelwert
OTA	Ochratoxin A
PBS	Phosphate Buffered Saline
PQ	Paraquat
PTC	Proximal Tubule Cells
PU	Puromycin
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SAGE	serial analysis of gene expression
SD	Standardabweichung
sec	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphism
T	Thymidin
T <sub>a</sub>	Annealing Temperature
Tab.	Tabelle

# 1 Einleitung

Diese Einleitung soll einen generellen Überblick über die Thematik der vorliegenden Dissertation liefern. Zunächst werden die verschiedenen „-omics“-Technologien vorgestellt mit besonderer Berücksichtigung von *Toxicogenomics*. Die Möglichkeiten, die diese neuen Technologien eröffnen, sowie deren Anwendbarkeit für die Untersuchung von Nephrotoxizität werden beleuchtet. Die Besonderheiten der Niere als Eliminationssystem sowie als Zielorgan zahlreicher Toxine werden vorgestellt, wobei die verschiedenen Ausprägungen nephrotoxischer Schädigungen sowie deren übliche Diagnostik und wissenschaftliche Untersuchung Berücksichtigung finden. Die Einleitung wird mit einer Übersicht über die in diesem Projekt untersuchten Modell-Nephrotoxine abgerundet.

## 1.1 Die Ära der „-omics“ Technologien

Der Begriff „-omics“ leitet sich von dem lateinischen Suffix „-om“ ab, das eine Gruppe oder eine Institution beschreibt. Heute wird diese Wortendung eher im Sinne von „gesamt“ oder „vollständig“ gebraucht. So kann der Ausdruck „Genom“ mit „die gesamte genetische Information eines Organismus“ übersetzt werden. Die Begriffe „Genomics“, „Transcriptomics“, „Proteomics“ und „Metabonomics“ beschreiben somit Methoden, mit denen die gleichzeitige Analyse der gesamten genetischen, transkriptionellen, translationellen oder metabolischen Information eines Organismus möglich ist.

In der molekularbiologischen Forschung führt der traditionelle Erkenntnisweg in der Regel über eine Hypothese zur Identifizierung und Charakterisierung von bestimmten Genen, Proteinen oder von speziellen biochemischen „pathways“. Bei dieser Vorgehensweise wurden Zusammenhänge zwischen verschiedenen Genen oder Proteinen erst nach mühevoller Kleinarbeit entdeckt oder konnten zum Teil bis heute nicht erschöpfend erklärt werden. Dank zunehmender Miniaturisierung und Automatisierung, wie zum Beispiel dem Roboter-gesteuerten Aufbringen von komplementären DNA's von *Arabidopsis thaliana* auf Glas-Objektträger in Hochgeschwindigkeit, wurde es schliesslich möglich, erste „Mikroarrays“

herzustellen, die eine gleichzeitige Analyse der Expressionsveränderungen von 45 Genen erlaubten [Schena et al., 1995]. Sehr schnell wurde die Kapazität der Mikroarrays vervielfacht, so dass schon 1996 Arrays mit 1046 humanen cDNA's hergestellt und eingesetzt wurden [Schena et al., 1996]. Mittlerweile stellt eine gleichzeitige Analyse der transkriptionellen Veränderungen von zehntausenden von Genen keine Schwierigkeit mehr dar.

### 1.1.1 Die verschiedenen „-omics“-Technologien

Die „-omics“ Technologien umfassen im Wesentlichen drei verschiedene Bereiche (Abb. 1):

- *Genomics*: beschreibt die gleichzeitige Analyse des gesamten Genoms eines Organismus.
- *Transcriptomics* („*functional genomics*“): beschreibt die gleichzeitige Analyse des gesamten Transkriptoms eines Organismus.
- *Proteomics*: beschreibt die gleichzeitige Analyse des gesamten Proteoms eines Organismus.

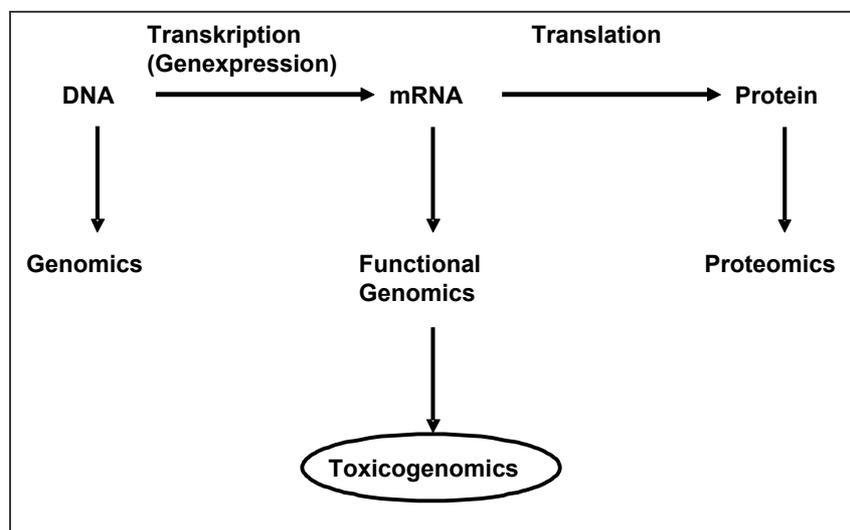


Abb. 1: Die „-omics“ Technologien und ihre Beziehung zueinander im Überblick.

In diesen drei Hauptkategorien hat sich schon die eine oder andere Subkategorie etabliert. So wird zum Beispiel unter dem Begriff „*Toxicogenomics*“ seit 1999 allgemein die Anwendung von *Transcriptomics* auf den Bereich der Toxikologie verstanden [Nuwaysir et al., 1999]. Mit Hilfe NMR-spektroskopischer Methoden können seit einigen Jahren sämtliche niedrigmolekulare Stoffwechselprodukte und

Metaboliten, die nach Toxin-Einwirkung mit dem Urin ausgeschieden werden, qualitativ und quantitativ untersucht werden. Diese Methodik ist ebenfalls 1999 unter dem Namen „*Metabonomics*“ etabliert worden [Nicholson et al., 1999; <http://www.ciit.org/GenomicsCtr/Metabonomics>]. Auch die Kombination genomischer und proteomischer Methoden hat in der Praxis schon erfolgreiche Anwendung gefunden [Ideker et al., 2001]. In Zukunft ist zu erwarten, dass sich noch weitere „-omics“ Technologien herauskristallisieren werden, die sich beispielsweise mit der Analyse von Lipiden, Kohlenhydraten oder Phospholipiden beschäftigen werden [Aardema et al., 2002].

### **1.1.2 Toxicogenomics: Methoden**

*Toxicogenomics* wird als eine vielversprechende Technologie betrachtet, welche die gleichzeitige Analyse der Expression von tausenden von Genen in einer Probe erlaubt. Für die Untersuchung der Beziehungen zwischen Genexpressionsmustern und ihren Veränderungen infolge therapeutischer oder umweltbedingter Einflüsse stehen verschiedene toxikogenomische Methoden zur Verfügung. Man unterscheidet sogenannte „offene Systeme“ und „geschlossene Systeme“.

#### **1.1.2.1 Offene Systeme**

Offene Systeme können unabhängig davon angewendet werden, ob die zu untersuchenden Gene in ihrer Sequenz und / oder Funktion bekannt sind oder nicht. Diese Methoden sind dazu geeignet neue Gene und *pathways* aufzudecken. Hierzu zählen unter anderem der *Differential Display* [Liang und Pardee, 1992] und *SAGE (serial analysis of gene expression)*. Der *Differential Display* basiert auf der reversen Transkription der gesamten messenger RNA einer Gewebe- oder Zellprobe mit Hilfe von degenerierten Oligo-dT-Primern. Diese speziellen Primer tragen an ihrem 3'-Ende zwei zusätzliche Nukleotide M und N, wobei es sich bei M um ein beliebiges Platzhalternukleotid (A, C oder G) handelt, bei N um ein Nukleotid, das als Base Adenin, Cytosin, Guanin oder auch Thymin enthalten kann. Durch N werden somit vier verschiedene Oligo-dT-Primer festgelegt, mit denen vier verschiedene mRNA-Populationen umgeschrieben werden können. In der anschließenden

Polymerasekettenreaktion werden wiederum die degenerierten Oligo-dT-Primer sowie üblicherweise 20 verschiedene Dekamere mit beliebiger Sequenz eingesetzt. Differenziell regulierte Transkripte können durch gelelektrophoretische Auftrennung der vier verschiedenen amplifizierten cDNA Populationen sowie anschliessende Klonierung und Sequenzierung identifiziert werden. Da die verwendeten Dekamere beliebige Sequenzen haben, besteht theoretisch die Möglichkeit, mit dieser Methode sämtliche Transkripte einer Probe zu erfassen. Praktisch wird dies jedoch in der Regel nicht erreicht. Ein grosser Nachteil des *Differential Display* besteht ausserdem darin, dass durch die Verwendung randomisierter Dekamere die Temperaturen bei der PCR recht niedrig gehalten werden müssen. Dies kann wiederum zu einer erhöhten Fehlerrate führen.

Auch mit Hilfe der seriellen Genexpressionanalyse (SAGE), die 1995 von Velculescu et al. entwickelt wurde, lässt sich theoretisch das gesamte Transkriptom auf einmal untersuchen, ohne die Sequenzen der Gene zu kennen. Die SAGE beruht auf der Hochdurchsatz-Sequenzierung von 10 bis 20bp langen DNA Fragmenten, sogenannten „tags“. Nach Identifizierung des zum „tag“ korrespondierenden Gens kann festgestellt werden, ob eine differenzielle Regulation in den untersuchten Proben vorliegt.

#### 1.1.2.2 Geschlossene Systeme

Im Gegensatz zu den offenen Systemen lassen sich in geschlossenen Systemen nur Gene untersuchen, von denen bereits bekannt ist, dass sie exprimiert werden. Es können somit keine neuen Gene identifiziert werden. Zu den geschlossenen Methoden zählen vor allem die Mikroarrays. Doch auch die quantitative Echt-Zeit-PCR (TaqMan<sup>®</sup>-PCR) kann dazugerechnet werden, für die mittlerweile ebenfalls Hochdurchsatz-Systeme auf dem Markt erhältlich sind, wie zum Beispiel die „*Micro Fluidic-Card*“ von Applied Biosystems. Diese Plattform ermöglicht die quantitative Expressionsanalyse eines individuell zusammengestellten Gen-Sets im 384-Well Format mit Hilfe der TaqMan<sup>®</sup>-PCR.

Die wohl vielversprechendste Methode zur globalen Genexpressionsanalyse ist die Verwendung von DNA Mikroarrays. Es gibt mittlerweile eine grosse Auswahl an verschiedenen Arrays, die sich in Parametern unterscheiden wie zum Beispiel die Länge des aufgebrachteten PCR Produktes (cDNA oder Oligonukleotid), die Art der

verwendeten Trägermatrix (Glas oder Nylonmembran), die Anzahl der PCR Produkte (komplettes Genom oder *pathway*-bezogen) oder die Art der Herstellung (gespottet oder *in-situ* synthetisiert). Die beiden am häufigsten verwendeten Systeme sind Mikroarrays mit gespotteten cDNA's und Mikroarrays mit *in-situ* synthetisierten Oligonukleotiden [Li et al., 2002].

Für die Herstellung von cDNA Mikroarrays (**Abb. 2**) werden zunächst die gewünschten cDNA-Klone der Ziel-Spezies mit Hilfe der PCR amplifiziert und aufgereinigt. Die ca. 0.6 bis 2.4kb langen PCR-Produkte (*targets*) werden anschliessend robotergesteuert mit Hilfe von Kapillaren oder Tintenstrahl-Vorrichtungen auf eine Trägermatrix aus Glas oder Nylon punktförmig aufgebracht [Duggan et al., 1999]. Für die Hybridisierung werden die zu untersuchenden mRNA Proben aus einem Test- und einem Kontrollexperiment in cDNA umgeschrieben und gleichzeitig mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Durch Messung der Fluoreszenzintensitäten mit einem dualen Laser-Scanner kann schliesslich die Menge an hybridisierter Test- und Kontroll-cDNA bestimmt und verglichen werden.

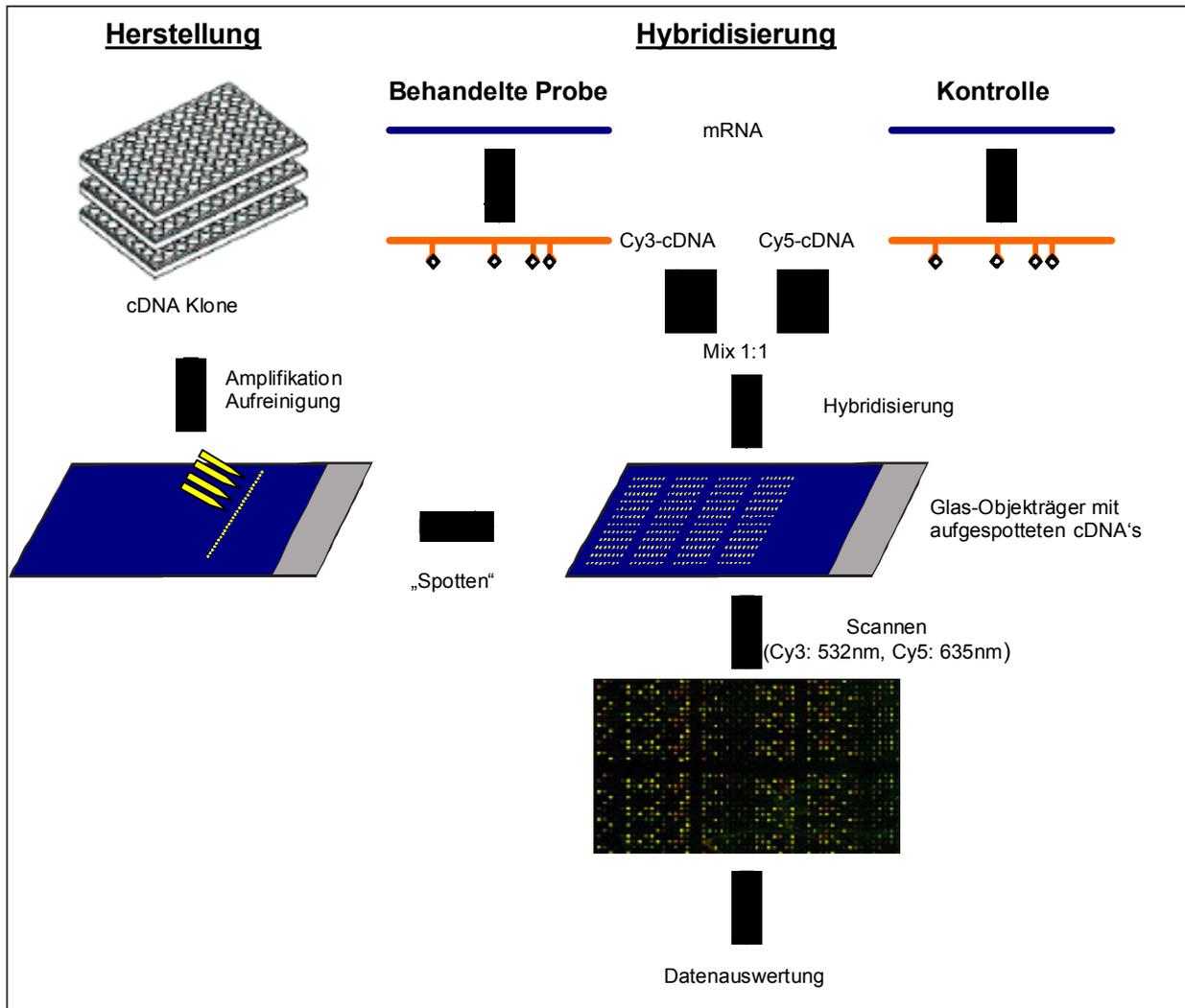


Abb. 2: Herstellung und Hybridisierung von cDNA-Arrays

Mittlerweile werden immer mehr Mikroarrays verwendet, bei denen nicht lange cDNA Sequenzen, sondern nur Oligonukleotide als *targets* aufgebracht werden, deren Länge je nach Hersteller zwischen 16 und 70 Nukleotiden variiert. Diese Oligonukleotid-Mikroarrays haben gegenüber den cDNA Arrays verschiedene Vorteile [Li et al., 2002]:

- Lange cDNA Sequenzen erlauben häufig Kreuz-Hybridisierungen mit Genen, deren Sequenz dem eigentlichen Ziel-Gen sehr ähnlich ist. Besonders Gene aus der gleichen Familie weisen einen hohen Grad an Sequenz-Überschneidungen auf, weshalb ihre eindeutige Identifizierung mit cDNA Mikroarrays schwierig ist.
- Durch Auswahl mehrerer Oligonukleotide für ein Gen, vorzugsweise am 3' Ende des Gens, lassen sich sowohl die Sensitivität als auch die Spezifität der Oligonukleotid-Arrays stark erhöhen.

- Die *targets* können nach ähnlichem G/C-Gehalt und vergleichbarer Schmelztemperatur ausgewählt werden, was insgesamt zu einer besseren Hybridisierungseffizienz führt.
- Die Ausbildung von Sekundärstrukturen, die eine Hybridisierung der Probe verhindern könnten, ist bei den kurzen Oligonukleotiden weniger wahrscheinlich.

Am Beispiel der Affymetrix GeneChips<sup>®</sup> werden in **Abb. 3** die photolithographische Herstellung von Oligonukleotid-Mikroarrays sowie die Hybridisierung der Proben verdeutlicht.

Den Ausgangspunkt bildet eine Glasoberfläche, die kovalent gebundene Verbindungsmoleküle trägt. Diese Verbindungsmoleküle werden mit lichtempfindlichen Schutzgruppen versehen. Durch eine Maske wird die Glasmatrix mit Licht bestrahlt, so dass an ausgewählten Stellen die Schutzgruppe entfernt werden kann. An die freiliegenden Bindungsstellen können nun Nukleotide gekoppelt werden, die wiederum mit einer lichtempfindlichen Schutzgruppe versehen sind. Durch Wiederholung dieses Prozesses mit unterschiedlichen Masken, die jeweils andere Areale der Trägermatrix für die Deprotektion freigeben, lassen sich bis zu 300000 Oligonukleotide auf einem Array synthetisieren [Lipshutz et al., 1999].

Für die Hybridisierung der Probe wird zunächst die mRNA aus einem Testexperiment oder aus einem Kontrollexperiment mit einem speziellen Oligo-dT Primer, der an seinem 5' Ende die Sequenz des Promoters für die T7 RNA Polymerase trägt, umgeschrieben. Nach der *in vitro* Transkription mit Biotin-markierten Nukleotiden wird die biotinylierte cRNA fragmentiert und auf den Array hybridisiert. Die Gegenfärbung der hybridisierten Proben erfolgt mit Phycoerythrin-markiertem Streptavidin. Die Fluoreszenzintensitäten des Phycoerythrins werden für die behandelte Probe und für die Kontrolle auf getrennten Arrays gemessen und schliesslich ausgewertet.

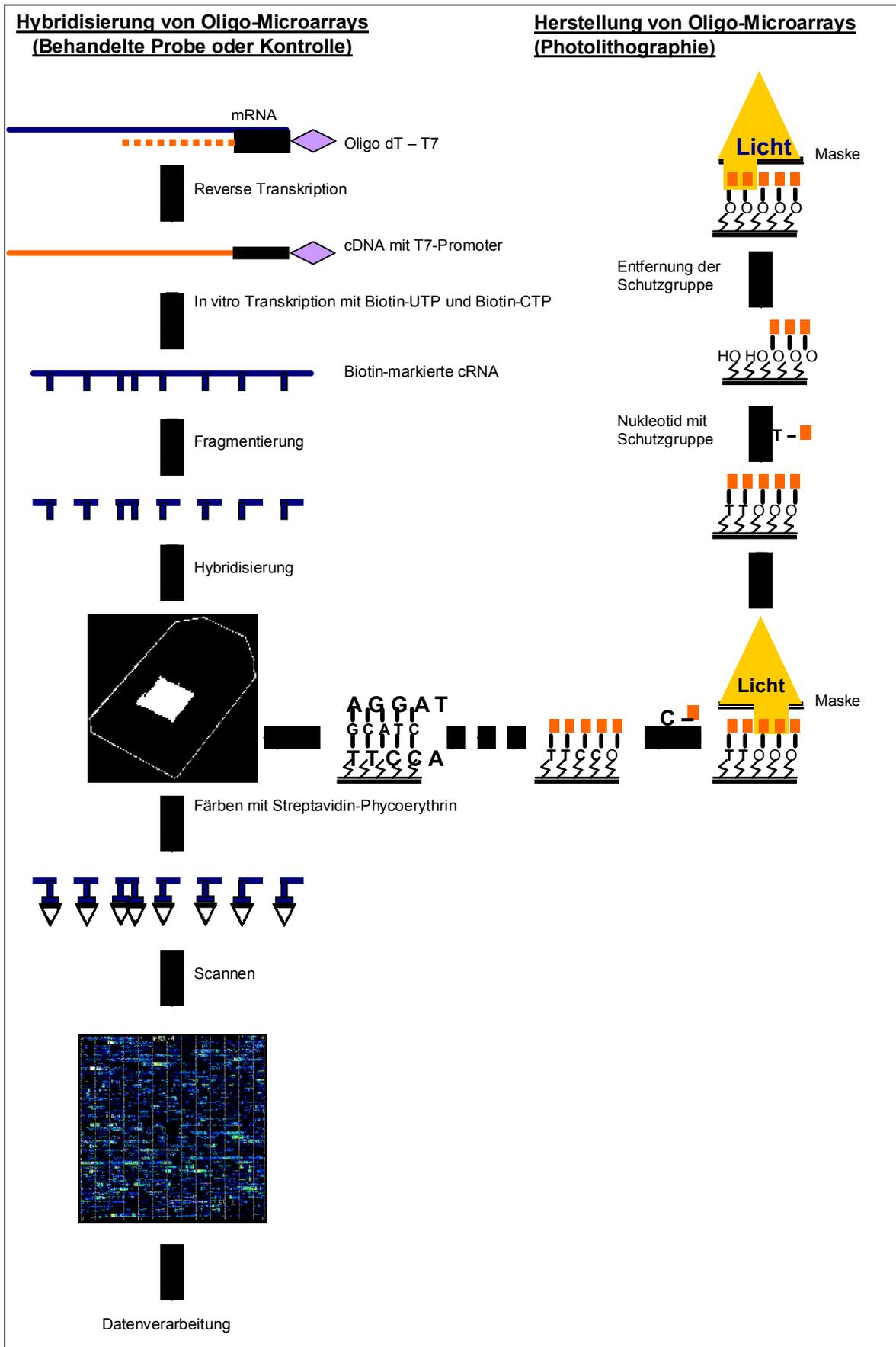


Abb. 3: Herstellung und Hybridisierung von Oligonukleotid-Arrays

### 1.1.3 *Toxicogenomics: Einsatzgebiete*

Die Anwendung von genexpressionsanalytischen Methoden auf das Gebiet der Toxikologie geht von der grundsätzlichen Annahme aus, dass alle toxikologisch relevanten Ereignisse, abgesehen von rasch einsetzender Nekrose, entweder direkt oder indirekt auf eine differenzielle Veränderung der Genexpression zurückzuführen sind oder diese zur Folge haben [Farr und Dunn, 1999; Corton et al., 1999]. Basierend auf diesen Überlegungen lassen sich globale Genexpressionsanalysen auf verschiedene Art und Weise in der Toxikologie einsetzen:

- zur Analyse des Wirkmechanismus von Toxinen
- zur Vorhersage der Toxizität einer unbekannt Substanz
- zur Definition von Schwellenwerten für maximal tolerierbare Toxinexposition
- zum „*Genotyping*“ (Identifizierung von genetischen Polymorphismen)
- zur Extrapolation tierexperimenteller Daten auf den Menschen
- zur Untersuchung der toxischen Auswirkungen von Substanzgemischen

#### 1.1.3.1 *Mechanistische Analyse*

Die Untersuchung des toxischen Wirkmechanismus einer Verbindung ist wahrscheinlich eines der arbeitsaufwendigsten Einsatzgebiete von *Toxicogenomics*. Gene, die nach der Behandlung mit Substanzen mit bekannten toxikologischen Endpunkten wie Karzinogenese, Genotoxizität, Lebertoxizität oder Nephrotoxizität unterschiedliche Expressionen aufweisen, werden bezüglich ihrer Zugehörigkeit zu bekannten biochemischen *pathways* untersucht. Hierbei können mögliche charakteristische Wechselwirkungen zwischen einzelnen Genen oder ganzen *pathways*, die im Zusammenhang mit einer spezifischen toxischen Ausprägung stehen, identifiziert und als typische Expressionsmuster (sogenannte „*fingerprints*“) für einen bestimmten toxikologischen Endpunkt etabliert werden [Rockett und Dix, 1999; Steiner und Anderson, 2000]. Diese Kenntnis der molekularen Veränderungen, die der Manifestation spezifischer pathologischer Schädigungen vorausgehen, ist von sehr grossem Wert für die möglichst frühzeitige Abschätzung des toxischen Potenzials einer Substanz [Farr und Dunn, 1999].

Für einige Toxine wurde bereits die Existenz spezifischer Expressionsmuster nachgewiesen. Zum Beispiel konnten Burczynski et al. (2000) nach der Behandlung einer humanen Leberzelllinie (HepG2) mit einer DNA-schädigenden Substanz (Cisplatin) und mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (Diflunisal und Flufenaminsäure) Genexpressionsprofile erstellen, die eine mechanistische Diskriminierung der beiden Toxingruppen voneinander erlaubten. Zusätzlich konnten Gensets identifiziert werden, mit deren Hilfe eine prädiktive Aussage bezüglich eines DNA-schädigenden oder eines inflammatorischen Toxizitätsmechanismus von 100 weiteren Substanzen in einer Datenbank möglich war.

#### 1.1.3.2 Prädiktion von Toxizität

Durch den Aufbau einer öffentlichen Datenbank, in der diese „*fingerprint*“-Profile von Substanzen mit unterschiedlichsten Toxizitätsmechanismen katalogisiert und gespeichert werden, würden sich die Genexpressionsmuster unbekannter Chemikalien oder neuer Kandidaten in der Arzneimittelentwicklung mit bereits bekannten Mustern vergleichen lassen, was eine Aussage über die Art und das Ausmass der möglicherweise vorhandenen Toxizität der unbekannteren Verbindungen erlauben würde [Aardema et al., 2002; Thomas et al., 2001]. Diese Datenbank-basierte Beurteilung potenzieller Toxine wird zwar die herkömmlichen Tiermodelle nicht ersetzen, sie kann aber bereits frühzeitig, beispielsweise in der Entwicklung eines neuen Arzneimittels, wichtige Hinweise für die Auswahl eines geeigneten Kandidaten oder eines passenden Testmodells geben und folglich dabei helfen, sowohl Zeit als auch Kosten bei der Entwicklung zu sparen und den Bedarf an Versuchstieren deutlich zu verringern [Nuwaysir et al., 1999; Rodi et al., 1999]. Der Aufbau einer solchen öffentlichen Datenbank wird Jahre benötigen und ausserdem die weltweite Zusammenarbeit von Wissenschaftlern aus Industrie, Regierungseinrichtungen und Universitäten erfordern, bevor auf dieser Basis verlässliche Risikoabschätzungen gemacht werden können [Aardema et al., 2002; Storck et al., 2002; Corton und Stauber, 2000]. Ein erster Schritt in diese Richtung wurde mit dem Beginn eines Projektes unternommen, das in einer Kooperation des *International Life Sciences Institute / Health and Environmental Sciences Institute* (ILSI / HESI) und Partnern aus Industrie, öffentlichen und universitären Forschungsinstituten durchgeführt wird und die Anwendung von *Genomics* und

*Proteomics* in der mechanistisch-basierten Risikobewertung untersuchen soll. Auch das *US National Center for Toxicogenomics* ([www.niehs.nih.gov/nct/](http://www.niehs.nih.gov/nct/)) ist im Begriff eine öffentliche Datenbank aufzubauen, in der molekulare Expressionsdaten aus den Gebieten *Transcriptomics*, *Proteomics*, *Metabonomics* und der konventionellen Toxikologie verknüpft werden sollen [Waters et al., 2003].

#### 1.1.3.3 Risikoabschätzung und Schwellenwertdefinition

Es wird allgemein davon ausgegangen, dass Toxin-induzierte Veränderungen in der Genexpression bereits bei Dosierungen auftreten, die noch keine morphologisch erkennbaren Auswirkungen zeigen. Durch Vergleich der Expressionsprofile, die durch Applikation ansteigender Toxin-Konzentrationen erhalten wurden, lässt sich somit unter Umständen ein Schwellenwert definieren, unterhalb dessen keine Gesundheitsrisiken zu erwarten sind [Farr und Dunn, 1999]. Diese Form der Anwendung *Toxicogenomics*-basierter Technologien wird vermutlich in Zukunft eine grosse Rolle bei der Risikoabschätzung von potenziell umweltschädigenden Chemikalien spielen [Simmons und Portier, 2002].

#### 1.1.3.4 Untersuchung genetischer Polymorphismen

Für eine individuelle Festlegung der Therapie und der gezielten Vermeidung von Über- oder Unterdosierungen kann es von Bedeutung sein, die genetische Prädisposition eines Individuums zu berücksichtigen. Hier besteht eine weitere Anwendungsmöglichkeit für *Toxicogenomics* bzw. *Pharmacogenomics*. Durch die Aufdeckung von genetischen Polymorphismen (sogenannten *single nucleotide polymorphisms* oder SNP's) lassen sich beispielsweise Personen identifizieren, die SNP's in Genen für *Cytochrom P450 2A6*, *Cytochrom P450 2C19* oder *NAT2* aufweisen, und somit bestimmte Arzneimittel wie verschiedene Barbiturate, Proguanil, Omeprazol, Hydrazin oder Isoniazid entweder nur bedingt oder übermässig metabolisieren können, was medizinisch unerwünschte Effekte zur Folge haben kann [Weber, 1999]. Es wurden bereits spezielle Mikroarrays entwickelt, um zum Beispiel SNP's in Cytochrom-codierenden Genen zu identifizieren („*Affymetrix CYP 450 Array*“). Auch die Prädisposition eines Individuums für die Entwicklung

bestimmter Krankheiten wie zum Beispiel Brustkrebs kann durch eine Analyse von genetischen Polymorphismen im BRCA1 und BRCA2 Gen bestimmt werden [Favis und Barany, 2000]. Diese personalisierte Risikoabschätzung wird vermutlich zukünftig eine entscheidende Rolle bei einer individuell angepassten Krankheitsdiagnose und -therapie einnehmen, wobei natürlich ethische Aspekte nicht ignoriert werden dürfen.

#### *1.1.3.5 Extrapolation tierexperimenteller Daten auf den Menschen*

Neue Arzneimittel oder Chemikalien werden traditionell und ethisch bedingt zunächst in Versuchstieren getestet und die gewonnenen Daten werden anschliessend auf den Menschen extrapoliert. Bei nahezu allen tierexperimentellen Methoden zur Untersuchung von Toxizität bestehen allerdings quantitative, zum Teil sogar qualitative Unterschiede in den Dosis-Wirkungs-Beziehungen zwischen dem verwendeten Versuchstier und dem Menschen. Um die im Tiermodell gewonnenen Daten besser auf den Menschen übertragen zu können, müssen sogenannte „Spezies-überbrückende Biomarker“ gefunden werden [Aardema et al., 2002]. Ein Ansatz dazu wäre, nach der Komplettierung der Sequenzen des humanen Genoms und der Genome der klassischen Versuchstiere, konservierte kodierende Regionen zwischen den menschlichen und den Tier-Genomen zu identifizieren. Diese konservierten Sequenzen können anschliessend zur Herstellung orthologer Mikroarrays verwendet werden, die eine aussagekräftige Extrapolation von Expressionsdaten auf den Menschen zulassen sollten [Thomas et al., 2002].

#### *1.1.3.6 Untersuchung der toxischen Auswirkungen von Substanzgemischen*

In der heutigen Zeit spielt die tägliche Belastung des menschlichen Körpers durch eine Vielzahl potenzieller Toxine aus unserer Umwelt eine grosse Rolle. Auch zeigen viele Krankheiten ein heterogenes Bild von Symptomen, die eine Behandlung mit mehreren Arzneimitteln erforderlich machen. Die Wechselwirkungen zwischen diesen Substanzen können additiv, antagonistisch oder sogar potenzierend sein. Die meisten Toxizitätsuntersuchungen sowie Risikobewertungen werden mit Einzelsubstanzen durchgeführt. Mit Hilfe von Mikroarrays lassen sich dagegen auch

Genexpressionsveränderungen, die durch Substanzgemische hervorgerufen werden, untersuchen. Durch Vergleich von Expressionsmustern, hervorgerufen durch Substanzgemische mit den Mustern der Einzelsubstanzen, können die Wechselwirkungen zwischen den Komponenten eines Gemisches untersucht werden [Aardema et al., 2002].

#### **1.1.4 Toxicogenomics: Grenzen**

Wie bei jeder Technologie gibt es auch für den Einsatz von *Toxicogenomics* Technologien gewisse Grenzen. Zum Beispiel kann niemand garantieren, dass beobachtete Regulationen in der Genexpression auch wirklich zu Veränderungen der Protein-Level führen und schliesslich funktionelle Auswirkungen haben. Weiterhin wird die Änderung des Phosphorylierungsstatus von Proteinen durch die Untersuchung des Transkriptoms nicht reflektiert [Debouck und Goodfellow, 1999; Pennie et al., 2000]. Diese Fragestellungen können jedoch durch eine Kombination toxikogenomischer mit toxikoproteomischen Untersuchungen bearbeitet werden.

Weiterhin wird für die Analyse der Genexpression Gewebe- oder Zellmaterial benötigt, welches nur durch invasive Eingriffe wie Biopsien oder Organentnahmen zugänglich ist. Auch die relativ grossen Mengen an RNA, die für die Hybridisierung auf Mikroarrays benötigt werden, so wie die dringend notwendige Bioinformatik und die hohen Kosten für Mikroarrays stellen limitierende Faktoren dar. Im Laufe der letzten Jahre sind allerdings erhebliche technische Fortschritte gemacht worden, was die Mikroarrays erschwinglicher machte und zu einer Reduktion des erforderlichen RNA Materials von ursprünglich 50-100µg auf 0,1-5µg führte.

Die zukünftigen Herausforderungen auf dem Gebiet *Toxicogenomics* werden sicherlich darin liegen, zu klären, bei welcher Behandlungsdosis und –dauer Genexpressionsanalysen durchzuführen sind, welchen Einfluss Alter, Spezies, Stamm und Ernährung der Versuchstiere auf transkriptionelle Änderungen haben und wie gut *in vitro* gewonnene Expressionsdaten mit *in vivo* Systemen korrelieren. Auch bei der Etablierung einer Genexpressionsprofil-Datenbank sollten diese Faktoren im Studiendesign berücksichtigt werden [Storck et al., 2002; Thomas et al., 2002].

## 1.2 Die Niere

Die Niere ist für den Organismus als Ausscheidungsorgan sowohl für Xenobiotika und ihre Metaboliten als auch für physiologische Stoffe von besonderer Bedeutung. Weitere essentielle Aufgaben der Niere beinhalten die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie des Säure-Basen-Gleichgewichtes und die Beteiligung an der Kontrolle des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens und des arteriellen Blutdrucks. Dieser Abschnitt der Einleitung soll einen Überblick über die Anatomie der Niere, ihre Besonderheiten als Zielorgan für Toxine und den aktuellen Stand der Diagnose und Untersuchung von Nephrotoxizität sowie die Einsatzmöglichkeiten von *Toxicogenomics* in diesem Gebiet liefern.

### 1.2.1 Kurzer Überblick über die Anatomie

Die Niere hat eine bohnenförmige Gestalt und weist beim Menschen einen Längsdurchmesser von ungefähr 10-12cm, einen Querdurchmesser von etwa 5-6cm und ein Gewicht von etwa 120-200g auf (**Abb. 4**). Die Niere lässt sich im Wesentlichen in vier Abschnitte unterteilen: die Nierenkapsel, die Nierenrinde (Cortex), das Nierenmark (Medulla) und das Nierenbecken (Pelvis) mit dem Harnleiter (Ureter).

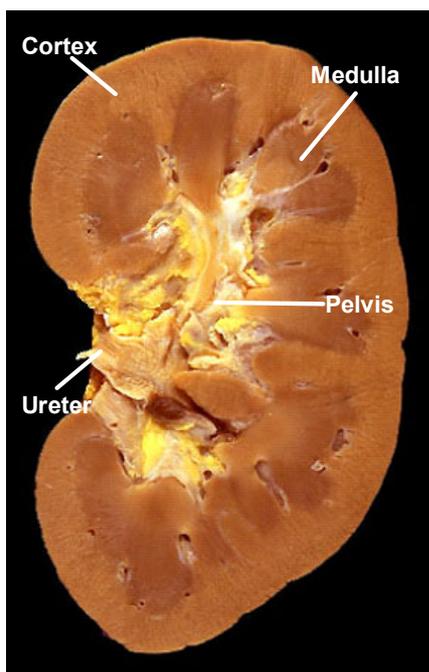


Abb. 4: Längsschnitt durch eine gesunde humane Niere  
(Quelle: <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL116.html>).  
Gut zu erkennen sind die etwas heller gefärbte äussere Rinde und das etwas dunkler gefärbte innen liegende Nierenmark. Das Nierenbecken enthält vereinzelt Fettablagerungen (gelb) und mündet in den Ureter.

Mikroskopisch betrachtet besteht die Niere aus etwa 1 bis 1.2 Millionen funktioneller Einheiten, den sogenannten Nephren. Ein Nephron (**Abb. 5**) kann unterteilt werden in das Nierenkörperchen (Glomerulum), den Tubulusapparat und das Sammelrohr. Das Glomerulum besteht aus einem Kapillarknäuel, das von der Bowman'schen Kapsel umgeben ist. Hier erfolgt die Filtration des Blutes unter Bildung eines nahezu eiweissfreien Primärharns. Bei der nachfolgenden Passage des Primärharns durch den Tubulusapparat werden zunächst im proximalen Tubulus Glucose, Aminosäuren und Elektrolyte aktiv rückresorbiert, was von einer verstärkten Rückgewinnung von Wasser begleitet wird. Weiterhin werden Abfallprodukte des Stoffwechsels und bestimmte Arzneimittel bzw. deren Metabolite aktiv über spezielle Transportsysteme in das Tubuluslumen sezerniert. In der Henle'schen Schleife, im distalen Tubulus und schliesslich im Sammelrohr werden hauptsächlich Elektrolyte und Wasser rückresorbiert. Die Regulation der Elektrolyt- und Wasserresorption sowie des Säure-Basen-Haushaltes erfolgt durch verschiedene hormonelle Regelkreise, die einer zentralen Kontrolle unterliegen. Hierbei spielt besonders das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System eine entscheidende Rolle.

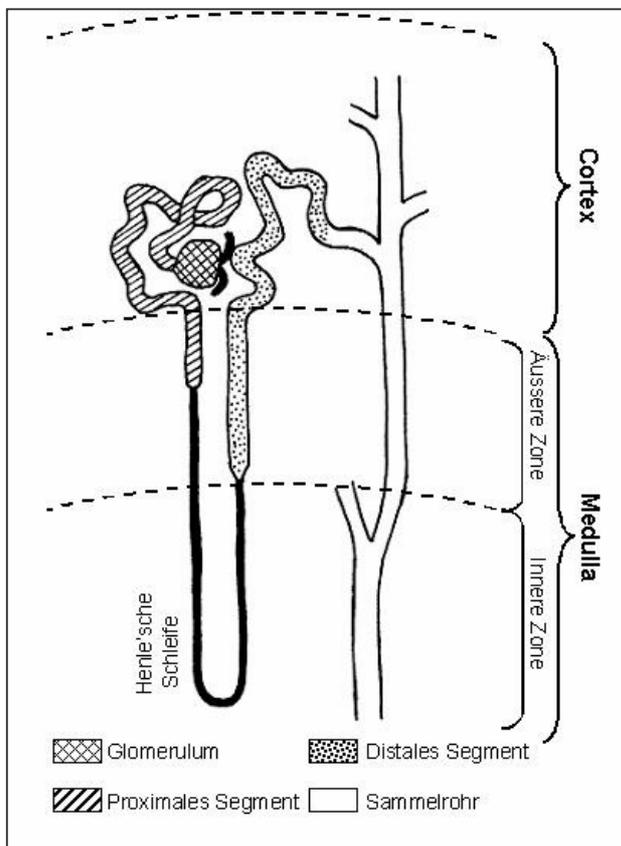


Abb. 5: Schematische Darstellung eines Nephrons.

### **1.2.2 Die Niere als Zielorgan für Toxine**

Die Niere ist häufig Ziel von Arzneimittel- oder Chemikalien-induzierter Organtoxizität. Das Zytostatikum Cisplatin zum Beispiel führt nach nur einmaliger Gabe bei bis zu 25% der damit behandelten Patienten zu Nierenversagen [Madias und Harrington, 1978]. Aminoglykosid-Antibiotika sind dafür bekannt, in 10 bis 20% aller therapeutischen Anwendungen nephrotoxisch zu wirken [Swan, 1997] und die Häufigkeit von renalen Syndromen im Zusammenhang mit der Einnahme von nicht-steroidalen Analgetika wird auf bis zu 18% geschätzt [Murray et al., 1990].

Diese hohe Anfälligkeit der Niere kann auf verschiedene nierenspezifische Eigenschaften zurückgeführt werden. Die meisten Xenobiotika sowie zahlreiche Chemikalien werden renal ausgeschieden. Diese Substanzen erreichen während ihrer Nephronpassage Konzentrationen, die weit über denen liegen, welchen andere Organe ausgesetzt sind. Die Gründe dafür liegen zum einen in der hohen Durchblutung der Nieren, die beim Erwachsenen etwa 1700 Liter pro Tag beträgt, was etwa 20-25% des Herzzeitvolumens in körperlicher Ruhe entspricht. Zum anderen haben viele Substanzen in der Niere eine sehr hohe Akkumulationsrate.

Diese starke Anreicherung von Toxinen in der Niere kann durch verschiedene Mechanismen zustande kommen. Zum Beispiel besteht eine der Hauptaufgaben der Niere darin, Wasser rückzugewinnen. Dabei kann es zu einer Aufkonzentration von gelösten Stoffen im Tubuluslumen kommen, was wiederum zum Auskristallisieren von Substanzen mit niedrigem Löslichkeitsprodukt und schliesslich zur Nierenobstruktion führen kann. Weiterhin besitzt die Niere zahlreiche aktive und passive Transportsysteme, die einerseits dazu dienen, Ionen, Aminosäuren und Kohlenhydrate rückzugewinnen oder zu sezernieren, andererseits aber auch für die Aufnahme oder Sekretion der meisten renal eliminierten Xenobiotika und Chemikalien verantwortlich sind. Als Beispiel wäre Quecksilber-II-Chlorid zu nennen, welches an Sulfhydrylgruppen von Proteinen in der Bürstensaummembran des proximalen Tubuls bindet und schliesslich internalisiert wird [Diamond und Zalups, 1998]. Aminoglykoside werden dagegen vermutlich über die spezifische Bindung an anionische Phospholipide in der Bürstensaummembran mit anschliessender Pinocytose aufgenommen [Werner et al., 1995]. Zusätzlich wird diskutiert, ob Aminoglykoside sogar aktiv über Bindung an den Megalin-Rezeptor rückresorbiert werden [Fanos und Cataldi, 2001]. Als letztes Beispiel sind beta-Lactam Antibiotika

zu nennen, welche bekannterweise aufgrund von aktiver Aufnahme über das renale organische Anionen Transportsystem in den proximalen Tubuluszellen angereichert werden [Kaloyanides, 1994].

Die meisten Rückresorptionsprozesse in der Niere sind, sofern sie nicht selbst unter ATP-Verbrauch stattfinden, auf den energiezehrenden Aufbau eines Natriumkonzentrationsgefälles als treibende Kraft angewiesen. Dementsprechend ist die Niere gegenüber ischämischen Vorfällen besonders anfällig, da sie zu einer Erschöpfung der ATP Vorräte führen können und folglich den Aufbau eines Natriumgradienten über die Membranen verhindern [Fanos und Cataldi, 2001].

Eine weitere Spezifität der Niere ist die Expression einer Vielzahl von metabolisch aktiven Enzymen. Hierzu sind nierenspezifische Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen, bestimmte Glutathion-S-Transferasen und Sulfotransferasen sowie die Gamma-Glutamyltransferase zu zählen. Viele Substanzen, die zunächst harmlos sind, können durch diese Enzyme zu Toxinen bioaktiviert werden. Zum Beispiel wird Hexachlorbutadien in der Leber zunächst mit Glutathion konjugiert und schliesslich in der Niere durch die dort vorkommende Cystein-Konjugat beta-Lyase zu einem toxischen Metaboliten umgewandelt [Dekant und Vamvakas, 1996]. Auch das Karzinogen Vinylidenchlorid wird erst in der Niere durch eine Androgen-abhängige Cytochrom P450 Monooxygenase, die ausschliesslich im proximalen Tubulus männlicher Mäuse exprimiert wird, aktiviert [Dekant, 1996].

### **1.2.3 *Verschiedene Ausprägungen von Nephrotoxizität***

Nephrotoxine können ihren Effekt auf die Niere entweder durch einen einzelnen spezifischen Mechanismus ausüben, oder aber durch mehrere Mechanismen gleichzeitig. Es liegen bereits mehrere Ansätze vor, eine Kategorisierung nephrotoxischer Vorkommnisse entweder entsprechend dem Zielort des Toxins [Koren, 1989] oder entsprechend dem generellen toxischen Effekt der Substanz [Werner et al., 1995] vorzunehmen. Im Folgenden sollen die bedeutendsten nephrotoxischen Ereignisse kurz vorgestellt werden.

### 1.2.3.1 Akutes Nierenversagen

Das akute Nierenversagen ist durch einen rapiden Abfall sämtlicher renaler Funktionen gekennzeichnet und tritt als Folge verschiedenster Ereignisse auf, die durch Nephrotoxine induziert werden. Zu den auslösenden Mechanismen zählen unter anderem akute Tubulusnekrose, intratubuläre Obstruktion, verminderte renale Durchblutung und thrombotische Vorkommnisse, wie das hämolytische urämische Syndrom.

Die akute Tubulusnekrose ist normalerweise auf eine direkte Verletzung des Tubulus aufgrund lokaler Anhäufung und / oder Aufnahme eines Toxins zurückzuführen. Dies kann zum einen zur Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktionen und somit des Energie-Haushaltes führen (Quecksilberionen, Cisplatin), zum anderen zu einer Hemmung des Phospholipidmetabolismus und Veränderungen im intrazellulären Calciumspiegel (Aminoglykoside), aber auch zu einer Hemmung sämtlicher Transportmechanismen (Tetrachlorkohlenstoff) oder zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität (Amphotericin B).

Die akute interstitielle Nephritis ist vor allem durch eine entzündliche Reaktion des Interstitiums und dessen Infiltration mit Lymphozyten, Monozyten und Plasmazellen gekennzeichnet. Diese Nebenwirkung tritt häufig bei der Behandlung mit Penizillinen, Cephalosporinen, Sulfonamiden, nicht-steroidalen Analgetika, Allopurinol und verschiedenen chinesischen Kräutern auf.

Die Anwendung hyperosmolarer Röntgenkontrastmittel ist eine der Hauptursachen für das Auftreten einer verminderten renalen Durchblutung [Koren, 1989]. Solche Durchblutungsstörungen der Niere können allerdings auch eine Kombination aus einer bereits vorher existierenden renalen Ischämie mit der langfristigen Anwendung nicht-steroidaler Analgetika zur Ursache haben. Die Ischämie führt über die Aktivierung von Angiotensin II und Vasopressin zur Vasokonstriktion, welche durch nicht-steroidale Analgetika verstärkt wird, da diese die Synthese der vasodilatierend wirkenden Prostaglandine verhindern [Bennett und Porter, 1990].

### 1.2.3.2 *Chronisches Nierenversagen*

Chronisches Nierenversagen ist eine tubulointerstitielle Erkrankung, die sich aus verschiedenen Vorerkrankungen entwickeln kann. Hierzu zählen akutes Nierenversagen, primäre Glomerulopathie, Nephrosklerose und Stenose der renalen Arterie, sofern sie von interstitieller Fibrose begleitet werden [Bohle et al., 1989].

Das Immunsuppressivum Cyclosporin A ist beispielsweise dafür bekannt, tubulointerstitielle Läsionen zu induzieren, die schliesslich chronisches Nierenversagen zur Folge haben [Paller, 1990]. Der langfristige Konsum von Nahrungsmitteln, die Kontaminationen des Mycotoxins Ochratoxin A enthalten, führt in den meisten Fällen zu einer ausgeprägten interstitiellen Fibrose und tubulärer Atrophie. Dieses klinische Erscheinungsbild wird sowohl mit chronischer Nephropathie in Schweinen als auch mit der endemischen Balkan Nephropathie des Menschen in Verbindung gebracht [Stefanovic und Polenakovic, 1991].

Das Basistherapeutikum D-Penizillamin und der Blutdrucksenker Captopril können durch Bindung an glomeruläre Strukturen über ihre Sulfhydrylgruppen zu Veränderungen der Filtrationsleistung des Glomerulums und dadurch bei manchen Patienten zu primärer Glomerulopathie führen [Koren, 1989]. Auch der chronische Missbrauch von nicht-steroidalen Antiphlogistika kann als Folge von primärer Glomerulopathie, interstitieller Nephritis und / oder papillärer Nekrose zu chronischem Nierenversagen führen [Paller, 1990].

### 1.2.3.3 *Veränderungen im Flüssigkeits- und Elektrolyt-Haushalt*

Eine der Hauptfunktionen der Niere ist die Regulation des Wasser- und Elektrolyt-Haushaltes im Organismus. Einige Nephrotoxine können den hochempfindlichen Regelprozess der Urinkonzentration und der Rückresorption von Ionen und anderen im Urin gelösten Stoffen durcheinander bringen und zu einer erhöhten Ausscheidungsrate (Natriurie, Kaliurie, Glucosurie etc.) führen.

Als Beispiel hierfür wären Lithiumsalze zu nennen, die zur Behandlung manisch-depressiver oder schizophrener Psychosen eingesetzt werden. Bei 20 – 70% aller behandelten Patienten interferiert Lithium mit der Wirkung des antidiuretischen Hormons (ADH) im distalen Tubulus und im Sammelrohr, was die Entwicklung eines

nephrogenetischen Diabetes insipidus zur Folge haben kann [Gabutti et al., 1998]. Veränderungen im Kaliumhaushalt treten häufig bei der Behandlung mit Cyclosporin A auf, was vermutlich auf eine Hemmung der Reninaktivität im Plasma sowie eine Hyposensibilisierung des Tubulus gegenüber Aldosteron zurückzuführen ist, wodurch schliesslich die Kaliumausscheidung stark beeinträchtigt wird [Bantle et al., 1985].

#### *1.2.3.4 Nierenkarzinogenese*

In verschiedenen Studien sowie in zahlreichen Karzinogenese Assays, durchgeführt im Rahmen des *“US National Toxicology Program”*, wurde für eine grosse Anzahl von Substanzen eine Beteiligung an der Entwicklung von renalen Karzinomen nachgewiesen [Huff, 1999]. Eine Vielzahl an möglichen Mechanismen der Tumorentstehung infolge Toxineinwirkung wird diskutiert. Hier ist vor allem die Bildung von DNA Addukten unter dem Einfluss von Nitrosaminen oder Ochratoxin A zu nennen [Obrecht-Pflumio und Dirheimer, 2000]. Eine weitere Ursache kann die oxidative Schädigung von DNA durch beispielsweise Kaliumbromat sein [Umemura et al., 1998]. D-Limonen und Perchlorethylen führen dagegen in männlichen Mäusen zu einer lysosomalen Akkumulation von Alpha-2-Mikroglobulin, was zum Untergang von proximalen Tubulusepithelzellen und anschliessender regenerativer Hyperplasie führen kann [Dietrich und Swenberg, 1991; Goldsworthy et al., 1988].

#### ***1.2.4 Aktueller Stand in Diagnostik und mechanistischer Untersuchung von Nephrotoxizität***

Eine frühe Diagnose Toxin-bedingter renaler Schädigungen ist von ausserordentlicher Wichtigkeit, denn viele akut-toxische Effekte sind nahezu vollständig reversibel, sobald die Exposition mit dem verursachenden Agens aufgehoben wird. Auf diese Weise kann auch der Übergang in einen chronisch nephrotoxischen Zustand verhindert werden. Die Gewinnung von Erkenntnissen über den Wirkmechanismus eines Toxins könnte in der Pharmaindustrie die Auswahl eines vielversprechenden Entwicklungskandidaten mit geringem nephrotoxischen Potenzial aus einer Gruppe von neuen Substanzen entscheidend beeinflussen. Mechanistisches Wissen kann auch für die Behandlung oder die Verminderung von

Nephrotoxizität bei bereits im Einsatz befindlichen Arzneimitteln durch beispielsweise Co-Applikation von gegenregulatorischen Substanzen von grossem Nutzen sein. So wurde zum Beispiel festgestellt, dass durch gleichzeitige Gabe des durchblutungsfördernden Wirkstoffes Pentoxyphyllin die Häufigkeit von Cyclosporin A-induziertem Nierenversagen entscheidend verringert werden kann [Kaputlu et al., 1997]. Auch das Auftreten von nephrotoxischen Ereignissen während der Behandlung mit dem Zytostatikum Adriamycin konnte durch die zusätzliche Applikation von Curcumin auf ein geringes Mass gesenkt werden [Venkatesan et al., 2000].

Für die Untersuchung renaler toxischer Schädigungen steht ein relativ breites Spektrum an Methoden zur Verfügung, das sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Modelle einschliesst.

#### 1.2.4.1 Enzymmessungen

Die klassische Methode, die auch heute noch verbreitete Anwendung findet, ist die Messung von Veränderungen in der Ausscheidung von Markerenzymen wie N-Acetyl-beta-D-Glukosaminidase, alkalische Phosphatase, Alaninaminopeptidase oder beta-2-Mikroglobulin mit dem Urin [Kunin et al., 1978]. Die Bestimmung von Serum-Kreatinin und Blutharnstoff-Stickstoff-Werten wird ebenfalls häufig zur Diagnose von Nierenschäden eingesetzt. Die Entwicklung von Techniken wie beispielsweise der nuklearen magnetischen Resonanzspektroskopie (NMR) ermöglicht ausserdem die Analyse des gesamten Proteinspektrums im Urin eines Patienten in einem einzigen Experiment und erleichtert die Identifizierung weiterer Biomarker für die Detektion von Nephrotoxizität [Holmes et al., 1992].

Vielversprechend für die Auffindung neuer Nephrotoxizitätsmarker ist auch die Verwendung von Proteomics Technologien. Zwei-dimensionale Gelelektrophorese gefolgt von massenspektrometrischer Identifizierung der differenziell regulierten Proteine sind in verschiedenen Studien zur Lösung dieser Problemstellung schon erfolgreich eingesetzt worden [Rasmussen et al., 1996; Pang et al., 2002]. Veränderungen in der Ausscheidung oder Aktivität von Markerenzymen können ebenso mit *in vitro* Modellen untersucht werden.

#### 1.2.4.2 *In vitro* Modelle

*In vitro* Modelle, die verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse liefern, sind in der heutigen toxikologischen Forschung von grosser Bedeutung. Besonders unter dem Aspekt der drei „R“ zum Wohle von Versuchstieren („*reduction, replacement and refinement*“), die bereits 1959 von W.M.S. Russel und R.L. Burch erstmals postuliert wurden, können *in vitro* Modelle entscheidend zu Verringerung, Austausch und Verbesserung von Tierversuchen beitragen. Sie bieten besonders auf dem Gebiet von *Toxicogenomics* die Möglichkeit zur Durchführung von zeitsparenden Studien unter Verbrauch geringster Mengen an Testsubstanz. Zum anderen existieren verschiedene humane Zellkulturmodelle, wodurch Extrapolationen von Genexpressionsergebnissen auf den Menschen wesentlich aussagekräftiger werden. Um *in vitro* Modelle erfolgreich einsetzen zu können und um Ergebnisse zu erhalten, die auf *in vivo* Verhältnisse übertragbar sind, ist es allerdings unerlässlich, die Leistungen und Limitationen eines *in vitro* Modells für die jeweilige Fragestellung zu charakterisieren.

Die Palette an *in vitro* Modellen zur Untersuchung von Nephrotoxizität reicht von der isolierten, perfundierten Komplettniere oder einzelnen Nephron-Segmenten über Gewebescheibchen („*slices*“) aus Ratten- oder Kaninchen-Nieren bis hin zu frisch isolierten Tubulusfragmenten oder renalen Zellen und letztendlich verschiedenen permanenten Nierenzellkulturen. Obwohl perfundierte Nieren und Nephron-Segmente die Möglichkeit bieten, funktionelle Eigenschaften spezifischer Bereiche des Nephrons unter Beibehaltung der tubulovaskulären Integrität zu untersuchen, werden sie aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer von nur wenigen Stunden nur selten eingesetzt. Im Gegensatz dazu sind renale „*slices*“ sehr beliebt, um Transportvorgänge und Toxizität zu untersuchen. Der Hauptnachteil der „*slices*“ besteht darin, dass die Oberflächen bei der Herstellung des Schnittes leicht beschädigt werden und einige Zellen an den Schnittstellen bereits erheblichem Stress ausgesetzt sind, was die Ergebnisse beeinträchtigen kann.

Primäre Zellkulturen, bestehend aus proximalen Tubuluszellen, Sammelrohrzellen oder frisch isolierten Glomeruli, stellen äusserst geeignete Modelle für die Erforschung von toxischen Effekten dar, die spezifisch für einen bestimmten renalen Zelltyp sind. Sie sind allerdings nicht einsetzbar, um Auswirkungen von Nierenschädigungen zu untersuchen, die spezifische Bereiche der Niere betreffen, in

denen der kultivierte Zelltyp morphologisch nicht vertreten ist. Weiterhin ist die Isolation von primären Zellen und ihre Kultivierung nicht trivial und sehr zeitaufwändig.

Permanente Zelllinien wie zum Beispiel LLC-PK1 (proximale Tubuluszellen aus dem Schwein), OK (proximale Tubuluszellen aus dem Opossum), NRK (proximale Tubuluszellen aus der Ratte) und MDCK (Sammelrohrzellen aus dem Hund) bieten im Gegensatz zu den primären Zellen den Vorteil einer einfachen Kultivierung und einer nahezu unbegrenzten Lebensdauer. In verschiedenen Studien wird der erfolgreiche Einsatz dieser Zelllinien zur Identifizierung renaler Toxine bestätigt [Li et al., 2003; Rezzani et al., 2002]. Nachteilig wirkt sich dagegen aus, dass diese Zelllinien verschiedene nierenspezifische Eigenschaften wie bestimmte metabolische Aktivitäten und Transportprozesse eingebüsst haben [Courjault-Gautier et al., 1995; Gstraunthaler, 1988], wodurch Ergebnisse bezüglich des nephrotoxischen Potenzials einer Verbindung, die mit diesen Zellkulturen gewonnen wurden, kritisch zu betrachten sind. LLC-PK1 Zellen können zum Beispiel das Enzym Fruktose-1,6-bisphosphatase nicht mehr exprimieren, wodurch sie ihre Fähigkeit zur Gluconeogenese eingebüsst haben [Pfaller und Gstraunthaler, 1998]. Ausserdem fehlt ihnen ein bestimmter Probenecid-sensitiver organischer Anionentransporter [Hori et al., 1993]. OK Zellen dagegen weisen keine Aktivität der Enzyme Gamma-Glutamyltranspeptidase und alkalische Phosphatase mehr auf, die jedoch beide als wichtige funktionelle Marker des proximalen Nephrons angesehen werden [Gstraunthaler, 1988].

Ein Hauptnachteil bei der Erforschung von Nephrotoxizität, der allen oben genannten Testmodellen gemeinsam ist, ist die Tatsache, dass sehr frühe toxische Ereignisse, die unter Umständen bereits vor sichtbaren Änderungen der Nierenmorphologie auftreten können, zum grössten Teil nicht detektierbar sind. Der Grund dafür liegt vor allem darin, dass die Niere sofort nach dem Kontakt mit einer toxischen Substanz gegenregulatorische Massnahmen einleitet, um die normale Nierenfunktion so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Dieser Mechanismus wird als die „funktionelle Reserve“ der Niere bezeichnet und ist in der Lage die ersten Symptome einer nephrotoxischen Schädigung zu maskieren. Dadurch können toxische Läsionen unter Umständen erst erkannt werden, nachdem nahezu 70-80% der epithelialen Masse der Niere geschädigt und die funktionelle Reserve der Niere aufgebraucht ist [Pfaller und Gstraunthaler, 1998].

### **1.2.5 Welche neuen Perspektiven eröffnet Toxicogenomics?**

*Toxicogenomics*-basierte Forschungsansätze bieten die Möglichkeit globale transkriptionelle Veränderungen bereits vor der Manifestation eines toxischen Effektes zu untersuchen. Die Aktivierung der funktionellen Reserve in der Niere beispielsweise wird vermutlich von Änderungen in der Genexpression begleitet, die mit Hilfe von Mikroarrays erkannt werden können, obwohl noch keine pathologischen Befunde vorliegen.

Der Vergleich von Expressionsprofilen aus gesundem und geschädigtem Nierengewebe könnte zur Aufdeckung spezifischer Transkriptionsmuster führen, die typisch für die Entwicklung und Progression von toxisch-bedingten Nierenerkrankungen sind [Eikmans et al., 2002; Imai et al., 2000]. Wada et al. (2001) haben zum Beispiel bei Streptozotocin-behandelten diabetischen Mäusen die zugrundeliegenden transkriptionellen Veränderungen dargestellt. Weiterhin haben Skubitz und Skubitz (2002) durch Vergleich der Genexpressionsmuster von normalen Nieren und renalen Karzinomen mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays differenziell regulierte Gene identifiziert, die wichtige Hinweise für die zukünftige Diagnose und Behandlung des renalen Zellkarzinoms liefern können. Scherer et al. (2003) konnten durch Definition eines prädiktiven Sets aus 10 Genen, die durch den Vergleich von abgestossenem und angenommenem transplantiertem Nierenmaterial erhalten wurden, mit einer Trefferwahrscheinlichkeit von 88% eine Transplantatabstossung vorhersagen.

Huang et al. (2001) waren in der Lage durch die Untersuchung von Cisplatin-behandelten Ratten und einer Rattenzelllinie mit Mikroarrays, die 250 toxikologisch relevante Gene enthielten, den Mechanismus von Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität genauer zu beleuchten. Die mechanistische Analyse von mehreren Genexpressionsprofilen verschiedener Nephrotoxine mit unterschiedlichen Wirkmechanismen könnte zur Selektion von Markergenen für bestimmte nephrotoxische Ereignisse führen und die Identifizierung des nephrotoxischen Potenzials zukünftiger Arzneimittelwirkstoffe ermöglichen.

Aus diagnostischer Sicht könnte die Analyse genetischer Polymorphismen Hinweise liefern, über das Risiko einzelner Personen bei Kontakt mit bestimmten Substanzen nephrotoxische Schäden zu entwickeln. Die Identifizierung von Genen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Entwicklung von 20 verschiedenen monogenetischen

Nierenerkrankungen beteiligt sind, wurde bereits von Guay-Woodford (1999) beschrieben.

## 1.3 Nephrotoxine

### 1.3.1 Ochratoxin A (OTA)

Ochratoxin A stellt die Hauptkomponente einer Gruppe von Sekundärmetaboliten dar, die von Schimmelpilzen verschiedener Spezies wie z.B. *Aspergillus ochraeus* oder *Penicillium verrucosum* produziert werden. OTA wird häufig als Kontamination in Getreideprodukten und anderen Nahrungs- und Genussmitteln pflanzlichen Ursprungs wie Nüsse, Kaffeebohnen, Rotwein und verschiedenen Gewürzen gefunden [Walker, 2002]. Dieses Mycotoxin wird als einer der Hauptauslöser der „porcine nephropathy“ bei Schweinen sowie der endemischen Balkannephropathie beim Menschen angesehen [Hald, 1991; Stoev, 1998]. Für beide Krankheiten sind die Degeneration der Epithelzellen des proximalen Tubulus, interstitielle Fibrose mit nachfolgender Entwicklung einer Polyurie sowie Veränderung der haematologischen und biochemischen Nierenparameter charakteristisch [Stoev et al., 2001].

Die Aufnahme von OTA in die proximalen Tubuluszellen erfolgt über verschiedene multispezifische organische Anionentransporter wie zum Beispiel OAT1 oder OAT3 und kann durch andere Substrate dieser Transporter wie Paraaminohippursäure, Probenecid oder Citrinin kompetitiv gehemmt werden [Jung et al., 2001].

Chemisch betrachtet handelt es sich bei OTA um ein Phenylalanin-Dihydroisocumarin-Derivat, das sich gegenüber Hitze und Feuchtigkeit recht stabil verhält (**Abb. 6**). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit der Aminosäure Phenylalanin besitzt OTA die Fähigkeit, kompetitiv tRNA-Phenylalanin-Synthetasen zu hemmen und kann folglich die Proteinbiosynthese beeinflussen [Dirheimer und Creppy, 1991].

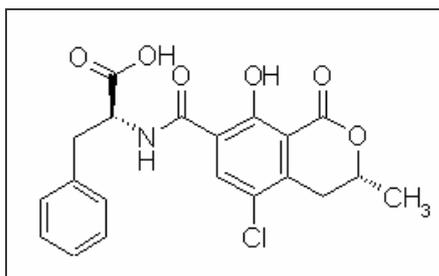


Abb. 6: Strukturformel Ochratoxin A

Auch bei der Entwicklung verschiedener Krebsarten wie zum Beispiel renaler Adenokarzinome, Blasenkarzinome, Hodenkrebs und Lebertumoren wird eine Vergiftung mit OTA als Auslöser diskutiert [Castegnaro et al., 1998; Huff, 1991; Schwartz, 2002]. Weiterhin gibt es zahlreiche Anhaltspunkte dafür, dass OTA genotoxische, teratogene und immunotoxische Eigenschaften aufweist [Dopp et al., 1999; Pfohl-Leszkowicz et al., 1991; Thuvander et al., 1996; Wei und Sulik, 1993].

Die Mechanismen, die diesen verschiedenen toxischen Effekten zu Grunde liegen, sind leider immer noch nicht im Detail aufgeklärt. Als eine der Hauptursachen für die genotoxischen und kanzerogenen Wirkungen von OTA werden die Bildung von DNA-Addukten sowie die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen angenommen [Obrecht-Pflumio und Dirheimer, 2000; Pfohl-Leszkowicz et al., 1991]. Es wird diskutiert, dass diese DNA Schädigungen grösstenteils auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) zurückzuführen sind [Gillman et al., 1999]. Auch die Beobachtung von Lipidperoxidation und die Prävention von OTA-induzierter Nephrotoxizität durch vorherige subkutane Injektion von Superoxiddismutase sprechen für eine Beteiligung von oxidativem Stress [Baudrimont et al., 1994; Omar et al., 1990]. Durch die ROS lassen sich allerdings nicht alle Symptome erklären, die bei einer OTA-Intoxikation auftreten. Weiterhin ist immer noch sehr wenig über die transkriptionellen Veränderungen in der Niere nach einer OTA Exposition bekannt.

Meisner und Cimbala (1986) haben Veränderungen in der Expression der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEPCK) nach der Verabreichung von OTA an Ratten untersucht und fanden einen Rückgang der PEPCK Transkripte um 50% im Vergleich zu Kontrolltieren. Sie beobachteten weiterhin Änderungen in der Expression von zahlreichen weiteren mRNA's. Leider waren zum damaligen Zeitpunkt diese Klone noch nicht restriktionskartiert und die Funktion der kodierten Proteine war somit nicht bekannt.

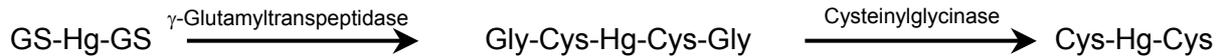
### **1.3.2 Quecksilber-(II)-Chlorid**

Quecksilber kommt in der Natur meist in Form von sulfidischen Erzen in der Erdkruste vor (ca. 80µg/kg). Eine natürliche Belastung mit Quecksilber ist auf das Entweichen von Quecksilber-Dämpfen durch Vulkanaktivität, Feuer oder Änderungen des Meeresspiegels zurückzuführen. Seit der industriellen Revolution im 18. und 19. Jahrhundert wird Quecksilber vor allem beim Abbau von Gold, in Batterien, in

Quecksilberdampflampen, sowie bei der Alkalichloridelektrolyse eingesetzt [Branches et al., 1993; Tunnessen et al., 1987]. Auch als Antiseptikum, Bakterizid und Fungizid fand es verbreitete Anwendung [Hilmy et al., 1976; Yeh et al., 1978]. In der Medizin war Quecksilber früher ein häufig verabreichtes Diuretikum. Später wurde es aufgrund seiner Eigenschaft, die Bildung des Hautpigmentes Melanin zu blockieren, in hautaufhellenden Cremes verwendet [Dyall-Smith und Scurry, 1990]. Heute findet man Quecksilber vor allem als Umweltgift, als Verunreinigung in verschiedenen Produkten der traditionellen chinesischen Medizin und in Amalgam-haltigen Dentallegierungen [Kang-Yum und Oransky, 1992]. Die Verwendung in der Zahnmedizin stellt für den Menschen die Hauptbelastung dar [Bjorkman et al., 1997; Sandborgh-Englund et al., 1998]. Sie wird mit durchschnittlich  $10\mu\text{g}$  pro Tag beziffert [Halbach, 1994]. Der Verzehr von quecksilberhaltigem Fisch und Meeresfrüchten liegt mit  $0.06\mu\text{g}$  pro Tag weit darunter [Risher, 2003].

Organische Hg-Verbindungen wie Phenylquecksilber oder Methylquecksilber sowie elementares Quecksilber akkumulieren nach der Aufnahme vor allem im Gehirn und führen dort zu neurotoxischen Schädigungen [Werner et al., 1995]. Die meisten organischen Hg-Verbindungen setzen jedoch im Körper nach kurzer Zeit  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen frei [Aronow, 1983]. Anorganisches Quecksilber verursacht dagegen hauptsächlich Nephrotoxizität, was auf eine hohe Akkumulation der Ionen in proximalen Tubuluszellen zurückzuführen ist [Zalups, 1991].

Tatsächlich werden mehrere Aufnahmemechanismen für  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen diskutiert. Die Ionen zeigen eine hohe Affinität zu Sulfhydrylgruppen, weshalb sie im Blutplasma an Proteine oder an Glutathion (GSH) gebunden (als Glutathionylquecksilber, GS-Hg-SG) vorliegen. Die Aufnahme der Ionen von der basolateralen (Blut-) Seite erfolgt vorwiegend in Form von GS-Hg-SG Komplexen im Co-Transport mit  $\text{Na}^+$  über einen Glutathiontransporter [Wei et al., 1999]. Inwieweit der organische Anionentransporter hier beteiligt ist, ist umstritten [Wei et al., 1999; Diamond und Zalups, 1998]. Die Aufnahme von  $\text{Hg}^{2+}$  von der luminalen (Tubulus-) Seite her, kann auf zwei Arten erfolgen. Zum einen ist eine endozytotische Aufnahme nach Bindung der  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen an Sulfhydrylgruppen von Membranproteinen denkbar [Diamond und Zalups, 1998]. Zum anderen wird filtrierte GS-Hg-SG nach der unten abgebildeten Reaktion im proximalen Tubulus in Cysteinylquecksilber umgewandelt und durch verschiedene Aminosäuretransporter in die Tubuluszellen aufgenommen [Cannon et al., 2000].



Klinisch betrachtet äussert sich eine Hg-bedingte Intoxikation der Niere durch akute Tubulusnekrose, Entwicklung eines nephrotischen Syndroms, Proteinurie und Glomerulonephritis [Werner et al., 1995]. Die hierbei zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind sehr vielfältig und zum Teil noch nicht vollständig geklärt. Die hohe Affinität von  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen gegenüber Sulfhydrylgruppen ist eine der Hauptursachen der Quecksilber-induzierten Nephrotoxizität [Aleo et al., 2002]. Zum Beispiel bindet  $\text{Hg}^{2+}$  auf diese Weise an verschiedene Membranproteine und führt zu Veränderungen in der Phospholipidzusammensetzung von Membranen, was zu einer Zerstörung der Integrität der Zellmembran, sowie der Membranen von Mitochondrien und Lysosomen führt [Morrison und Pascoe, 1986; Nath et al., 1996]. Weiterhin wird die Hemmung verschiedener ATPasen wie beispielsweise der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase auf die Bindung von  $\text{Hg}^{2+}$  an Sulfhydrylgruppen in den aktiven Zentren dieser Enzyme zurückgeführt [Diamond und Zalups, 1998]. Als Folge werden die Ionengradienten und somit der aktive Transport an den Membranen empfindlich gestört.

Ein weiterer Faktor, der erheblich zur Entwicklung von Nephrotoxizität nach Hg-Exposition beiträgt, ist die Auslösung von oxidativem Stress durch Produktion von Wasserstoffperoxid sowie die Hemmung der mitochondrialen Atmung. Die reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) führen zu Lipidperoxidation und somit weiterer Membranzerstörung, während die Unterbrechung der Energie-Gewinnung unter anderem eine weitere Beeinträchtigung der Transportprozesse zur Folge hat [Lund et al., 1993; Nath et al., 1996; Diamond und Zalups, 1998].

$\text{Hg}^{2+}$  Ionen sind weiterhin in der Lage, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration zu erhöhen und ausserdem die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Signaltransduktion zu beeinflussen [Werner et al., 1995].

Zum Schluss sei noch die häufige Induktion allergischer Responses durch  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen erwähnt, wie zum Beispiel die Entwicklung von T-Zell-vermittelter Autoimmunität [Roos et al., 1996].

### 1.3.3 Paraquat Dihydrochlorid

Paraquat wurde 1955 entdeckt und seit 1962 in der Landwirtschaft als Herbizid (Gramoxon®) eingesetzt. Seit 1989 ist die Verwendung von Paraquat in den meisten Ländern aufgrund der hohen Toxizität bei missbräuchlicher Verwendung verboten. In Schwellen- und Entwicklungsländern wird Paraquat allerdings auch heute noch angewendet.

Es handelt sich bei Paraquat um ein Bipyridin-Derivat (**Abb. 7**), das üblicherweise als Dichlorid vorliegt und auch als Methylviologen bezeichnet wird.

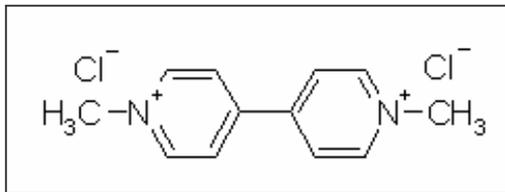


Abb. 7: Molekülstruktur Paraquat

Paraquat kann oral, dermal oder inhalativ aufgenommen werden und führt in erster Linie zu massiven Schädigungen von Lunge und Niere, in hohen Dosen auch zu Leber- und Herzschädigungen [Kurisaki und Sato, 1979; Parkinson, 1980]. In der Lunge werden zunächst die alveolären Epithelzellen geschädigt, was die Bildung eines Lungenödems zur Folge hat. Später kommt es durch die übermäßige Proliferation von Fibroblasten zur Entstehung einer Lungenfibrose und Anoxie [Smith et al., 1978]. Die verstärkte Akkumulation in der Lunge ist vermutlich auf die Aufnahme von Paraquat durch einen Diamin-Transporter zurückzuführen, der spezifisch in den alveolären Epithelzellen und Clara-Zellen der Lunge vorkommt [Smith, 1987].

In der Niere führt Paraquat zu akutem Nierenversagen, welches durch nekrotische Schädigung der proximalen Tubuli, Verlust des Bürstensaumes der proximalen Tubulusepithelzellen, Proteinurie, Glucosurie und Aminoazidurie, sowie eine erhöhte Ausscheidung von Phosphat, Natrium und Kalium gekennzeichnet ist [Vaziri et al., 1979; Chan et al., 1998]. Auch in der Niere wird Paraquat, welches praktisch keine Metabolisierung aufweist [Fuke et al., 1996], durch einen spezifischen Transportmechanismus in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen und später ins Tubuluslumen sezerniert. Die Aufnahme von der basolateralen Seite erfolgt über den Energie-abhängigen organischen Kationentransporter OKT1, zum Teil auch über

den sehr ähnlichen Transporter OKT2 [Chan et al., 1998]. Die Sekretion an der luminalen Membran kann über zwei verschiedene aktive Mechanismen erfolgen. Zum einen wird das Dikation mit Hilfe von P-Glycoprotein sezerniert, das unspezifisch auch zahlreiche andere Substanzen ausschleust, zum anderen erfolgt ein aktiver Transport durch einen organischen Kationen / Protonen-Austauscher, dessen Triebkraft ein Protonengradient ist, der durch den Natrium / Protonen-Austauscher in der luminalen Bürstensaummembran aufrecht erhalten wird [Wright und Wunz, 1995; Chan et al., 1998].

Die Hauptursache für diese zahlreichen Schädigungen liegt vermutlich in der Umwandlung von Paraquat durch die Cytochrom P 450 Reduktase in ein Paraquat-Radikal. Dieses Radikal wird bei Kontakt mit molekularem Sauerstoff sofort wieder zu Paraquat oxidiert, wobei allerdings ein Superoxidanion entsteht. Dieses Superoxidanion führt seinerseits zur Generation weiterer ROS wie zum Beispiel Wasserstoffperoxid oder dem Hydroxyl-Radikal. Der Organismus wird massivem oxidativem Stress ausgesetzt, was verstärkte Lipidperoxidation und somit Membranschäden zur Folge hat [Smith et al., 1978; Barabas et al., 1984; Bus und Gibson, 1984; Smith, 1987; DeGray et al., 1991]. Es ist ausserdem bekannt, dass bei der Reduktion und anschliessenden Oxidation von Paraquat NADPH verbraucht wird, das somit für den Abbau schädigender Peroxide nicht mehr zur Verfügung steht. Als Folge werden NADPH-bildende Prozesse, wie der Pentosephosphatweg, stimuliert, und NADPH-verbrauchende Prozesse, wie die Fettsäuresynthese, gehemmt [Smith et al., 1978; Bus und Gibson, 1984; Smith, 1987; Zychlinski et al., 1988].

Die Veränderungen der Genexpression nach der Einwirkung von Paraquat sind lediglich in der Lunge unter Anwendung der *Differential Display* Methode einmalig untersucht worden. Hierbei wurde ein Anstieg der Transkripte für RNA Polymerase und Lpin2 (ein Protein, das an der Regulation der Adipozytendifferenzierung und des Glycerolipidmetabolismus beteiligt ist) in der Lunge beobachtet [Tomita et al., 2002]. Für die Niere existieren keine vergleichbaren Untersuchungen.

#### **1.3.4 Puromycin**

Puromycin ist ein Adenosinnukleosid-Derivat (**Abb. 8**), das von *Streptomyces alboniger* produziert wird und antibiotische und antiparasitäre Wirkung durch

Hemmung der Proteinbiosynthese aufweist [Drews, 1966; Jaffe, 1975]. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Elongation der Peptidketten nicht nur bei Bakterien, sondern auch bei Säugetierzellen, Algen und anderen Einzellern verhindert wurde, so dass ein therapeutischer Einsatz nicht in Frage kam [Drews, 1966]. Weiterhin führte Puromycin zur Entwicklung eines nephrotischen Syndroms, einer tubulointerstitiellen Nephritis oder einer Glomerulopathie, die jeweils von massiver Proteinurie begleitet waren [Andrews, 1977; Eddy und Michael, 1988]. Die Administration des Hydrolyseprodukts von Puromycin, Puromycin aminonukleosid, an Ratten wird seit vielen Jahren zur experimentellen Induktion eines nephrotischen Syndroms eingesetzt [Frenk et al., 1955].

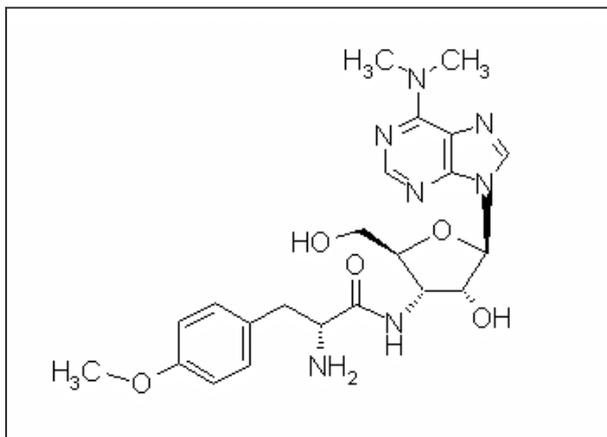


Abb. 8: Molekülstruktur Puromycin

Die Metabolisierung von Puromycin ist gering. Ein Teil der aufgenommenen Menge wird nach der Hydrolyse zum Puromycinaminonukleosid im Purinzyklus durch die Adenosin-Deaminase in N6-methyl-3'-amino-3'-deoxyadenosin umgewandelt, welches durch die Purin-Nucleosidphosphorylase und die Xanthinoxidase schliesslich in Hypoxanthin umgewandelt wird [Ghiggeri et al., 1991].

Der Mechanismus der Puromycin-induzierten Nephrotoxizität ist immer noch nicht eindeutig geklärt. Eine Infiltration des tubulären Interstitiums und der Glomeruli mit Makrophagen und T-Zellen, sowie der Anstieg der Genexpression verschiedener Chemokine lässt auf die Auslösung von Entzündungsprozessen schliessen [Ou et al., 1999; Ou et al., 2000]. Als gesichert gilt, dass Puromycin die Fussfortsätze der Podozyten in den Glomeruli zerstört [Andrews, 1977; Ryan und Karnovsky, 1975]. Als Folge kann das verzweigte Netz, das die Podozytenfortsätze mit der Basalmembran bilden und die Hauptfiltereinheit in den Glomeruli darstellt, nicht mehr aufrecht erhalten werden. Die Glomeruli werden durchlässig für Proteine mit höherem Molekulargewicht als 5000g/mol, die normalerweise zurückgehalten werden würden (Proteinurie). Diese Änderungen im Profil der im Urin ausgeschiedenen

Proteine wurden von Cutler et al. (1999) mit Hilfe der nuklearen magnetischen Resonanzspektroskopie und anschliessender massenspektrometrischer Analyse untersucht.

Im proximalen Tubulus erfolgt die aktive Wiederaufnahme der filtrierten Proteine, was allerdings zu einer Akkumulation der Proteine in den Lysosomen der proximalen Tubuluszellen führt und schliesslich zur Freisetzung lysosomaler Enzyme und zur nekrotischen Zerstörung der proximalen Tubuluszellen [Price und Ellis, 1976].

Auf molekularer Ebene wird eine Beteiligung von ROS an der Entstehung Puromycin-induzierter Nephrotoxizität diskutiert [Kawaguchi et al., 1992; Ricardo et al., 1994]. Ob diese ROS jedoch aus dem Purin-Zyklus bei der Metabolisierung von Puromycin stammen, oder auf andere Weise entstehen, ist strittig [Diamond et al., 1986; Giggheri et al., 1991]. Veränderungen in der Genexpression nach Puromycin-Gabe sind bisher nur bei *Streptococcus pneumoniae* untersucht worden [Ng et al., 2003]. In dieser Arbeit wurde eine erhöhte Transkription von mRNA's beobachtet, die für ribosomale Proteine, Hitzeschock Proteine und Enzyme aus der *de novo* Purinnukleotidsynthese codieren. Weiterhin wurde über eine verminderte Expression von Transkripten der Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Enzymen, die an der Aminosäuresynthese beteiligt sind, berichtet.

#### **1.4 Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit**

Die Wichtigkeit der Niere als Zielorgan in der Toxikologie wurde in dieser Einleitung verdeutlicht. Auch die herausragenden Möglichkeiten, die neue Technologien wie zum Beispiel DNA Mikroarrays für die toxikologische Forschung bieten, wurde dargestellt. Die mechanistische Analyse und der Vergleich der Genexpression in der Niere nach der Einwirkung verschiedener Nephrotoxine könnten helfen, verschiedene Fragestellungen zu beantworten:

- Lassen sich Toxizitätsmechanismen von bekannten Nephrotoxinen mit Hilfe toxikogenomischer Daten bestätigen?
- Können Hinweise auf bisher unbekannte, unklare oder strittige Wirkmechanismen dieser Nephrotoxine erlangt werden?

- Können durch Vergleich der Genexpressionsprofile mehrerer Nephrotoxine mit unterschiedlichen Wirkmechanismen Expressionsmuster erkannt werden, die typisch für einen speziellen Toxizitätsmechanismus sind bzw. die allen Nephrotoxinen, unabhängig ihres Wirkmechanismus, gemeinsam sind?

Die vorgelegte Arbeit soll diese Fragestellungen ausführlich beantworten.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der toxikologischen Forschung ist ausserdem die Etablierung verlässlicher und reproduzierbarer *in vitro* Modelle. Vor allem aus der Sicht des Tierschutzes, aber auch aus ökonomischen Gründen wie Zeit- und Kostenersparnis oder limitierter Menge an Prüfsubstanz wird die Forderung nach geeigneten *in vitro* Modellen immer lauter. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand somit darin, ein solches *in vitro* Modell für die Untersuchung von Nephrotoxizität zu implementieren und zu charakterisieren.

Da der proximale Tubulus mit seinen vielseitigen Aufgaben bei der Rückresorption und Sekretion von zahlreichen Xenobiotika aber auch endogenen Substanzen ein Hauptziel für Nephrotoxine darstellt, wurden primäre Epithelzellen aus dem proximalen Tubulus von Ratte und Mensch für die Durchführung der nachfolgenden Untersuchungen gewählt. Die Herausforderung bestand hierbei vor allem darin, primäre proximale Tubuluszellen (PTC) der Ratte über einen längeren Zeitraum unter Beibehalt ihrer charakteristischen Merkmale und Funktionen zu kultivieren. Bisher wurden primäre PTC aus der Ratte überwiegend in Suspensionen für maximal 48h kultiviert, da sie sehr schnell dedifferenzieren und dabei ihre Bürstensaummembran verlieren, deren Enzyme und Transporter für die Metabolisierung und Resorption bzw. Sekretion im Tubulus von grosser Bedeutung sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell zur Kultivierung von PTC der Ratte dahingehend optimiert, dass die Zellen nun über einen Zeitraum von mindestens zehn bis zwölf Tagen einen Grossteil ihrer charakteristischen Funktionen beibehalten. Weiterhin wurden die Limitationen des Modells im Hinblick auf die Expression charakteristischer Gene bestimmt, was für die Korrelation von *in vitro* und *in vivo* Daten von grösster Bedeutung ist. Auf eine gleichermassen ausführliche Charakterisierung von humanen PTC wurde allerdings verzichtet, da humanes Nierenmaterial nur sehr begrenzt zur Verfügung stand. Durch Korrelation der Expressionsdaten, die aus den Tierstudien mit Ratten, sowie den *in vitro* Modellen der Ratte und des Menschen gewonnen wurden, können schliesslich

entscheidende Hinweise für die Vorhersage von Nephrotoxizität im Menschen gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der höchsten erhältlichen Reinheit verwendet.

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Merck
Agarose-1000	Invitrogen
Aminoallyl-dUTP (aa-dUTP)	Sigma
Ammoniumacetat-Lösung (7.5M)	Sigma
Atlas™ Glass Approved DMSO (wasserfrei)	Clontech
β-Mercaptoethanol	Sigma
bis-Benzimid (Hoechst No.33342)	Sigma
Bromphenol Blue – Xylene Cyanole Dye Solution	Sigma
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma
BSA, acetyliert (50mg/mL)	Invitrogen
CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	Merck
Casy <sup>®</sup> ton	Schärfe System GmbH
dATP (100mM)	Geneo
dCTP (100mM)	Geneo
dGTP (100mM)	Geneo
Diethylether	Merck
DMEM/F-12 (1:1) (mit 15mM HEPES und L-Glutamin, ohne Phenolrot)	Invitrogen
DMSO (Dimethylsulfoxide; 99.5% purity)	Sigma
DNA Ladder 10bp (1.0µg/µL)	Invitrogen
dTTP (100mM)	Geneo
EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt) Lösung (0.5M)	Sigma
EGTA (Ethyleneglycol-bis-(β-Aminoethylether)-N,N,N',N',-tetraacetic acid)	Sigma
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fluorolink™ Cy3-dCTP (25nM)	Amersham Pharmacia Biotech (APB)
Fluorolink™ Cy3 monofunctional dye	APB
Fluorolink™ Cy5-dCTP (25nM)	APB
Fluorolink™ Cy5 monofunctional dye	APB
Foetales Kälberserum (FCS)	PAA

Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
HBSS (Hank's Balanced Salts Solution without Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> )	Invitrogen
Heringsperma DNA (10mg/mL)	Sigma
Hydroxylamin	Sigma
MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) Monohydrat der freien Säure	Sigma
MES (2-[N-Morpholino]ethanesulfonic acid) Natriumsalz	Sigma
Methanol	Merck
MTT ((3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide)	Sigma
Narcoren <sup>®</sup> (Sodiumpentobarbital 160mg/mL)	Merck
Natriumacetatlösung (4M)	Sigma
Natriumchloridlösung, isotonisch, steril (zur Verdünnung von Narcoren <sup>®</sup> )	Fresenius
Natriumchloridlösung (5M)	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Natriumhydrogencarbonat	Sigma
Natriumhydroxidlösung (1M)	Merck
Ochratoxin A	Sigma
2-Propanol	Merck
Paraquat Dihydrochlorid	Riedel-de-Haen
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000u/ 10mg/mL)	PAA
Percoll <sup>™</sup> , steril (Dichte 1.129g/mL)	APB
Phosphate buffered saline with Ca <sup>2+</sup> and Mg <sup>2+</sup> (PBS)	PAA
Phosphate buffered saline 10x concentrate (0.1M, pH 7.4)	Sigma
Puromycin Hydrochlorid	Sigma
Quecksilber-II-Chlorid	Sigma
REGM <sup>®</sup> Singlequots <sup>®</sup>	Clonetics
RNA 6000 Ladder	Ambion
RNA-Later	Qiagen
RPMI 1640 Medium	Invitrogen
Salzsäure (1M)	Merck
SSC 20x (3M Sodiumchloride, 0.3M Sodiumcitrate)	Invitrogen
SSPE 20x (3M Sodiumchloride, 0.2M Sodiumdihydrogenphosphate, 0.02M EDTA)	Invitrogen
Streptavidin, R-Phycoerythrin conjugate (SAPE, 1mg/mL)	Molecular Probes
TAE Puffer 50x (2M Trisacetat, 50mM EDTA)	Invitrogen
Tris-HCl-Puffer (1M), pH 7.4	Sigma
Trypan-Blau Lösung (0.4%)	Sigma
Trypsin-EDTA Lösung (Trypsin 0.5g/L, EDTA 0.2g/L)	PAA
10% Tween 20	BioRad
UltraPure <sup>™</sup> Distilled Water (DNase, RNase-free) (UPD Wasser)	Invitrogen
Xylol	Merck

### 2.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
ABI Prism <sup>®</sup> Optical Adhesive Covers	Applied Biosystems
ABI Prism <sup>®</sup> 96-Well Optical Reaction Plates with Barcode	Applied Biosystems
Agfa Vista, 400ASA, Farbbildfilm	Agfa
Biocoat <sup>®</sup> Collagen-I-coated 24-Well plates	Beckton Dickinson (BD)
Deckgläser (24 x 24mm)	Menzel-Gläser
Einwegkanülen (21G, 27G)	Terumo
Einweg-Skalpellklingen, steril	Rüttgers GmbH
Einwegspritzen (1mL, 5mL, 10mL, 50mL)	BD, Ersta
Eppendorf-Tubes (0.5mL, 1.5mL, 2mL)	Eppendorf
Falcon-Röhrchen (15mL, 50mL)	BD
Fine Point Filter Tips (200µL)	Rainin
Gaze Monodur PA 63N und 132N	Udo Fleischhacker GmbH
Human Genome U133A Mikroarray	Affymetrix, Inc.
Human H300 Mikroarray	Phase-1, Inc.
Objektträger-Versandgefäße (Hybridisierungskammern für Phase-1-Arrays)	Sarstedt
Kryo-Vials (2mL)	Nunc
Microcon YM 30 Filtereinsätze	Millipore
Microtest <sup>™</sup> Tissue Culture Plates, 96-Well-Platten	BD
Millex HA Saterilfiltereinheiten (0.22µm)	Millipore
Parafilm „M“	American National Can
Petrischalen (□35mm, □100mm)	BD
Pipetten, gestopft, steril (5mL, 10mL, 25mL, 50mL)	BD
Pipettenspitzen, steril (2.5µL, 10µL, 100µL, 1000µL, 2500µL)	Eppendorf, Biozym
Rat CT700 Mikroarray	Phase-1
Rat 250 Mikroarray	Phase-1
Rat Genome U34A Mikroarray	Affymetrix, Inc.
Sterilfiltersystem (500mL, 1000mL)	Corning
UV-Star 384-Well-Platten	Greiner

### 2.1.3 Kits

Kits	Bezugsquelle
ABI Prism <sup>®</sup> DNA Sequencing Kit (Big Dye <sup>™</sup> Terminator Cycle Sequencing v2.0)	Applied Biosystems
Alkaline Phosphatase Leukocyte Staining Kit	Sigma
BioArray <sup>™</sup> High Yield <sup>™</sup> RNA Transcript Labeling Kit	Affymetrix, Inc./Enzo
GeneChip <sup>®</sup> Eucaryotic Hybridisation Control Kit	Affymetrix, Inc./Enzo
GeneChip <sup>®</sup> Sample Cleanup Module	Affymetrix, Inc./Qiagen
LDH, IFCC flüssig Kit	Roche Diagnostics
Qiaquick <sup>®</sup> PCR Purification Kit	Qiagen
Qiaquick <sup>®</sup> Gel Extraction Kit	Qiagen
Quantum RNA 18S Internal Standards Kit	Ambion
RiboGreen <sup>™</sup> Quantitation and Reagent Kit	Molecular Probes
RNA 6000 Nano LabChip Kit	Agilent
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RNeasy Midi Kit	Qiagen
Superscript <sup>™</sup> Double-stranded cDNA Synthesis Kit	Invitrogen
Superscript <sup>™</sup> First-strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
Superscript <sup>™</sup> II Rnase H <sup>-</sup> Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen
SYBR <sup>®</sup> Green PCR Core Reagents	Applied Biosystems
Taqman <sup>®</sup> PCR Core Reagents	Applied Biosystems
Taqman <sup>®</sup> Ribosomal RNA Control Reagents	Applied Biosystems

### 2.1.4 Arbeitsgeräte

Arbeitsgeräte	Hersteller
ABI Prism <sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
ABI Prism <sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Axiovert-35-Mikroskop	Zeiss
Bioanalyzer 2100	Agilent
Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Casy <sup>®</sup> 1 Cell Counter	Schärfe System GmbH
Contax 167MT-Spiegelreflexkamera	Kyocera
CytoFluor II	PerSeptive Biosystems
Easy-cast Horizontal Elektrophoresis System	Owl Scientific
Eppendorfpipetten (2.5mL, 10mL, 100mL, 1000mL, 2500mL)	Eppendorf
Gene Array Scanner	Affymetrix/Agilent
GeneChip <sup>®</sup> Fluidics Station 400	Affymetrix
GeneChip <sup>®</sup> Hybridisation Oven 640	Affymetrix

GenePix 4000A Scanner	Axon Instruments
GPKR-Zentrifuge	Beckmann
Labovert FS Lichtmikroskop	Leitz
Laminar Airflow RF600 GS	Beck+Thies
Neubauer Zählkammer	Brand
Plattenschüttler TPM-2	Sarstedt
Power Pack 200	Biorad
Roche / Hitachi 717 klinisch-chemischer Analysenautomat	Roche Diagnostics
Schüttelwasserbad SW-21C	Julabo
Schwingmühle MM200	Retsch
Spektramax Plus	Molecular Devices
Stahlkugeln (□7mm)	Retsch
Tecan Ultra Microplate Reader	Tecan
Thermocycler (PTC-200, Peltier Thermal Cycler)	Biozym
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 4515R	Eppendorf
UV-Lampe Reprostar II	Camag
Vakuum Konzentrator	Bachofer
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Vortexer (Agilent Lab Chips)	IKA Works
Wärmeschrank	Heraeus
Zentrifuge 4K15C	Sigma/Qiagen

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

<u>Puffer / Lösung</u>	<u>Zusammensetzung</u>	
aa-dUTP-haltiger dNTP-Mix (50x)	dATP (100mM)	10µL
	dCTP (100mM)	10µL
	dGTP (100mM)	10µL
	dTTP (100mM)	6µL
	aa-dUTP (100mM)	4µL
Affymetrix Waschpuffer A	SSPE 20x	300mL
	10% Tween 20	1mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	

Affymetrix Waschpuffer B	12x MES Stammlösung	83.3mL
	5M Natriumchloridlösung	5.2mL
	10% Tween 20	1mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Antikörper-Färbepuffer/Oligo-Array	2x Färbepuffer	300µL
	Goat IgG-Reagent (10mg/mL)	6µL
	BSA, acetyliert	24µL
	Anti-Streptavidin, biotinyliert (0.5mg/mL)	3.6µL
	UPD-Wasser	266µL
Auftragspuffer für Gelelektrophorese	Bromphenol-Blue–Xylene-Cyanol Dye	400µL
	Formamid	ad 2000µL
BSA-Puffer	BSA	12.5mg
	HBSS	ad 500mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
cDNA-Fällungslösung (1x Ansatz)	DEPC-Wasser	107.3µL
	Ammoniumacetatlösung (7.5M)	79.3µL
	Ethanol (95%)	513.3µL
Collagenase-Puffer	CaCl <sub>2</sub> (wasserfrei)	221.98mg
	Collagenase IV	5438U
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	5mL
	HBSS	ad 500mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Cy3-dCTP-Lösung	Cy3 (25nM)	10µL
	Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0)	70µL
Cy5-dCTP-Lösung	Cy5 (25nM)	10µL
	Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0)	90µL
dNTP-Mix Cy3	dATP (100mM)	2µL
	dGTP (100mM)	2µL
	dTTP (100mM)	2µL
	dCTP (100mM)	0.5µL
	Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0)	393.5µL

dNTP-Mix Cy5	dATP (100mM)	2µL
	dGTP (100mM)	2µL
	dTTP (100mM)	2µL
	dCTP (100mM)	0.66µL
	Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0)	393.4µL
Färbepuffer 2x	12x MES Stammlösung	41.7mL
	5M Natriumchloridlösung	92.5mL
	10% Tween 20	2.5mL
	UPD-Wasser	ad 250mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Hydroxylamin-Lösung (4M)	Hydroxylamin	27.8g
	UPD-Wasser	ad 100mL
Isolationspuffer (für humane PT-Zellen)	RPMI Medium	500mL
	FCS	25mL
	Penicillin/Streptomycin-Lösung	10mL
Hybridisierungskontrolle (Oligo-Array) (Komponenten enthalten im GeneChip® Eucaryotic Hybridisation Control Kit)	Kontroll Oligo B2 (3nM)	170µL
	Hybridisierungskontrolle (20x)	510µL
Hybridisierungspuffer/cDNA-Array	Hybridisierungsstockpuffer	18µL
	Heringssperma DNA	2µL
Hybridisierungspuffer/Oligo-Array	Hybridisierungskontrolle	20µL
	Heringssperma DNA (10mg/mL)	3µL
	BSA, acetyliert (50mg/mL)	3µL
	MES Puffer (2x)	150µL
	UPD-Wasser	84µL
Hybridisierungsstockpuffer (cDNA-Array)	Formamid	0.5mL
	20x SSC	0.25mL
	0.4% wässrige SDS-Lösung	0.25mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Sterilfiltereinheit	
LysePuffer zur RNA-Isolation	RLT-Puffer (RNeasy Kit, Qiagen)	99mL
	β-Mercaptoethanol	1mL

MES Puffer 2x	12x MES Stammlösung	8.3mL
	5M Natriumchloridlösung	17.7mL
	0.5M EDTA-Lösung	4.0mL
	10% Tween 20	0.1mL
	UPD-Wasser	ad 50mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
MES Puffer 1x	2x MES Hybridisierungspuffer	50mL
	UPD-Wasser	ad 100mL
MES Stammlösung 12x	MES freie Säure Monohydrat	70.4g
	MES Natriumsalz	193.3g
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Natriumbicarbonatpuffer (0.1M)	Natriumbicarbonat	8.4g
	UPD-Wasser	ad 100mL
	PH-Wert mit NaOH (1M) auf 8.5-9.0 einstellen	
Percoll-Lösung (Dichte 1.04g/mL)	Percoll-Stammlösung	20mL
	RPMI Medium	48mL
Percoll-Lösung (Dichte 1.07g/mL)	Percoll-Stammlösung	40mL
	PBS	32mL
Percoll-Stammlösung	Percoll	144mL
	HBSS	16mL
Perfusionspuffer	EGTA	95.1mg
	HBSS	ad 500mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Phase-1 Waschpuffer A:	20x SSC	100mL
	UPD Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Phase-1 Waschpuffer B:	SDS	1.0g
	20x SSC	100mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	

Phase-1 Waschpuffer C:	SDS	1.0g
	20x SSC	5mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Phase-1 Waschpuffer D:	20x SSC	5mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL
	Steril filtrieren durch 0.22µm Filtersystem	
Phosphatpuffer (10mM, pH 7.0)	Phosphate buffered saline 10x	10mL
	UPD-Wasser	ad 100mL
SAPE Färbepuffer/Array	2x Färbepuffer	600µL
	UPD-Wasser	540µL
	BSA, acetyliert	48µL
	SAPE	12µL
TAE Puffer (1x)	TAE Puffer (50x)	20mL
	UPD-Wasser	ad 1000mL

### 2.1.6 Kulturmedien

<u>Kulturmedium für PT Zellkultur (Ratte und Human)</u>	<u>Zusammensetzung</u>
DMEM/F-12 (1:1)	500mL
Penicillin/Streptomycin-Lösung	1%
FCS	5%
REGM Singlequots:	
humaner epidermaler Wachstumsfaktor	0.01µg/mL
Insulin	5µg/mL
Hydrocortison	0.5µg/mL
Epinephrin	0.5µg/mL
Trijodthyronin	6.51µg/mL
Transferrin	10µg/mL

### 2.1.7 Enzyme

<u>Enzyme</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Collagenase IV (435U/mg)	Sigma
RNase-free DNase I Set	Qiagen

### 2.1.8 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Anti-Streptavidin, biotinyliert	Vector Laboratories
Goat IgG-Reagent	Sigma
Maus Anti-Ratte IgG gegen E-Cadherin	BD Transduction Laboratories
Maus Anti-Ratte IgG gegen Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Austauscher (Isoform NHE3)	Chemicon
Maus Anti-Ratte IgG gegen N-Cadherin	BD Transduction Laboratories
Ziege Anti-Maus IgG (H+L), (konjugiert mit Alexa Fluor 488)	Molecular Probes

### 2.1.9 Versuchstiere

<u>Species</u>	<u>Stamm</u>	<u>Bezugsquelle</u>
Ratte, ♂	Wistar, Hsd Cpb:Wu	Harlan-Winkelmann

### 2.1.10 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle synthetischen Oligonukleotide werden von der Firma Invitrogen im 50nmol Masstab synthetisiert mit Ausnahme des T7-(dT)<sub>24</sub> Primers, der von der Firma Proligo Primers and Probes bezogen wird. Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgte beim Hersteller durch Entsalzen.

Oligonukleotid (Acc. No.)	Sequenz 5' → 3'	T <sub>a</sub> (°C)
Calpactin I h.c. (AA964578) Forward	GACATTGCCTTCGCCTACCA	
Calpactin I h.c. (AA964578) Reverse	ACCAGACAAGGCCGACTTCAT	61
Ceruloplasmin (L33869) Forward	AGGCCTTTTTCCAGGTTTCGT	
Ceruloplasmin (L33869) Reverse	ATAATGTCTCACATGTCTGTCTTGGAT	58
Clusterin (M64723) Forward	CACTACGGGCCTCTGAGCTT	
Clusterin (M64723) Reverse	ACGTCCATGGCCTGTTGAG	59
GADD 153 (U36994) Forward	CTGCCTTTTCGCCTTTGAGAC	
GADD 153 (U36994) Reverse	CCCCAATTTTCATCTGAGGACA	60
GADD 45 (L32591) Forward	GCCAAGCTGCTCAACGTAGAC	
GADD 45 (L32591) Reverse	AGGGTGAAATGGATCTGCAGA	62
GST alpha (AA818339) Forward	GAAGGAGAGAGCCCTCATCGA	
GST alpha (AA818339) Reverse	AGGGTAATGGAGAACTATTTTCATCCA	59
Oligo dT <sub>(12-18)</sub>	TTTTTTTTTTTT(TTTTTT)	
Sulfotransferase K2 (AA926193) Forward	CTACAATCCCCAAGACTATCATGGA	
Sulfotransferase K2 (AA926193) Reverse	TCCAATCACCCACAATTCCTTT	57
T7-(dT) <sub>24</sub> Primer	GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT <sub>24</sub>	

### 2.1.11 Software

Software	Bezugsquelle
Affymetrix <sup>®</sup> Microarray Suite	Affymetrix, Inc.
GeneData Expressionist <sup>™</sup> Analyst v4.0.5	Gene Data
GeneData Expressionist <sup>™</sup> Refiner v3.0.4	Gene Data
GenePix Pro v3.0	Axon Instruments
Matrix Express v2.0	Phase-1, Inc.
Primer Express <sup>®</sup> Software v2.0	Applied Biosystems

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen der Ratte

Proximale Tubuluszellen (PTC) der Ratte werden nach einem Verfahren isoliert, das an die von Boom et al. (1992) beschriebene Methode angelehnt ist. Männliche Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 160-180g werden durch eine intraperitoneale Injektion mit 50mg/kg Körpergewicht (KG) Natriumpentobarbital (Narcoren<sup>®</sup>) narkotisiert. Die *in-situ*-Perfusion der Nieren erfolgt mit EGTA-haltiger Perfusionslösung mit einer Geschwindigkeit von ca. 10mL/min für 8 Minuten. Die Nieren werden entnommen und in Collagenasepuffer für 20 Minuten verdaut. Nach dem Entfernen der Nierenkapsel werden die kortikalen Bereiche von der Medulla getrennt und mit dem Skalpell fein zerkleinert. Zum Abstoppen des Collagenase-Verdau wird der Gewebepulver in BSA-Puffer aufgenommen und anschliessend durch ein 132µm Gaze sowie durch ein 63µm Gaze filtriert, wodurch die proximalen Tubuluszellen von den übrigen Zelltypen des renalen Cortex getrennt werden. Auf eine Percoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation wie bei der Isolation der humanen PT Zellen wird bei der Ratte verzichtet, da die Verluste an Zellmaterial sehr gross wären und auch ohne diesen Zwischenschritt eine hohe Reinheit der Kultur erreicht werden konnte. Die Zellzahl und die Vitalität der PT-Zellen werden nach zweimaligem Waschen durch Trypan-Blau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt, wobei sich die Zellkonzentration in Zellen/mL aus der gezählten Zellzahl x Verdünnungsfaktor x  $10^4$  ergibt. Die Zellen werden schliesslich in Kulturmedium verdünnt und in einer Dichte von ca.  $0.5 \times 10^5$  Zellen pro Well in Collagen I beschichteten 24-Well-Platten ausgesät. Die Kultivierung erfolgt bei 37°C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre. Im Anschluss an eine 120stündige Anheftungsphase mit einmaligem Mediumwechsel nach 72 Stunden, wird die Kultur mit PBS gewaschen. Nach weiteren 48 Stunden hat die Zellkultur eine zusammenhängende Mono-Schicht gebildet und kann mit den jeweiligen Nephrotoxinen behandelt werden. Die Morphologie der Zellen wird nach der Isolation alle 48 Stunden mikroskopisch überprüft (Labovert FS Lichtmikroskop). In verschiedenen Vorversuchen hat sich das verwendete Kulturmedium als optimal erwiesen. Es enthält verschiedene hormonelle (Epinephrin, Hydrocortison, Insulin, Trijodthyronin), wachstumsfördernde (humaner epithelialer Wachstumsfaktor, FCS), sowie antibakterielle Zusätze (Penicillin,

Streptomycin) und wird ausserdem mit Transferrin und L-Glutamin angereichert. Weiterhin ist die PT Zellkultur durch den Zusatz von HEPES vor pH-Schwankungen aufgrund von kurzfristigen Entnahmen der Zellen aus dem Brutschrank geschützt. Auf die Zugabe von Phenolrot zum Kulturmedium wird aufgrund negativer Auswirkungen auf das Zellwachstum verzichtet.

### ***2.2.2 Isolation und Kultivierung proximaler Tubuluszellen des Menschen***

Humanes Nierenmaterial wird von der Nierenkapsel befreit, medulläre und cortikale Bereiche werden getrennt und der Cortex wird fein zerkleinert. Der Gewebepulver wird in Isolationsmedium mit 0.067% Collagenase IV suspendiert und für zwei Stunden bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Suspension wird durch 132µm Gaze filtriert, um grobe Gewebereste abzutrennen. Ein Percoll-Dichte-Gradient wird hergestellt durch Überschichten einer dichteren Percollösung (1.07g/mL) mit einer dünneren Percollösung (1.04g/mL). Nach zweimaligem Waschen mit frischem Isolationspuffer wird die Zellsuspension auf den Percoll-Dichte-Gradienten überführt und für 25 Minuten bei 1400xg zentrifugiert. Die proximalen Tubuluszellen sammeln sich zwischen den beiden Percoll-Schichten an und können aus dieser Phase gewonnen werden. Nach erneutem Waschen werden Vitalität und Zellzahl durch Trypan-Blau-Färbung in der Neubauer Zählkammer bestimmt und die Zellen nach Resuspension in Kulturmedium in einer Dichte von  $0.5 \times 10^4$  Zellen pro Well ausgesät. Die Kultivierung und Behandlung mit Nephrotoxinen erfolgt analog zu den PT-Zellen der Ratte.

### ***2.2.3 Bestimmung der Zellzahl während der Kultivierung***

Die Ablösung der Zellen aus den Kulturplatten erfolgt nach dem Waschen mit PBS durch Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung für zwei Minuten. Die Zellen werden in 500µL Kulturmedium pro Well aufgenommen und in einer 1:1000-Verdünnung im Casy<sup>®</sup>1 Cell Counter gezählt. Die Ausgrenzung von toten Zellen erfolgt durch Einstellung der Grössenlimitierung der zu zählenden Zellen auf mindestens 7.5µm.

#### **2.2.4 Bestimmung der Vitalität**

Die Vitalität der PT Zellen wird mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass nur vitale, stoffwechselaktive Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT mit Hilfe ihrer Succinatdehydrogenase zu wasserunlöslichen, blauen Formazankristallen umsetzen können. Die Absorption des Formazans kann bei 570nm photometrisch bestimmt und mit der Vitalität der Zellen korreliert werden. Die Zellkultur wird hierzu für zwei Stunden mit MTT-Lösung (5mg/mL in PBS) bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Formazankristalle werden anschliessend durch Lyse der Zellen mit 3%iger SDS-Lösung und Zugabe von Isopropanol mit 0.04N Salzsäure freigesetzt und die Absorption wird im Tecan Ultra Microplate Reader gemessen. Die Bestimmung der Vitalität erfolgt prozentual zur Kontrolle.

#### **2.2.5 Immunhistochemische Färbungen von PT-Zellen**

Für die Färbungen der Zellkulturen werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen und in einem Aceton/Methanol (3:7) Gemisch für 10 Minuten bei -20°C fixiert. Anschliessend werden die unspezifischen Bindungsstellen mit 0.5% BSA in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur abgeblockt. Es folgt die Inkubation mit dem in PBS (+ 0.5% BSA, + 5% FCS) verdünnten primären Antikörper (Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher NHE3, N-Cadherin, E-Cadherin) über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wird zwei Stunden mit dem in PBS verdünnten zweiten Antikörper (Anti-Maus IgG, konjugiert mit Alexa Fluor 488) bei 4°C inkubiert. Für die Gegenfärbung der Zellkerne („*Blue-stain*“) wird bis-Benzimid (0.1µg/mL) verwendet. Die Fotografien werden mit einer Contax 167 MT Spiegelreflexkamera auf einem Axiovert 35 Fluoreszenzmikroskop bei 488nm und 365nm aufgenommen.

#### **2.2.6 Behandlung mit Nephrotoxinen**

Die verwendeten Modell-Nephrotoxine werden in DMSO gelöst, ausser Paraquat Dihydrochlorid, welches in einem DMSO/PBS 1:1 Gemisch gelöst wird. Die Verdünnung dieser Stammlösungen auf die jeweils eingesetzte Konzentration erfolgt

mit Kulturmedium. Die Endkonzentration von DMSO in dem Behandlungsmedium bleibt bei jeder eingesetzten Verdünnung aller Testsubstanzen unter 0.03%. Die Behandlung der PT Zellen mit den Nephrotoxinen beginnt nach 168 Stunden. Die Erneuerung des Behandlungsmediums erfolgt im 24-Stunden-Intervall. Zu den jeweiligen Erntezeitpunkten werden die PT Zellen mit PBS gewaschen und mit Lysepuffer lysiert. Bis zur Isolation der RNA werden die lysierten Zellen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 2.3 Biochemische Methoden

Die Messung der Enzymaktivitäten der Lactatdehydrogenase (LDH) werden im Labor für klinische Chemie, Bayer Health Care durchgeführt.

### 2.3.1 *Quantitative Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)-Aktivität*

Zur Bestimmung der Lactatdehydrogenase-Aktivität wird der LDH IFCC flüssig Kit zusammen mit dem Analysenautomaten Roche/Hitachi 717 verwendet. Die LDH katalysiert die Umwandlung von Lactat zu Pyruvat gemäss folgender Reaktion:



Der Anstieg der NADH-Menge wird durch Messung der Extinktionszunahme nach Zugabe von Lactat zum Zellkulturüberstand bei 340nm photometrisch bestimmt und verhält sich direkt proportional zur katalytischen Aktivität der LDH.

### 2.3.2 *Histochemische Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP)-Aktivität*

Die alkalische Phosphatase katalysiert die Hydrolyse von Phosphateestern im alkalischen Milieu. Die PT Zellen werden in einem Gemisch aus drei Teilen Citratlösung (*Alkaline Phosphatase Kit*), acht Teilen Aceton und einem Teil Formaldehyd für 30 Sekunden fixiert. Anschliessend wird das aus 1-Naphthylphosphat (AP-Kit) durch alkalische Phosphatase freigesetzte 1-Naphthol mit

einem Diazoniumsalz (AP-Kit) zu einem roten Azofarbstoff gekuppelt, der entsprechend der Lokalisation und der Aktivität der AP in der Zelle präzipitiert. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgt mit Haematoxylin. Das Vorhandensein und die Lokalisation der AP-Aktivität wird lichtmikroskopisch evaluiert (Axiovert 35) und fotografiert (Contax 167 MT).

## 2.4 Durchführung der in vivo-Studien

Die Tierstudien werden mit Hilfe von Dr. F. Krötlinger und seinen Mitarbeitern in der Abteilung für Experimentelle Toxikologie, Bayer Health Care entsprechend den OECD Richtlinien zur Testung von Chemikalien Nr. 407 durchgeführt.

### 2.4.1 Behandlung der Ratten

Für die Tierstudien werden ausschliesslich männliche Ratten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 200g eingesetzt. Die Tiere haben während der gesamten Versuchszeit uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser. Puromycin Hydrochlorid, Paraquat Dihydrochlorid und HgCl<sub>2</sub> werden in 0.5%iger Tylose gelöst, Ochratoxin A wird in Maiskeimöl suspendiert. Die Testsubstanzen werden täglich per Gavage appliziert. Die Abtötung der Ratten erfolgt nach Betäubung mit Diethylether durch Entbluten nach folgendem Schema:

Substanz	Dosis	24h	72h	168h
HgCl <sub>2</sub>	18mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
	1.8mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
Ochratoxin A	10mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
	3mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
	1mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
Paraquat	35mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
	3.5mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
Puromycin	45mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
	4.5mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere
Kontrolle	0mg/kg	3 Tiere	3 Tiere	3 Tiere

Die Nieren werden sofort entnommen, entkapselt und längs geschnitten. Pro Tier wird eine Nierenhälfte in 10%iger Formalinlösung fixiert und für die histopathologischen Untersuchungen verwahrt. Die übrigen drei Nierenhälften werden in RNA-Later eingelegt, um eine Degradation der RNA zu verhindern [Florell et al., 2001]. Cortex und Medulla werden schliesslich getrennt und bis zur Isolation der RNA bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### **2.4.2 Histopathologische Untersuchungen**

Die histopathologischen Untersuchungen werden von Dr. med. vet. U. Bach und ihren Mitarbeitern in der Abteilung für toxikologische Pathologie, Bayer Health Care durchgeführt.

Aus den formalinfixierten Nierenhälften werden ca. 5 $\mu\text{m}$  dicke Paraffinschnitte hergestellt. Die Präparate werden mit Eosin gefärbt, mit Haematoxylin gegengefärbt und schliesslich von Dr. med. vet. U. Bach und Dr. med. vet. M. Rinke toxikologisch bewertet.

### **2.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.5.1 Isolation von RNA aus Zellen**

Die Isolation der Gesamt-RNA aus den lysierten Zellen erfolgt mit dem *RNeasy Midi* Kit gemäss dem „*RNeasy Midi-Protokoll for Isolation of total RNA from animal cells*“ (Qiagen). Die Lysate werden nach dem Auftauen mehrmals durch eine 21G Kanüle geschert, um eventuell enthaltene DNA zu fragmentieren. Pro Midi-Säule werden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen eingesetzt und es wird je zweimal mit 200 $\mu\text{L}$  RNase-freiem Wasser eluiert. Bei Verwendung der *RNeasy* Kits wird nach Angaben des Herstellers eine weitgehend DNA-freie Gesamt-RNA erhalten, die einen erhöhten Anteil an mRNA aufweist, da die in der Gesamt-RNA normalerweise enthaltenen kleinen ribosomalen RNA's und transfer RNA's mit einer Grösse von weniger als 200 Nukleotiden abgetrennt werden.

### **2.5.2 Isolation von RNA aus cortikalem Nierengewebe**

Die Isolation der Gesamt-RNA aus cortikalem Nierengewebe erfolgt mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) gemäss dem „*RNeasy Mini-Protokoll for Isolation of total RNA from animal tissues*“. Pro Mini-Säule werden ca. 30mg Gewebe auf Trockeneis in ein 2mL Eppendorf-Tube eingewogen und eine hitzesterilisierte Stahlkugel dazugegeben. Nach Zugabe von 700µL Lysepuffer wird das Gewebe in der Schwingmühle für 3 x 3Minuten bei einer Frequenz von 30Hz gemahlen. Durch 10minütige Zentrifugation bei 16000xg werden nicht-lysierbare Gewebeanteile abgetrennt. Das Lysat wird mehrmals durch eine 21G Kanüle geschert und anschliessend gemäss dem Protokoll weiterverarbeitet. Bei der RNA-Isolation aus Gewebe wird zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt, wie im *RNeasy-Mini-Protokoll* unter „*Optional On-column DNase digestion with the RNase-free DNase Set*“ beschrieben, um die Verunreinigung der Gesamt-RNA mit DNA so gering wie möglich zu halten. Die Eluierung der Gesamt-RNA von den Säulen erfolgt zweimal mit je 30µL RNase-freiem Wasser.

### **2.5.3 Qualitätsbestimmung und Quantifizierung der RNA**

Die total-RNA wird mit dem „*RiboGreen<sup>TM</sup> Quantitation and Reagent Kit*“ fluorimetrisch quantifiziert. Die Qualität der RNA wird kontrolliert durch Gelelektrophorese im Nano-Massstab in einem Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des „*RNA 6000 Nano Lab Chip Kit*“ gemäss den Angaben des Herstellers. Für die weiteren Versuche wird ausschliesslich RNA verwendet, die keine Degradation aufweist und deren Verhältnis von 23S rRNA-Peak zu 18S rRNA-Peak über 1.9 liegt. Ein Beispiel für ein Elektropherogramm einer RNA mit optimaler Qualität ist in **Abb. 9** dargestellt.

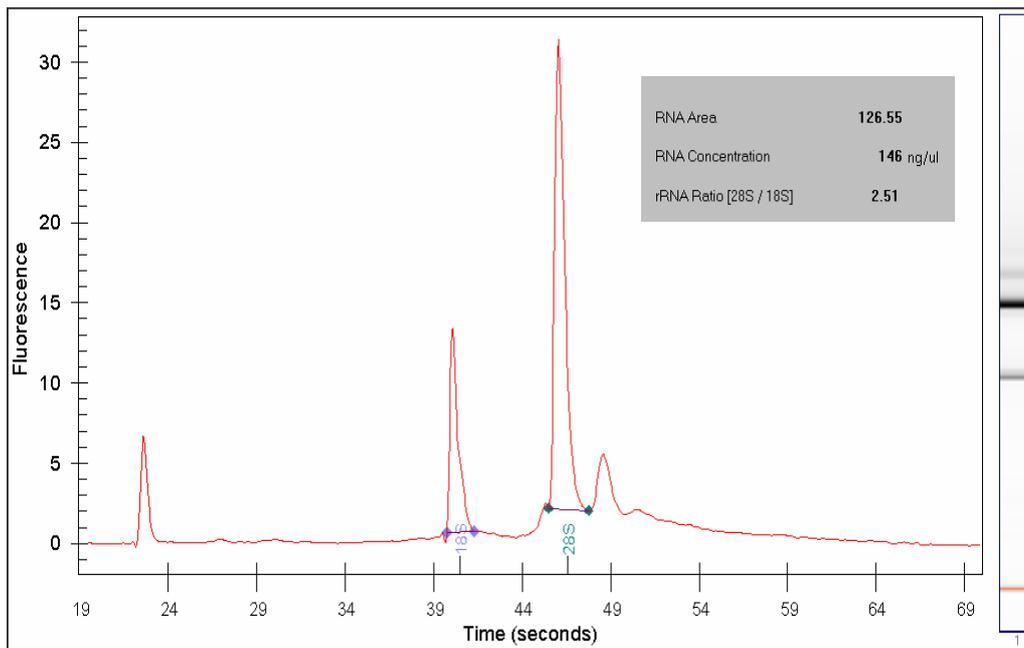


Abb. 9: Elektropherogramm einer RNA optimaler Qualität erstellt mit dem Agilent 2100 Bioanalytiker. Erkennbar sind die beiden ribosomalen Peaks sowie ein kleiner Hügel zwischen ihnen, der charakteristisch für die mRNA ist. Ansonsten sind keine weiteren Peaks erkennbar, eine Degeneration der RNA kann somit ausgeschlossen werden. Das Verhältnis 23S:18S beträgt 2.51.

## 2.5.4 Reverse Transkription und Prozessierung der cDNA für die Hybridisierung auf cDNA-Mikroarrays

### 2.5.4.1 Direktes Verfahren

Zur Herstellung direkt markierter cDNA wird der „*Superscript<sup>TM</sup> II RNase H<sup>-</sup> Reverse Transcriptase Kit*“ verwendet. Jeweils in getrennten Ansätzen werden 10µg Gesamt-RNA der behandelten Probe bzw. 10µg Gesamt-RNA der Kontrolle eingesetzt. Nach Zugabe von je 14µL UPD-Wasser und 8µL Oligo dT Primer (0.5µg/µL) werden die Ansätze für je 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert und anschliessend für ca. 10 Minuten im Eis abgekühlt. Folgende Mastermixe werden zur Durchführung der RT-Reaktion zu den jeweiligen Ansätzen pipettiert:

Behandelte Probe		Kontrolle	
5x First Strand Buffer	8µL	5x First Strand Buffer	8µL
DTT (0.1M)	4µL	DTT (0.1M)	4µL
dNTP-Mix Cy3	2µL	dNTP-Mix Cy5	2µL
Cy3-dCTP-Lösung	2µL	Cy5-dCTP-Lösung	2µL
Superscript II (200U/µL)	<u>2µL</u>	Superscript II (200U/µL)	<u>2µL</u>
Gesamt	18µL	Gesamt	18µL

Die Inkubation der Ansätze erfolgt im Thermocycler bei 45°C für 2 Stunden. Im Anschluss an die RT-Reaktion wird die markierte cDNA durch Zusatz von je 700µL cDNA-Fällungslösung für mindestens 1 Stunde bei –80°C oder über Nacht bei –20°C gefällt. Die Aufreinigung der markierten cDNA's erfolgt mit dem „*Qiaquick PCR Purification Kit*“ entsprechend dem „*Qiaquick PCR Purification Kit Protocol*“. Die Einbaurrate der Fluorophore wird durch photometrische Messung der Absorption bei 260nm (cDNA) und 550nm (für Cy3-markierte Proben) bzw. 650nm (für Cy5-markierte Kontrollen) und unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt. Schliesslich werden Cy3- und Cy5-markierte cDNA's im Verhältnis 1:1 gemischt, im Vakuum-Konzentrator zur Trockene eingedampft und bis zur Hybridisierung bei –20°C für maximal 7 Tage gelagert.

#### 2.5.4.2 Indirektes Verfahren

Zur Herstellung indirekt markierter cDNA wird ebenfalls der „*Superscript<sup>TM</sup> II RNase H Reverse Transkriptase Kit*“ verwendet. Jeweils in getrennten Ansätzen werden hierbei 10µg Gesamt-RNA der behandelten Probe bzw. 10µg Gesamt-RNA der Kontrolle nach Zugabe von je 14.5µL UPD-Wasser und 1µL Oligo dT Primer (5µg/µL) für 10 Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert und anschliessend für ca. 10Minuten im Eis abgekühlt. Folgender Mastermix wird zur Durchführung der RT-Reaktion zu den jeweiligen Ansätzen pipettiert:

Behandelte Probe + Kontrolle	
5x First Strand Buffer	6µL
DTT (0.1M)	3µL
UPD-Wasser	3µL
aa-dUTP-haltiger dNTP-Mix (50x)	0.6µL
Superscript II (200U/µL)	<u>1.9µL</u>
Gesamt	14.5µL

Die Inkubation der Ansätze erfolgt im Thermocycler bei 42°C für 2 Stunden. Im Anschluss wird die RT-Reaktion durch Zugabe von 10µL NaOH (1M) und 10µL EDTA-Lösung (0.5M) gestoppt und der Ansatz mit 25µL Tris-HCl-Puffer (1M, pH 7.4) neutralisiert. Die Aufreinigung der cDNA erfolgt mit „*Microcon YM30*“ – Filtereinsätzen entsprechend den Herstellerangaben. Die cDNA wird anschliessend im Vakuum-Konzentrator eingedampft und dann in gleichen Teilen UPD-Wasser und Natriumbicarbonatpuffer (pH 8,5-9,0) aufgenommen. Die gelöste aminoallyl-cDNA wird mit dem lyophilisierten monoreaktiven Fluorophor-N-Hydroxysuccinimidylester (73pmol Cy3-NHS pro behandelte Probe, 70pmol Cy5-NHS pro Kontrolle) konjugiert und überschüssige Fluorophore mit 4M Hydroxylamin-Lösung abgefangen. Die fluoreszenzmarkierte cDNA wird anschliessend mit dem „*Qiaquick PCR Purification Kit*“ entsprechend dem „*Qiaquick PCR Purification Kit Protocol*“ aufgereinigt. Die Überprüfung der Einbaurate der Fluorophore erfolgt wie beim direkten Einbauverfahren beschrieben. Die entsprechend markierten cDNA's werden schliesslich im Verhältnis 1:1 gemischt, im Vakuum-Konzentrator zur Trockene eingedampft und bis zur Hybridisierung bei –20°C für maximal 7 Tage gelagert.

### **2.5.5 Hybridisierung und Scannen von cDNA-Mikroarrays**

Die getrocknete cDNA-Probe wird in 20µL Hybridisierungspuffer aufgenommen, fünf Minuten bei 98°C denaturiert und drei Minuten bei 10000xg zentrifugiert. 16µL der Probe werden nun auf einen staubfreien cDNA-Mikroarray aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Der „*Rat CT 700*“ Mikroarray enthält sowohl 696 verschiedene cDNA's von toxikologisch relevanten Rattengenomen, gespottet in vier Replikaten, als auch mehrere Negativkontrollen und „*Spots*“ mit *Arabidopsis Thaliana* Sequenzen, die als Hybridisierungskontrollen dienen. Der „*Rat 250*“ Mikroarray wird nur für den Vergleich des direkten und indirekten Verfahrens zur

Fluoreszenzmarkierung von cDNA eingesetzt. Er enthält neben 250 cDNA's von toxikologisch relevanten Rattengenen mehrere Negativkontrollen, allerdings keine Hybridisierungskontrollen. Die Mikroarrays werden schliesslich über Nacht in einer Hybridisierungskammer mit 75µL Hybridisierungsstockpuffer zum Befeuchten der Atmosphäre bei 42°C inkubiert. Am nächsten Tag werden die Arrays mit abnehmender Stringenz für je fünf Minuten in den Waschpuffern A, B, C, D und Millipore-Wasser gewaschen, durch Zentrifugation in einer 4K15C Zentrifuge bei 161xg für fünf Minuten getrocknet und bis zum Scannen dunkel und trocken bei 4°C gelagert. Die Fluoreszenz-Intensitäten werden im GenePix 4000A-Scanner mit einem dualen Laser-System bei zwei verschiedenen Wellenlängen (532nm = grüne Spots = behandelte Probe; 635nm = rote Spots = Kontrolle) gemessen. Die Spannung der Photomultiplier wird dabei so gewählt, dass der Quotient aus den mittleren Fluoreszenzintensitäten aller Spots bei 532nm und 635nm bei  $1 \pm 0.05$  liegt.

### **2.5.6 Reverse Transkription und Prozessierung der cDNA für die Hybridisierung auf Oligonukleotid-Mikroarrays**

Bei der Hybridisierung auf Oligonukleotid-Mikroarrays werden behandelte Probe und Kontrolle auf getrennte Arrays hybridisiert. Eine Kontrolle kann somit für mehrere behandelte Proben des gleichen Untersuchungszeitpunktes verwendet werden.

#### **2.5.6.1 Reverse Transkription – Erststrangsynthese**

Es werden 5µg Gesamt-RNA in 11µL UPD-Wasser gelöst, mit 1µL T7-(dT)<sub>24</sub> Primer (100pM) für 10Minuten bei 70°C im Thermocycler inkubiert und schliesslich für einige Minuten im Eis abgekühlt. Der T7-(dT)<sub>24</sub> Primer enthält ausser Thymidin-Nukleotiden eine Promotersequenz für die T7 RNA Polymerase, welche später für die in vitro Transkription eingesetzt wird. Für die Erststrang- und die Zweitstrangsynthese wird der „*Superscript<sup>TM</sup> Double-stranded cDNA Synthesis Kit*“ verwendet. Folgender Mastermix wird pro Ansatz für die Erststrangsynthese pipettiert:

Komponente	Menge
5x First Strand Buffer	4 $\mu$ L
DTT (0.1M)	2 $\mu$ L
dNTP-Mix (10mM)	<u>1<math>\mu</math>L</u>
Gesamt	7 $\mu$ L

Nach Inkubation bei 45°C im Thermocycler für zwei Minuten werden pro Ansatz 1 $\mu$ L *Superscript II Reverse Transcriptase* (200U/ $\mu$ L) zugegeben und für eine Stunde bei 45°C weiterinkubiert.

#### 2.5.6.2 Herstellung doppelsträngiger DNA

Die Zweitstrangsynthese wird anschliessend durchgeführt nach Zugabe des folgenden Mastermixes pro Ansatz:

Komponente	Menge
RNase-freies Wasser	91 $\mu$ L
5x Second Strand Buffer	30 $\mu$ L
dNTP-Mix (10mM)	3 $\mu$ L
DNA Ligase (10U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
E.coli DNA Polymerase I (10U/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L
RNase H (2U/ $\mu$ L)	<u>1<math>\mu</math>L</u>
Gesamt	130 $\mu$ L

Die Reaktionsansätze werden für zwei Stunden bei 16°C inkubiert. Durch weitere Inkubation für fünf Minuten bei 16°C nach Zugabe von 2 $\mu$ L T4 DNA Polymerase werden überhängende Enden der doppelsträngigen DNA abgeschnitten und durch 10 $\mu$ L EDTA-Lösung (0.5M) werden die Reaktionen anschliessend gestoppt. Die Aufreinigung der dsDNA erfolgt mit dem „GeneChip® Sample Cleanup Module“ entsprechend den Herstellerangaben. Die Eluierung der dsDNA wird einmalig mit 14 $\mu$ L Elutionspuffer (aus dem Kit) durchgeführt.

### 2.5.6.3 *In vitro* Transkription – cRNA-Synthese

Die dsDNA wird unter Verwendung des „BioArray™ High Yield™ RNA Transcript Labeling Kit“ in komplementäre RNA (cRNA) umgeschrieben. Zur Durchführung der *in vitro* Transkription wird folgender Mastermix hergestellt:

Komponente	Menge
Eluierte dsDNA	12µL
RNase-freies Wasser	10µL
HY Reaction Buffer (10x)	4µL
Biotinylated Ribonucleotides (10x)	4µL
DTT (10x)	4µL
RNase Inhibitor (10x)	4µL
T7 RNA Polymerase (20x)	<u>2µL</u>
Gesamt	40µL

Der Ansatz wird für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Die anschliessende Aufreinigung erfolgt wiederum mit dem „GeneChip® Sample Cleanup Module“ entsprechend den Herstellerangaben. Die cRNA wird einmal mit 11µL und einmal mit 10µL RNase-freiem Wasser eluiert.

Durch photometrische Messung bei 260nm in einem Spektramax Plus Spektrometer wird die Ausbeute an cRNA nach Sambrook et al. (1982) gemäss folgender Formel ermittelt:

$$\text{OD}_{260} \times 37\mu\text{g/mL} = \text{cRNA-Ausbeute } (\mu\text{g/mL})$$

Die Bildung des Quotienten aus der Extinktion bei 260nm und 280nm ermöglicht Aussagen über die Qualität der cRNA. Zur Hybridisierung wird ausschliesslich cRNA mit einem Quotienten von mindestens 1.9 verwendet. Eine zusätzliche Qualitätskontrolle der cRNA liefert die gelelektrophoretische Analyse mit dem Bioanalyzer 2100 unter Verwendung des „RNA 6000 Nano Lab Chip Kits“ gemäss den Angaben des Herstellers.

## **2.5.7 Hybridisierung, Färben und Scannen der Oligonukleotid-Mikroarrays**

### **2.5.7.1 Hybridisierung**

Für die Hybridisierung werden 15µg der cRNA mit UPD-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 32µL gebracht und mit 8µL Fragmentierungspuffer (5x, enthalten im „GeneChip® Sample Cleanup Module“) für 35Min. bei 94°C im Thermomixer fragmentiert. Nach Zugabe von 260µL Oligo-Mikroarray Hybridisierungspuffer pro Ansatz wird erst für fünf Minuten bei 99°C denaturiert, dann für weitere fünf Minuten bei 45°C inkubiert und schliesslich für fünf Minuten in der Tischzentrifuge bei 16000xg zentrifugiert. In der Zwischenzeit werden die Oligo-Mikroarrays mit je 200µL MES-Puffer (1x) befüllt und für mindestens 10Minuten bei 45°C und 60rpm im Hybridisierungssofen prä-hybridisiert. Der 1x MES-Puffer wird anschliessend durch 200µL des Probenüberstandes ersetzt und die Mikroarrays im Hybridisierungssofen für 16-17 Stunden bei 45°C und 60rpm hybridisiert.

### **2.5.7.2 Färben und Scannen der Oligonukleotid-Mikroarrays**

Das Färben und Waschen der Oligonukleotid-Arrays erfolgt in der *GeneChip® Fluidics Station 400*. Die Färbe- und Waschvorgänge werden durch das Software Programm „*Affymetrix® Microarray Suite*“ gesteuert. Für die RG U34A Arrays wird das Färbeprotokoll „EukGE WS2“ verwendet, welches eine zweifache Färbung der Arrays vorsieht, um eine Verstärkung der Fluoreszenzsignale zu erreichen. Hierbei wird zunächst die restliche im Array enthaltene Probe durch 200µL Affymetrix Waschpuffer A ersetzt. Anschliessend werden die Arrays in der *GeneChip® Fluidics Station* zehnmal mit dem Affymetrix Waschpuffer A bei 25°C und viermal mit dem Affymetrix Waschpuffer B bei 50°C gewaschen. Für den ersten Färbeschritt werden die Arrays in der *GeneChip® Fluidics Station* mit 600µL SAPE Färbepuffer für 10 Minuten bei 25°C gefärbt und anschliessend mit Affymetrix Waschpuffer A zehnmal gewaschen. Das in dem SAPE Färbepuffer enthaltene Streptavidin-Phycoerythrin bindet an die Biotinreste der Ribonukleotide, die zuvor während der in vitro Transkription in die hybridisierte cRNA eingebaut worden sind. Um eine Verstärkung des Fluoreszenzsignals zu erhalten, werden die Arrays anschliessend für 10 Minuten bei 25°C mit 600µL Antikörper-Färbepuffer behandelt. Dieser zweite Färbepuffer

enthält einen biotinylierten Antikörper gegen Streptavidin, der an das bereits angelagerte Streptavidin bindet. An die biotinylierten Bereiche des Antikörpers kann in einem dritten 10minütigen Färbeschritt mit wiederum 600µL SAPE-Färbepuffer nochmals Streptavidin-Phycoerythrin gekoppelt werden, was zu einer erheblichen Amplifikation des Fluoreszenzsignals führt. Abschliessend werden die Arrays fünfzehnmal mit Affymetrix Waschpuffer A bei 30°C gewaschen. Das Scannen der Arrays erfolgt in einem *Gene Array Scanner*, wobei die Fluoreszenzsignale des Phycoerythrins bei 570nm gemessen werden. Um eine Erhöhung der Sensitivität und eine Verringerung der Hintergrundsignale zu erreichen, wird jeder Array doppelt gescannt und die Werte werden anschliessend gemittelt.

### **2.5.8 Herstellung eines cDNA Standards für die quantitative Echt-Zeit PCR**

Durch intraperitoneale Injektion von 80mg/kg KG Natriumpentobarbital (Narcoren®) werden drei männliche Ratten (je ~200g) abgetötet und die Nieren entnommen. Die Nieren werden sofort entkapselt, medulläre von corticalen Bereichen getrennt und die Gewebe werden separat in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Gesamt-RNA wird isoliert, quantifiziert und ihre Qualität bestimmt. Unter Verwendung des „*Superscript<sup>TM</sup> First-strand Synthesis System for RT-PCR*“ werden 1000ng Gesamt-RNA (aus drei Ratten gepoolt) in 10µL UPD-Wasser gelöst und im Thermocycler in cDNA umgeschrieben. Folgender Reaktionsansatz wird für die reverse Transkription zugegeben:

Komponente	Menge
RNase-freies Wasser	1µL
Random Hexamer (50ng/µL)	0.5µL
Oligo (dT) <sub>12-18</sub> (0.5µg/µL)	0.5µL
PCR Buffer (10x)	2µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2µL
dNTP Mix (10mM)	1µL
DTT (0.1M)	2µL
Superscript II (50U/µL)	<u>1µL</u>
Gesamt	10µL

Das verwendete Temperatur-Zeit-Schema lautet:

Phase	Temperatur	Zeit
Hybridisierungsphase	25°C	10min
Synthesephase	42°C	50min
Denaturierungsphase	70°C	15min

Parallel wird ein Ansatz ohne Zugabe von Superscript II durchgeführt. Diese „-RT-Kontrolle“ dient bei der späteren Primer-Validierung als Spezifitäts-Kontrolle, um eine unerwünschte Amplifikation von genomischer DNA durch die Primer auszuschliessen.

Der gewonnene cDNA Standard ist einer Ausgangskonzentration von 50ng/μL Gesamt-RNA äquivalent und wird für die Herstellung einer Standardreihe in den Verhältnissen 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt.

### **2.5.9 Primer-Validierung für TaqMan<sup>®</sup> PCR**

Die Auswahl der spezifischen Primer für die jeweils untersuchten Gene erfolgt unter Verwendung der Primer Express<sup>®</sup> Software v2.0. Die Sequenzen der ausgesuchten Primerpaare werden durch „*Blasten*“ [Altschul et al., 1990] auf ihre Spezifität für das jeweils gesuchte Target-Gen überprüft. Eine Verdünnungsreihe des cDNA Standards sowie die „-RT-Kontrolle“ werden für einen TaqMan<sup>®</sup> PCR-Testlauf als „*Templates*“ eingesetzt und mit den jeweiligen Primerpaaren in einem *ABI Prism<sup>®</sup> 7900HT Sequence Detection System* amplifiziert. Unter Verwendung des *SYBR<sup>®</sup> Green PCR Core Reagents Kits* wird folgender Reaktionsansatz hergestellt und zu den Templates pipettiert:

Komponente	Menge
RNase-freies Wasser	9.47µL
SYBR <sup>®</sup> Green PCR Buffer (10x)	2.22µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2.67µL
dNTP Mix with dUTP (12.5mM)	1.78µL
Forward Primer (2.5pmol/µL)	1.78µL
Reverse Primer (2.5pmol/µL)	1.78µL
AmpErase <sup>®</sup> (1U/µL)	0.22µL
AmpliTaq <sup>™</sup> Gold (5U/µL)	0.11µL
Template	<u>2.20µL</u>
Gesamt	22.23µL

Die Ansätze werden nach dem folgendem Temperatur-Zeit-Schema inkubiert:

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialphase	50°C	2min	
Denaturierungsphase, initial	95°C	10min	
Denaturierungsphase, zyklisch	95°C	15sek	40 Zyklen
Hybridisierungs-/Elongationsphase	X°C	60sek	
Denaturierungsphase	95°C	15sek	Schmelzkurve
Hybridisierungsphase	X°C	15sek	
Denaturierungsphase, terminal	95°C	15sek	

X = Hybridisierungstemperatur des jeweils verwendeten Primerpaars (siehe Kapitel „Synthetische Oligonukleotide“)

Die Verdünnungen des cDNA Standards, sowie die -RT-Kontrolle und eine „No template Control“ (NTC) werden in jeweils drei Replikaten angesetzt und die Fluoreszenz-Zunahme von interkaliertem SYBR<sup>®</sup> Green Farbstoff in Abhängigkeit von der Zyklenzahl gemessen. Die daraus gewonnenen C<sub>t</sub>-Werte werden anschliessend gemittelt. Bei einer Verdünnungsreihe des Standards mit dem Faktor 10 sollten die einzelnen Verdünnungen idealerweise um jeweils ca. 3.3 C<sub>t</sub>-Werte auseinanderliegen gemäss folgender Formel:

$$2^{\text{Anzahl der Zyklen}} = \text{Amplifikationsfaktor}$$

Die -RT-Kontrolle sollte im Idealfall einen  $C_T$ -Wert aufweisen, der im Bereich des  $C_T$ -Wertes der NTC liegt.

Im Anschluss an die 40 Zyklen wird eine Schmelzkurve generiert, aus welcher ersichtlich ist, ob das Primerpaar wie erwartet nur ein Produkt gebildet hat.

Durch Gelelektrophorese im präparativen Massstab, sowie Sequenzierung der Amplifikate wird abschliessend die Identität des gebildeten Produktes verifiziert.

#### **2.5.10 Agarose-Gelelektrophorese im präparativen Massstab**

Die gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikate erfolgt mittels eines 2%igen Agarose-Gels unter Verwendung eines TAE Laufpuffers (1x). 20 $\mu$ L der Proben werden mit je 4 $\mu$ L Auftragspuffer versetzt und bei einer Spannung von 126V für 120 Minuten aufgetrennt. Die Gele werden anschliessend mit Ethidiumbromidlösung (Stammlösung 10mg/mL in UPD-Wasser, mit TAE-Puffer zu 5 $\mu$ g/mL verdünnt) für fünf Minuten gefärbt und für weitere fünf Minuten mit Leitungswasser entfärbt. Unter einer UV-Lampe werden die detektierten DNA-Banden ausgeschnitten und die Amplifikate mit Hilfe des „Qiaquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kits“ extrahiert. Als Grössenmarker wird eine 10bp DNA Ladder verwendet.

#### **2.5.11 Sequenzierung von TaqMan<sup>®</sup> PCR Amplifikaten**

Die eluierten Amplifikate werden durch Bestimmung der OD<sub>260</sub> gemäss Sambrook et al. (1982) quantifiziert:

$$\text{OD}_{260} \times 40\mu\text{g/mL} = \text{ssDNA-Ausbeute } \mu\text{g/mL}$$

Folgender Mastermix wird unter Verwendung der Komponenten des „ABI Prism<sup>®</sup> DNA Sequencing Kits“ angesetzt:

Für den Forward Primer:		Für den Reverse Primer:	
Aufgereinigtes Amplifikat	10ng	Aufgereinigtes Amplifikat	10ng
UPD-Wasser	12µL	UPD-Wasser	12µL
Forward-Primer (2.5pmol/µL)	4µL	Reverse Primer (2.5pmol/µL)	4µL
BigDye™ Terminator Puffer	4µL	BigDye™ Terminator Puffer	4µL
Gesamt	20µL	Gesamt	20µL

Im Thermocycler wird folgendes Temperatur-Zeit-Schema gefahren:

Phase	Temperatur	Zeit	
Denaturierungsphase	96°C	30sek	
Hybridisierungs-/Elongationsphase	X°C	4min 15sek	25 Zyklen

X = Hybridisierungstemperatur des jeweils verwendeten Primerpaares (siehe Kapitel „Synthetische Oligonukleotide“)

Die Aufreinigung der DNA erfolgt durch eine Natriumacetat / Ethanol-Fällung. Die Ansätze werden in 20µL TSR-Puffer aufgenommen, denaturiert und die Sequenzen werden im Labor von Dr. J. Franz unter Verwendung eines *ABI Prism® 310 Genetic Analyzer* bestimmt.

### **2.5.12 Verifizierung von Mikroarray-Expressionsdaten mit quantitativer Taqman®-PCR**

Zur Verifikation der mit den Arrays erhaltenen Expressionsdaten, wird die Expression einiger ausgesuchter Gene zusätzlich mit Hilfe der quantitativen Taqman®-PCR untersucht. Die reverse Transkription wird durchgeführt wie im Kapitel „Herstellung eines cDNA-Standards für quantitative Echt-Zeit-PCR“ beschrieben. Für einen einfachen Ansatz werden 100ng Gesamt-RNA in 10µL UPD-Wasser gelöst und eingesetzt. Für die nachfolgende quantitative Taqman®-PCR wird eine cDNA-Menge als Template eingesetzt, die einer Ausgangsmenge von 5ng/µL Gesamt-RNA äquivalent ist. Der zugegebene Mastermix entspricht dem für die Primer-Validierung verwendeten Reaktionsansatz. Das Temperatur-Zeit-Schema lautet:

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialphase	50°C	2min	
Denaturierungsphase, initial	95°C	10min	
Denaturierungsphase, zyklisch	95°C	15sek	40 Zyklen
Hybridisierungs-/Elongationsphase	X°C	60sek	

X = Hybridisierungstemperatur des jeweils verwendeten Primerpaares (siehe Kapitel „Synthetische Oligonukleotide“)

### **2.5.13 Auswertung der Taqman<sup>®</sup>-PCR Ergebnisse unter Verwendung der $\Delta\Delta C_T$ -Methode**

Zur Auswertung der Taqman<sup>®</sup>-PCR Ergebnisse wird die vergleichende  $C_T$ -Wert-Methode angewendet. Diese Methode beruht auf der Normalisierung der gemessenen  $C_T$ -Werte der Proben auf den  $C_T$ -Wert von 18S RNA, der in jeder Probe separat bestimmt wird. Es wird bei dieser Methode davon ausgegangen, dass die Menge an 18S RNA in jeder Probe unverändert bleibt, unabhängig davon, ob das Ausgangsmaterial mit Toxinen behandelt wurde oder nicht. Die Berechnung ist im Detail im „User Bulletin #2: Relative Quantitation of gene expression“ (Applied Biosystems) beschrieben.

Zur Amplifikation der 18S-RNA in den Ochratoxin A-behandelten Proben wird der im Kapitel „Primer-Validierung für Taqman<sup>®</sup>-PCR“ aufgeführte Reaktionsansatz mit Komponenten aus dem „SYBR<sup>®</sup> Green PCR Core Reagents Kit“ unter Verwendung von 18S-Primern aus dem „Quantum RNA 18S Internal Standards Kit“ verwendet. Das verwendete Temperatur-Zeit-Schema lautet:

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialphase	50°C	2min	
Denaturierungsphase, initial	95°C	10min	
Denaturierungsphase, zyklisch	95°C	15sek	40 Zyklen
Hybridisierungs-/Elongationsphase	59°C	60sek	

Für die Amplifikation von 18S RNA in allen weiteren Taqman<sup>®</sup>-PCR Versuchen wird der „Taqman<sup>®</sup> Ribosomal RNA Control Reagents Kit“ zusammen mit den

Komponenten des „*Taqman*<sup>®</sup> *PCR Core Reagent Kits*“ in folgendem Ansatz verwendet:

Komponente	Menge
RNase-freies Wasser	11.40µL
PCR Buffer A (10x)	2.00µL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4.40µL
dNTP Mix with dUTP (12.5mM)	1.60µL
Forward Primer 18S (10µM)	0.10µL
Reverse Primer 18S (10µM)	0.10µL
Vic-Sonde (40µM)	0.10µL
AmpErase <sup>®</sup> (1U/µL)	0.20µL
AmpliTaq <sup>™</sup> Gold (5U/µL)	0.10µL
Template	<u>2.20µL</u>
Gesamt	22.20µL

Die Ansätze durchlaufen folgendes Temperatur-Zeit-Schema:

Phase	Temperatur	Zeit	
Initialphase	50°C	2min	
Denaturierungsphase, initial	95°C	10min	
Denaturierungsphase, zyklisch	95°C	15sek	40 Zyklen
Hybridisierungs-/Elongationsphase	60°C	60sek	

## 2.6 Mathematische Methoden

### 2.6.1 Qualitätsbeurteilung der cDNA-Mikroarrays

Nach Abzug der Hintergrund-Fluoreszenzen bei 532nm und 635nm in jedem „Spot“ mit Hilfe der Software „*GenePix Pro v3.0*“ erfolgt die weitere Auswertung mit der Software „*Matrix Express 2*“. Jedes Gen ist auf dem Mikroarray vierfach aufgespottet. Die Fluoreszenzintensitäten dieser Replikate werden gemittelt. Jeder „Spot“ muss in beiden Kanälen Fluoreszenzintensitäten von über 50 aufweisen, um als „valide“ betrachtet zu werden. Die Standardabweichung zwischen den vier Replikaten eines Gens darf nicht über 25% liegen und es müssen mindestens zwei Replikate als valide eingestuft werden, damit ein Gen für die weiteren Auswertungen zugelassen

wird. Die Induktionsfaktoren ergeben sich als Quotient aus der gemittelten Fluoreszenzintensität bei 532nm und der gemittelten Fluoreszenzintensität bei 635nm. Induktionsfaktoren über 2 oder unter 0.5 werden allgemein als statistisch signifikant angesehen [Grills et al., 2001]. In Einzelfällen ist es nötig, die Signifikanzgrenzen anzupassen, um entweder keine wichtigen Informationen zu verlieren oder um bei zu grossen Datenmengen auf die aussagekräftigsten Veränderungen zu fokussieren. Die Vergleichbarkeit der Experimente wird für jeden Mikroarray durch Normalisierung auf den Mittelwert aus den Induktionsfaktoren aller Gene eines Arrays gewährleistet.

### **2.6.2 Qualitätsbeurteilung der Oligonukleotid-Mikroarrays**

Auf den verwendeten Oligonukleotid-Arrays sind für jedes Gen 16 verschiedene „probes“ (25mere) photolithographisch aufsynthetisiert worden. Diese werden als „*perfect matches*“ bezeichnet. Zu jeder „*probe*“ existiert ausserdem eine „*mismatch*“-Sequenz auf dem Array, bei der jeweils eine Base vertauscht wurde. Mit Hilfe der „*Affymetrix*<sup>®</sup> *Microarray Suite*“ (MAS) wird zunächst ein Korrekturfaktor berechnet, mit welchem die Fluoreszenzintensitäten der hybridisierten cRNA-Proben auf eine mittlere Target-Intensität von 100 normalisiert werden. Die Korrekturfaktoren von Arrays, die miteinander verglichen werden sollen, dürfen sich maximal um den Faktor drei unterscheiden. Anschliessend werden die einzelnen Gene entsprechend ihres *perfect match/mismatch*-Verhältnisses in die Kategorien „*present*“, „*marginal*“ oder „*absent*“ eingeteilt. Die weitere Qualitätskontrolle wird unter Verwendung der „*GeneData Expressionist Refiner*“ Software durchgeführt. Hierbei werden sowohl Qualitätsbestimmungen durchgeführt, die auf einer statistischen Analyse der Hybridisierungssignale jedes einzelnen Experiments beruhen, als auch solche Qualitätskontrollen, die sich auf ein virtuell aus allen Experimenten generiertes Referenzexperiment beziehen. Zu den letzteren Kontrollen gehören:

- Maskierung von defekten Gebieten auf den Arrays. Als defekte Gebiete werden Areale auf dem Array bezeichnet, die im Vergleich mit dem Referenzexperiment besonders hohe (bereits im Sättigungsbereich liegende) oder besonders niedrige Signalintensitäten aufweisen.

- Erkennung von Signal-Gradienten durch Vergleich der Signalintensitäten auf jedem Array mit denen des Referenzexperiments und Korrektur solcher Gradienten.
- Identifizierung von Ausreißern („*outlier masking*“).
- Klassifizierung der Experimente in gut, mittel oder schlecht durch Zusammenfassung der Ergebnisse aus sämtlichen Qualitätskontrollen.

### **2.6.3 Statistische Auswertungsmethoden**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Software „*GeneData Expressionist Analyst*“. Dieses Programm stellt zahlreiche Methoden für die Datenanalyse zur Verfügung, die im Folgenden etwas genauer dargestellt werden sollen.

#### **2.6.3.1 Histogramm**

Die Darstellung der Daten einer Experimentreihe als zweidimensionales Histogramm ist sinnvoll, um die grundlegenden Eigenschaften eines Datensets zu beschreiben. Für jedes Gen wird der jeweilige Induktionsfaktor (vertikal) über die verschiedenen Experimente einer Studie (horizontal) aufgetragen. Auf diese Weise kann rasch ermittelt werden, ob normal verteilte Daten vorliegen und ob die Normalisierung der Daten erfolgreich war.

#### **2.6.3.2 Box Plot Analyse**

Die Box Plot Analyse verschafft einen ersten vergleichenden Überblick über die Expressionsdaten aller Experimente einer Versuchsreihe. Die sogenannte „*box*“ umfasst 50% der Daten eines Experiments. Die Streuung der Daten in einem Experiment wird durch die Position der oberen und unteren Fehlerbalken angezeigt. Daten, die sich ausserhalb der Fehlerbalken befinden, werden als Ausreißer erkannt. Durch die parallele Darstellung aller Experimente nebeneinander, können somit Experimente identifiziert und von weiteren Analysen ausgeschlossen werden,

die einen hohen Anteil an Ausreißern aufweisen und somit nicht einer normalen Datenverteilung folgen.

### 2.6.3.3 Hauptkomponentenanalyse

Die Hauptkomponentenanalyse (*principal components analysis* oder *PCA*) ist ein Strukturen-entdeckendes multivariantes Analyseverfahren, das zur Analyse von Datensätzen geeignet ist, bei denen der Anwender zu Beginn der Analyse noch keine Vorstellungen über die Beziehungszusammenhänge in dem Datensatz besitzt. Das Ziel der Hauptkomponentenanalyse besteht darin, eine Menge an Mustern im hochdimensionalen Raum durch Berechnung von wenigen „synthetischen Variablen“ (sogenannten „Eigengenen“) auf eine geringere Anzahl von Dimensionen zu reduzieren. Hierbei werden die synthetischen Variablen so gewählt, dass sie die Unterschiede zwischen den Daten möglichst deutlich darstellen, ohne die Beziehungen der Daten zueinander zu verändern. In der Regel werden drei synthetische Variablen berechnet, entsprechend den Achsen im dreidimensionalen Raum. Diesen „Komponenten“ werden die Daten eines Datensatzes entsprechend ihrer Ähnlichkeit zu den synthetischen Variablen im dreidimensionalen Raum angeordnet. Durch diese Visualisierungsmethode können somit Experimente, in denen die Expressionsprofile der Gene eine hohe Ähnlichkeit aufweisen, sowie „Ausreißerexperimente“ schnell erkannt werden [Mertens, 2003].

### 2.6.3.4 Cluster-Analysen

*Cluster-Analysen* dienen in erster Linie der Strukturierung eines beliebigen Datensets. Man unterscheidet zwei verschiedene Ansätze: die Partitionierung und die hierarchische Einteilung.

Bei der Partitionierung werden die jeweiligen Daten aufgrund ihrer Distanz zueinander bewertet und entsprechend ihrer Ähnlichkeit zueinander in gemeinsame oder getrennte Gruppen, sogenannte "*cluster*" eingeteilt. Ein Beispiel für eine partitionierende, nicht-hierarchische *cluster*-Methode ist der "*k-means*"-Algorithmus.

#### 2.6.3.5 *K-means-Algorithmus*

Der "*k-means*"-Algorithmus [Hartigan, 1975; Hartigan und Wong, 1979] ist ein nicht-hierarchisches *clustering*-Verfahren, mit dem Datenpunkte oder Profile entsprechend ihrer Distanz zueinander in verschiedene *cluster* eingeteilt werden. In den *k-means*-Analysen dieser Arbeit wird für die Bestimmung der Distanz normalerweise der euklidische Abstand verwendet.

Es handelt sich hier um ein iteratives Verfahren, bei dem, angewandt auf Genexpressionsanalysen, zunächst aus den vorhandenen Daten *k* verschiedene, sogenannte zentrale Expressionsprofile willkürlich ausgewählt werden. Die Profile jedes einzelnen Gens werden nun demjenigen zentralen Profil zugeordnet, das ihm am ähnlichsten ist. Die zentralen Profile werden anschliessend unter Berücksichtigung der Profile aller Gene in ihrem *cluster* neu berechnet. Sollte nach dieser Neuberechnung das Expressionsprofil eines Gens einem zentralen Profil eines anderen *clusters* ähnlicher sein, werden die Expressionsprofile neu zugeordnet. Dieses Vorgehen wird so lange wiederholt, bis es nach einer Neuberechnung der zentralen Profile zu keiner Änderung der *cluster*-Zuordnungen mehr kommt.

Aufgrund der ständigen Wiederholung der Berechnungsschritte, kann dieses Verfahren sehr zeitaufwendig sein.

#### 2.6.3.6 *Hierarchisches clustering*

Eine *cluster*-Analyse, die auf dem hierarchischen Prinzip beruht, führt dagegen zu unterschiedlich vielen *clustern* auf unterschiedlichen Hierarchieebenen. Die *cluster*-Einteilung kann nach dem "*top-down*"-Prinzip erfolgen, das mit einem *cluster* beginnt und dieses sukzessive in Untergruppen unterteilt oder nach dem "*bottom-up*"-Prinzip, wobei mit *n* *clustern* begonnen wird, die sukzessive entsprechend ihrer Ähnlichkeit zusammengefasst werden.

### 2.6.3.7 *Self organizing map (SOM)*

Die SOM ist ein weitverbreitetes Instrument für die Analyse grosser Datenmengen und wurde von Kohonen (1990) etabliert. Sie ermöglicht eine Einteilung der Gene in den verschiedenen Experimenten in bestimmte Gruppen, entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile. Der Ähnlichkeitsgrad der Profile kann auf unterschiedliche Weise bestimmt werden. In den nachfolgend beschriebenen Ergebnissen wurde der normalisierte euklidische Abstand zwischen jedem Gen in den jeweils miteinander verglichenen Experimenten bestimmt. Verschiedene Gene werden nach dieser Methode in dieselbe Gruppe eingeteilt, wenn ihre Expressionswerte gleichzeitig um denselben Faktor ansteigen oder absinken. Die absoluten Expressionswerte spielen hierbei eine untergeordnete Rolle.

## 3 Ergebnisse

In diesem Kapitel werden ausschliesslich bearbeitete Daten dargestellt. Sämtliche Rohdaten sind auf Anfrage in elektronischer Form (CD-ROM oder DVD) bei der Autorin erhältlich.

### 3.1 Charakterisierung einer primären PT Zellkultur für die Durchführung von Genexpressionsstudien

Für die Durchführung von prädiktiven und / oder mechanistischen Genexpressionsanalysen ist eine ausführliche Charakterisierung des verwendeten Zellkulturmodells unumgänglich. Ein geeignetes primäres *in vitro* Modell muss verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Dazu gehören:

- Einfache und schnelle Gewinnung der Zellkultur
- Hohe Zellausbeute
- Hohe Reproduzierbarkeit
- Dauerhafte Beibehaltung charakteristischer Zellfunktionen
- Stabile Genexpression unter normalen Kulturbedingungen

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse zur Charakterisierung von primären proximalen Tubuluszellen hinsichtlich der Erfüllung dieser Kriterien vorgestellt.

#### 3.1.1 Zellzahl und Vitalität

Die Aussaat der PTC erfolgte an Tag 0 in einer Dichte von  $0.5 \times 10^5$  Zellen pro Well. Am fünften Kultivierungstag wurden die nicht-angehefteten Zellen abgewaschen. Die Zellzahl der adhäsiven Zellen wurde an Tag 5, 7, 10 und 12 bestimmt und zeigte einen deutlichen Anstieg bis zum zehnten Kultivierungstag (**Abb. 10**). Ab dem siebten Kultivierungstag bildete sich ein zusammenhängender Zellrasen. Erst ab dem zwölften Tag war eine Abnahme der Zellzahl zu beobachten.

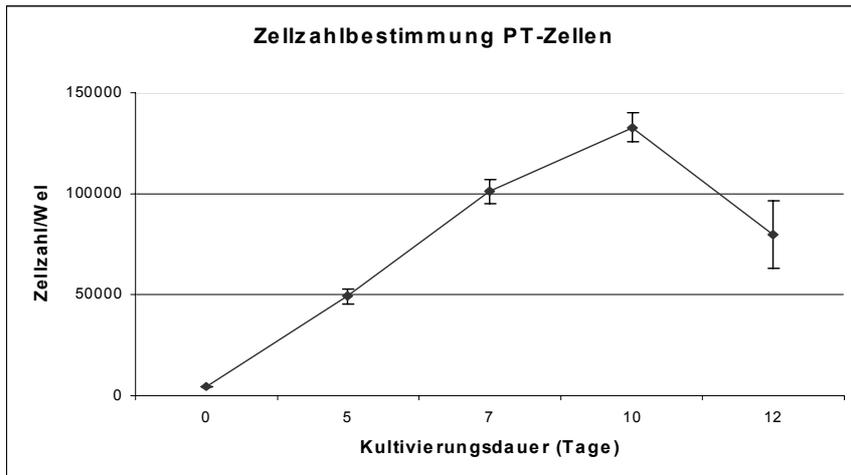


Abb. 10: PT-Zellzahl.

Darstellung der PT-Zellzahl in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken entsprechen der absoluten Standardabweichung.

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe des MTT-Assays durch Messung der Extinktion bei 570nm bestimmt. In Abhängigkeit von den mittleren Zellzahlen ergab sich die Vitalität der Zellen proportional zur gemessenen  $OD_{570}$ . Aus **Abb. 11** ist ersichtlich, dass die Vitalität der Zellen bezogen auf den fünften Kultivierungstag zunächst auf fast 200% zunahm und sich schliesslich ab Tag 10 auf einen Wert um 150% einpendelte.

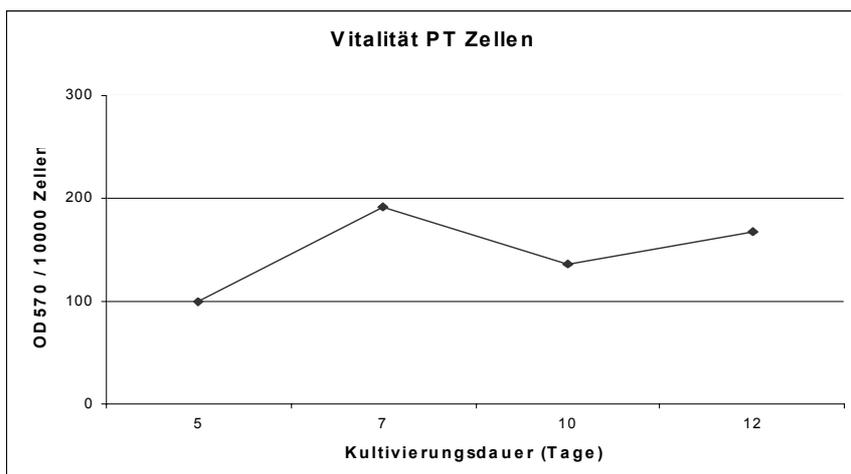


Abb. 11: Vitalität der PTC.

Darstellung der Vitalität der PTC als  $OD_{570}/10000$  Zellen prozentual bezogen auf Tag 5 in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

### 3.1.2 Färbungen

Mit Hilfe von Antikörperfärbungen sollten verschiedene Fragestellungen zur Charakterisierung der Zellkultur geklärt werden. Hierzu gehörte zunächst die eindeutige Identifizierung der Zellen als Kultur proximaler Tubuluszellen durch Anfärbung des Natrium-Protonen-Austauschers (Isoform NHE3) und des Adhäsionsproteins N-Cadherin mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Die Fluoreszenzaufnahmen in **Abb. 12** zeigen verschiedene Zeitpunkte der Kultivierung von PTC aus derselben Isolation, angefärbt mit Antikörpern gegen die NHE3 Isoform des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, sowie eine „Blue Stain-Färbung“ der entsprechenden Zellkerne. Die **Abb. 12a-d** lassen erkennen, dass die PTC an Tag 8 und Tag 10 eine dichte Monoschicht bildeten und an einigen Stellen sogar mehrschichtig wuchsen (Ausbildung sogenannter „Dome“). Der Protonenaustauscher konnte überall gut angefärbt werden, in den mehrschichtigen Bereichen ist sein Vorkommen besonders hoch. Auf den **Abb. 12e-h** ist ausserdem zu erkennen, dass es mit zunehmendem Alter (Tag 14 nach der Isolation) zu Veränderungen in der Kultur kam. Die vorher konfluente Zellschicht bekam „Risse“ und die Fluoreszenzfärbung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers wurde schwächer. Dies sind Hinweise auf eine Dedifferenzierung der Zellen und einen Verlust der typischen Zellfunktionen, was besonders auf den **Abb. 12g** und **12h** deutlich wird. Hier wird ein Ausschnitt der Kultur dargestellt, der bei lichtmikroskopischer Betrachtung fibroblastisch erschien, und erwartungsgemäss konnte der Protonenaustauscher nur noch in den vielzelligeren Bereichen der Dome nachgewiesen werden.

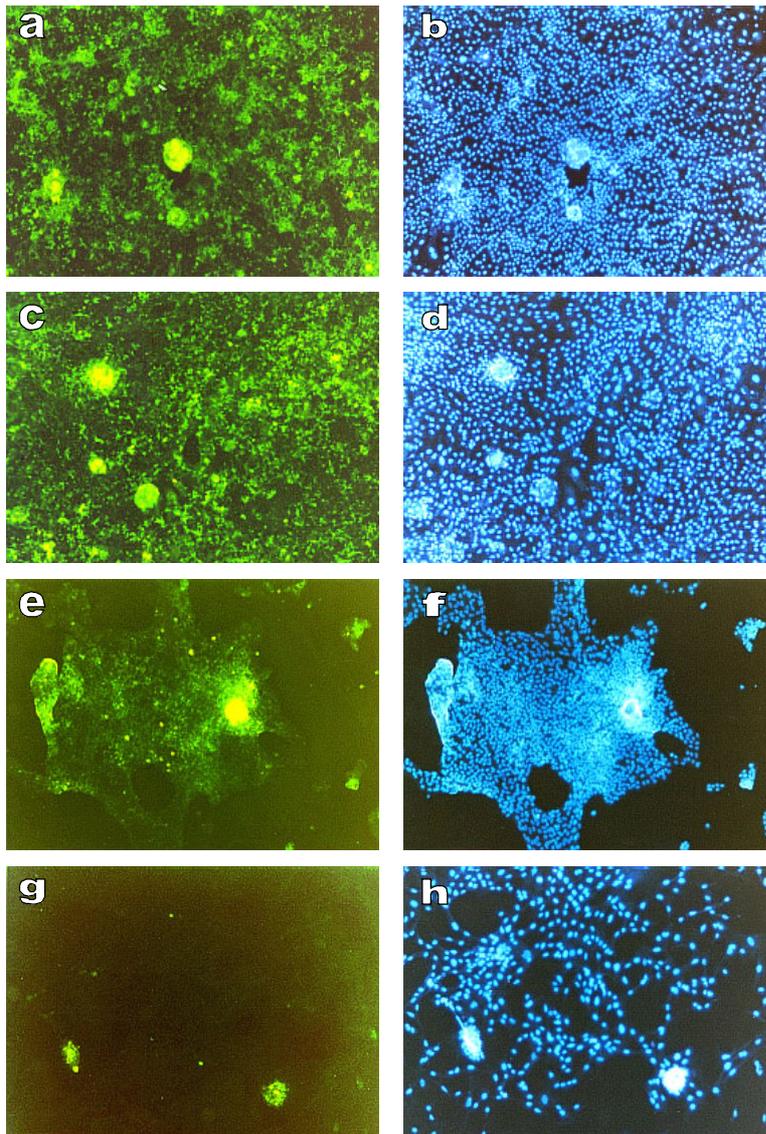


Abb. 12: Antikörperfärbung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und *Blue Stain* der Zellkerne.

Vergrößerung 100fach. Linkes Bild: Antikörperfärbung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, Detektion mit AlexaFluor 488; Rechtes Bild: *Blue Stain*-Färbung der Zellkerne, gleicher Bildausschnitt; **a, b**: acht Tage in Kultur; **c, d**: zehn Tage in Kultur; **e-h**: vierzehn Tage in Kultur

Die Anfärbung des Adhäsionsproteins N-Cadherin in der Zellkultur lieferte eine weitere Bestätigung der Identität. In **Abb. 13** ist eine deutliche Anfärbung von N-Cadherin an den Verbindungsstellen zwischen den Zellen zu erkennen. **Abb. 14** zeigt, dass eine analoge Anfärbung von E-Cadherin dagegen nicht möglich war.

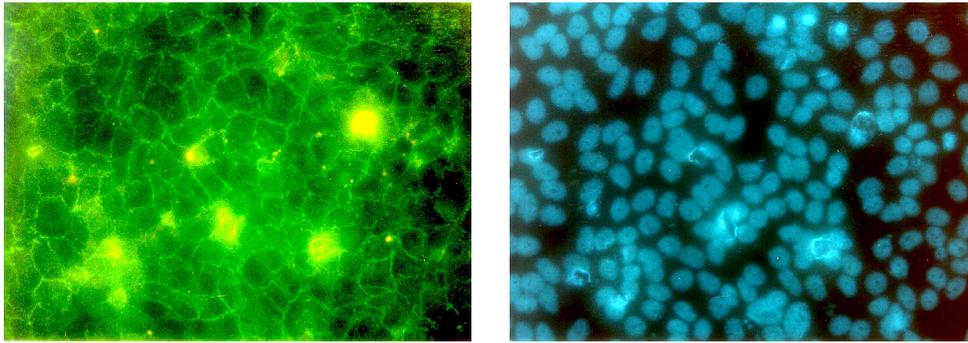


Abb. 13: Antikörperfärbung von N-Cadherin.  
Vergrößerung 400fach. Detektion: Alexa Fluor 488. Links: Färbung von N-Cadherin, Rechts: *Blue Stain* der Zellkerne.

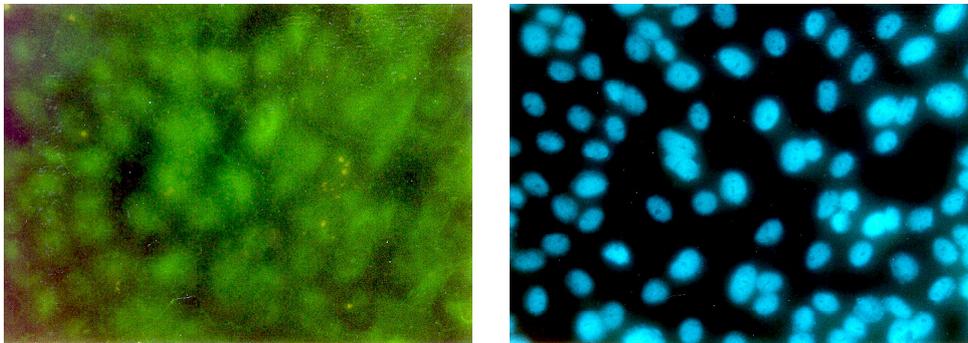


Abb. 14: Antikörperfärbung von E-Cadherin.  
Vergrößerung 400fach. Detektion: Alexa Fluor 488. Links: Färbung von N-Cadherin, Rechts: *Blue Stain* der Zellkerne.

Für Aussagen über die Erhaltung der charakteristischen Funktionen von proximalen Tubuluszellen wurden Bereiche, die eine hohe Aktivität des Markerenzym alkalische Phosphatase (AP) aufweisen, angefärbt. In **Abb. 15** wurden Gebiete mit hoher AP-Aktivität rötlich angefärbt. Es ist zu erkennen, dass die AP-Aktivität besonders in Bereichen erhöht ist, in denen mehrere Zellen ein tubulusartiges Lumen ausbildeten. Weiterhin ist die kopfsteinpflasterartige Morphologie der Zellen gut sichtbar.



Abb. 15: Färbung der alkalischen Phosphatase.

Vergrößerung links 320fach, rechts 400fach. Bereiche mit Phosphatase Aktivität erscheinen als rötliche Granula. Gegenfärbung der Zellkerne mit Haematoxylin.

### **3.1.3 Genexpression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Ratten-PTC)**

Um die Veränderungen der Genexpression in der Zellkultur nach der Behandlung mit Nephrotoxinen untersuchen zu können, muss zunächst sichergestellt werden, dass im Versuchszeitraum möglichst keine alterungsbedingten transkriptionellen Änderungen in der Zellkultur auftreten. Zu diesem Zweck wurden die Zellen einer unbehandelten PTC-Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet, Gesamt-RNA wurde isoliert und die jeweilige Genexpression mit Hilfe von cDNA Mikroarrays (*Rat CT 700*, Phase-1) mit der Expression am siebten Kultivierungstag verglichen. Gene, die einen Induktionsfaktor von mehr als +2 oder –2 aufwiesen, wurden als signifikant differenziell reguliert angesehen [Grills et al., 2001].

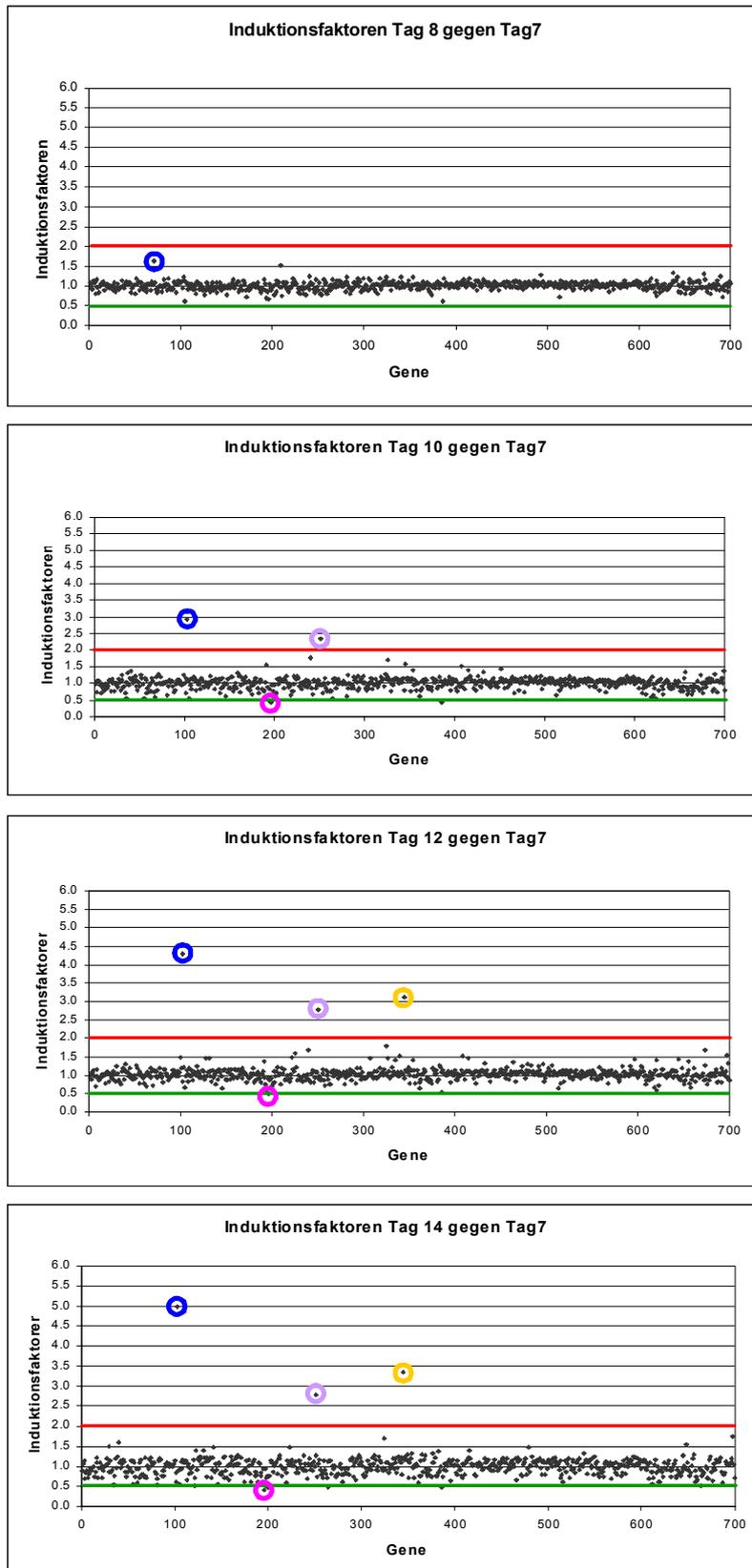


Abb. 16: Darstellung der Induktionsfaktoren von 700 Ratten-Genen mit zunehmender Kultivierungsdauer in Abhängigkeit von Tag 7. Datenpunkte repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Rote Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor +2. Grüne Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor -2. **Blau:** Collagen I alpha 2. **Pink:** Glutathion-S-Transferase Pi. **Violett:** Lysyloxidase. **Gelb:** EST 120.

In **Abb. 16** ist zu erkennen, dass die Zahl der transkriptionellen Veränderungen von Tag 8 bis Tag 14 stetig zunimmt. Insgesamt waren es neun Gene, deren Expression in einer unbehandelten Zellkultur mit der Zeit als signifikant verändert erschien. Diese

sogenannten „Zellkultur-Alterungsgene“ sind zusammen mit ihren Induktionsfaktoren in **Tab. 1** aufgelistet.

GenBank Acc.No.	Genbezeichnung	MW	MW	MW	MW
		Tag8	Tag10	Tag12	Tag14
AF121217	Collagen type I alpha 2	1.20 (± 0.15)	2.92 (± 1.73)	4.28 (± 2.00)	5.00 (± 2.20)
X02904	GST P1	0.67 (± 0.19)	0.42 (± 0.16)	0.50 (± 0.29)	0.41 (± 0.22)
M17701	GAPDH	0.98 (± 0.22)	0.59 (± 0.07)	0.69 (± 0.19)	0.47 (± 0.19)
D30035	Heme binding protein 23	1.00 (± 0.24)	0.65 (± 0.14)	0.76 (± 0.21)	0.48 (± 0.18)
U11038	Lysyl oxidase	1.07 (± 0.10)	2.35 (± 0.69)	2.79 (± 1.21)	2.79 ± (0.82)
J00750	Metallothionein 1	0.87 (± 0.21)	0.53 (± 0.26)	0.73 (± 0.39)	0.48 (± 0.30)
unbekannt	EST 120	0.99 (± 0.13)	1.60 (± 0.13)	3.12 (± 1.35)	3.34 (± 1.16)
unbekannt	EST 158	0.60 (± 0.20)	0.42 (± 0.10)	0.52 (± 0.27)	0.49 (± 0.22)
M19533	T-cell cyclophilin	1.10 (± 0.21)	0.67 (± 0.10)	0.83 (± 0.28)	0.50 (± 0.21)
Anzahl der Gene mit FC > +/-2		0	4	4	9

Tab. 1: Induktionsfaktoren von „Zellkultur-Alterungsgenen“.

Die Induktionsfaktoren repräsentieren Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen. Absolute Standardabweichungen sind in Klammern angegeben. Rot: hochregulierte Gene. Grün: runterregulierte Gene.

### 3.1.4 Genexpression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer (Human-PTC)

Die Untersuchung der Genexpression in humanen PTC in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer wird in **Abb. 17** dargestellt. Am achten und zehnten Tag erschien jeweils nur ein Gen im Vergleich zu Tag 7 differenziell reguliert. Der zwölfte Kultivierungstag wies allerdings schon sieben transkriptionelle Veränderungen auf. Diese Gene sind in **Tab. 2** zusammengefasst. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass aufgrund der limitierten Verfügbarkeit im Fall der humanen PTC keine Replikationen der Experimente durchgeführt werden konnten und deshalb die Aussagekraft dieser Ergebnisse eingeschränkt ist.

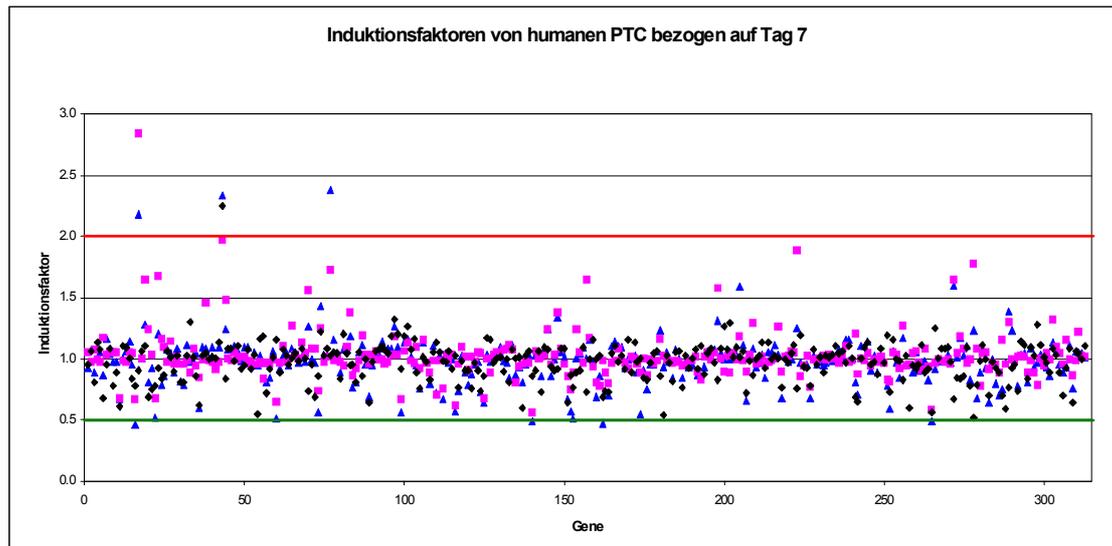


Abb. 17: Darstellung der Induktionsfaktoren von 313 Human-Genen mit zunehmender Kultivierungsdauer in Abhängigkeit von Tag 7.

Rote Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor +2. Grüne Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor -2. Schwarz = Tag 8 gegen Tag 7, Pink = Tag 10 gegen Tag 7, Blau = Tag 12 gegen Tag 7

GenBank Acc.No.	Genname	Tag 8	Tag 10	Tag 12
XM_064999	Aldose reductase	0.78	0.68	0.46
K01396	Alpha 1-antitrypsin	0.91	2.84	2.18
U14680	BRCA1	2.25	1.97	2.34
M64722	Clusterin	1.03	1.73	2.38
M64082	Flavin containing monooxygenase 1	0.86	0.56	0.49
L12723	Heat shock protein 70	0.69	0.99	0.48
AF136175	RNA-dependent helicase	0.56	0.58	0.50

Tab. 2: Induktionsfaktoren von „Zellkultur-Alterungsgenen“ in humaner PTC Kultur.

Induktionsfaktoren bezogen auf den siebten Kultivierungstag. Rot: hochregulierte Gene. Grün: runterregulierte Gene.

### 3.1.5 Genexpression in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer: Echt-Zeit-PCR (Taqman<sup>®</sup> PCR)

Zur Bestätigung ausgesuchter Ergebnisse der vorangegangenen Versuche wurde die quantitative Echt-Zeit-PCR als unabhängige Methode eingesetzt. Zum einen wurde die Expression von Genen überprüft, die sogenannte „Markergene“ für die Identität und Funktion von proximalen Tubuluszellen darstellen. Anschliessend wurde die Expression der Zellkultur-Alterungsgene verifiziert.

### 3.1.5.1 Expression von „PTC-Markergenen“

Zur Bestätigung der Identität und Funktion der proximalen Tubuluszellen wurde die Expression der „PTC-Markergene“ N-Cadherin, alkalische Phosphatase (AP),  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase (GGT) und Natrium-Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1) über die Dauer der Kultivierung der PTC mit Hilfe der Echt-Zeit-PCR untersucht. In **Abb. 18** wurden die Induktionsfaktoren dieser Markergene in Abhängigkeit vom fünften Kultivierungstag dargestellt. Der Vergleich mit dem Tag der Zellisolation erschien nicht sinnvoll, da verschiedene Umstände zu einer Verfälschung der Expressionsdaten führen können. Zum einen sind die Zellen während der Isolation erhöhtem Stress ausgesetzt, was einen grossen Einfluss auf ihre Genexpression haben kann. Ausserdem wird an Tag 0 die Expression der Marker in toten oder beschädigten Zellen miterfasst, die nach dem Waschen an Tag 5 nicht mehr vorhanden sind.

Die Menge an N-Cadherin-Transkript nimmt mit dem Alter der Zellkultur leicht zu. Die Expression der AP und des SGLT1 bleibt für die gesamte Dauer der Kultivierung nahezu konstant. Die GGT-Expression nimmt dagegen von Tag 5 nach Tag 7 um das ca. 6fache zu, bleibt dann aber bis Tag 12 unverändert.

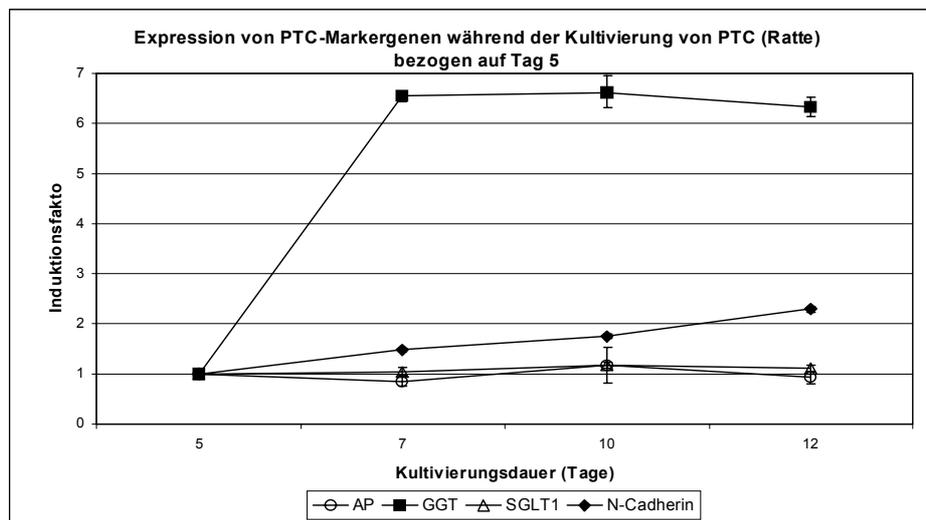


Abb. 18: Expression von „PTC-Markergenen“ in Abhängigkeit von Tag 5.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen, normalisiert gegen die jeweilige Expression von 18S RNA. Die absolute Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

### 3.1.5.2 Expression von „Zellkultur-Alterungsgenen“

Die Mikroarray-basierten Genexpressionsanalysen von unbehandelten PTC Kulturen über die Dauer der Kultivierung wiesen auf verschiedene Gene hin, die mit zunehmendem Alter einer PTC Kultur transkriptionelle Veränderungen erfahren. Zur Bestätigung dieser Hinweise wurde die Expression von zweien dieser „Alterungsgene“, Collagen I alpha 2 und Lysyloxidase, mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR nachgeprüft. In **Abb. 19** sind die Induktionsfaktoren der beiden Gene während der Kultivierung der PTC in Abhängigkeit von Tag 5 dargestellt. Beide Gene erfuhren mit zunehmendem Alter der Kultur eine starke Induktion ihrer Expression.

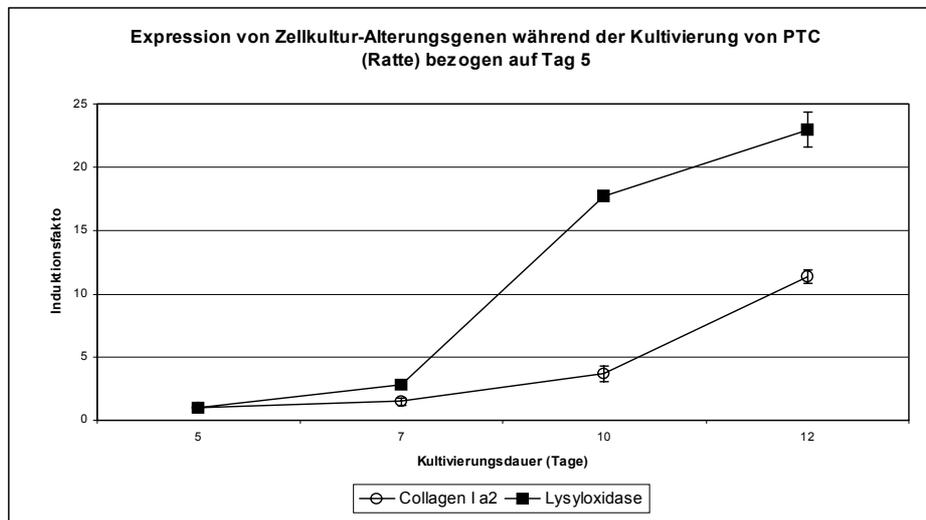


Abb. 19: Expression von „Alterungsgenen“ in Abhängigkeit von Tag 5.

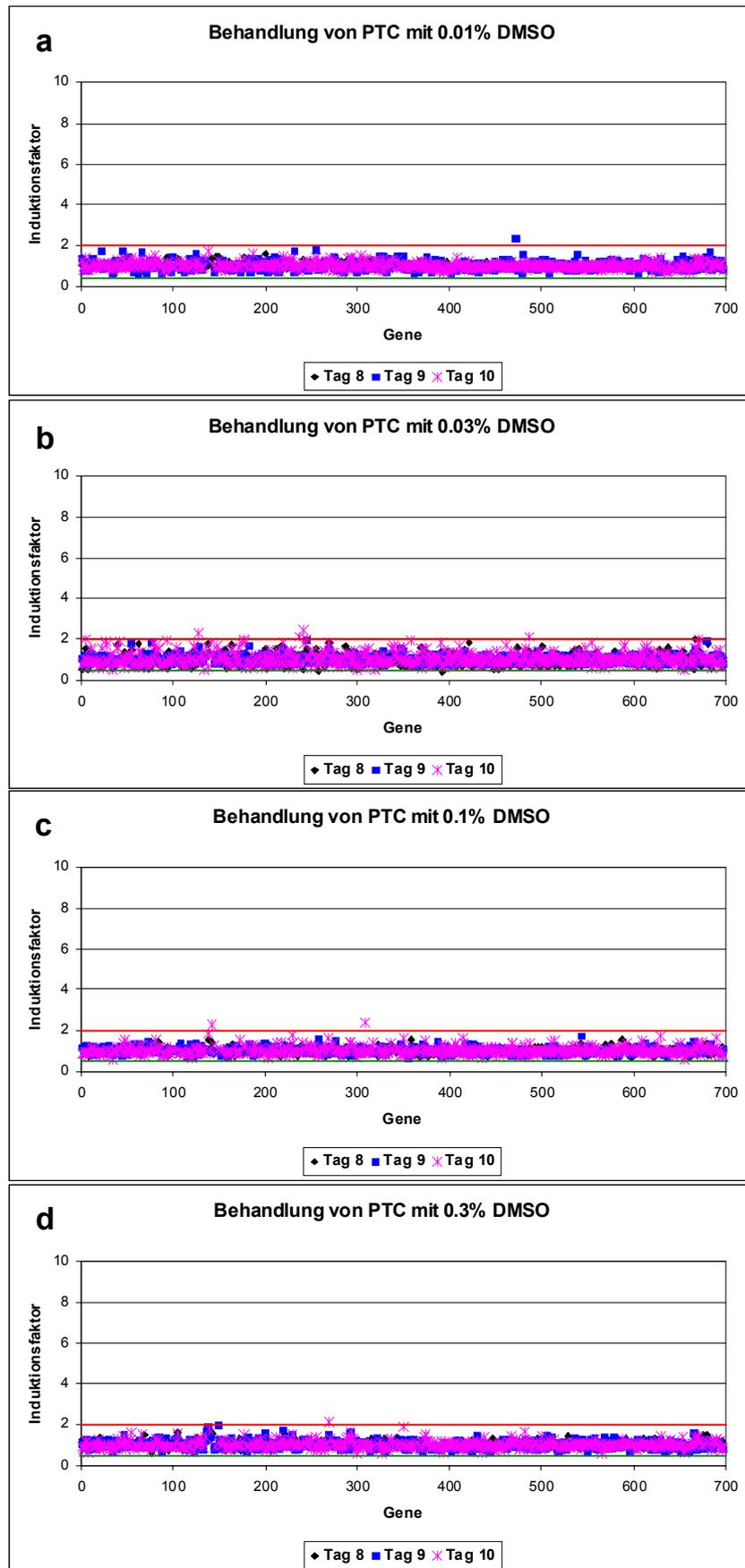
Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen, normalisiert gegen die jeweilige Expression von 18S RNA. Die absolute Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Aufgrund der Ergebnisse der Untersuchungen zur Charakterisierung der PTC Kultur wurde für die Nephrotoxizitätsexperimente ein optimaler Behandlungszeitraum der Zellen von Tag 7 bis Tag 10 definiert. In diesem Zeitraum wiesen die PTC die typische Morphologie proximaler Tubuluszellen auf, sie waren weiterhin in der Lage typische PTC Funktionen auszuüben und die alterungsbedingten Veränderungen der Genexpression waren noch im Anfangsstadium, so dass beobachtete Veränderungen der Genexpression während dieses Zeitraums praktisch ausschliesslich auf die Toxin-Einwirkung zurückgeführt werden können.

Eine vergleichbar ausführliche Charakterisierung von humanen PTC war leider aufgrund des limitierten Zugangs zu Ausgangsmaterial nicht möglich.

### 3.1.6 Einfluss von DMSO auf die Genexpression in PTC

Die Modellnephrotoxine wurden für die Behandlung der PTC zunächst in DMSO gelöst und schliesslich mit Kulturmedium auf die entsprechende Behandlungskonzentration verdünnt. Die Endkonzentration von DMSO in den eingesetzten Nephrotoxin-Kulturmedium-Verdünnungen überschritt in keinem Fall 0.1% (v/v). Im Folgenden wird untersucht, in welchen Konzentrationen das Lösungsmittel DMSO transkriptionelle Veränderungen in PTC hervorrufen kann. In **Abb. 20a-f** sind die Veränderungen in der Transkription nach ein-, zwei- und dreitägiger Behandlung von PTC mit verschiedenen Konzentrationen DMSO (v/v) dargestellt. Die Induktionsfaktoren ergaben sich hier als Quotienten aus der Genexpression DMSO-behandelter PTC und der Genexpression unbehandelter PTC des gleichen Alters („*time-matched control*“). Es ist ersichtlich, dass bis zu einer Konzentration von 0.3% DMSO praktisch keine Veränderungen auftraten. Bei einer DMSO-Konzentration von 1% waren erste Einflüsse auf die Genexpression der PTC erkennbar. Die Behandlung mit 3% DMSO führte in den PTC zu einer deutlichen Induktion bzw. Repression einer Vielzahl von Genen, die am dritten Behandlungstag (Tag 10) besonders hoch ausfiel. Die genaue Anzahl der zweifach regulierten Gene in den jeweiligen DMSO-Konzentrationen ist in **Abb. 21** dargestellt. Als Konsequenz aus diesen Versuchen wurde die maximale DMSO-Konzentration in den Nephrotoxin-Kulturmedium-Verdünnungen stets unter 0.1% (v/v) gehalten, so dass DMSO-bedingte Einflüsse auf die Transkription in den PTC ausgeschlossen werden konnten.



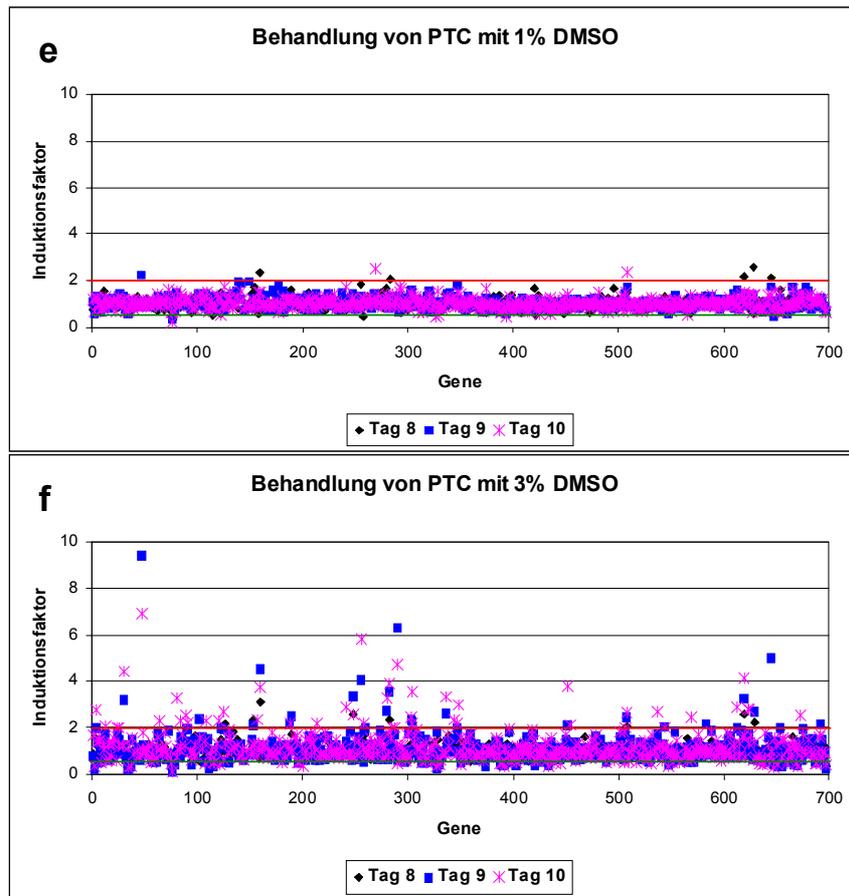


Abb. 20: Transkriptionelle Veränderungen in PTC nach DMSO-Behandlung. Dargestellt sind die Induktionsfaktoren von 699 Genen nach ein-, zwei- und dreitägiger DMSO-Behandlung bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle des jeweils gleichen Zeitpunktes. **a**: 0.01% DMSO; **b**: 0.03% DMSO; **c**: 0.1% DMSO; **d**: 0.3% DMSO; **e**: 1% DMSO; **f**: 3% DMSO. Rote Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor +2; Grüne Linie  $\hat{=}$  Induktionsfaktor -2.

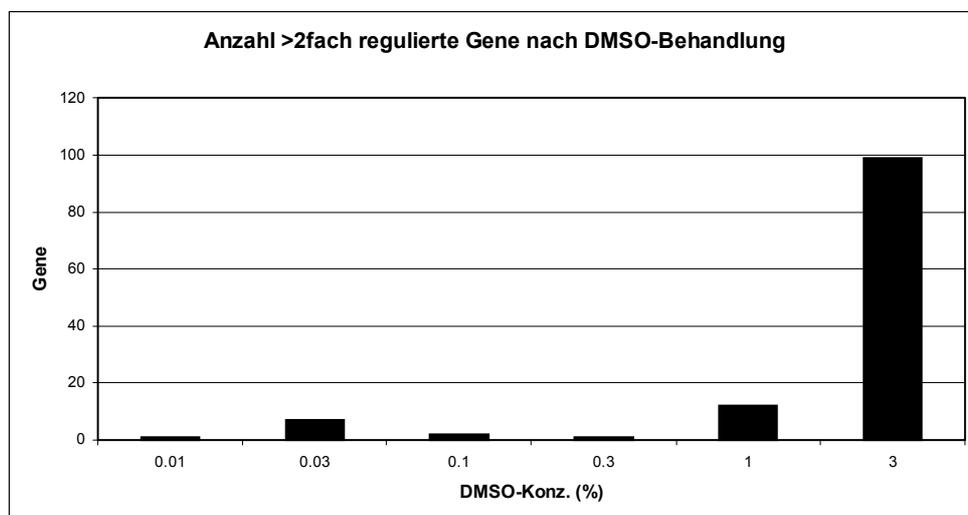


Abb. 21: Anzahl der signifikant differenziell regulierten Gene nach DMSO-Behandlung.

### 3.2 Experimente zur Dosisfindung für die Behandlung von PTC mit Nephrotoxinen

Die Veränderungen in der Genexpression in PTC nach Behandlung mit Nephrotoxinen können je nach eingesetzter Behandlungskonzentration stark variieren. Bei Einsatz der Modellsubstanzen in hochtoxischen Konzentrationen sind die Gen-Antworten in der Regel nicht mehr nachweisbar, da die transkriptionellen Abläufe in der Zelle zum Erliegen gekommen sind. Es muss also ein Konzentrationsbereich für jedes Nephrotoxin ermittelt werden, in dem bereits toxin-induzierte Veränderungen stattfinden, aber die Zellen noch ausreichend überlebensfähig sind. Ausserdem wird ein subtoxischer Bereich ermittelt, in dem äusserlich noch keine toxischen Wirkungen erkennbar sind, die Transkription aber unter Umständen schon beeinträchtigt sein könnte. Die subtoxischen bzw. toxischen Konzentrationen der Nephrotoxine werden durch die Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand (**Abb. 22 und 24**) und durch Bestimmung der Vitalität der PTC nach fünftägiger Behandlung ermittelt (**Abb. 23 und 25**). Der subtoxische Bereich wurde als die Konzentration des Nephrotoxins definiert, die gerade noch keine Veränderungen der LDH-Aktivität im Kulturüberstand hervorrief (LDH-Aktivität <150% der Kontrolle) und die Vitalität der PTC über einen Behandlungszeitraum von fünf Tagen kaum beeinträchtigte (>75% der Kontrolle). Als toxischer Bereich wurden diejenigen Konzentrationen der Nephrotoxine ausgewählt, bei denen eine maximale LDH-Aktivität nach zwei- bis viertägiger Behandlung nachgewiesen werden konnte und die Vitalität erst nach fünftägiger Behandlung unter 50% der Kontrolle sank.



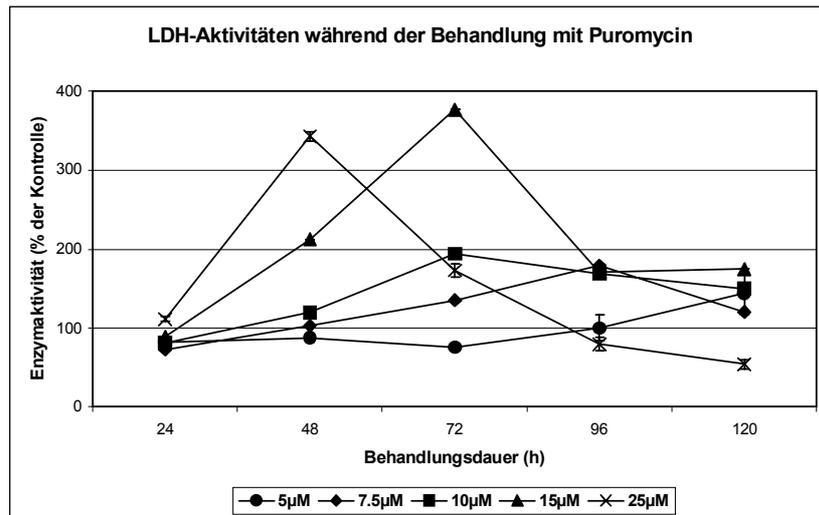
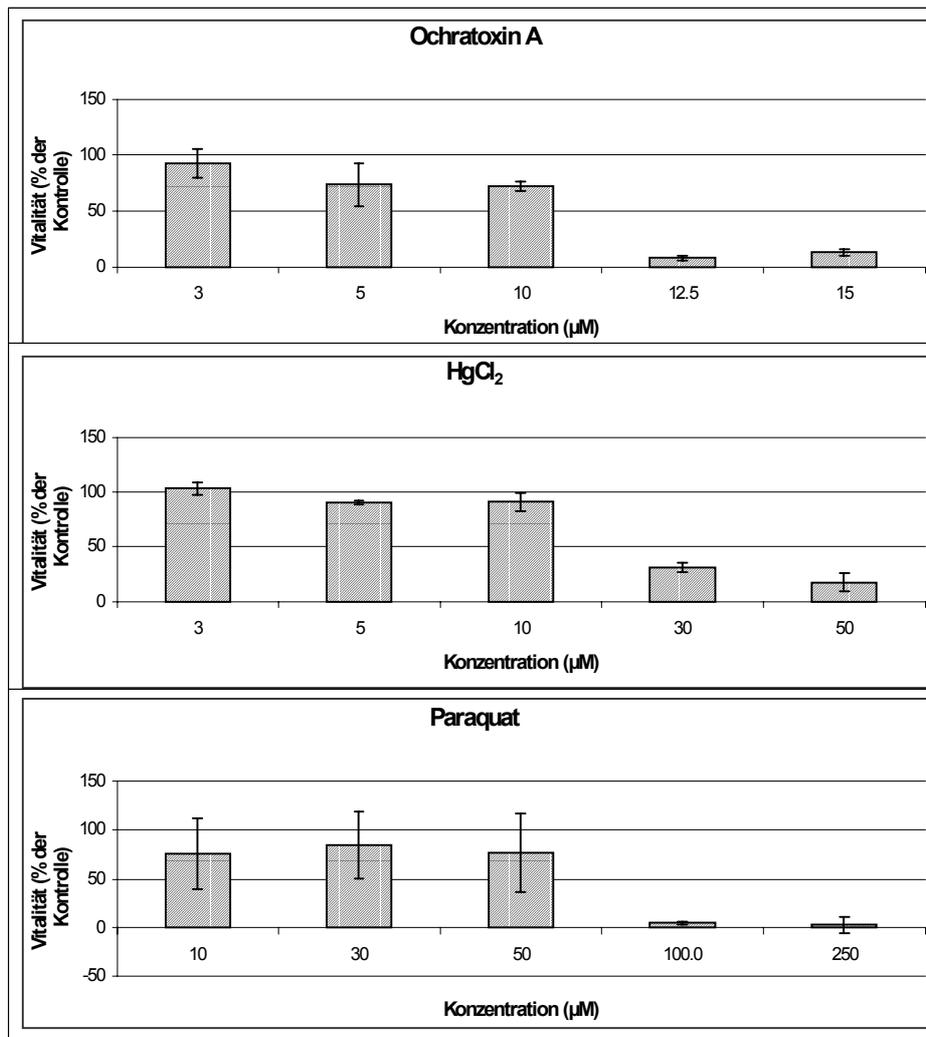


Abb. 22: Aktivität der LDH während der Behandlung von Ratten-PTC mit Nephrotoxinen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen, relative Standardabweichungen sind prozentual als Fehlerbalken dargestellt.



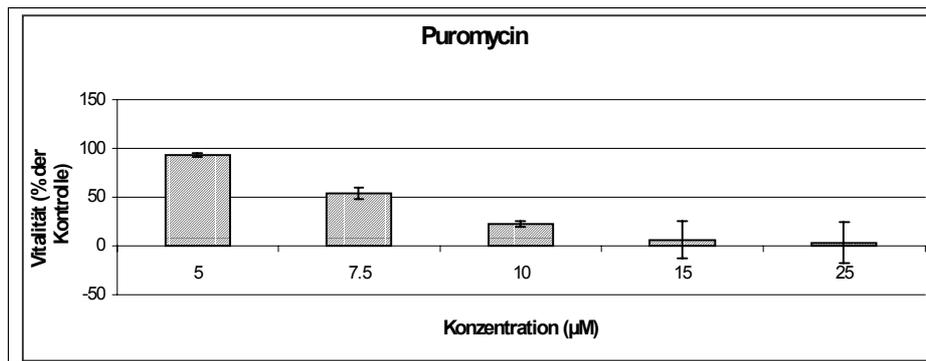
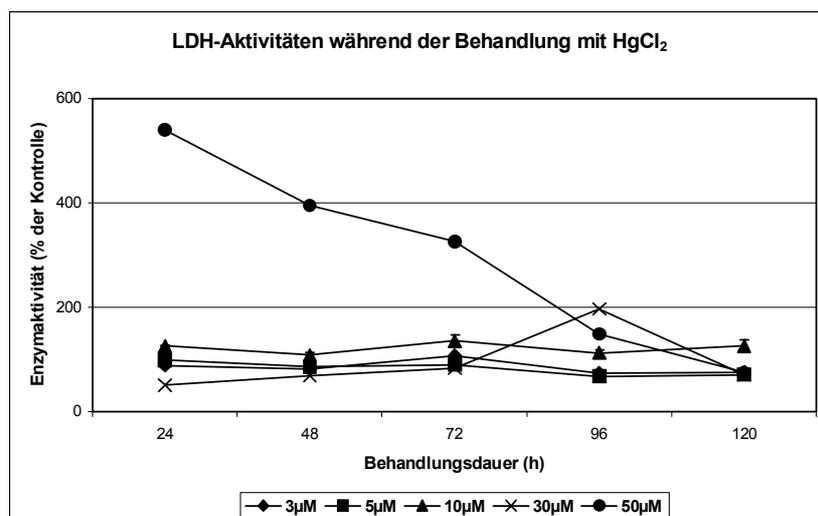
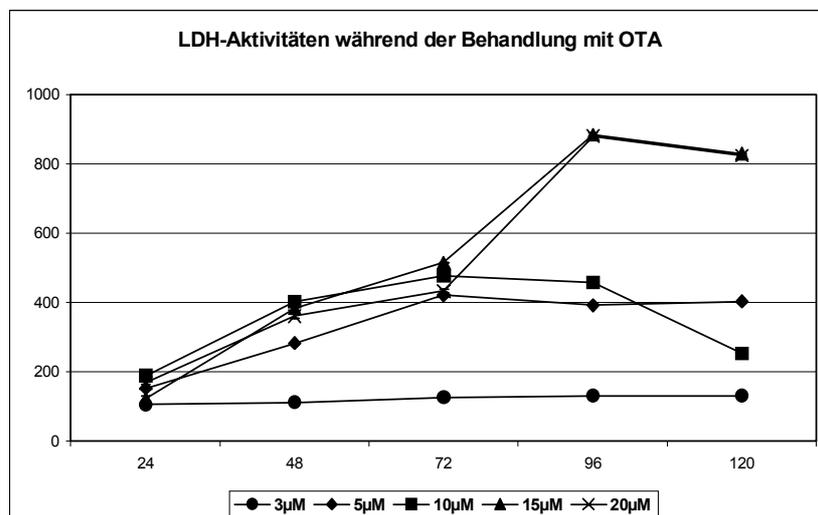


Abb. 23: Vitalität von Ratten-PTC nach fünftägiger Nephrotoxin-Behandlung. Darstellung von Mittelwerten aus mindestens drei Messungen, Fehlerbalken repräsentieren die relative Standardabweichung (%).



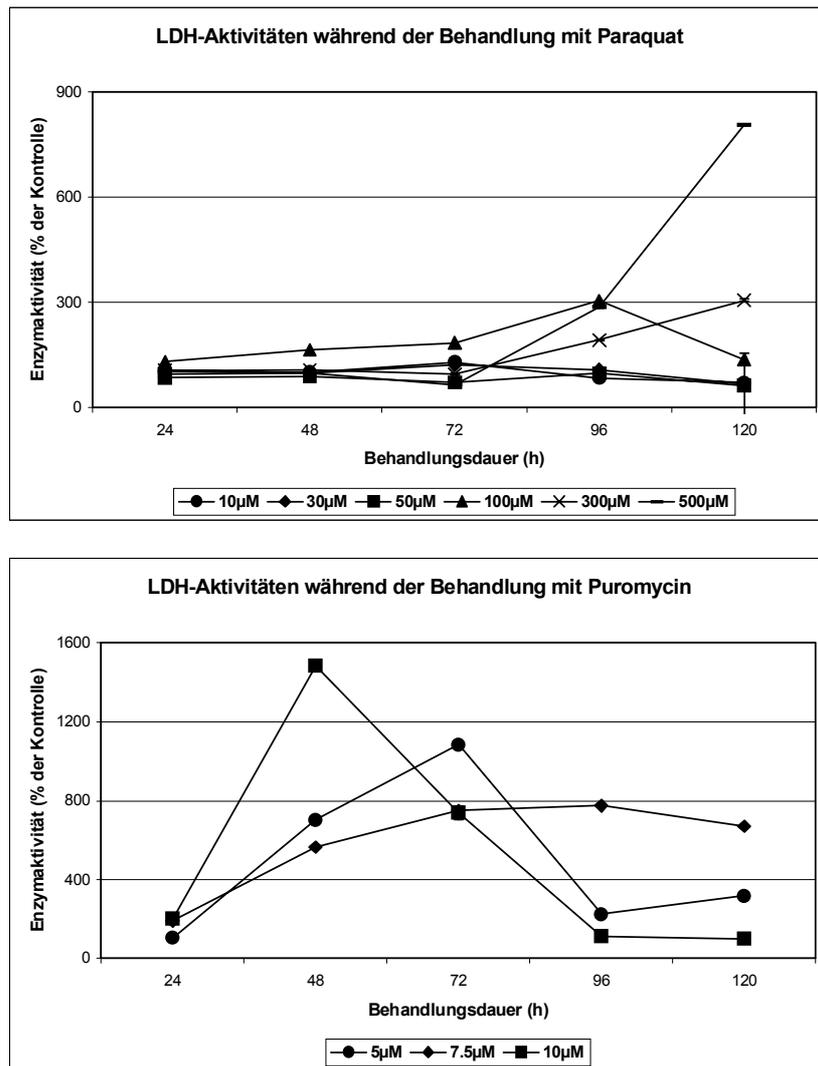


Abb. 24: Aktivität der LDH während der Behandlung von Human-PTC mit Nephrotoxinen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus drei Messungen, relative Standardabweichungen sind prozentual als Fehlerbalken dargestellt.

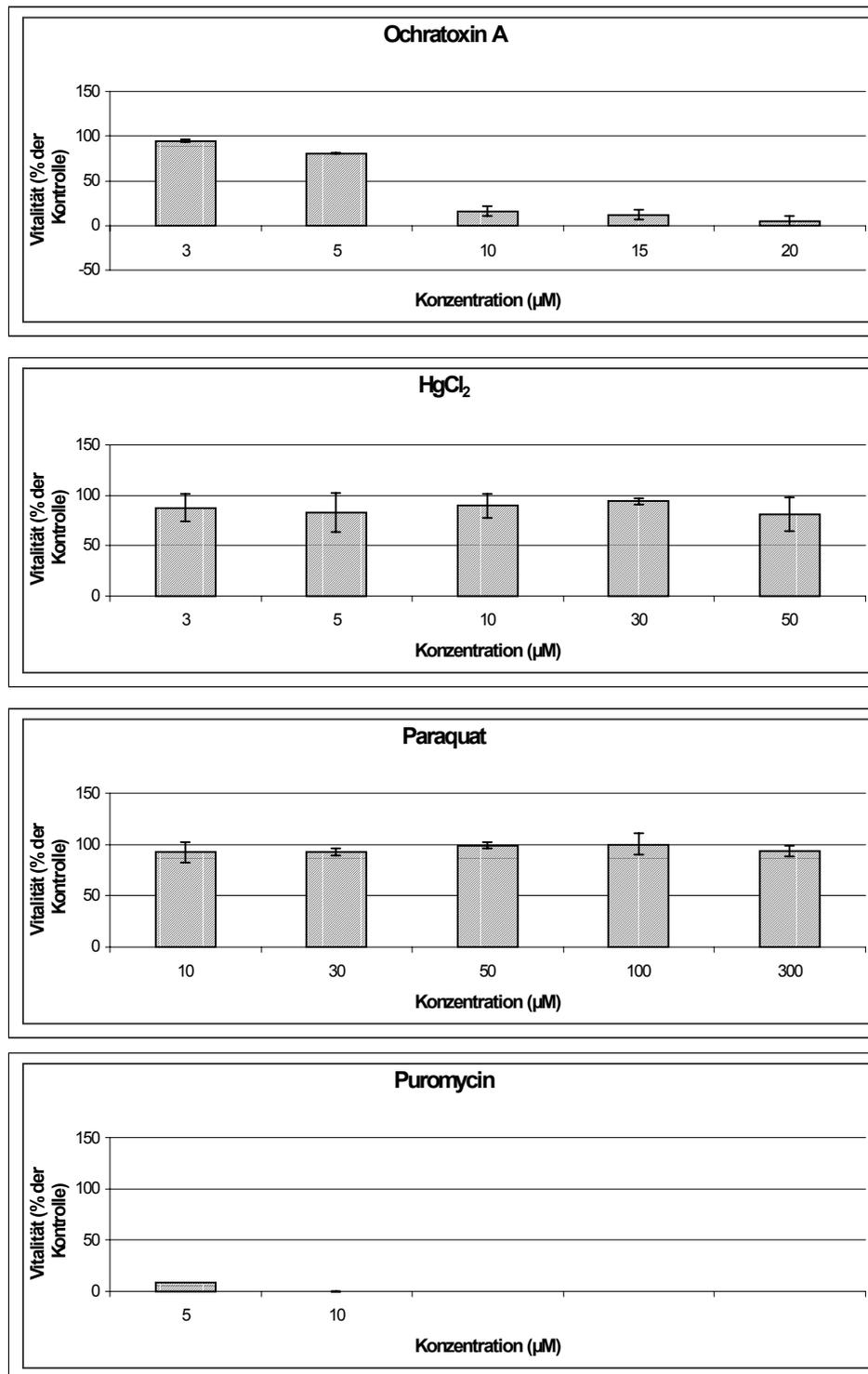


Abb. 25: Vitalität von Human-PTC nach fünftägiger Nephrotoxin-Behandlung.

Darstellung von Mittelwerten aus mindestens drei Messungen, Fehlerbalken repräsentieren die relative Standardabweichung (%).

**Tab. 3** fasst die aus den Dosisfindungs-Experimenten ermittelten subtoxischen und toxischen Konzentrationen der Nephrotoxine zusammen, die anschliessend in den Genexpressionsanalysen eingesetzt wurden.

		OTA	HgCl <sub>2</sub>	Paraquat	Puromycin
<b>Ratte</b>	subtoxisch	5µM	10µM	50µM	5µM
	toxisch	15µM	30µM	100µM	15µM
<b>Human</b>	subtoxisch	3µM	30µM	50µM	5µM
	toxisch	10µM	50µM	100µM (300µM)	10µM

Tab. 3: Subtoxische und toxische Nephrotoxin-Konzentrationen.

Aus den dargestellten Ergebnissen in **Tab. 3** ist zu erkennen, dass humane und Ratten-PTC unterschiedlich empfindlich auf die Behandlung mit den verschiedenen Nephrotoxinen reagierten. Humane PTC erwiesen sich gegenüber der Behandlung mit Ochratoxin A und Puromycin als wesentlich empfindlicher als PTC der Ratte, während die Sensibilität gegenüber HgCl<sub>2</sub> und Paraquat in humanen PTC dagegen deutlich niedriger war als in der Ratte.

### 3.3 Vergleich von direktem und indirektem Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung von cDNA

Bei der Verwendung der cDNA-Mikroarrays wurden behandelte Probe und Kontrolle mit zwei verschiedenen Fluorophoren markiert und anschliessend zusammen auf einen Array hybridisiert. Die Markierung der beiden cDNA Proben mit den Fluoreszenzfarbstoffen kann auf direkte und auf indirekte Weise erfolgen. Bei dem direkten Fluoreszenzmarkierungsverfahren wird ein bestimmter Anteil der dCTP-Moleküle gegen dCTP-Moleküle ausgetauscht, die mit den Fluorophoren Cy3 bzw. Cy5 markiert sind. Die markierten Nukleotide werden bei der reversen Transkription direkt in die cDNA eingebaut. Für die behandelte Probe wird in der Regel Cy3 (grüne Fluoreszenz) und für die Kontrolle Cy5 (rote Fluoreszenz) verwendet. Das direkte Markierungsverfahren hat den Vorteil, dass der Einbau der Fluorophore ohne Zwischenschritte stattfinden kann. Ausserdem sind die eingesetzten fluoreszenzmarkierten dCTP-Moleküle gegen physiko-chemische Einflüsse weitestgehend stabil. Als Nachteil wäre dagegen der oft ungleichmässige Einbau der Fluorophore zu nennen, was darauf zurückzuführen ist, dass die Cy3-dCTP bzw. Cy5-dCTP-Moleküle sehr gross sind und sich somit im cDNA-Strang sterisch behindern können. Weiterhin fällt die Reverse Transkriptase häufig beim Einbau der

grossen Farbstoffe von ihrer RNA-Matritze ab, was zur Folge hat, dass häufig sehr kurze cDNA-Stücke entstehen, die nicht bis zu ihrem 3'-Ende fertig synthetisiert worden sind.

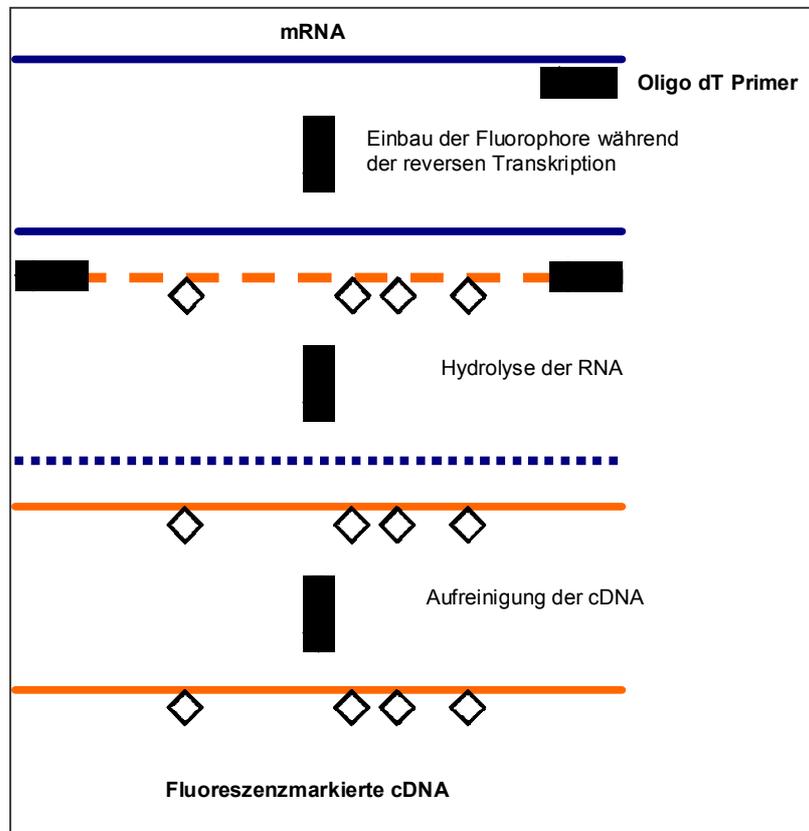


Abb. 26: Verfahren zum direkten Einbau von Fluorophoren in cDNA.

Im Gegensatz zum direkten Verfahren sind beim indirekten Verfahren die Fluorophore nicht direkt an die dNTP's angehängt, sondern es wird bei der reversen Transkription zunächst ein Nukleotid mit einer reaktiven Aminoallyl-Gruppe in die cDNA eingebaut. Die cDNA wird anschliessend mit monoreaktiven Fluorophor-N-hydroxysuccinimidylestern (Cy3-NHS bzw. Cy5-NHS) gekoppelt. Diese indirekte Methode hat den Vorteil, dass die reverse Transkriptase nicht die grossen Fluorophor-dCTP-Nukleotide in die cDNA einbauen muss, sondern die vergleichsweise kleinen Aminoallyl-Nukleotide. Dadurch wird gewährleistet, dass das Enzym nicht frühzeitig von der RNA-Matritze abfällt und vollständige cDNA-Moleküle synthetisiert werden. Ein weiterer Vorteil besteht darin, dass der Einbau der Aminoallyl-dUTP-Moleküle sowohl in der Kontrolle als auch in der behandelten Probe gleich verläuft und die spätere Bindung des Farbstoffes auf einer einfachen chemischen Reaktion beruht. Die Menge an eingebautem Farbstoff pro cDNA-Molekül ist dadurch in behandelter Probe und Kontrolle besser vergleichbar. Als

Nachteil wäre bei dieser Methode die geringe Stabilität der Fluorophor-NHS-Verbindungen zu nennen. Schon in Gegenwart geringster Feuchtigkeitsmengen findet eine Hydrolyse der Verbindungen statt, so dass Lagerung und Verarbeitung der Farbstoffe unter strengstem Feuchtigkeitsausschluss erfolgen müssen.

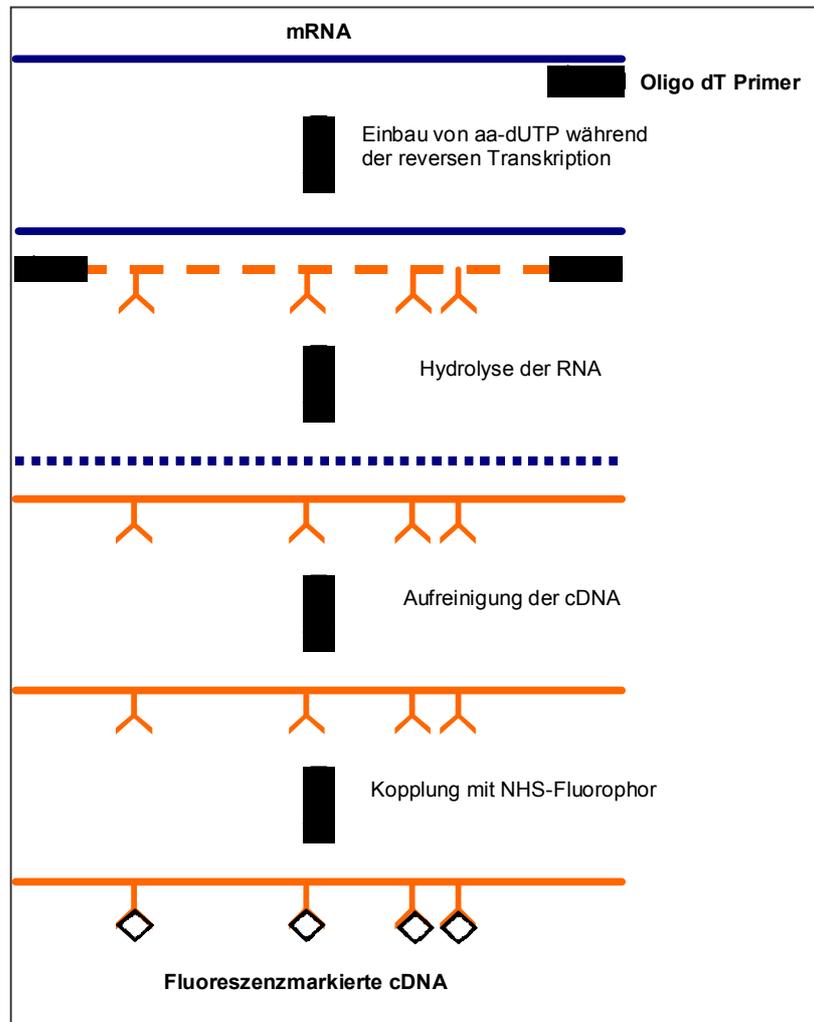


Abb. 27: Verfahren zum indirekten Einbau von Fluorophoren in cDNA.

Da beide Verfahren verschiedene Vor- und Nachteile haben, wird in einem experimentellen Vergleich das geeignetere Verfahren zur Fluoreszenz-Markierung von PTC-cDNA ermittelt. Gesamt-RNA aus einer unbehandelten PTC-Kultur wird auf vier Versuchsansätze verteilt. Zwei Ansätze werden nach dem direkten Verfahren und zwei Ansätze nach dem indirekten Verfahren jeweils mit Cy3 bzw. Cy5 markiert und anschliessend auf RAT 250 Arrays hybridisiert. Die Fluoreszenzintensitäten werden bei 532nm und 635nm gemessen und gegeneinander in einem sogenannten *Scatter-Plot* aufgetragen (**Abb. 28**). Hierbei wird jeweils der Mittelwert (*Mean*) der

Fluoreszenz in allen „*Pixels*“ eines Spots abzüglich ihres jeweiligen Hintergrundes verwendet, wobei Fluoreszenzintensitäten unter 10 aufgrund zu geringer Signifikanz nicht ausgewertet worden sind. Wenn Cy3 und Cy5 gleichmässig in die cDNA eingebaut worden sind, sollte im *Scatter Plot* eine Diagonale zu erkennen sein, da es sich bei den aufgetragenen Proben um identische cDNA's handelt.

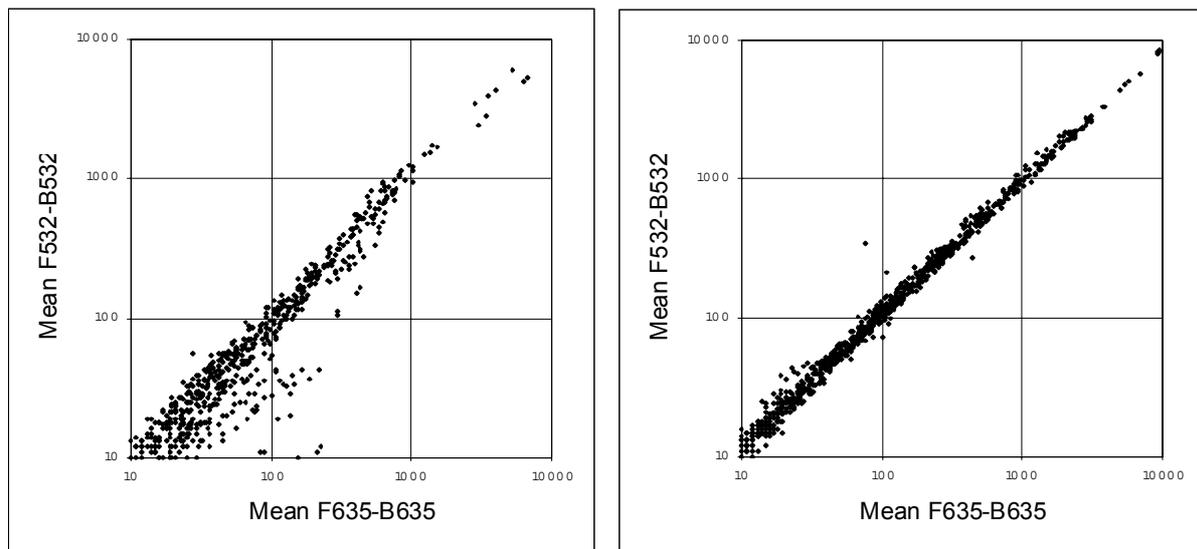


Abb. 28: Vergleich von direkter und indirekter Fluoreszenzmarkierung von cDNA.

Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (Hintergrund-subtrahiert) bei 532nm gegen die mittleren Fluoreszenzintensitäten bei 635nm in *Scatter Plots*. Links: direkter Einbau der Fluorophore. Rechts: indirekter Einbau der Fluorophore. Die Achsen der Diagramme sind logarithmisch skaliert.

**Abb. 28** zeigt, dass dies beim indirekten Verfahren der Fall ist. Bei der Anwendung des direkten Verfahrens ist dagegen eine Verschiebung der Fluoreszenzintensitäten zugunsten von Cy5 (635nm) zu erkennen. Insgesamt werden 80 Gene als signifikant differenziell reguliert angezeigt, dies entspricht einer „falsch-positiv“-Rate von 32%. Beim indirekten Verfahren erscheinen lediglich fünf Gene als signifikant verändert, entsprechend einer „falsch-positiv“-Rate von 2%. Aufgrund dieser Ergebnisse wird für sämtliche Experimente mit cDNA-Mikroarrays das indirekte Verfahren zur Fluoreszenzmarkierung der cDNA eingesetzt.

### 3.4 Genexpression *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit OTA

Die Genexpression nach OTA-Behandlung wurde mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays zum einen *in vivo* in männlichen Wistar-Ratten und zum anderen *in vitro* in Ratten-PTC und Human-PTC untersucht. Für die Analysen wurden aus den *in vivo* Studien Nieren-Proben von Ratten verwendet, die mit 1mg/kg OTA oder 10mg/kg OTA für jeweils 24Stunden (einmalige Applikation) bzw. 72Stunden (dreimalige Applikation) behandelt wurden, sowie die entsprechenden Kontrolltiere. Alle fünf Tiere einer Dosisgruppe wurden individuell zusammen mit einer gepoolten Probe aller vier Kontrolltiere des entsprechenden Zeitpunkts auf insgesamt 20 cDNA-Mikroarrays hybridisiert.

PTC der Ratte wurden mit 5 $\mu$ M bzw. 12.5 $\mu$ M OTA für 24Stunden und 72Stunden behandelt und anschliessend ebenfalls zusammen mit unbehandelten PTC desselben Alters auf cDNA-Mikroarrays hybridisiert. Diese Experimente wurden einmalig mit PTC-Kulturen aus unabhängigen Perfusionen wiederholt. Humane PTC wurden mit 3 $\mu$ M und 10 $\mu$ M OTA für ebenfalls 24 Stunden und 72 Stunden behandelt. Diese Experimente wurden einmalig durchgeführt.

Die Qualität der Hybridisierungen wurde im Anschluss an die individuelle Kontrolle der Arrays noch zusätzlich im Vergleich mit den anderen Arrays dieses Versuchs in einem sogenannten „*Box Plot*“ untersucht. Aufgrund der *Box Plot* Analyse der Ratten-Arrays wurden drei Proben von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen (**Abb. 29**).

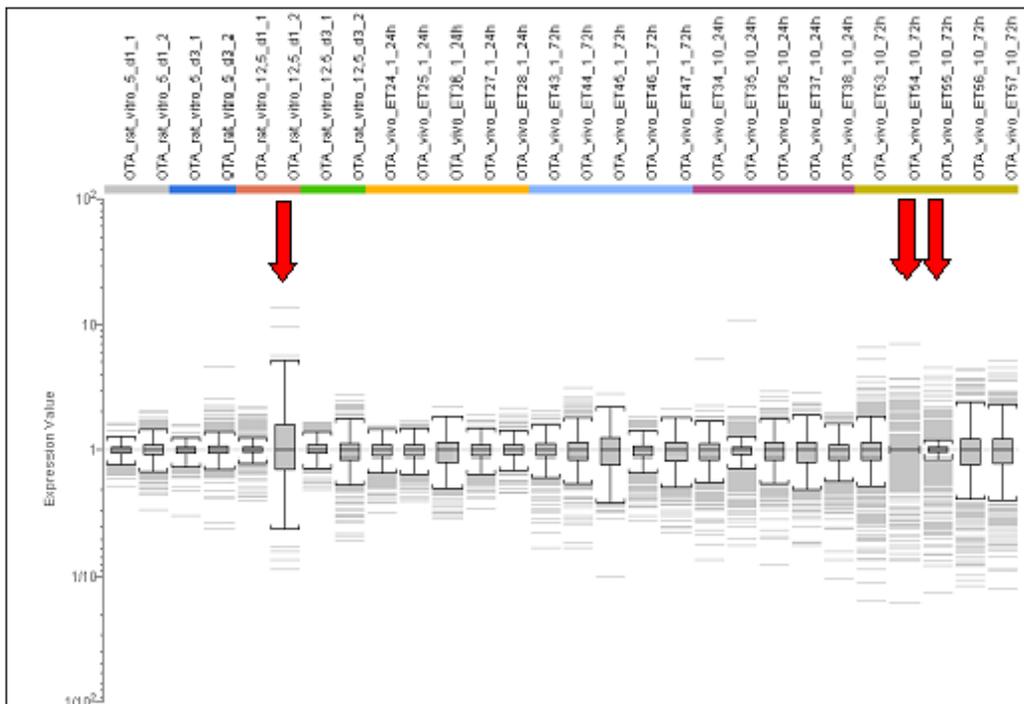


Abb. 29: *Box Plot* Analyse von allen Arrays mit OTA-behandelten Ratten-Proben.

Horizontal sind die Experimente, vertikal die Induktionsfaktoren aller Gene eines Experiments dargestellt. Die Arrays wurden individuell auf einen mittleren Induktionsfaktor von 1 normalisiert. Die graue *Box* markiert den Expressionsbereich in dem sich 50% der Gene des jeweiligen Arrays befinden. Die Klammern sind vom oberen bzw. unteren Boxenende jeweils 1.5 Boxenlängen entfernt. Die grauen Linien ausserhalb der Klammern stellen Ausreisser dar. Die roten Pfeile markieren Experimente, deren Expressionsdaten keine Normalverteilung aufwiesen und somit von den Analysen ausgeschlossen wurden.

### 3.4.1 Korrelation von Expressionsdaten *in vivo* und *in vitro* (Ratte)

Die Analyse der Expressionsdaten aus den *in vivo* und *in vitro* Experimenten mit Ratten-Proben lieferte insgesamt 254 Gene, deren Expression gegenüber der Kontrolle in mindestens einem der Versuche signifikant verändert war. Davon waren 89 Gene hoch- und 165 Gene runterreguliert.

Um die Korrelation zwischen *in vivo* und *in vitro* Daten zu überprüfen, wurde zunächst eine Hauptkomponentenanalyse (PCA) durchgeführt. In **Abb. 30** ist zu erkennen, dass die *in vivo* und *in vitro* Experimente in unterschiedlichen Arealen gruppiert wurden, somit also Gene vorhanden sein müssen, deren Expression durch OTA-Behandlung *in vivo* und *in vitro* unterschiedlich beeinflusst wurde.

Für die Identifizierung von Genen, deren Expression *in vivo* und *in vitro* gleichartig oder unterschiedlich reguliert wurde, sind beide Gruppen mit Hilfe eines T-Tests

( $p=0.001$ ) verglichen worden. Auf diese Weise konnten modellunabhängige und modellabhängige transkriptionelle Veränderungen nach Behandlung mit OTA unterschieden werden. Es wurden 215 (entsprechend 84.6% aller regulierten Gene) modellunabhängig regulierte Gene identifiziert, die im Folgenden als „gemeinsame Gene“ bezeichnet werden. Modellabhängig reguliert wurden dagegen 39 Gene (15.4% aller regulierten Gene), die künftig als „diskriminierende Gene“ bezeichnet werden. Aufgrund dieser Daten konnte eine relativ hohe Korrelation zwischen den *in vivo* und *in vitro* Experimenten angenommen werden.

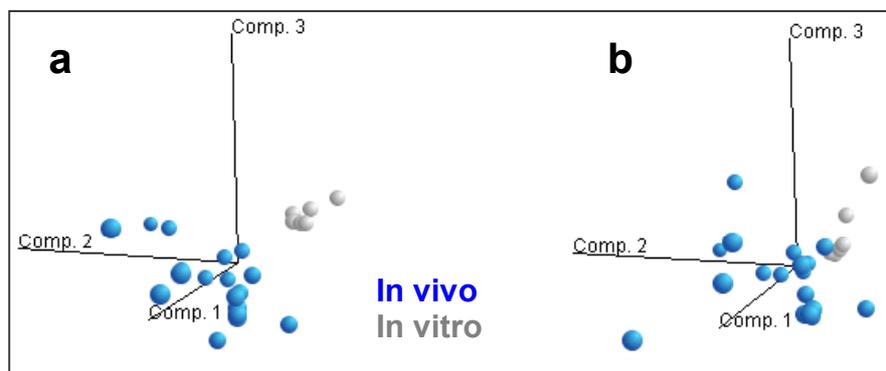


Abb. 30: PCA von OTA-behandelten *in vivo* und *in vitro* Experimenten (Ratte).

**a:** Dreidimensionale Anordnung der *in vivo* und *in vitro* Experimente bezogen auf die jeweilige Expression der 254 differenziell regulierten Gene. Es bilden sich zwei getrennte „Wolken“. **b:** Gleiche Analyse nach Ausschluss der diskriminierenden Gene. *In vivo* und *in vitro* Experimente ordnen sich in einer grossen Wolke an.

Die diskriminierenden Gene wurden mit Hilfe eines hierarchischen *clusterings* näher untersucht (**Abb. 31**). Es ist ersichtlich, dass die 39 Gene entsprechend ihren Expressionsprofilen *in vivo* und *in vitro* in drei verschiedenen Gruppen *clustern* (**Tab. 4**). In der ersten Gruppe fanden sich Gene, die *in vivo* hochreguliert waren, *in vitro* allerdings kaum Veränderungen aufwiesen. Die zweite Gruppe bestand aus *in vivo* nicht veränderten Genen, die *in vitro* allerdings runterreguliert waren. Gruppe 3 umfasste schliesslich *in vivo* runterregulierte Gene, die *in vitro* keine Veränderungen zeigten. Unterschiede zwischen OTA-induzierten Transkriptionsveränderungen *in vivo* und *in vitro* scheinen demnach nur bei Genen zu bestehen, die *in vitro* gegenüber der Kontrolle eine verminderte Expression aufwiesen oder gar nicht reguliert wurden. *In vitro* hochregulierte Gene waren bei den diskriminierenden Genen nicht zu finden.

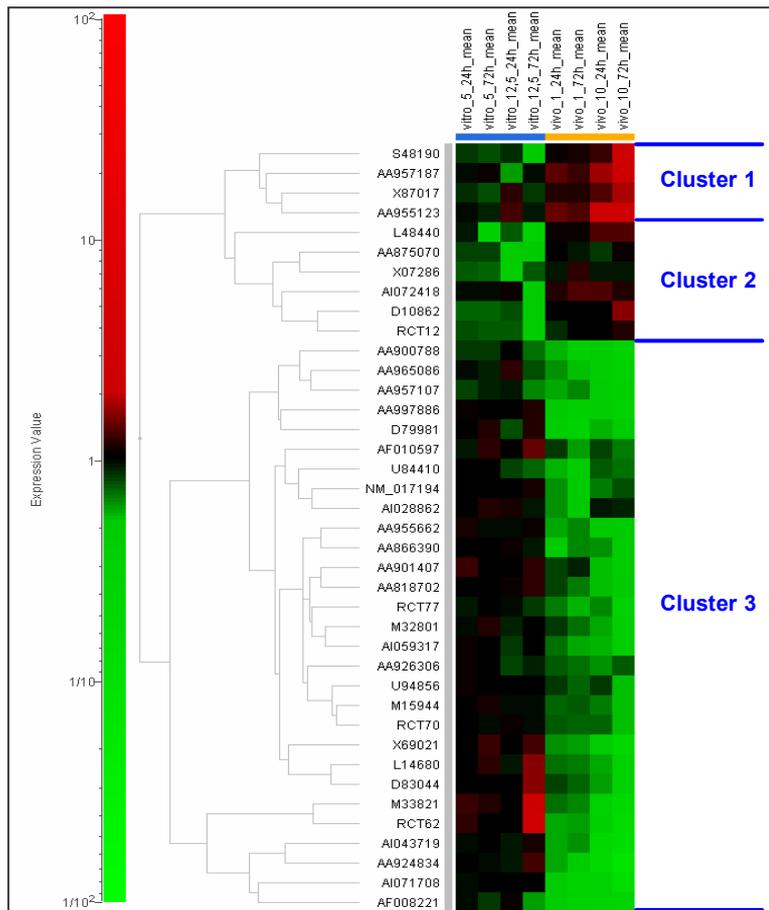


Abb. 31: Hierarchisches *clustering* der diskriminierenden Gene.

Die Daten repräsentieren Mittelwerte aus zwei Experimenten (*in vitro*) bzw. fünf Tieren (*in vivo*). Hochregulierte Gene sind rot, runterregulierte Gene grün dargestellt.

<b>cluster 1</b>	<b>In vitro nicht reguliert, in vivo hochreguliert</b>	<b>Biochemische Funktion</b>
S48190	Activin receptor type II (ACRII)	Differenzierung, Zellproliferation, Signaltransduktion
X87017	60S ribosomal protein L6 (60SL6) 2 EST's	Translation, Proteinmetabolismus Unbekannt
<b>cluster 2</b>	<b>In vitro runterreguliert, in vivo nicht reguliert</b>	<b>Biochemische Funktion</b>
AA875070	Alpha-prothymosin	Zellproliferation, Mitogenese, Immunabwehr
D10862	ID-1 (Inhibitor of DNA binding 1)	Differenzierung, Zellproliferation, Geweberegeneration, Transkription
X07286	Protein kinase C alpha (PKC $\alpha$ )	Intrazelluläre Signaltransduktion, Tumorprogression, Zellproliferation
L48440	Collagen type II 2 EST's	Fibrose; Extrazelluläre Matrix Unbekannt
<b>cluster 3</b>	<b>In vitro nicht reguliert, in vivo runterreguliert</b>	<b>Biochemische Funktion</b>
AA901407	Betaine homocysteine methyltransferase (BHMT)	Metabolismus, Biosynthese
AA997886	Cytochrome P450 2D18	Metabolismus, Phase-I-Biotransformation

AA900788	D-dopachrome tautomerase	Metabolismus, Inflammation
M33821	Gamma-glutamyl transpeptidase	Metabolismus, Phase-II-Biotransformation
U94856	Paraoxonase 1	Metabolismus, Phase-I-Biotransformation
M32801	Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 2	Metabolismus, Peroxisomenproliferation, Fettsäuremetabolismus
AA866390	Retinol dehydrogenase type III	Metabolismus, Biosynthese
AA955662	Apolipoprotein C1 (ApoC1)	Lipidtransport, Hyperlipidemie
AF010597	Bile salt export pump	Transzellulärer Transport, Cholestase
D79981	Organic anion transporter K1	Ionen Transport
D83044	Organic cation transporter 2	Ionen Transport
AF008221	Renal organic anion transporter	Ionen Transport
X69021	Senescence marker protein-30	Ca <sup>2+</sup> Homöostase, Ionen Transport
A1043719	Aspartoacylase	Osmoregulation, Neuronale Funktionen
AA965086	CDK108	Aminosäuremetabolismus, Osmoregulation, NADP-reguliertes Thyroidhormon-bindendes Protein in der Niere
M15944	Neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase)	Hormonelle Regulation, Kanzerogenese
NM_017194	Acetylcholine receptor epsilon	Signal Transduktion
L14680	Bcl-2	Anti-Apoptose; DNA Reparatur
U84410	Caspase 3	Apoptose, DNA Schädigung
	10EST's	Unbekannt

Tab. 4: Einteilung der diskriminierenden Gene in *cluster* entsprechend ihrer Expressionsprofile. Innerhalb der *cluster* wurden die Gene entsprechend ihrer biochemischen Funktion gruppiert.

Die diskriminierenden Gene werden in der Diskussion unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Eigenschaften des *in vitro* Testmodells und der *in vivo* Studien bewertet. Von den folgenden Analysen wurden diese Gene ausgeschlossen, um zu gewährleisten, dass die beobachteten OTA-induzierten transkriptionellen Veränderungen allgemeine Effekte des Toxins darstellen, die nicht vom verwendeten Testmodell abhängig sind.

### 3.4.2 Dosis- und zeitabhängige Veränderungen der Genexpression (Ratte)

Die Expressionsprofile der 215 verbleibenden gemeinsamen Gene wurden bezüglich dosis- oder zeitabhängiger Verläufe untersucht. Mit Hilfe von T-Tests wurden zur Identifizierung dosisabhängiger Profile alle „*low dose*“ Experimente (1mg/kg bzw. 5µM; 72h) gegen alle „*high dose*“ Experimente (10mg/kg bzw. 12.5µM, 72h) verglichen. Zur Identifizierung der zeitabhängigen Profile wurden alle kurz behandelten Experimente (24h, *high dose*) gegen alle länger behandelten Experimente (72h, *high dose*) analysiert. Den angewandten statistischen Kriterien

entsprechend ( $p=0.005$  bzw.  $p= 0.01$ ) wurden 36 dosisabhängig regulierte Gene („Dosis-Gene“) und 14 zeitabhängig regulierte Gene („Zeit-Gene“) gefunden, wobei ein Gen beiden Gruppen zugeordnet werden konnte. Die übrigen 165 differenziell regulierten Gene wiesen weder dosis- noch zeitabhängige Expressionsprofile auf und wurden deshalb zugunsten der besseren Übersichtlichkeit in der Interpretation nicht berücksichtigt.

Es stellte sich heraus, dass sowohl die Dosis- als auch die Zeit-Gene aufgrund ihrer biochemischen Funktionen in die gleichen vier Kategorien eingeteilt werden konnten: Akut-Phase Response und Inflammation (**Tab. 5**), Reaktionen auf DNA-Schädigungen (z.B. DNA-Reparatur-Prozesse und Apoptose; **Tab. 6**), zellulärer Stoffwechsel, Biotransformation und Entgiftungsprozesse (**Tab. 7**) und oxidativer Stress (**Tab. 8**). Die Dosis- und Zeit-Gene enthielten ausserdem elf bzw. zwei sogenannte EST's, welche exprimierte Gensequenzen darstellen, deren biochemische Funktion allerdings noch nicht bekannt ist. Aus **Tab. 6** ist weiterhin ersichtlich, dass GADD 45 sowohl dosis- als auch zeitabhängig reguliert wurde. Die Tendenzen der Expressionsprofile von „low dose“ zu „high dose“ bzw. von kurzer zu längerer Behandlung sind in den Tabellen mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

Gen-Bank Acc. No.	Dosis-Gene	Abk.	„low dose“ Experimente bei 72h ( $\pm$ SD)	„high dose“ Experimente bei 72h ( $\pm$ SD)	Tendenz des Expressions-profils
X17457	Ciliary neurotrophic factor	CNTF	1.03 $\pm$ 0.18	2.42 $\pm$ 0.55	↑
AA901050	Contrapsin-like protease inhibitor	CPI-21	1.17 $\pm$ 0.26	0.43 $\pm$ 0.05	↓
U07619	Tissue factor	TF	1.06 $\pm$ 0.17	1.77 $\pm$ 0.46	↑
Gen-Bank Acc. No.	Zeit-Gene	Abk.	„high dose“ Experimente bei 24h ( $\pm$ SD)	„high dose“ Experimente bei 72h ( $\pm$ SD)	Tendenz des Expressions-profils
NM_012488	Alpha-2-macroglobulin	a2MG	1.14 $\pm$ 0.09	2.16 $\pm$ 0.56	↑
AA925421	Alpha-fibrinogen	Fiba	0.91 $\pm$ 0.11	2.24 $\pm$ 0.79	↑
L33869	Ceruloplasmin	Cer	1.07 $\pm$ 0.15	2.59 $\pm$ 0.94	↑
AA900368	Zinc finger protein	Zf9	1.20 $\pm$ 0.15	3.48 $\pm$ 1.37	↑

Tab. 5: Akut-Phase Response und Inflammation.

Dargestellt sind die gemittelten Induktionsfaktoren der jeweiligen Experimente  $\pm$  die absolute Standardabweichung. Im oberen Abschnitt sind Gene gelistet, die ein dosisabhängiges Expressionsprofil aufweisen, im unteren Abschnitt sind zeitabhängig regulierte Gene aufgeführt.

Gen-Bank Acc. No.	Dosis-Gene	Abk.	„low dose“ Experimente bei 72h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
AA964578	Calpactin I heavy chain	Calp1	0.86 ± 0.11	2.00 ± 1.04	↑
L03201	Cathepsin S	CatS	0.92 ± 0.17	2.23 ± 0.74	↑
L32591	Gadd45	G45	0.76 ± 0.15	1.76 ± 0.25	↑
Gen-Bank Acc. No.	Zeit-Gene	Abk.	„high dose“ Experimente bei 24h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
M21730	Annexin V	AnxV	0.99 ± 0.10	2.12 ± 0.96	↑
M64723	Clusterin	Clust	1.19 ± 0.17	2.00 ± 0.81	↑
U66461	Dynein light chain 1	Dyn1	0.93 ± 0.09	1.88 ± 0.67	↑
U36994	Gadd153	G153	1.22 ± 0.17	2.00 ± 0.33	↑
L32591	Gadd45	G45	0.86 ± 0.11	1.76 ± 0.25	↑
AA899456	Nucleosome assembly protein	NAP	1.06 ± 0.10	2.17 ± 0.69	↑

Tab. 6: Reaktionen auf DNA-Schädigung, DNA-Reparatur und Apoptose.

Dargestellt sind die gemittelten Induktionsfaktoren der jeweiligen Experimente ± die absolute Standardabweichung. Im oberen Abschnitt sind Gene gelistet, die ein dosisabhängiges Expressionsprofil aufweisen, im unteren Abschnitt sind zeitabhängig regulierte Gene aufgeführt.

Gen-Bank Acc. No.	Dosis-Gene	Abk.	„low dose“ Experimente bei 72h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
M15327	Alcohol dehydrogenase 1	ADH1	1.03 ± 0.22	0.58 ± 0.26	↓
AA818673	Argininosuccinate lyase	ASL	0.89 ± 0.20	0.36 ± 0.30	↓
NM_024381	Glucocorticoid-receptor translocation promoter	Gyk	1.14 ± 0.23	0.40 ± 0.27	↓
AI059491	Beta-alanine synthase	bALS	0.81 ± 0.21	0.43 ± 0.42	↓
M29579	Glutamine synthetase	GlnS	0.88 ± 0.13	0.44 ± 0.32	↓
AA818339	Glutathione S-transferase alpha	GSTa	0.78 ± 0.17	0.43 ± 0.30	↓
X02904	Glutathione S-transferase P1	GSTp1	0.85 ± 0.18	0.49 ± 0.07	↓
K00136	Glutathione S-transferase Ya	GSTya	0.73 ± 0.14	0.47 ± 0.32	↓
L25331	Lysyl hydroxylase	LH	0.86 ± 0.10	0.46 ± 0.18	↓
AA925731	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase	IDH	0.86 ± 0.07	0.51 ± 0.23	↓
AA926193	Sulfotransferase K2	STK2	1.27 ± 0.49	0.39 ± 0.38	↓
Gen-Bank Acc. No.	Zeit-Gene	Abk.	„high dose“ Experimente bei 24h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
V01235	Liver fatty acid binding protein	LFABP	1.13 ± 0.12	1.75 ± 0.56	↑
J02640	NADPH quinone oxidoreductase-1 (DT-diaphorase)	DT-Dia	0.71 ± 0.21	0.51 ± 0.19	↓

Tab. 7: Zellulärer Stoffwechsel, Biotransformation und Entgiftung.

Dargestellt sind die gemittelten Induktionsfaktoren der jeweiligen Experimente ± die absolute Standardabweichung. Im oberen Abschnitt sind Gene gelistet, die ein dosisabhängiges Expressionsprofil aufweisen, im unteren Abschnitt sind zeitabhängig regulierte Gene aufgeführt.

Gen-Bank Acc. No.	Dosis-Gene	Abk.	„low dose“ Experimente bei 72h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
M11670	Catalase	Cat	0.98 ± 0.22	0.44 ± 0.32	↓
L38615	Glutathione synthetase	GlutS	0.89 ± 0.21	0.43 ± 0.30	↓
AF057308	Hypoxia-inducible factor 1 alpha	HIF1	1.21 ± 0.23	1.93 ± 0.43	↑
Gen-Bank Acc. No.	Zeit-Gene	Abk.	„high dose“ Experimente bei 24h (± SD)	„high dose“ Experimente bei 72h (± SD)	Tendenz des Expressions-profils
-	-	-	-	-	-

Tab. 8: Oxidativer Stress.

Dargestellt sind die gemittelten Induktionsfaktoren der jeweiligen Experimente ± die absolute Standardabweichung. Im oberen Abschnitt sind Gene gelistet, die ein dosisabhängiges Expressionsprofil aufweisen, im unteren Abschnitt sind zeitabhängig regulierte Gene aufgeführt.

Bei der Betrachtung der Gene in den vier Kategorien fällt auf, dass Gene mit Funktionen im zellulären Stoffwechsel, Biotransformation oder Entgiftung und Gene, die bei oxidativem Stress eine Rolle spielen eher dosisabhängig reguliert wurden, während Akut-Phase Responses oder Entzündungsprozesse, sowie Reaktionen auf DNA-Schädigungen eher zeitabhängig auftraten.

Ausser den in den **Tab. 5-8** gelisteten Genen wurden noch zwei Gene identifiziert, *ref-1* und *stem cell factor*, die in sämtlichen Experimenten gleichmässig runterreguliert waren. Dies scheint ein generell auftretender Effekt während der Behandlung mit OTA zu sein.

### 3.4.3 Verifizierung der Ergebnisse mit quantitativer Echt-Zeit PCR

Um die Mikroarray-Daten zu bestätigen, wurden für eine Auswahl an Genen quantitative Echt-Zeit-PCR Analysen mit den für 72h mit 10mg/kg OTA behandelten Nierenproben durchgeführt. **Abb. 32** zeigt die durch Taqman<sup>®</sup> PCR ermittelten Induktionsfaktoren von *calpactin I heavy chain*, *ceruloplasmin*, *clusterin*, *GADD 153*, *GADD 45*, *GST alpha* und *sulfotransferase K2* im Vergleich zu den Induktionsfaktoren, die aus den Mikroarray-Experimenten erhalten wurden. Die Tendenz der Transkriptionsveränderungen lässt sich durch die Taqman<sup>®</sup> PCR-Ergebnisse bestätigen. Die aus den Mikroarray-Experimenten ermittelten Induktionsfaktoren erschienen jedoch durchweg niedriger als die PCR-basierten Faktoren.

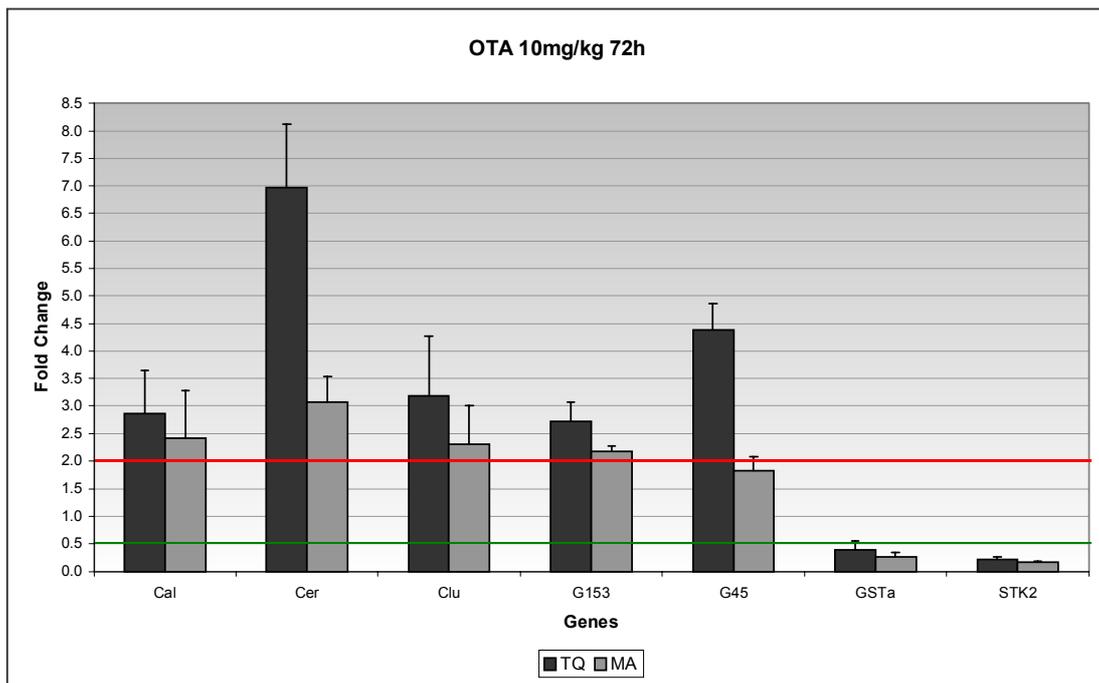


Abb. 32: Vergleich der Induktionsfaktoren aus Taqman® PCR und Mikroarray Experimenten. Dargestellt sind die gemittelten Induktionsfaktoren aus fünf Tieren, die 10mg/kg OTA für 72h erhalten haben. Die Fehlerbalken repräsentieren die absolute Standardabweichung.

### 3.4.4 Histopathologie der Nierengewebeschnitte aus den OTA-behandelten Ratten

Ratten, die einmalig mit 1mg/kg oder 10mg/kg OTA behandelt und nach 24 Stunden abgetötet wurden, wiesen keine erkennbaren histopathologischen Veränderungen auf. Die Ausnahme bildete eine leichte Akkumulation von hyalinem Material im Tubuluslumen, was auf eine veränderte glomeruläre Filtrationsrate hinweist (Daten nicht abgebildet). Nach dreimaliger Behandlung und Abtötung nach 72 Stunden zeigten die Ratten beider Dosisgruppen jedoch klare degenerative Läsionen, die hauptsächlich im inneren Teil des Cortex und im äusseren Teil der Medulla lokalisiert waren (**Abb. 33**). In der subkapsulären Region wurden dagegen keine solchen Veränderungen gefunden. Nekrotische Veränderungen einzelner Zellen des tubulären Epithels sowie Abschilferung von Zellen in das tubuläre Lumen konnten häufig detektiert werden. Apoptotische Zellen, erkennbar durch ihre verminderte Zellgrösse und kondensiertes nukleäres Chromatin, waren weitverbreitet in den nekrotischen Gebieten.

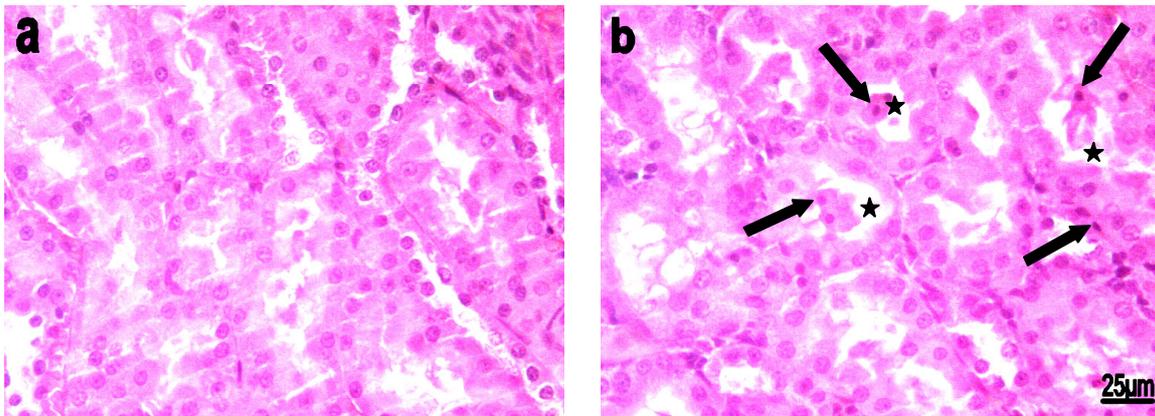


Abb. 33: Haematoxylin & Eosin – Färbung von Rattennieren-Paraffinschnitten nach OTA-Behandlung. **a:** Ausschnitt aus dem inneren Cortexbereich einer Kontrollniere, behandelt mit Vehikel (Maiskeimöl) für 72Stunden. Es sind keine morphologischen Veränderungen sichtbar. **b:** Ausschnitt aus dem inneren Nieren-Cortexbereich einer mit 10mg/kg OTA für 72Stunden behandelten Ratte. Einzelne Zellnekrosen, die auf apoptotischen Zelltod hinweisen, sind über den gesamten Ausschnitt verteilt (Pfeile). Abschilferungen von Zellen in das Tubuluslumen sind erkennbar (★). Vergrößerung beider Ausschnitte: 400x.

### 3.4.5 Dosis- und zeitabhängige Veränderungen der Genexpression in humanen PTC

Die humanen PTC wurden mit 3µM bzw. 10µM OTA für jeweils 24h bzw. 72h behandelt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und die Veränderungen in der Genexpression auf H 300 cDNA-Mikroarrays untersucht. Dieser Array enthält 313 gespottete humane cDNA Sequenzen von toxikologisch relevanten Genen sowie eine Negativ-Kontrolle. Die Auswertung der vier Arrays lieferte insgesamt 55 signifikant durch die Behandlung mit OTA regulierte Gene. Davon waren 17 Gene hoch- und 38 Gene runterreguliert. Ein anschließend mit diesen Genen durchgeführtes SOM *clustering* lieferte 24 Gene (**Tab. 9**), die ein dosisabhängiges Profil aufwiesen und drei Gene (**Tab. 10**), die ein zeitabhängiges Profil aufwiesen.

GenBank Acc. No.	Genbezeichnung	MW 3µM ± Streuung	MW 10µM ± Streuung	Tendenz des Expressionsprofils
<b>Akut-Phase Responses, Inflammation</b>				
D90209	Activating transcription factor 3	1.15 ± 0.14	0.44 ± 0.13	↓
M92843	GOS24 (zinc finger transcriptional regulator)	0.50 ± 0.13	1.00 ± 0.00	↑
M97935	Interferon stimulatory gene factor 3	0.36 ± 0.08	1.00 ± 0.00	↑
X02532	Interleukin-1 beta	1.21 ± 0.20	2.60 ± 0.11	↑
U08839	Urokinase plasminogen activator receptor	2.19 ± 0.11	0.67 ± 0.24	↓
AF022158	Zinc-finger protein-37	1.33 ± 0.24	0.36 ± 0.11	↓
<b>DNA Schädigung, DNA Reparatur, Apoptose, Canzerogenese</b>				
AF029082	14-3-3 sigma protein	0.44 ± 0.01	1.03 ± 0.03	↑
X51688	Cyclin A	0.45 ± 0.04	1.35 ± 0.35	↑
D78341	Cyclin G	0.48 ± 0.07	1.00 ± 0.00	↑
U10906	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor p27kip1	0.95 ± 0.05	0.36 ± 0.11	↓
L36140	DNA dependent helicase	0.93 ± 0.01	0.28 ± 0.12	↓
X12795	E2F-1	0.82 ± 0.05	0.40 ± 0.14	↓
M13194	ERCC 1 (excision repair protein)	0.50 ± 0.01	1.11 ± 0.11	↑
NM002417	Ki67	0.44 ± 0.16	1.05 ± 0.05	↑
U05340	p55CDC	0.47 ± 0.03	0.96 ± 0.05	↑
S43127	Ref-1	0.50 ± 0.12	1.23 ± 0.20	↑
M55580	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase (SSAT)	0.37 ± 0.00	1.13 ± 0.27	↑
U03106	Waf1	3.09 ± 0.74	1.10 ± 0.10	↓
<b>Zellulärer Stoffwechsel, Biotransformation und Entgiftung</b>				
X03120	Apolipoprotein CIII	2.03 ± 0.87	0.71 ± 0.20	↓
X12966	Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 2	1.04 ± 0.06	0.46 ± 0.14	↓
<b>Sonstige</b>				
CNBP	Cellular nucleic acid binding protein (CNBP)	1.00 ± 0.12	0.47 ± 0.02	↓
X51841	Integrin beta-4	0.74 ± 0.03	2.14 ± 0.32	↑
M23115	Sarcoplasmic reticulum calcium ATPase	2.16 ± 0.33	1.00 ± 0.00	↓
U82819	Uncoupling protein 2	0.37 ± 0.07	1.00 ± 0.00	↑

Tab. 9: Dosisabhängig regulierte Gene nach Behandlung von humanen PTC mit OTA.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus den Experimenten mit 3µM OTA bzw. 10µM OTA zusammen mit der jeweiligen Streuung. Rot = hochregulierte Gene. Grün = runterregulierte Gene. Die Pfeile geben die jeweilige Tendenz des Expressionsprofils von der niedrigen zur hohen OTA-Konzentration an. Die Gene wurden entsprechend ihrer biochemischen Funktion in vier Gruppen unterteilt.

GenBank Acc. No.	Genbezeichnung	MW 24h ± Streuung	MW 72h ± Streuung	Tendenz des Expressionsprofils
<b>DNA Schädigung, DNA Reparatur, Apoptose, Canzerogenese</b>				
M32721	Poly(ADP-ribose) polymerase	3.21 ± 1.77	0.86 ± 0.34	↓
<b>Zellulärer Stoffwechsel, Biotransformation und Entgiftung</b>				
AF057039	Organic anion transporter 1	0.74 ± 0.26	2.27 ± 1.33	↑
<b>Oxidativer Stress</b>				
M21304	Glutathione peroxidase	0.91 ± 0.03	0.53 ± 0.05	↓

Tab. 10: Zeitabhängig regulierte Gene nach Behandlung von humanen PTC mit OTA.

Dargestellt sind die Mittelwerte aus den 24h bzw. den 72h Experimenten zusammen mit der jeweiligen Streuung. Rot = hochregulierte Gene. Grün = runterregulierte Gene. Die Pfeile geben die jeweilige Tendenz des Expressionsprofils von der kürzeren zur längeren OTA-Behandlung an. Die Gene wurden entsprechend ihrer biochemischen Funktion in drei Gruppen unterteilt.

Die Gene sind in **Tab. 9** und **10** in insgesamt fünf verschiedene biochemische Kategorien unterteilt: Akut-Phase Responses und Inflammation, Reaktionen auf DNA-Schädigungen wie DNA-Reparatur, Apoptose und Kanzerogenese, zellulärer Stoffwechsel, Biotransformation und Entgiftung, oxidativer Stress und sonstige. Es fiel auf, dass die in den humanen PTC differenziell regulierten Gene den gleichen biochemischen Kategorien angehören, wie die transkriptionell veränderten Rattengene, so dass von einer guten Korrelation der Expressionsdaten aus Mensch und Ratte ausgegangen werden kann. Problematisch bei diesem Vergleich war dagegen, dass zum einen der humane Mikroarray wesentlich weniger Gene enthielt als der Ratten-Array und zum anderen vielen Genen des Ratten-Arrays keine entsprechenden Orthologen auf dem Human-Array zugeordnet werden konnten und umgekehrt. Eine Korrelation der Daten konnte somit nur über die Zugehörigkeit der veränderten Gene zu bestimmten biochemischen „*pathways*“ erfolgen.

### 3.5 Plattformvergleich: cDNA-Mikroarrays versus Oligo-Mikroarrays

Für die Untersuchung der Genexpression in der Niere standen verschiedene technische Plattformen zur Verfügung: zum einen ein Mikroarray mit ca. 700 toxikologisch relevanten Rattengenen, die als cDNA's von ca. 300-400b auf einen Glasobjektträger gespottet worden sind. Zum anderen ein Mikroarray mit ca. 8800 Rattengenen, die *in situ* in Form von mehreren Oligonukleotid-„*probe-sets*“ pro Gen

photolithographisch auf den Array synthetisiert worden sind. Beide Plattformen haben verschiedene Vor- und Nachteile, auf die in der Diskussion näher eingegangen werden soll. Um beide Plattformen vergleichen zu können, wurden aus RNA-Proben von OTA-behandelten Rattennieren (0mg/kg, 1mg/kg, 3mg/kg und 10mg/kg, jeweils für 72h behandelt) Gruppenpools aus fünf Tieren pro Gruppe hergestellt und nach entsprechender Prozessierung auf die beiden Plattformen hybridisiert. Die Induktionsfaktoren wurden berechnet und signifikant regulierte Gene extrahiert (**Tab. 11**). Ausgesuchte Gene wurden mit Hilfe der Taqman<sup>®</sup>-PCR verifiziert.

Dosierung	GenBank Acc.No.	Genname	FC cDNA-Array	FC Oligonukleotid -Array	FC Taqman-PCR
<b>1mg/kg</b>			<b>7 Gene</b>	<b>107 Gene</b>	<b>1 Gen</b>
	AA997886	Cytochrome P450 2D18	0.35	(0.65)	0.40
	AA900788	D-dopachrome tautomerase	0.41	0.43	
	M11794	Metallothionein 1	0.49	0.31	
	M27883	Pancreatic secretory trypsin inhibitor type II (PSTI-II)	0.41	0.65	
	M19007	Protein kinase C beta1	0.47	(0.50)	
	AF008221	Renal organic anion transporter	0.27	0.16	
<b>3mg/kg</b>			<b>18 Gene</b>	<b>431 Gene</b>	<b>3 Gene</b>
	D13978	Argininosuccinate lyase	0.50	0.47	
	AI043719	Aspartoacylase	0.32	(kein Wert)	
	L14680	Bcl-2	0.38	(0.97)	
	AI059491	Beta-alanine synthase	0.37	0.29	
	<b>U84410</b>	<b>Caspase 3</b>	<b>0.42</b>	<b>(4.05)</b>	<b>2.99 (10mg/kg)</b>
	X17163	c-jun	2.23	(3.47)	
	X70871	Cyclin G	2.07	4.82	2.42
	AA900788	D-dopachrome tautomerase	0.36	0.31	
	AA955123	EST (AA955123)	2.10	(kein Wert)	
	M33821	Gamma-glutamyl transpeptidase	0.34	0.26	
	K00136	Glutathione S-transferase Ya	0.48	0.85	
	AA818115	Methylacyl-CoA racemase alpha	0.49	0.53	
	D79981	Organic anion transporter K1	0.46	0.40	
	M19007	Protein kinase C beta1	0.48	(1.00)	
	AF008221	Renal organic anion transporter	0.23	(0.07)	
	X69021	Senescence marker protein-30	0.32	0.34	
	M77479	Sodium/bile acid cotransporter	0.49	(0.56)	
	AB009246	Stem cell factor	0.39	(1.12)	0.68
<b>10mg/kg</b>			<b>50 Gene</b>	<b>766 Gene</b>	<b>10 Gene</b>
	X91234	17-beta hydroxysteroid-dehydrogenase	2.83	(4.75)	
	M15327	Alcohol dehydrogenase 1	0.43	0.61	
	J03552	Alpha 1 - inhibitor III	0.51	(kein Wert)	
	AB015637	alpha-1,2-fucosyltransferase	0.40	(0.25)	

AA925421	Alpha-fibrinogen	3.83	10.23	
J02596	Apolipoprotein CIII	2.13	0.68	0.90
D13978	Argininosuccinate lyase	0.42	(0.20)	
AI043719	Aspartoacylase	0.48	(kein Wert)	
L14680	Bcl-2	0.25	(0.97)	
X17163	c-jun	3.08	5.00	
AA964578	Calpactin I heavy chain	2.45	3.38	3.54
M22413	Carbonic anhydrase III	0.47	(0.97)	
L03201	Cathepsin S	3.23	6.06	
AA965086	CDK108	0.49	(kein Wert)	
L33869	Ceruloplasmin	3.27	6.86	9.52
L46791	Cholesterol esterase	0.50	0.38	
X17457	Ciliary neurotrophic factor	2.29	2.21	
X70871	Cyclin G	2.71	5.22	6.10
S79304	Cytochrome c oxidase subunit I	0.47	0.18	
J05156	Cytochrome P450 11A1	0.52	(1.00)	
AA997886	Cytochrome P450 2D18	0.36	(0.55)	0.17
AA900788	D-dopachrome tautomerase	0.34	0.28	
L32591	Gadd45	2.27	4.36	4.33
M33821	Gamma-glutamyl transpeptidase	0.19	0.22	
M29579	Glutamine synthetase	0.37	0.42	
AA818339	Glutathione S-transferase alpha subunit	0.31	0.51	0.49
K00136	Glutathione S-transferase Ya	0.27	0.51	
L38615	Glutathione synthetase	0.41	0.29	
M89791	Insulin-like growth factor binding protein 1	2.07	31.96	29.5
U12309	Integrin beta1	2.12	2.41	
L25331	Lysyl hydroxylase	0.43	1.00	
M11661	Major acute phase protein alpha-1	6.86	(kein Wert)	
AA818115	Methylacyl-CoA racemase alpha	0.30	0.18	
AF041105	Organic anion transporter 3	0.48	(kein Wert)	
D79981	Organic anion transporter K1	0.38	0.53	
L19031	Organic anion transporting polypeptide 1	0.41	0.87	
D83044	Organic cation transporter 2	0.31	0.35	
U94856	Paraoxonase 1	0.43	(0.50)	
M32801	Peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase 2	0.49	0.33	
M12337	Phenylalanine hydroxylase	0.42	0.38	
D44495	Ref-1	0.48	0.43	
AF008221	Renal organic anion transporter	0.33	0.10	
AA963445	Selenoprotein P	0.47	1.00	
X69021	Senescence marker protein-30	0.20	0.25	
M77479	Sodium/bile acid cotransporter	0.29	(0.11)	
AB009246	Stem cell factor	0.27	(1.59)	1.45
AA926193	Sulfotransferase K2	0.25	0.33	0.23
U06179	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1	2.29	2.05	
AA900368	Zinc finger protein	2.49	8.84	

Tab. 11: Vergleich von verschiedenen technischen Plattformen.

Dargestellt sind die Induktionsfaktoren von differenziell regulierten Genen, die sich auf beiden Plattformen finden, sowie die Taqman<sup>®</sup>-basierten Induktionsfaktoren einzelner Gene. Werte in Klammern konnten erst durch Anwendung weniger stringenter Qualitätskriterien ermittelt werden. Gene, die auf beiden Plattformen in unterschiedliche Richtungen reguliert erschienen, wurden rot dargestellt. Gene, die auf einer Plattform differenziell reguliert, auf der anderen als nicht reguliert erschienen, wurden grau dargestellt.

Wie erwartet konnten auf dem grösseren Oligonukleotid-Array wesentlich mehr differenziell regulierte Gene identifiziert werden als auf dem cDNA-Array. Die Richtung der Regulation stimmte in den meisten Fällen auf beiden Arrays überein. Eine Ausnahme bildete *caspase 3*, das auf dem cDNA-Array runterreguliert, auf dem Oligonukleotid-Array dagegen hochreguliert erschien. Der mittels Taqman<sup>®</sup>-PCR ermittelte Induktionsfaktor von 2.99 unterstützte die Oligonukleotid-Array-Daten. Weiterhin wurden 12 Gene gefunden, die auf einer Plattform differenziell reguliert, auf der anderen dagegen nicht oder kaum reguliert erschienen. Wiederum wurden durch Taqman<sup>®</sup>-PCR in drei ausgesuchten Fällen die Daten des Oligonukleotid-Arrays bestätigt.

Ausserdem fiel auf, dass die Induktionsfaktoren der hochregulierten Gene auf dem Oligonukleotid-Array insgesamt wesentlich höher ausfielen, als auf dem cDNA-Array. Bei dem *insulin-like growth factor binding protein 1* war dieser Effekt besonders ausgeprägt. Auch in diesem Fall wurde mit Hilfe der Taqman<sup>®</sup>-PCR der Induktionsfaktor der Oligonukleotid-Plattform bestätigt.

### **3.6 Genexpressionsanalyse in vivo und in vitro nach Behandlung mit verschiedenen Nephrotoxinen**

Die Veränderungen der Genexpression im Nierencortex von Ratten wurden nach Applikation von Quecksilber-(II)-chlorid, Paraquat und Puromycin untersucht. Weiterhin wurden Ratten-PTC und humane PTC mit den verschiedenen Nephrotoxinen behandelt und ebenfalls differenziell regulierte Gene identifiziert.

### 3.6.1 Histopathologie

Die histopathologischen Befunde wurden nach Hämatoxylin & Eosin-Färbung (H&E) von Nierencortex-Paraffinschnitten von Dr. med. vet. U. Bach erstellt.

Ein Ausschnitt aus einer Kontrollniere, der keinerlei histopathologische Befunde aufweist, ist in **Abb. 34** dargestellt.

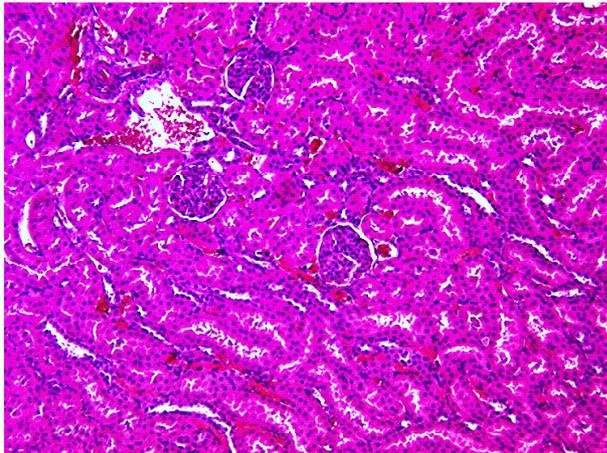


Abb. 34: H&E-gefärbter Ausschnitt aus dem inneren Cortextbereich einer Kontrollniere. Es sind keine histopathologischen Läsionen sichtbar. Vergrößerung: 100x.

#### 3.6.1.1 Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Quecksilber-(II)-chlorid

In **Abb. 35** sind mehrere H&E-gefärbte Nierenparaffin-Schnitte aus dem inneren Nierencortex von  $\text{HgCl}_2$ -behandelten Ratten dargestellt. Die Behandlung der Ratten mit verschiedenen  $\text{HgCl}_2$ -Konzentrationen führte bereits nach 24h in den mit 1.8mg/kg behandelten Tieren zu einer markanten Degeneration und / oder Nekrose des Tubulusepithels (**Abb. 35a**). Diese nekrotischen Veränderungen setzten sich in den für 72h (**Abb. 35b**) und 168h (**Abb. 35c**) behandelten Tieren fort, wobei in der 72h-Gruppe und besonders in der 168h-Gruppe zusätzlich eine deutliche Dilatation der proximalen Tubuli sichtbar wurde. Weiterhin war bei der niedrigen  $\text{HgCl}_2$ -Konzentration nach 24h und nach 72h eine starke inflammatorische Infiltration der proximalen Tubuli mit mononukleären Zellen zu erkennen.

In der 18mg/kg Dosisgruppe waren nach 24h überraschenderweise keine histopathologischen Veränderungen vorhanden. In der 72h-Gruppe zeigten die proximalen Tubuli jedoch deutliche nekrotische Veränderungen, tubuläre Dilatation begleitet von einer Infiltration inflammatorischer Zellen, sowie stark mineralisierte

Bereiche als Hinweis auf eine Verkalkung der Nekrose (**Abb. 35d**). Nach 168h waren in der 18mg/kg-Gruppe zahlreiche dilatierte Tubuli zu erkennen (**Abb. 35e**).

Nach 72h und noch offensichtlicher nach 168h Behandlung der Ratten mit  $\text{HgCl}_2$ , konnten bei beiden Dosierungen Zeichen für eine Regeneration des tubulären Gewebes, wie eine basophile Färbung der regenerierenden Bereiche (blau-violett), sowie ein abgeflachtes Tubulusepithel, beobachtet werden.

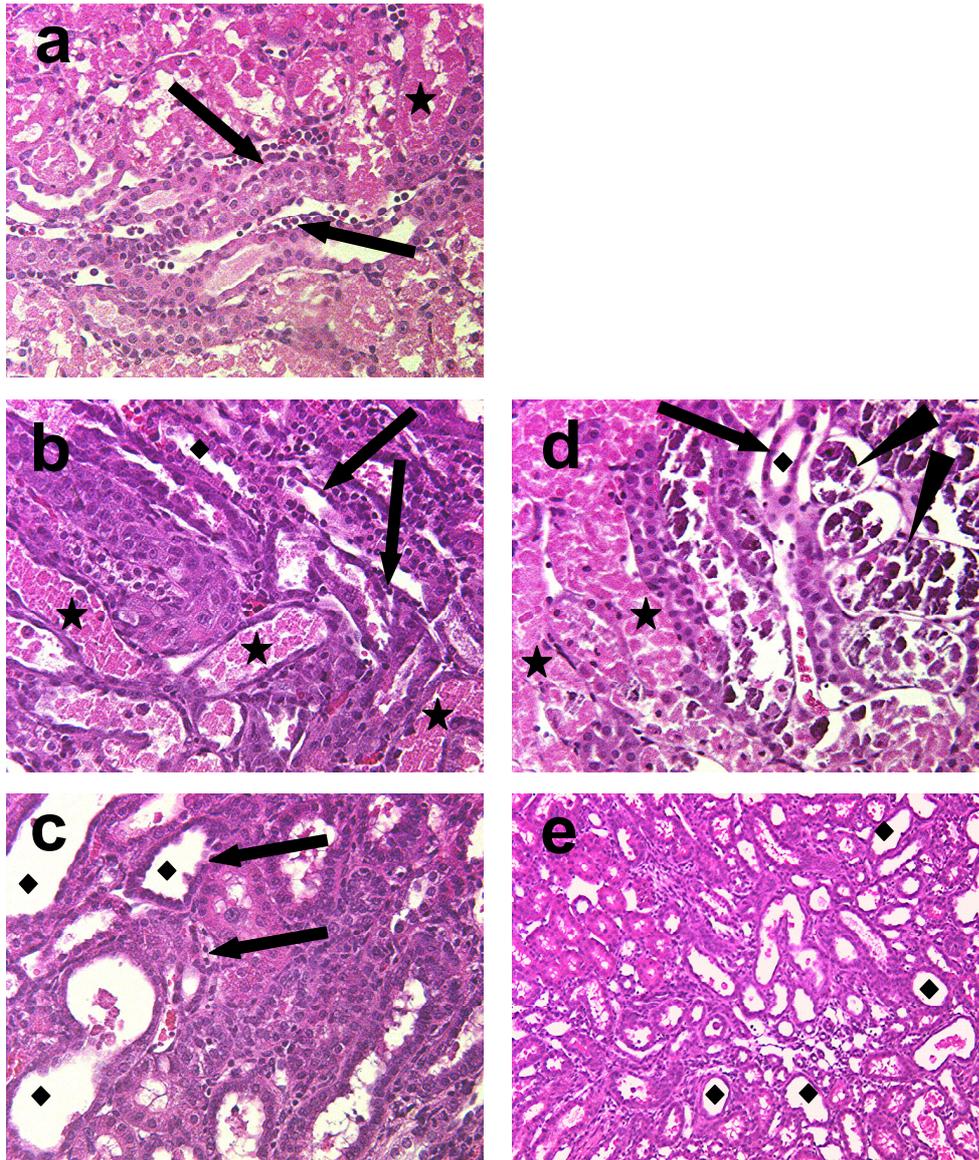


Abb. 35:  
Haematoxylin &  
Eosin-Färbung  
von Nierencortex-  
Paraffinschnitten  
nach Behandlung  
mit  $\text{HgCl}_2$ .

**a:** Behandlung mit 1.8mg/kg  $\text{HgCl}_2$  für 24h. Vergrößerung: 250x. **b:** Behandlung mit 1.8mg/kg  $\text{HgCl}_2$  für 72h. Vergrößerung: 250x. **c:** Behandlung mit 1.8mg/kg  $\text{HgCl}_2$  für 168h. Vergrößerung: 250x. **d:** Behandlung mit 18mg/kg  $\text{HgCl}_2$  für 72h. Vergrößerung: 250x. **e:** Behandlung mit 18mg/kg  $\text{HgCl}_2$  für 168h. Vergrößerung: 100x. →: Degeneration und / oder Nekrose der Tubuli. ★: Mononukleäre Zellinfiltration. ◆: Tubuläre Dilatation. ▶: Mineralisation als Zeichen der Verkalkung der Nekrose. Basophil (blau-violett) gefärbtes Tubulusepithel: Anzeichen für eine Regeneration des Gewebes.

### 3.6.1.2 *Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Paraquat*

**Abb. 36** zeigt einen Ausschnitt aus dem inneren Nierencortexbereich einer Ratte, die 35mg/kg Paraquat für 168h erhalten hat. Es sind keine histopathologisch relevanten Veränderungen sichtbar.

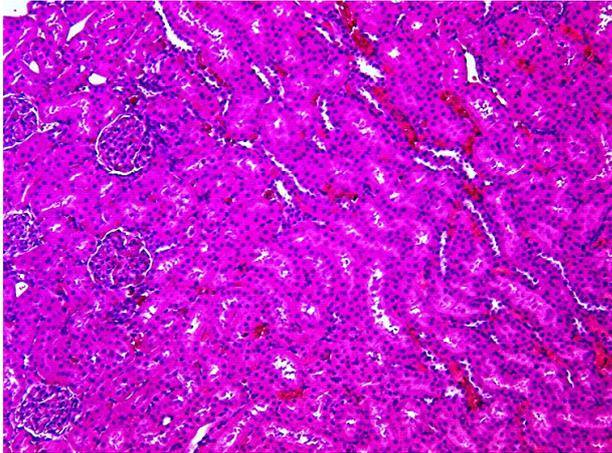


Abb. 36: Haematoxylin & Eosin-Färbung von Nierencortex-Paraffinschnitten nach Behandlung mit Paraquat.

Behandlung mit 35mg/kg Paraquat für 168h.  
Vergrößerung: 100x.

### 3.6.1.3 *Histopathologische Veränderungen in den Nieren nach der Behandlung von Ratten mit Puromycin*

In **Abb. 37** ist ein Ausschnitt aus der Niere einer Puromycin-behandelten Ratte dargestellt.

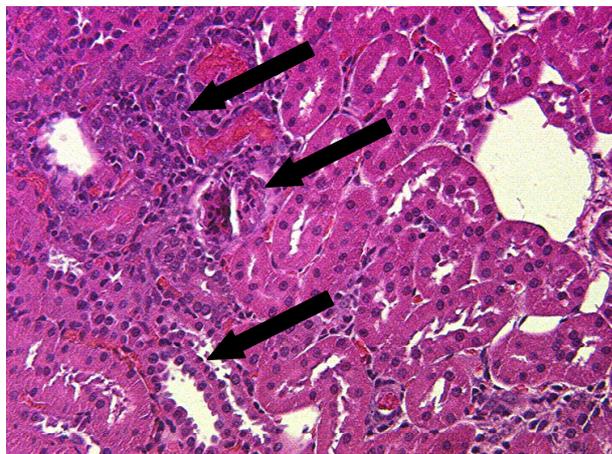


Abb. 37: Haematoxylin & Eosin-Färbung von Nierencortex-Paraffinschnitten nach Behandlung mit Puromycin.

Behandlung mit 45mg/kg Puromycin für 168h.  
Vergrößerung: 250x. → basophil gefärbtes Tubulusepithel.

Die Behandlung mit Puromycin führte in den niedrigen Konzentrationen zu keinem Zeitpunkt zu erkennbaren histopathologischen Befunden. Durch Behandlung mit

45mg/kg Puromycin konnten nach 168h jedoch deutliche Anzeichen für eine Regeneration von Tubulusepithelgewebe (basophil gefärbte Tubuli) beobachtet werden.

### **3.6.2 Veränderungen der Genexpression im Nierencortexgewebe der Ratte nach Behandlung mit Quecksilber-II-chlorid**

Die Expressionsdaten von jeweils drei Tieren aus jeder Dosisgruppe wurden mit den Daten der gepoolten Kontrolltiere des entsprechenden Zeitpunktes in einem T-Test verglichen. Gene, deren Expression sich um mehr als den Faktor zwei zwischen Dosisgruppe und Kontrollgruppe unterschied ( $p = 0.001$ ), wurden als signifikant differenziell reguliert angesehen und sind in **Tab.12** zusammengefasst.

$p = 0.001$		24h	72h	168h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
HgCl <sub>2</sub>	1.8mg/kg	209	28	20	214	335
	18mg/kg	10	52	163	188	

Tab. 12: Anzahl der differenziell regulierten Gene ( $FC > |2|$ ) nach HgCl<sub>2</sub>-Behandlung.

Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der Dosisgruppen mit denen der jeweiligen Kontrollgruppe im T-Test ( $p=0.001$ ) ermittelt.

Es ist ersichtlich, dass bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> die Rattennieren schon sehr früh (nach bereits 24h) sehr viele Gene mit veränderter Expression aufwiesen, zu den späteren Zeitpunkten ging die Zahl der differenziell regulierten Gene allerdings wieder auf 28 (72h) bzw. 20 (168h) zurück. Nach dem Aussortieren von Überschneidungen und unbekanntem EST's blieben bei der niedrigen Dosierung 214 verschiedene, signifikant regulierte Gene übrig.

Im Gegensatz dazu stand die Zahl der differenziell regulierten Gene bei Ratten, die 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> erhalten hatten. Die Veränderungen der Genexpression in der Niere nahmen hier im Laufe der Zeit stetig zu. In dieser Gruppe wurden ohne Überschneidungen und EST's 188 Gene signifikant in ihrer Expression verändert.

Insgesamt wurden durch die Behandlung der Ratten mit 1.8mg/kg bzw. 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> 335 Gene reguliert, deren Expressionsprofile im Folgenden genauer untersucht wurden.

In **Abb.38** wurden diese 335 Gene gemäss ihrer biochemischen Funktion bestimmten Kategorien zugeordnet und die Kategorien anschliessend nach Anzahl der zugehörigen Gene geordnet. Einige Gene wurden mehreren Kategorien zugeteilt, um eine genauere Charakterisierung der jeweiligen Genfunktionen zu ermöglichen.

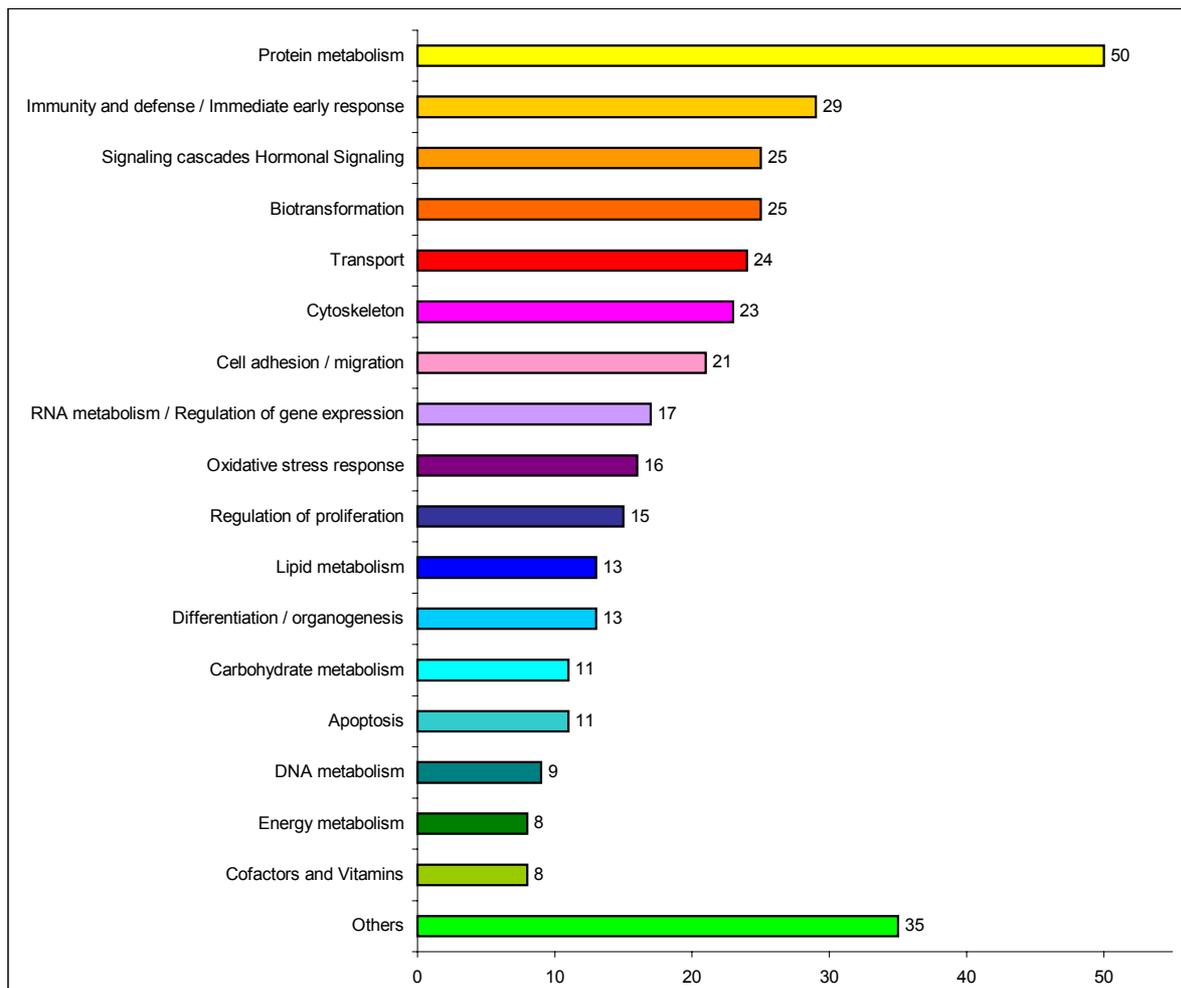


Abb. 38: „Ranking“ der durch HgCl<sub>2</sub>-Behandlung in der Ratte veränderten biochemischen *pathways*. Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

Die meisten differenziell regulierten Gene konnten der Kategorie „Proteinmetabolismus“ zugeordnet werden. Der Kategorie „Immunabwehr / Akutphasereaktionen“ wurden die zweitmeisten regulierten Gene zugeordnet, gefolgt von der Kategorie „Signaltransduktion / hormonelle Signaltransduktion“. Jeweils 29, 25, 25, 24, 23, 21, 17 und 16 regulierte Gene konnten in die Kategorien

„Biotransformation“, „Transport“, „Zytoskelett“, „Zelladhäsion / -migration“, „RNA Metabolismus / Regulation der Genexpression“ und „Oxidativer Stress“ eingeordnet werden. Die restlichen Kategorien werden in **Abb. 38** nur der Vollständigkeit wegen dargestellt. Eine ausführliche Behandlung würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten.

### 3.6.2.1 Proteinmetabolismus

Durch Administration von  $\text{HgCl}_2$  an Ratten waren in den Nieren insgesamt 50 verschiedene Gene differenziell reguliert, die im Proteinmetabolismus eine Rolle spielen. Diese Gene wurden entsprechend der Ähnlichkeit ihrer Expressionsprofile hierarchisch geordnet (**Abb. 39**).

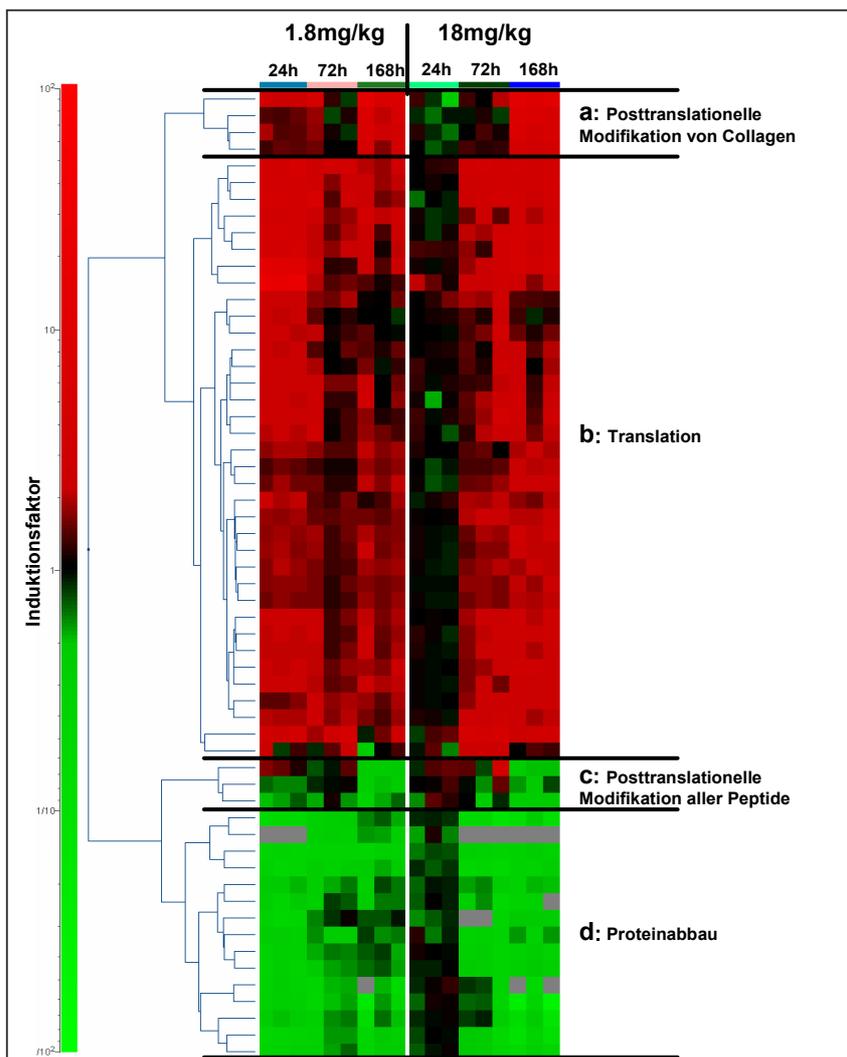


Abb. 39: Hierarchisches *clustering* der Gene mit Funktion im Proteinmetabolismus. Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder.

Aus der hierarchischen Anordnung der Gene ergaben sich vier verschiedene *cluster*. Die einzelnen Gene wurden zusammen mit ihrer typischen Funktion im Proteinmetabolismus in **Tab.13** aufgelistet.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Funktion im Proteinmetabolismus
<b>a</b>	U68562	HSP 60	Proteinreparatur / Proteinfaltung
	L25331	Lysyl hydroxylase	Posttranslationelle Modifikation: Collagen
	AA875582	Lysyl oxidase	Posttranslationelle Modifikation: Collagen
<b>b</b>	J02646	Eukaryotic translation initiation factor 2 (EIF2A)	Translation
	AF063447; U21719; U25746	Nuclear RNA helicases DDXL, DDX21, HEL117	Translation
	AA892562	Nucleolar protein NAP57 (Dyskerin)	Translation
	H31914	Nucleolin	Translation
	J03969	Nucleophosmin	Translation
	z.B. X78327	Ribosomal Proteins of large subunit 3, 10a, 13, 13a, 18a, 21, 22, 23a, 24	Translation
	z.B. X53377	Ribosomal Proteins of small subunit 6, 7, 8, 11, 12, 19, 24	Translation
	D25224	Ribosomal protein SA	Translation
	D13623	Ribosome binding protein 34	Translation
	AA875594	FK506-binding protein 1A	Proteinfaltung
	M86389; L16764	HSP 27, HSP 70	Proteinreparatur / Proteinfaltung
	AA819338	Signal sequence receptor delta subunit	Translokation neu synthetisierter Peptide
	A1235585	Cathepsin D	Proteinabbau
	D10757	Proteasome subunit beta 9	Proteinabbau
<b>c</b>	S75280	GRP 75	Proteinreparatur / Proteinfaltung
	AF008554	Implantation-associated protein.	Posttranslationelle Modifikation: N-glykosylation
	E03428	Peptidyl-glycine alpha-amidating MO	Posttranslationelle Modifikation: alpha-Amidierung von Peptiden
<b>d</b>	M25073	Aminopeptidase N	Proteinabbau
	M38135	Cathepsin H	Proteinabbau
	J04591	Dipeptidyl peptidase4	Proteinabbau
	S43408	Mepirin A alpha-subunit	Proteinabbau
	M88601	Mepirin A beta-subunit	Proteinabbau
	M15944	Neutral endopeptidase/enkephalinase	Proteinabbau
	AB012759	Prolyl endopeptidase	Proteinabbau
	AA892468	Protease serine 8 (prostasin)	Proteinabbau
	AA892810	LDL receptor-related protein associated prot.1	Proteinfaltung
	M83143	Sialyltransferase 1	Posttranslationelle Modifikation
	U19485	Secreted phosphoprotein 24	Regulation

Tab. 13: Durch HgCl<sub>2</sub> regulierte Gene mit verschiedenen Funktionen im Proteinmetabolismus.

Sortiert nach *clustern* aus **Abb. 39**.

Zu *cluster a* gehörten zwei Gene, *lysoxidase* und *lysylhydroxylase*, die bei der posttranslationalen Modifikation von Collagen eine Rolle spielen. Sie wurden bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> nach 24h leicht und nach 168h stark hochreguliert, während nach 72h keine Regulation zu beobachten war. In den hohen Dosisgruppen war dagegen erst gegen Ende der Studie (168h) ein starker Anstieg ihrer Expression zu erkennen. In *cluster b* fanden sich Gene, die bei den niedrigen Dosisgruppen permanent und in den hohen Dosisgruppen nach 72h und 168h stark hochreguliert waren. Hierbei handelte es sich vor allem um Gene von ribosomalen Untereinheiten und Gene, die eine Rolle bei der Initiation der Translation spielen.

Das dritte *cluster (c)* beinhaltete Gene, die sowohl bei 1.8mg/kg als auch bei 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> nach 168h gegenüber der Kontrolle vermindert exprimiert wurden. Diese Gene spielen eine Rolle bei der Glykosylierung und Amidylierung von Peptiden.

*Cluster d* umfasst dagegen Gene, die permanent runterreguliert erschienen. Lediglich in den hohen Dosisgruppen setzte die Unterdrückung der Genexpression erst nach 72h ein.

### 3.6.2.2 *Auswirkungen auf Immunabwehr, Akutphasereaktionen, Zelladhäsion und Zytoskelett*

Die regulierten Gene aus den Kategorien „Immunabwehr / Akutphasereaktion“, „Zelladhäsion / -migration“ und „Zytoskelett“ wurden sowohl im Ergebnisteil als auch in der späteren Interpretation zusammen ausgewertet, da zahlreiche Wechselwirkungen zwischen den Genen in diesen Kategorien bestehen und somit eine gemeinsame Auswertung sinnvoll ist.

Die insgesamt 73 Gene wurden mit Hilfe eines „*k-means clustering*“ in Gruppen mit ähnlichen Expressionsprofilen eingeteilt (**Abb.40**).

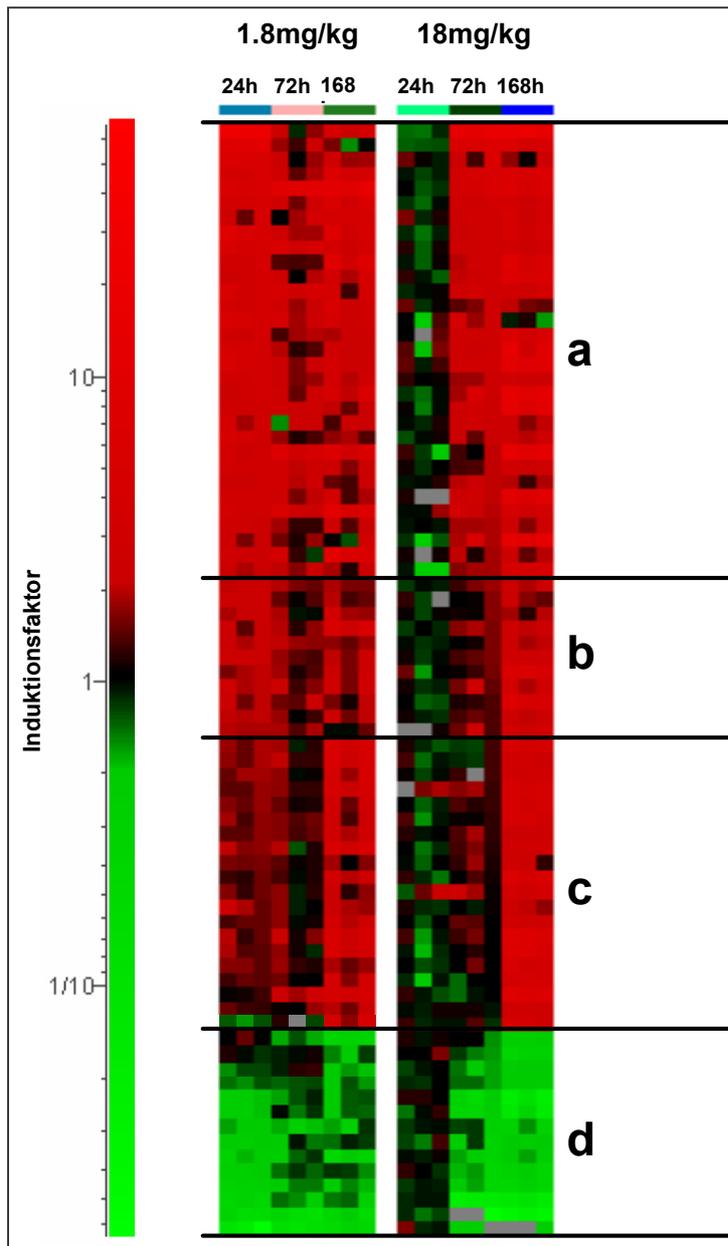


Abb. 40: *k-means clustering* von Genen aus den Kategorien „Immunabwehr“, „Zelladhäsion“ und „Zytoskelett“. Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder. Die Buchstaben **a-d** bezeichnen die jeweiligen *cluster*.

In **Tab. 14** sind die Gene entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den vier verschiedenen *clustern* dargestellt. Gene aus *cluster a* waren über den gesamten Verlauf der Studie bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> im Vergleich zur Kontrolle stark hochreguliert. Bei Administration von 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> war die Expression dieser Gene nach 24h noch nicht reguliert, ab 72h war allerdings eine deutliche Induktion ihrer Expression zu beobachten.

In *cluster b* finden sich Gene, die bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> das gleiche Profil aufwiesen, wie die Gene aus *cluster a*, bei 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> jedoch erst nach 168h eine gegenüber der Kontrolle induzierte Expression zeigten.

Gene, die sich bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> zunächst nur mässig reguliert zeigten, nach 168h dagegen stark hochreguliert waren und bei 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> das gleiche Profil zeigten, wie Gene aus *cluster b*, wurden in *cluster c* zusammengefasst.

Die Expression der Gene aus *cluster d* ist bei 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> permanent, bei 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> dagegen erst nach 72h und 168h gegenüber der Kontrolle vermindert.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Kategorie	Subkategorie	
<b>a</b>	D00913	ICAM1	Cell adhesion / Immunity and defense	Adhesion molecule	
	Y13275	TM4SF3	Cell adhesion / Immunity and defense	Adhesion molecule   Blood coagulation	
	M14656	Osteopontin	Cell adhesion / Immunity and defense	ECM   TNF / cytokine pathway	
	AA892854	CXCL13	Immunity and defense / Cell adhesion	TNF / cytokine pathway   Regulation	
	U17035	IP-10 (CXCL10)	Immunity and defense / Cell adhesion	TNF / cytokine pathway   Regulation	
	X17053	MCP-1	Immunity and defense / Cell adhesion	TNF / cytokine pathway   Regulation	
	U49062	CD24	Immunity and defense	Adaptive immunity	
	K03039	CD45	Immunity and defense	Adaptive immunity	
	M57276	CD53 (OX-44)	Immunity and defense	Adaptive immunity	
	M34253	Interferon regulatory factor 1	Immunity and defense	Antigen presentation	
	D88250	Complement component C1s	Immunity and defense	Complement system	
	L33869	Ceruloplasmin	Immunity and defense / Immediate early response	Acute phase protein	
	M18416	EGR-1 (Krox-24)	Immediate early response	Transcription factor	
	S3733	EGR-2 (Krox-20)	Immediate early response		
	AI014163	INF-rel. developmental regulator 1	Immediate early response		
	L13039	Calpactin I heavy chain	Cytoskeleton	Cell morphology / motility	
	J03627	Calpactin I light chain	Cytoskeleton	Cell morphology / motility	
	M15474	Tropomyosin 1 alpha	Cytoskeleton	Cell morphology / motility	
	S57478	Calpactin II	Cytoskeleton	Cell morphology / motility   Exo / endocytosis	
	X06801	Alpha-actin	Cytoskeleton	Cell morphology / motility	
	M83107	Transgelin	Cytoskeleton	Constituent	
	X62952	Vimentin	Cytoskeleton	Intermediate filament	
	J00797	Tubulin alpha-1	Cytoskeleton	Microtubuli	
	AB011679	Tubulin beta-5	Cytoskeleton	Microtubuli	
	AF083269	ARP2/3 complex	Cytoskeleton	Regulation	
	M58404	Thymosin beta-10	Cytoskeleton	Regulation	
	<b>b</b>	L00191	Fibronectin 1	Cell adhesion	ECM
		AI009191	Fyn proto-oncogene	Immunity and defense	Adaptive immunity
		D10757	Proteasome subunit beta 9	Immunity and defense	Antigen presentation
		X71127	Complement component C1q beta	Immunity and defense	Complement system
		AA892775	Lysozyme	Immunity and defense	Innate immunity
X61381		Interferon inducible protein	Immunity and defense	TNF / cytokine pathway	
L26267		NFKB1	Immunity and defense	Transcription factor	
X54617		Myosin regulatory light chain 2A	Cytoskeleton	Cell morphology / motility	
<b>c</b>	X52140	Integrin alpha-1	Cell adhesion	Adhesion molecule	
	AI177366	Integrin beta-1	Cell adhesion	Adhesion molecule	

	M27207	Collagen I alpha 1	Cell adhesion	ECM
	AJ005394	Collagen V alpha 1	Cell adhesion	ECM
	AI179399	Collagen V alpha 2	Cell adhesion	ECM
	AJ005396	Collagen XI alpha 1	Cell adhesion	ECM
	AA891204	Osteonectin	Cell adhesion	ECM
	S66184	Lysyl oxidase	Cell adhesion	ECM
	AA892897	Lysyl hydroxylase	Cell adhesion	ECM
	X59267	Drebrin	Cytoskeleton	Cell morphology / motility
	X59601	Plectin 1	Cytoskeleton	Intermediate filament
	AI180288	Caldesmon 1	Cytoskeleton	Regulation
	U23769	PDZ and LIM domain protein 1	Cytoskeleton	Regulation
	M34043	Thymosin beta-4	Cytoskeleton	Regulation
	D42137	Annexin V (Lipocortin V)	Cytoskeleton / Immunity and defense	Cell morphology / motility   Blood coagulation
	U42719	Complement component C4a	Immunity and defense	Complement system
	S32038	c-Jun proto-oncogene	Immediate early response	Stress kinase pathway
<b>d</b>	AA800737	Catenin delta-2	Cell adhesion	Adhesion molecule
	M19647	Glandular kallikrein 7	Cell adhesion	ECM
	AA946108	Laminin-5 alpha 3	Cell adhesion	ECM
	M81687	Syndecan-2	Cell adhesion	ECM
	M80826	Trefoil factor 3	Cell adhesion	Regulation
	S68809	S-100 protein, alpha chain	Cytoskeleton	Cell morphology / motility
	X79321	Microtubule-assoc. protein tau	Cytoskeleton	Microtubuli
	AA800671	Ras GTPase activating protein-related protein	Cytoskeleton	Regulation
	AA945569	A1MG	Immunity and defense / Immediate early response	Acute phase protein
	D10693	Histamine N-methyltransferase	Immunity and defense	Allergic responses
	X70900	Serine protease hepsin	Immunity and defense	Blood coagulation
	AF080507	Mannose-binding protein A	Immunity and defense	Complement system
	S75960	Uromodulin (Tamm-Horsfall glycoprotein)	Immunity and defense	TNF / cytokine pathway

Tab. 14: Gene mit Funktionen in der Immunabwehr, der Akutphasereaktion, der Zelladhäsion und bei Aufbau und Regulation des Zytoskeletts.

Die Buchstaben **a-d** bezeichnen die Zuordnung zu den *clustern* aus **Abb. 40**.

### 3.6.2.3 Signaltransduktionswege

Die Behandlung der Ratten mit 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> bzw. 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> führte im Nierencortex zu einer gegenüber den Kontrollen signifikanten Regulation von insgesamt 25 Genen, die eine Rolle in der Signaltransduktion spielen. **Abb.41** zeigt die Einteilung dieser Gene in zwei Gruppen. *Cluster a* enthält Gene, die in den niedrigen Dosisgruppen nach 24h und nach 168h deutlich induziert wurden. In den hohen Dosisgruppen zeigten diese Gene einen stetigen Anstieg in ihrer Expression von 24h bis 168h.

Die Gene in *cluster b* wiesen in den 1.8mg/kg Gruppen eine gegenüber der Kontrolle permanent verminderte Expression auf, während sie in den 18mg/kg Gruppen erst im Verlauf der Studie von 24h bis 168h runterreguliert wurden.

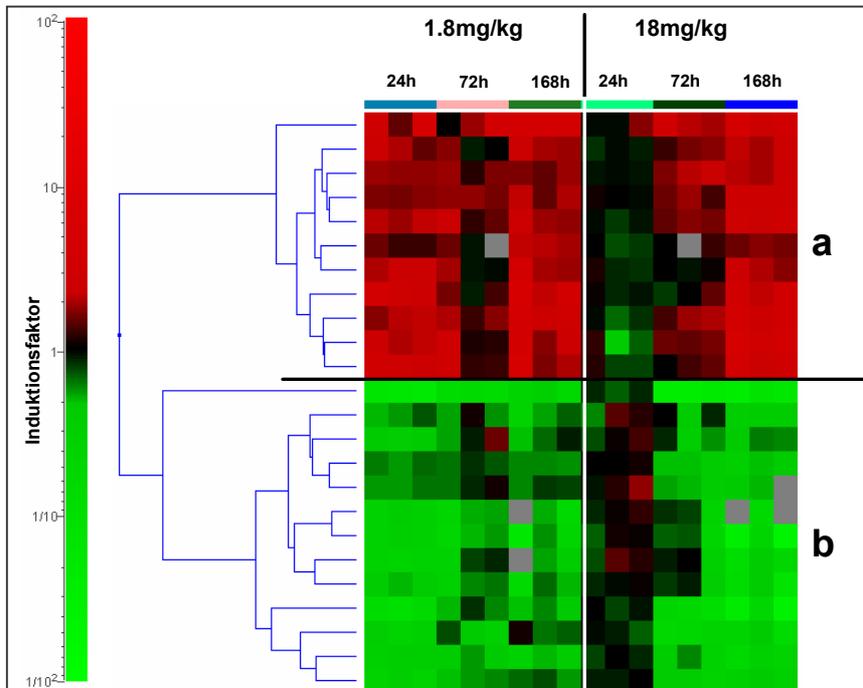


Abb. 41: Hierarchisches *clustering* von Genen aus der Kategorie „Signaltransduktion“.

Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder. Die Buchstaben *a* und *b* bezeichnen die jeweiligen *cluster*.

**Tab. 15** fasst die Gene aus *cluster a* und *b* gemeinsam mit ihren spezifischen Funktionen bei der Signaltransduktion zusammen.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Signaltransduktion Subkategorie
<b>a</b>	AA925556	TNF intracell. domain-interacting protein	Adapter protein
	L06096	ITPR3	Ca <sup>2+</sup> signaling
	U03390	GTP-binding protein beta subunit-like protein 12.3	GPCR pathway
	AA848831	Lysophosphatidic acid receptor	GPCR pathway
	M81642	PAR1 (Thrombin receptor)	GPCR pathway
	A1113289	Protein-tyrosine phosphatase	Insulin / Glucagon pathway
	M57276	CD53 (OX-44)	PLC-PKC pathway
	D17445	14-3-3 protein eta	Signaling cascades
	A1009191	Fyn proto-oncogene	Signaling cascades
	S32038	c-Jun proto-oncogene	Stress kinase pathway
	U48596	MEKK1	Stress kinase pathway
<b>b</b>	J05510	ITPR1	Ca <sup>2+</sup> signaling
	D31662	SMP-30 (Regucalcin)	Ca <sup>2+</sup> signaling
	AB012944	Parathyroid hormone receptor	Ca <sup>2+</sup> and Pi metabolism regulation
	M74054	Angiotensin II receptor 1A	Electrolyte metabolism regulation
	AF061443	G protein-coupled receptor 4	GPCR pathway
	A1639418	Thyroxine deiodinase, type I	Growth / differentiation
	E03428	Peptidyl-glycine alpha-amidating MO	Hormonal signaling
	J04591	Dipeptidyl peptidase4	Insulin / Glucagon pathway
	J05592	Protein phosphatase inhibitor 1	Insulin / Glucagon pathway
	AA874951	Amnionless protein	TGFβ family pathway
	AA858573	Secreted phosphoprotein 24	Regulation

Tab. 15: Gene mit Funktionen in der Signaltransduktion.

Die Gene wurden entsprechend **Abb. 41** in *cluster a* und **b** geordnet.

### 3.6.2.4 Biotransformation

Gene mit Funktionen in der Biotransformation, die nach Behandlung der Ratten mit 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> bzw. 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> gegenüber der Kontrolle differenziell reguliert waren, liessen sich mit Hilfe eines hierarchischen *clusterings* in drei Gruppen einteilen (**Abb. 42**).

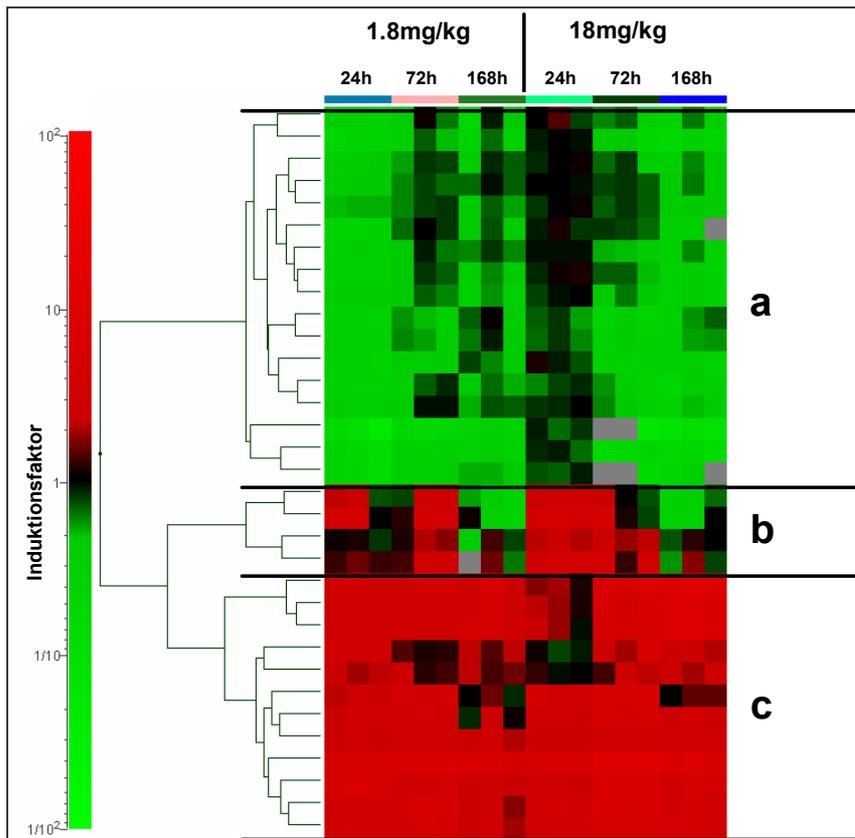


Abb. 42: Hierarchisches *clustering* von Genen mit Funktion in der Biotransformation.

Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder. Die Buchstaben **a-c** bezeichnen die jeweiligen *cluster*.

Gene aus *cluster a* zeigten bei 1.8mg/kg permanent verminderte Expression gegenüber der Kontrolle, während bei 18mg/kg erst nach 72h eine allmähliche Abnahme ihrer Expression zu beobachten war.

*Cluster b* beinhaltete nur zwei Gene, die aber mit jeweils zwei unterschiedlichen „*probe sets*“ auf dem Array repräsentiert sind. Hierbei handelte es sich um die *catechol-O-methyltransferase* und die *UDP-glucuronyltransferase 1A6*. Diese Gene erschienen in beiden Dosisgruppen bei 24h und / oder 72h induziert, was bei 168h jedoch in eine gegenüber der Kontrolle deutlich verminderte Expression umschlug.

In *cluster c* fanden sich vor allem Glutathion-S-Transferasen und einige Phase I Gene. Hier war in beiden Dosisgruppen eine nahezu permanente Induktion der Expression zu erkennen. Vor allem bei den Glutathion-S-Transferasen fiel die besonders frühe (24h) und besonders starke Induktion der Expression auf (4-8fache Induktion).

**Tab. 16** listet die regulierten Gene der drei Gruppen zusammen mit ihren jeweiligen Funktionen in der Biotransformation auf.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biotransformation Subkategorie
<b>a</b>	AF045464	Aflatoxin B1 aldehyde reductase	Phase I
	AB008423	Cytochrome P450 2D2	Phase I
	J02869	Cytochrome P450 2D5	Phase I
	M20131	Cytochrome P450 2E1	Phase I
	M26125	Epoxide hydrolase	Phase I
	M64755	Cysteine sulfinic acid decarboxylase	Phase II
	AA892234	Glutathione S-transferase 3	Phase II
	D10693	Histamine N-methyltransferase	Phase II
	AA892382	N-acetyltransferase Camello 1	Phase II
	L19998	Sulfotransferase 1A1	Phase II
	AA926193	Sulfotransferase 1C2	Phase II
	AB008807	Glutathione transferase omega 1	Phase II   GSH metabolism
	AI012802	Hydroxyacylglutathione hydrolase	GSH metabolism
	D79981	OAT-K1/K2	Phase III
<b>b</b>	M60753	Catechol-O-methyltransferase	Phase II
	D38061	UDP-glucuronosyltransferase 1A6	Phase II
<b>c</b>	M60322	Aldehyde reductase 1	Phase I
	M26125	Epoxide hydrolase 1	Phase I
	J02679	NADPH-Quinone Oxidoreductase (Diaphorase)	Phase I
	AA892520	Synaptic vesicle membrane protein	Phase I
	J02810	Glutathione-S-transferase M1 (Yb1)	Phase II
	H32189	Glutathione-S-transferase M2 (Yb2)	Phase II
	S72506	Glutathione-S-transferase A5 (Yc2 )	Phase II
	AI012589	Glutathione-S-transferase P1	Phase II
	U06273	UDP-glucuronosyltransferase 2B12	Phase II

Tab. 16: Gene mit Funktionen in der Biotransformation.

Die Gene wurden entsprechend **Abb. 42** in *cluster a-c* geordnet.

### 3.6.2.5 *Transport*

HgCl<sub>2</sub> beeinflusste die Expression von insgesamt 24 Genen, denen eine Funktion bei Transportprozessen zugeschrieben wird. Durch Anwendung des *k-means* Algorithmus liessen sich Gene mit ähnlichem Expressionprofil in zwei verschiedene *cluster* einteilen (**Abb. 43**). Die genauen Funktionen der Gene bei Transportprozessen wurden in **Tab. 17** für die beiden *cluster* zusammengefasst.

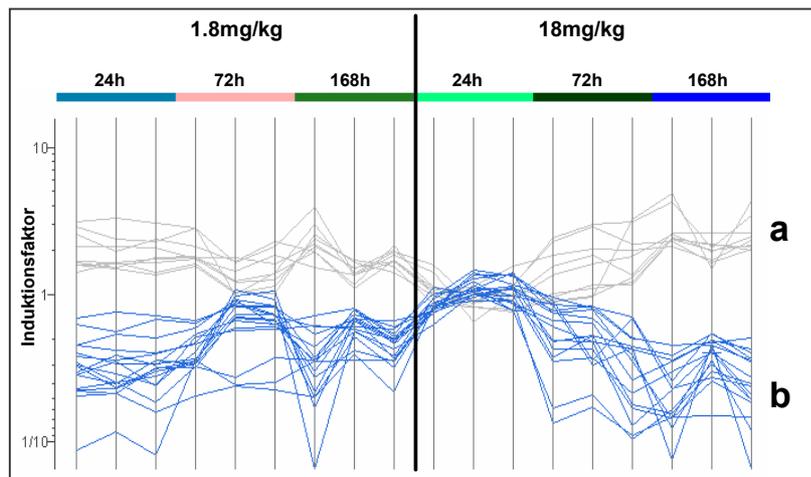


Abb. 43: *K-means clustering* von Genen mit Funktion bei Transportprozessen.

Darstellung der Expressionsprofile der einzelnen Gene. Horizontal: Dosisgruppen. Vertikal: Induktionsfaktoren der Gene. Die Buchstaben **a** und **b** bezeichnen die jeweiligen *cluster*.

Gene aus *cluster a* wiesen in den niedrigen Dosisgruppen ein über die Zeit leicht abnehmendes Expressionsprofil auf, während sie in den hohen Dosisgruppen über die Zeit deutlich gegenüber der Kontrolle induziert erschienen. Gene aus *cluster b* zeigten ein zu *cluster a* genau gegensätzliches Profil. Nach Administration von 1.8mg/kg HgCl<sub>2</sub> wurde ihre Expression mit Zunahme der Behandlungsdauer leicht induziert, während bei 18mg/kg HgCl<sub>2</sub> eine mit der Zeit immer deutlicher gegenüber der Kontrolle verringerte Expression beobachtet wurde.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Transport Subkategorie
<b>a</b>	AI171962	Annexin I (Calpactin II)	Intracellular: Ca <sup>2+</sup> release / Exocytosis
	AA874928	Sorting nexin 4	Intracellular: Endocytosis
	AB010119	TCTEX-1 Dynein light chain	Intracellular: Vesicle transport
	D01046	Ras-related GTP-binding protein 11B	Intracellular: Vesicle transport
	AI009806	Dynein light chain 1	Intracellular: Vesicle transport
	AA875102	Small nuclear ribonucleoprotein E	Intracellular: Nuclear transport
	L06096	ITPR3	Membrane: Ca <sup>2+</sup> release
	M13979	GLUT1	Membrane: Glucose transport
<b>b</b>	X76456	Alpha-albumin	Extracellular: Plasma protein
	L34049	LDL receptor-rel. protein 2 (Megalin)(GP 330)	Intracellular: Exo / Endocytosis
	AF031430	Syntaxin 7	Intracellular: Vesicle transport
	J05510	ITPR1	Membrane: Ca <sup>2+</sup> release
	AA891726	Na <sup>+</sup> -dependent phosphate transporter I	Membrane Transport (Na <sup>+</sup> -dep.)
	AB013455	Na <sup>+</sup> -dependent phosphate transporter II	Membrane Transport (Na <sup>+</sup> -dep.)
	U12973	XTRP2 Na <sup>+</sup> / Cl <sup>-</sup> -dependent- solute transporter	Membrane Transport (Na <sup>+</sup> -dep.)
	S76742	XTRP3 Na <sup>+</sup> / Cl <sup>-</sup> -dependent- solute transporter	Membrane Transport (Na <sup>+</sup> -dep.)
	AA892468	Protease serine 8 (prostasin)	Membrane Transport (Na <sup>+</sup> -dep.)
	M80804	Neutral and basic amino acid transport protein	Membrane Transport (Amino Acid)
	D83044	OCT2	Membrane Transport (Anion)
	AF048828	Voltage-dep. anion-selective channel protein 1	Membrane Transport (Anion)
	AF080468	Glucose-6-phosphate translocase	Membrane Transport (Carboh.)
	U84727	2-oxoglutarate/malate carrier protein	Membrane Transport (Carboh.)
	AI232096	Peptide transporter 2	Membrane Transport (Peptide)
	X67948	Aquaporin 1	Membrane Transport (Water)

Tab. 17: Gene mit Funktionen bei Transportprozessen.

Die Gene wurden entsprechend **Abb. 43** in *cluster a* und *b* geordnet.

Auffallend ist hierbei, dass in *cluster a* hauptsächlich Gene vertreten waren, die bei intrazellulären Transportprozessen und hier vor allem beim Transport von Vesikeln eine Rolle spielen. In *cluster b* dagegen fanden sich hauptsächlich Gene mit Funktionen im Natrium-abhängigen Membrantransport.

### **3.6.3 Veränderungen der Genexpression in PTC Zellen der Ratte nach Behandlung mit Quecksilber-II-chlorid**

Die Ratten-PTC aus zwei unabhängigen Zellpräparationen wurden jeweils mit 10µM und 30µM HgCl<sub>2</sub> behandelt und die RNA nach 24h bzw. 72h Behandlungsdauer geerntet. Die RNA Proben wurden anschliessend individuell auf Oligonukleotid-Arrays hybridisiert und die Expressionsdaten mit den Daten der unbehandelten Zellen des entsprechenden Zeitpunktes in einem T-Test verglichen.

Gene, deren Expression sich um mehr als den Faktor zwei zwischen behandelten Zellen und Kontrollzellen unterschied, wurden als signifikant differenziell reguliert angesehen und sind in **Tab.18** zusammengefasst.

p = 0.01		24h	72h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
HgCl <sub>2</sub>	10µM	5	18	21	28
	30µM	2	19	19	

Tab. 18: Signifikant regulierte Gene (FC>|2|) nach Behandlung von PTC mit HgCl<sub>2</sub>.

Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der behandelten Zellen mit denen der jeweiligen Kontrollzellen im T-Test (p=0.01) ermittelt.

Vergleichbar mit den *in vivo* Daten wurden auch *in vitro* zunächst bei der niedrigeren Behandlungskonzentration nach 24h mehr Gene in ihrer Expression differenziell reguliert als bei der hohen Behandlungskonzentration. Nach 72h Behandlung war die Anzahl der regulierten Gene bei beiden Behandlungskonzentrationen nahezu identisch. Unter den gewählten statistischen Bedingungen hatte die Behandlung von PTC mit 10µM und 30µM HgCl<sub>2</sub> Einfluss auf die Expression von insgesamt 28 verschiedenen Genen, wovon 12 Gene sowohl bei 10µM als auch bei 30µM differenziell reguliert wurden. In **Abb. 44** wurden diese 28 Gene wiederum gemäss ihrer Zugehörigkeit zu biochemischen Kategorien in einem „*ranking*“ dargestellt.

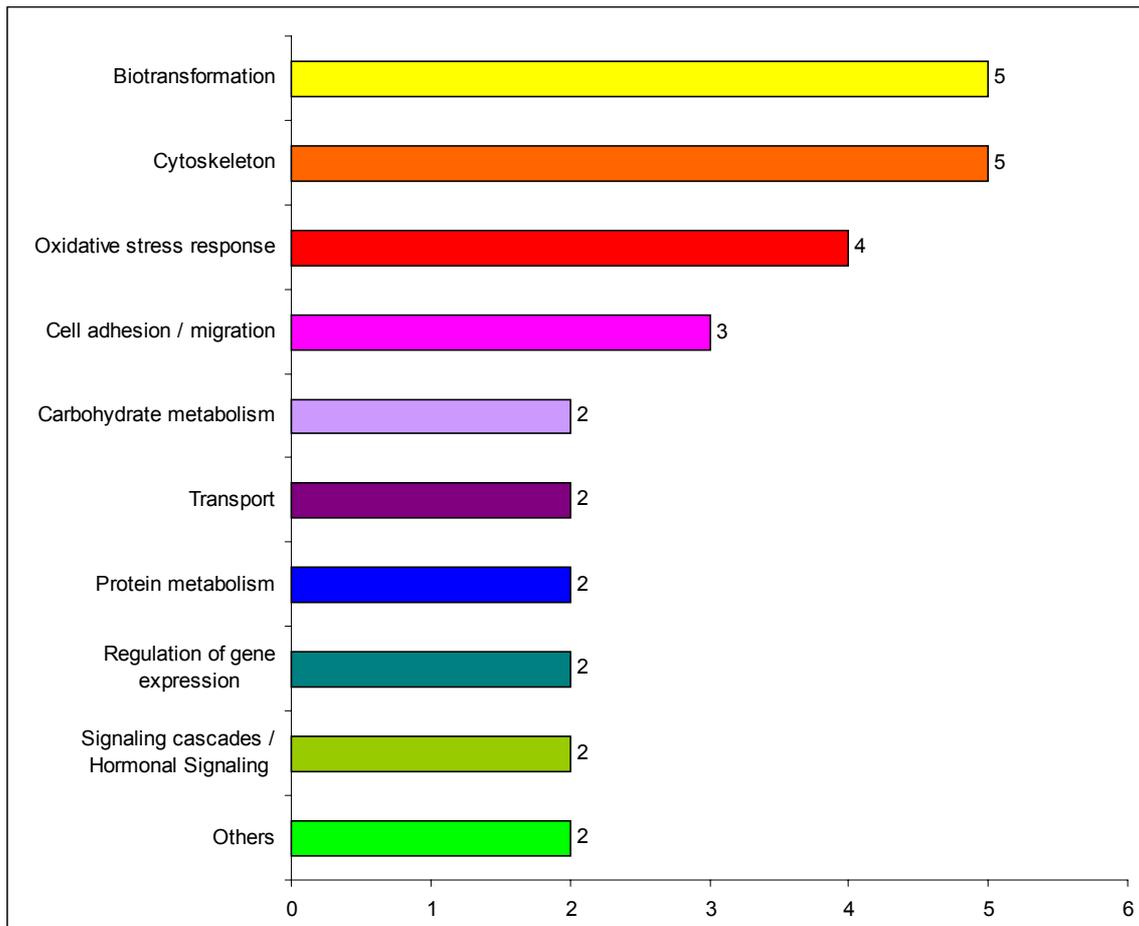


Abb. 44: *Ranking* der durch  $\text{HgCl}_2$ -Behandlung von Ratten-PTC veränderten biochemischen *pathways*.

Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

Die meisten differenziell regulierten Gene fanden sich im Gegensatz zu *in vivo* in den Kategorien „Biotransformation“ und „Zytoskelett“, gefolgt von „Oxidativer Stress“ und „Zelladhäsion / -migration“. Den Kategorien „Kohlenhydratmetabolismus“, „Proteinmetabolismus“, „Transport“, „Regulation der Genexpression“, und „Signaltransduktion“ konnten jeweils zwei Gene zugeordnet werden.

Die durch  $\text{HgCl}_2$ -Behandlung von PTC signifikant regulierten Gene sind in **Tab. 19** entsprechend ihrer biochemischen Funktion zusammen mit ihren durchschnittlichen Induktionsfaktoren aufgelistet.

Kategorie	GenBank Acc.No	Genname	Subkategorie	24h		72h	
				10µM	30µM	10µM	30µM
Biotransformation	K01932 D38061	GST A1	Phase II	2.32	2.37	2.90	3.09
		UDP-glucuronosyltransferase 1A6	Phase II	2.19	1.73	3.20	3.09
	K00136 S72505 X62660	GST A2	Phase II	6.64	6.99	27.76	28.17
		GST A3	Phase II	3.88	3.55	5.19	4.81
		GST A4	Phase II	3.01	2.61	2.2	2.38
Zytoskelett	AF084186	Spectrin alpha chain	Zellmorphologie / -motilität	1.48	1.64	1.63	2.06
	AA875523	Myosin light chain alkali	Zellmorphologie / -motilität	0.87	0.78	0.68	0.44
	M83107	Transgelin	Bestandteil	0.40	0.38	0.23	0.24
	Z12152	Neurofilament triplet M protein	Intermediales Filament	2.54	2.86	3.45	4.24
	AF026505	Arg/Abl-interacting protein	Microtubuli	0.55	0.67	0.48	0.59
Oxidativer Stress	M11670	Catalase		2.49	2.54	2.44	2.98
	M21210	Glutathione peroxidase 1	GSH Metabolismus	1.87	1.87	2.48	2.36
	U66322	Dithiolethione-inducible gene-1	Lipidreparatur	2.39	2.31	8.13	8.69
	U63923	Thioredoxin reductase 1		1.98	1.98	3.52	3.36
Zelladhäsion / -migration	U57362	Collagen type XII alpha 1	ECM	0.65	0.59	0.45	0.46
	U09401	Tenascin C	ECM	0.45	0.35	0.34	0.26
	AB013732	UDP-glucose 6-dehydrogenase	ECM	2.22	2.17	2.74	2.85
Kohlenhydrat-metabolismus	U09256	Transketolase		1.71	1.74	2.37	2.65
	AB013732	UDP-glucose 6-dehydrogenase		2.22	2.17	2.74	2.85
Transport	AA892920	Renal Na <sup>+</sup> -dependent Pi transport protein 1	Ionentransport	3.76	2.81	6.25	6.12
	AA875523	Myosin light chain alkali	Vesikeltransport	0.87	0.78	0.68	0.44
Protein-metabolismus	J04591	Dipeptidyl peptidase4	Proteinabbau	1.34	1.36	1.75	2.17
	J02646	EIF-2A	Translation	2.30	2.16	1.21	1.90
Regulation der Gen-expression	AA900476	Cbp/p300-interacting transactivator 2	Coaktivator	1.60	1.59	1.57	2.22
	U50736	Ankyrin-like repeat protein	Corepressor	0.72	0.67	0.47	0.47
Signaltransduktion / Hormonelle Signaltransduktion	J04591	Dipeptidyl peptidase4	Insulin / Glukagon Pathway	1.34	1.36	1.75	2.17
	Y08355	PKC-zeta-interacting protein	PLC-PKC Pathway	1.53	1.57	1.75	2.02
Andere	U66322	Dithiolethione-inducible gene-1	Lipidmediator	2.39	2.31	8.13	8.69
	AA874802	Histone H1.0	Organellstruktur	0.74	0.70	0.50	0.57

Tab. 19: Durch HgCl<sub>2</sub>-Behandlung *in vitro* differenziell regulierte Gene.

Dargestellt sind die durchschnittlichen Induktionsfaktoren aus zwei unabhängigen Experimenten.

Rot = hochreguliert. Grün = runterreguliert.

Auffällig an den in **Tab. 19** aufgelisteten Genen war die zum Teil sehr starke Induktion der Glutathion-S-Transferasen und die verstärkte Expression von Genen, die eine Rolle bei der Beantwortung von oxidativem Stress spielen, sowie des renalen Natrium-abhängigen Phosphattransporters.

### 3.6.4 Vergleich der differenziell regulierten Gene in der Ratte *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit Quecksilber-(II)-chlorid

Die aus einem T-Test erhaltenen p-Werte geben Auskunft darüber, mit welcher Signifikanz sich die Expressionsdaten eines Gens in behandelter Probe und Kontrolle unterscheiden. Zum Beispiel unterschied sich die Expression der 28 durch HgCl<sub>2</sub>-Behandlung von Ratten-PTC differenziell regulierten Gene mit einer

Signifikanz von mindestens  $p = 0.01$  von ihrer entsprechenden Expression in den Kontrollzellen. Die Berechnung der p-Werte, mit denen sich die Expression dieser 28 *in vitro* differenziell regulierten Gene in den *in vivo* Versuchen von den Kontrolltieren unterschied, kann Rückschlüsse bezüglich der Korrelation von *in vivo* und *in vitro* Experimenten erlauben. Dasselbe gilt für die Expression der 335 *in vivo* differenziell regulierten Gene in den Zellkulturexperimenten. **Tab. 20** gibt in der mittleren Spalte die prozentualen Anteile der *in vitro* differenziell regulierten Gene an, die *in vivo* ebenfalls einen signifikanten Expressionsunterschied zwischen behandelter Probe und Kontrolle aufwiesen und in der rechten Spalte den Prozentsatz der *in vivo* differenziell regulierten Gene, die auch *in vitro* eine signifikante Veränderung der Genexpression aufwiesen.

Signifikanz	<i>In vitro</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vivo</i> signifikant reguliert waren [%]	<i>In vivo</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vitro</i> signifikant reguliert waren [%]
$p < 0.1$	87	27.9
$p > 0.1$	13	72.1

Tab. 20: Prozentuale Anteile und Signifikanz der *in vitro* bzw. *in vivo* durch  $\text{HgCl}_2$  differenziell regulierten Gene im jeweils anderen Modell.

Aus **Tab. 20** ist ersichtlich, dass ca. 87% der *in vitro* differenziell regulierten Gene auch *in vivo* signifikant ( $p < 0.1$ ) durch Behandlung mit  $\text{HgCl}_2$  reguliert wurden. Der Anteil der *in vivo* differenziell regulierten Gene, die auch *in vitro* eine signifikante Regulation zeigten, betrug dagegen lediglich ca. 28%, während ca. 72% dieser Gene *in vitro* überhaupt keine Expressionsveränderungen zeigten.

### 3.6.5 Veränderungen der Genexpression im Nierencortexgewebe der Ratte nach Behandlung mit Paraquat

Analog den mit  $\text{HgCl}_2$  behandelten Tieren, wurden auch die Expressionsdaten von jeweils drei Paraquat-behandelten Rattennieren jeder Dosisgruppe mit den Expressionsdaten der gepoolten Kontrolltiere des entsprechenden Zeitpunktes in einem T-Test verglichen. Die Durchführung des T-Tests erfolgte mit etwas geringerer Stringenz als bei der Auswertung der  $\text{HgCl}_2$ -Expressionsdaten, da die Anzahl der

durch Paraquat regulierten Gene deutlich geringer war und somit auf eine engere Eingrenzung der Daten verzichtet werden konnte. In **Tab. 21** ist die Anzahl der Gene aufgelistet, deren Expression sich zwischen den Dosisgruppen und den dazugehörigen Kontrollgruppen bei  $p = 0.05$  um mindestens den Faktor 1.7 unterschied.

$p = 0.05$	24h	72h	168h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
<b>Paraquat 3.5mg/kg</b>	12	-	13	21	143
<b>35mg/kg</b>	23	6	121	132	

Tab. 21: Anzahl der differenziell regulierten Gene ( $FC > |1.7|$ ) nach Paraquat-Behandlung.

Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der Dosisgruppen mit denen der jeweiligen Kontrollgruppe im T-Test ( $p=0.05$ ) ermittelt.

Nach der Behandlung mit 3.5mg/kg Paraquat wurden nach 24h und 168h nahezu gleich viele Gene reguliert (12 und 13), während nach 72h keine Unterschiede in der Genexpression zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden konnten. In den hohen Dosisgruppen wurden zu allen Zeitpunkten mehr Gene differenziell reguliert, wobei auch hier nach 72h weniger Expressionsveränderungen als nach 24h auftraten. Die meisten Gene wurden durch 35mg/kg Paraquat nach 168stündiger Behandlung im Nierencortex der Ratte differenziell reguliert.

Nach dem Aussortieren von Überschneidungen und EST's blieben insgesamt 157 Gene übrig, deren Expression im Nierencortex nach Paraquat-Behandlung signifikant verändert war.

**Abb. 45** zeigt ein „*ranking*“ der biochemischen Kategorien, in welche die 157 differenziell regulierten Gene eingeordnet werden konnten. Wiederum wurden manche Gene mehreren Kategorien zugeteilt, wenn dadurch eine bessere Charakterisierung der Genfunktion möglich war.

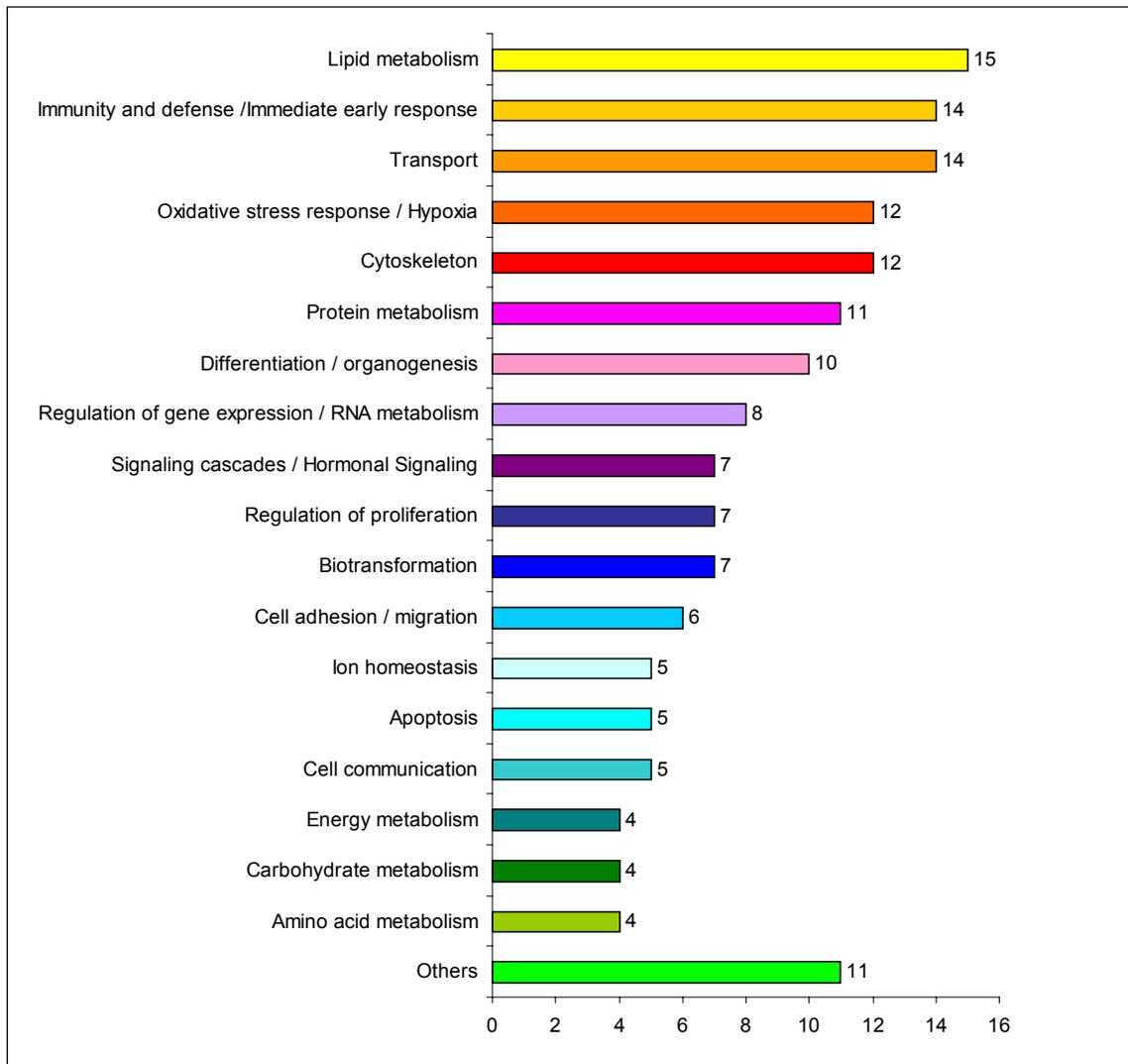


Abb. 45: *Ranking* der durch Paraquat-Behandlung in der Ratte veränderten biochemischen *pathways*. Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

Unter Paraquat-Einfluss wurden hauptsächlich Gene transkriptionell verändert, die eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen, dicht gefolgt von Genen mit Funktionen in der Immunabwehr oder bei Transportprozessen. Jeweils zwölf regulierte Gene erfüllen Aufgaben bei der Beantwortung von oxidativem Stress und sind am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt. Jeweils elf, zehn und acht regulierte Gene konnten den Kategorien „Proteinmetabolismus“, „Differenzierung“ und „Regulation der Genexpression“ zugeordnet werden. Die Darstellung der restlichen Kategorien in **Abb. 45** dient wiederum der Vollständigkeit, auf ihre Interpretation wurde zugunsten einer ausführlichen Analyse der obersten Kategorien des *rankings* verzichtet.

### 3.6.5.1 Lipidmetabolismus, oxidativer Stress, Proteinmetabolismus und Signaltransduktion

Die Gene aus den Kategorien „Lipidmetabolismus“, „oxidativer Stress“, „Proteinmetabolismus“ und „Signaltransduktion“ wurden gemeinsam analysiert, da ihre jeweiligen biochemischen Funktionen in einem engem Zusammenhang stehen. Aus **Abb. 46** ist ersichtlich, dass die Gene aus diesen Kategorien drei verschiedene Expressionsprofile aufwiesen.

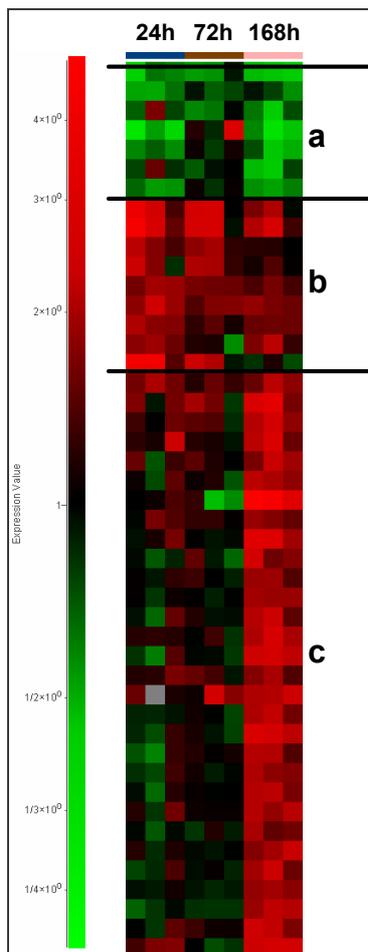


Abb. 46: *K-means clustering* der Gene aus den Kategorien „Lipidmetabolismus“, „Oxidativer Stress“, Proteinmetabolismus“ und Signaltransduktion.

Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder. Die Buchstaben **a-c** bezeichnen die jeweiligen *cluster*. Dargestellt sind die drei Behandlungszeitpunkte der mit 35mg/kg Paraquat behandelten Tiere.

Die Expression der Gene in *cluster a* war während der gesamten Versuchszeit gegenüber der Kontrolle vermindert. In *cluster b* finden sich Gene, deren Expression nach 24h Paraquat-Behandlung und zum Teil noch nach 72h stark induziert war, die nach 168h jedoch wieder eine mit den Kontrolltieren vergleichbare Expression erreichten. *cluster c* besteht dagegen aus Genen, deren Expression erst nach 168h Paraquat-Behandlung stark induziert wurde, wobei nach 24h und 72h noch keine Veränderungen erkennbar waren.

Die Gene aus **Abb. 46** sind zusammen mit ihren biochemischen Funktionen in **Tab. 22** aufgeführt.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	S79304	Cytochrome c oxidase subunit I	Energiemetabolismus
	K00750	Cytochrome C	Energiemetabolismus
	AF036761	Acyl-CoA desaturase 2	Fettsäuresynthese
	AA800220	Lysophospholipase 1	Lyse von Phospholipiden
	AA858640	HSP60	Proteinreparatur
	AI236721	14-3-3 protein gamma	Signaltransduktion
	AA849769	Follistatin-related protein 1	Signaltransduktion / TGFβ <i>Pathway</i>
<b>b</b>	AI013472	DRI 42	Differenzierung / DAG Bereitstellung
	J02749	Acetyl-CoA acyltransferase 1	Fettsäureoxidation
	Y09333	Acyl coenzyme A thioester hydrolase	Fettsäureoxidation
	D00729	Delta3, delta2-enoyl-CoA isomerase	Fettsäureoxidation
	D90109	Long-chain acyl-CoA synthetase 2	Fettsäureoxidation
	AB005743	Fatty acid translocase (CD36)	Fettsäuretransport
	M21210	Glutathione peroxidase 1	Oxidativer Stress / GSH Metabolismus
	AF069782	Nucleolar protein 5	Translation
<b>c</b>	M35826	NADH-ubiquinone oxidoreductase	Energiemetabolismus
	AI176422	e-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Energiemetabolismus
	AA892012	Glutamate oxaloacetate transaminase-2	Fettsäureaufnahme
	D16478	Long-chain enoyl-CoA hydratase	Fettsäureoxidation
	J02844	Carnitine O-octanoyltransferase	Fettsäureoxidation
	J02752	Acyl-CoA oxidase 1	Fettsäureoxidation
	M00002	Apolipoprotein A4	Lipidtransport
	AI014169	Thioredoxin interacting protein	Oxidativer Stress / GSH Metabolismus
	AA891286	Thioredoxin reductase 1	Oxidativer Stress / Protektion
	M19936	Sulfated glycoprotein 1	Oxidativer Stress / Protektion
	D49708	Arg/ser-rich splicing factor 10	Oxidativer Stress / <i>Splicing</i> -Faktor
	AA818593	Phosphatidate phosphohydrolase 2	Phospholipidabbau
	M21476	Protein disulfide isomerase	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	L18889	Calnexin	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AF039890	Aminopeptidase N	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	D90404	Cathepsin C	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AI071507	Tripeptidyl-peptidase II	Proteinabbau
	AA108277	HSP 105	Proteinreparatur
	S69315	GRP 94	Proteinreparatur
	AA685903	HSP 84	Proteinreparatur
	S78556	GRP 75	Proteinreparatur
	S74572	Protein phosphatase 2C beta	Signaltransduktion
	M31322	Amyloid-like protein 2	Signaltransduktion
	S50461	GTP-binding protein alpha-12	Signaltransduktion / G-Protein
	M23572	Gene 33 polypeptide	Stresskinase <i>Pathway</i>
	AI231354	JNK2	Stresskinase <i>Pathway</i>

Tab. 22: Durch Paraquat regulierte Gene mit Funktionen im Lipid- und Proteinmetabolismus, in der Signaltransduktion und in der Reaktion auf oxidativen Stress.

Sortiert nach *clustern* aus **Abb. 46**.

Die Gene in *cluster a* wiesen unterschiedlichste biochemische Funktionen auf. In *cluster b* fanden sich gemäss **Tab. 22** hauptsächlich Gene, die bei der Fettsäureoxidation eine Rolle spielen, während die Gene in *cluster c* neben der Fettsäureoxidation vor allem Funktionen bei der Proteinmodifikation und –reparatur, sowie in der Reaktion auf Stresszustände erfüllen.

### 3.6.5.2 Immunabwehr und Akutphasereaktion

Die Expressionsprofile von Genen, die unter dem Einfluss von Paraquat im Nierencortex differenziell reguliert wurden und bei der Immunabwehr oder in der Akutphasereaktion eine Rolle spielen, wurden in **Abb. 47** dargestellt. Es sind zwei Gruppen zu erkennen: *cluster a* enthält Gene, deren Expression nach 168h Paraquat-Behandlung stark ansteigt, während die Expression der Gene in *cluster b* nach 168h im Vergleich zur Kontrolle abnimmt.

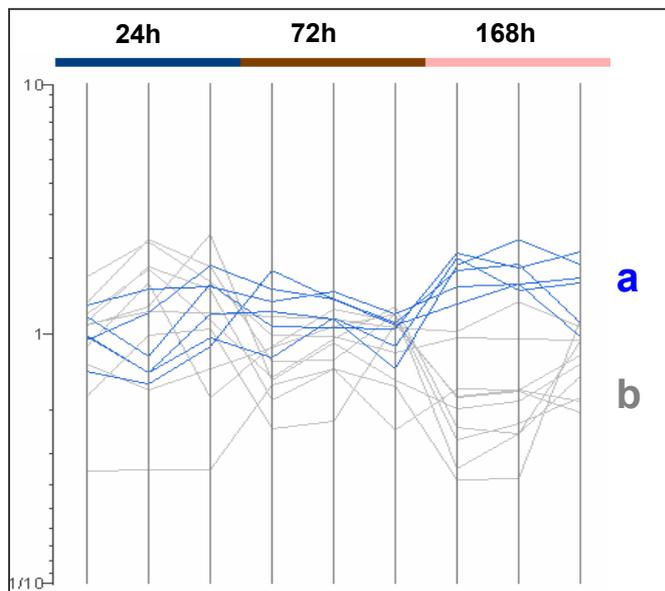


Abb. 47: Expressionsprofile von Genen mit Funktionen in der Immunabwehr. Die Skala links repräsentiert die Induktionsfaktoren. Die Buchstaben **a** und **b** bezeichnen die jeweiligen *cluster*. Dargestellt sind die drei Behandlungszeitpunkte der mit 35mg/kg Paraquat behandelten Tiere.

In **Tab. 23** sind wiederum die Gene zusammen mit ihrer biochemischen Funktion aufgelistet.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	L13025	Polymeric-immunoglobulin receptor	Adaptive Immunabwehr
	D90404	Cathepsin C	Adaptive Immunabwehr
	M19648	Tissue kallikrein	Blutgerinnung
	AJ222813	IL18	Zytokine
<b>b</b>	AF025308	MHC Ib RT1-Eu alpha chain	Antigenpräsentation
	X53054	MHC II RT1.D beta chain	Antigenpräsentation
	AF029240	MHC Ib RT1.S3	Antigenpräsentation
	AA800613	Zinc finger protein 36	Akutphasereaktion
	AF030091	Cyclin L	Akutphasereaktion
	X17053	MCP-1	Zytokine

Tab. 23: Durch Paraquat regulierte Gene mit Funktion in der Immunabwehr.

### 3.6.5.3 Transport

Ein hierarchisches *clustering* von differenziell regulierten Genen, die verschiedene Aufgaben bei Transportprozessen erfüllen, ist in **Abb. 48** dargestellt. *Cluster a* enthält zwei Gene, deren Expression nach 168h Stunden Paraquat-Behandlung gegenüber der Kontrolle stark abnimmt. *Cluster b* besteht aus einem einzigen Gen, das bereits nach 24h durch Paraquat induziert wurde, nach 72h und 168h jedoch keine veränderte Expression gegenüber der Kontrolle aufwies. In **Tab. 24** fällt auf, dass die meisten Gene aus *cluster c*, deren Expression erst nach 168h stark induziert wird, entweder beim Golgi-bezogenen Transport oder beim Na<sup>+</sup>-abhängigen Membrantransport eine Rolle spielen.

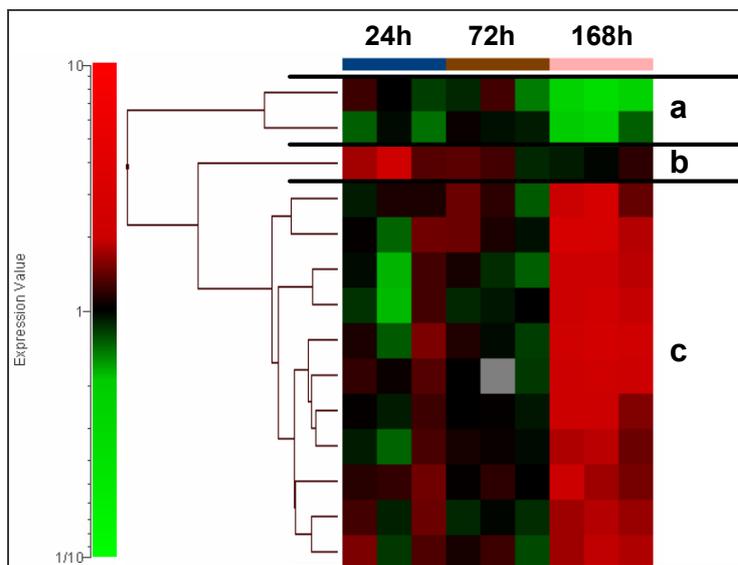


Abb. 48: Hierarchisches *clustering* von Genen mit Funktionen bei Transportprozessen. Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder. Die Buchstaben **a-c** bezeichnen die jeweiligen *cluster*.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	K03045	Plasma retinol-binding protein	Retinol Transport
	L38644	Importin beta-1	Nucleärer Transport
<b>b</b>	M96601	Taurine/beta-alanine transporter	Aminosäure Transport
<b>c</b>	AA926292	Trans-golgi network protein 1	Golgi-bezogener Transport
	AF052596	SNAP-23	Golgi-bezogener Transport
	U87971	Syntaxin 5	Golgi-bezogener Transport
	X92097	Cop-coated vesicle membrane protein	Golgi-bezogener Transport
	X53773	Adaptor-related protein complex	Golgi-bezogener Transport
	U39875	Calcineurin B	Golgi-bezogener Transport
	Y12635	Vacuolar proton pump	Sekretion aus Golgi-Vesikeln
	U28504	Na <sup>+</sup> -dep. Phosphate Transporter I	Na <sup>+</sup> -abhängiger Membrantransport
	M28647	Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Na <sup>+</sup> -abhängiger Membrantransport
	U15098	Excitatory amino acid transporter 2	Na <sup>+</sup> -abhängiger Membrantransport
	S70011	Tricarboxylate carrier protein	Mitochondrieller Membrantransport

Tab. 24: Gene mit Funktionen bei Transportprozessen.

Gruppiert entsprechend den *clustern a-c* aus **Abb. 48**.

### **3.6.6 Veränderungen der Genexpression in PTC Zellen der Ratte nach Behandlung mit Paraquat**

Ratten-PTC aus mehreren unabhängigen Präparationen wurden für 24h und 72h mit 50µM und 150µM Paraquat inkubiert und auf separate Oligonukleotid-Mikroarrays hybridisiert. Nach Kontrolle der Qualität der Hybridisierungen kamen drei der 50µM Proben, die für 24h und zwei der 50µM Proben, die für 72h inkubiert worden sind, für die Auswertung in Frage. Bei den mit 150µM Paraquat behandelten Proben wurden vier verschiedene Präparationen ausgewertet. Die RNA-Qualität der für 72h mit 150µM Paraquat inkubierten Proben war für eine Hybridisierung auf Mikroarrays nicht ausreichend, deshalb wurden aus dieser Konzentrationsgruppe keine Daten erhoben. Die Expressionsdaten der übrigen behandelten Proben wurden in einem T-Test mit der Expression in den entsprechenden Kontrollzellen verglichen. Differenziell regulierte Gene sind in **Tab. 25** zusammengefasst.

p = 0.005		24h	72h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
Paraquat	50µM	2	9	9	91
	150µM	98	-	85	

Tab. 25: Signifikant regulierte Gene ( $FC > |1.7|$ ) nach Behandlung von PTC mit Paraquat.

Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der behandelten Zellen mit denen der jeweiligen Kontrollzellen im T-Test ( $p=0.005$ ) ermittelt.

Die Behandlung von Ratten-PTC mit 50µM Paraquat induzierte nur geringe Veränderungen der Genexpression (insgesamt neun Gene) im Vergleich zur Kontrolle. Die hohe Paraquat-Konzentration führte dagegen schon nach 24h zu deutlichen Veränderungen in der Expression von 98 Genen.

In **Abb. 49** sind die gesamten durch Paraquat regulierten Gene nach Ausschluss der EST's in einem *ranking* gemäss ihrer biochemischen Funktion geordnet.

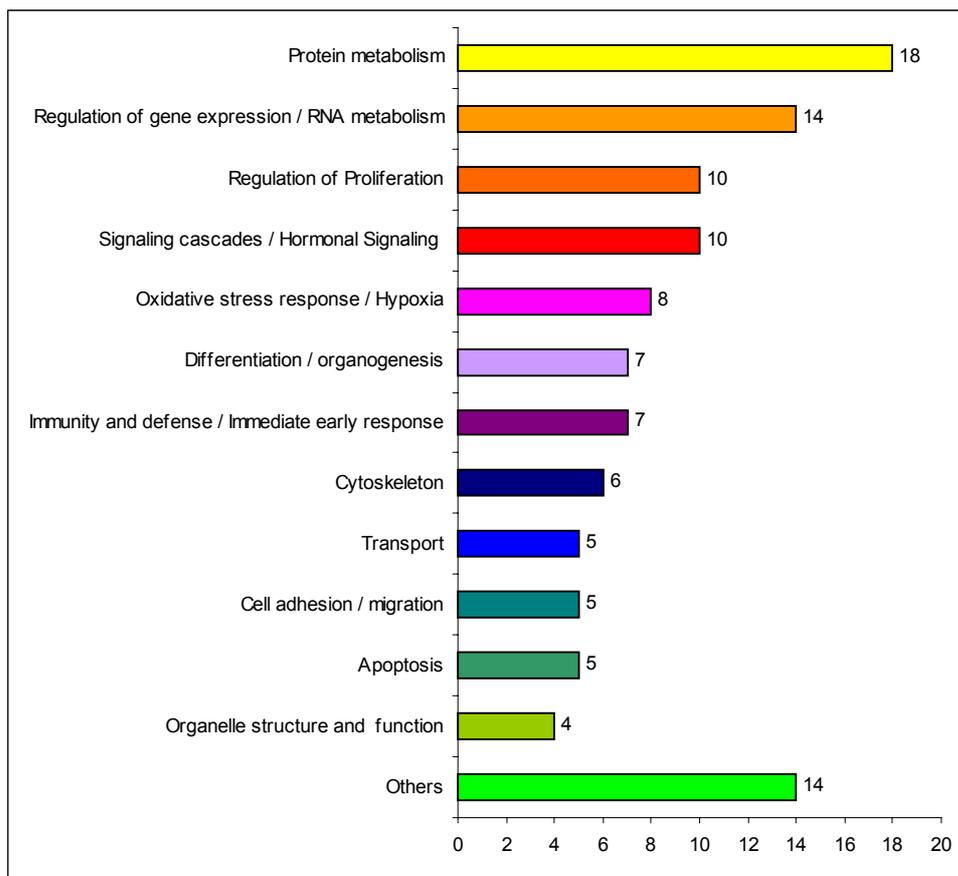


Abb. 49: „Ranking“ der durch Paraquat-Behandlung von Ratten-PTC veränderten biochemischen *pathways*.

Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

Gene mit Funktionen im Proteinmetabolismus sind in dieser Rangliste an oberster Stelle vertreten (18 Gene), gefolgt von der Kategorie „Regulation der Genexpression und RNA Metabolismus“ (14 Gene). Am dritthäufigsten (jeweils zehn Gene) wurden durch Paraquat-Behandlung solche Gene reguliert, die in der Signaltransduktion oder bei der Proliferation eine Rolle spielen. Die Kategorie „Oxidativer Stress“ folgte mit acht, die Kategorien „Differenzierung“ und „Immunabwehr“ mit jeweils sieben Genen. Die Expressionsprofile sämtlicher Gene aus den Kategorien 1-8 sind in **Abb. 50** dargestellt.

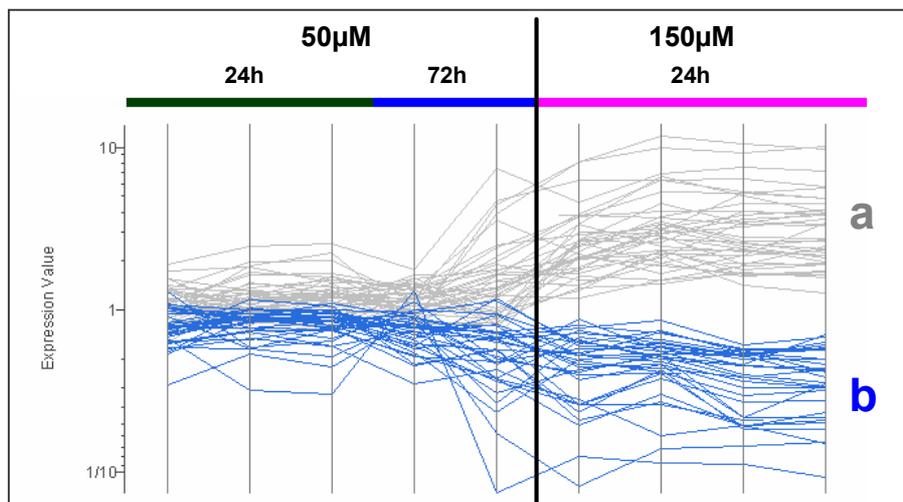


Abb. 50: Expressionsprofile der in Ratten-PTC durch Paraquat regulierten Gene. Horizontal: Dosisgruppen (Grün = 50µM, 24h; Blau = 50µM, 72h; Pink = 150µM, 24h). Vertikal: Expressionswerte der Gene.

Aus **Abb. 50** sind zwei deutliche Gruppen von Genen erkennbar. In *cluster a* finden sich Gene, die in der 150µM / 24h –Gruppe und zum Teil auch in der 50µM / 72h - Gruppe eine starke Induktion zeigten. Gene, die durch die hohe Dosis Paraquat, sowie zum Teil durch die niedrige Dosis nach 72h Behandlung, gegenüber der Kontrolle vermindert exprimiert wurden, wurden in *cluster b* zusammengefasst.

Die regulierten Gene sind entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu den biochemischen Kategorien in **Tab. 26-29** aufgelistet. Durch Paraquat-Behandlung wurden in den PTC der Ratte hauptsächlich Gene in ihrer Expression verändert, die bei der Reparatur von (oxidativen) DNA Schäden oder (oxidativen) Proteinschäden oder bei der Modifikation oder Faltung von Proteinen eine Rolle spielen (**Tab.26**). Weiterhin wurde eine starke Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren beobachtet, sowie eine verminderte Expression von Genen, die eine Funktion bei der Prozessierung von Prä-mRNA ausüben (**Tab. 27**). Ausserdem wurden durch Paraquat einige Gene

induziert, die Aufgaben in der Zellregeneration übernehmen (**Tab. 28**). Einflüsse von Paraquat auf die Signaltransduktion in den PTC wurden in **Tab. 29** dargestellt.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	U30186	GADD153	Reparatur oxidativer DNA-Schäden / proapoptotisch
	AA108308	Ubiquitin E3 ligase Mdm2	Reparatur oxidativer DNA-Schäden / antiapoptotisch
	AA875620	HSP 70.3	Reparatur oxidativer Protein-Schäden
	L16764	HSP 70-1/2	Reparatur oxidativer Protein-Schäden
	S62097	Geranylgeranyltransferase beta SU	Posttranslationelle Proteinmodifikation
<b>b</b>	A1014169	Thioredoxin interacting protein	Oxidativer Stress / GSH Metabolismus
	AF065387	Gamma-glutamyl carboxylase	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AF087431	Glycoprotein processing glucosidase I	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AF008554	Implantation-associated protein.	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	U21662	Mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AA945806	Ribosomal protein S14	Translation
	D45250	Proteasome activator 11S complex SU 2	Proteinabbau
	L18889	Calnexin	Proteinfaltung
	D78308	Calreticulin	Proteinfaltung
	AA891161	ER Oxidoreductin 1-L beta	Proteinfaltung
	U41853	Hypoxia up-regulated 1	Proteinfaltung
	M86870	Protein disulfide isomerase A4	Proteinfaltung
	AF077354	HSP 70.4	Reparatur oxidativer Protein-Schäden
	U48596	MEKK1	Stresskinase Pathway

Tab. 26: Gene mit Funktionen im Proteinmetabolismus und / oder in der Reaktion auf oxidativen Stress.

Gruppiert entsprechend den *clustern a+b* aus **Abb. 50**.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	AF104399	Cbp/p300-interacting transactivator 2	Co-Aktivatoren der Genexpression
	M63282	Activating transcription factor 3	Transkriptionsfaktor
	AF001417	Kruppel-like factor 6	Transkriptionsfaktor
	X63594	IKB alpha	Transkriptionsfaktor (über NFkB)
	A1639130	RNASE 1	RNA Abbau
	U77829	GAS5 Growth arrest specific 5	rRNA Aufbereitung
<b>b</b>	U08214	URE-B1 DNA binding protein	Co-Aktivatoren der Genexpression
	AF036335	NonO/p54nrb	Prä-mRNA Aufbereitung / Splicing
	A1170608	Zinc finger protein 265	Prä-mRNA Aufbereitung / Splicing
	A1639172	Stem-loop binding protein	Prä-mRNA Aufbereitung / -Stabilität
	D14048	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Prä-mRNA Aufbereitung / -Stabilität
	AA799523	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	Prä-mRNA Aufbereitung / -Transport

Tab. 27: Gene mit Funktion in der Regulation der Genexpression oder im RNA Metabolismus.

Gruppiert entsprechend den *clustern a+b* aus **Abb. 50**.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	U03416	Olfactomedin 1	Differenzierung
	S77528	C/EBP beta	Differenzierung / Transkriptionsfaktor
	U37101	Granulocyte colony stimulating factor	Regeneration / Wachstumsfaktor
	AI014163	NGF- inducible protein PC4	Regeneration / Wachstumsfaktor
	D30735	Hepatopoietin	Regeneration / Wachstumsfaktor
	U02315	Neuregulin-1	Regeneration / Wachstumsfaktor
	L26292	Krüppel-like factor 4	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung
	AF020618	Progression elevated gene 3	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung
	L32591	GADD45a	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung
U77829	GAS5	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung	
<b>b</b>	AI176461	E-selectin ligand 1	Regeneration / Wachstumsfaktor
	H31479	Tumor suppressor in lung cancer 1	Wachstumshemmer

Tab. 28: Gene mit Funktionen in der Zellproliferation oder Differenzierung.

Gruppieren entsprechend den *clustern a+b* aus **Abb. 50**.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	AJ011969	Growth differentiation factor 15	Signaltransduktion / Akt / ERK Pathway (antiapoptotisch)
	AA799418	Calcitonin gene-rel. peptide-recept. Component	Signaltransduktion / Ca <sup>2+</sup>
	AA891527	Four and a half LIM domains 2	Signaltransduktion / Integrin-gekoppelt (antiapoptotisch)
	AF013144	MAP-kinase phosphatase CPG21	Signaltransduktion / MAPK Pathway (-)
	Y08355	PKC-zeta-interacting protein	Signaltransduktion / PLC-PKC Pathway
	D30734	Ras GTPase-activating protein 2	Signaltransduktion / RTK Pathway (-)
<b>b</b>	AA892470	Calmodulin 1	Signaltransduktion / Ca <sup>2+</sup>
	AI102620	Olfactory receptor MOR260-5	Signaltransduktion / G-Protein-gekoppelt
	U48596	MEKK1	Signaltransduktion / MAPK Pathway
	AB005549	Partitioning-defective 3	Signaltransduktion / PLC-PKC Pathway
	M64780	Aggrin	Signaltransduktion / synaptisch (ACH)

Tab. 29: Gene mit Funktionen in der Signaltransduktion.

Gruppieren entsprechend den *clustern a+b* aus **Abb. 50**. Das Minuszeichen in Klammern hinter der biochemischen Funktion weist auf eine negative Regulation dieser Funktion hin.

### 3.6.7 Vergleich der differenziell regulierten Gene in der Ratte *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit Paraquat

Analog zu den Versuchen mit Quecksilber-II-chlorid wurde auch die Korrelation zwischen den durch Paraquat induzierten Expressionsveränderungen *in vivo* und *in vitro* mit Hilfe eines T-Tests verglichen. Die Signifikanzen, mit denen sich die Expression der *in vitro* durch Paraquat regulierten Gene *in vivo* von der Kontrolle unterschieden, wurden in **Tab. 30** (mittlere Spalte) zusammengefasst. In der rechten

Spalte finden sich dagegen die Signifikanzen, mit denen sich die *in vivo* regulierten Gene *in vitro* von der Kontrolle unterschieden.

Signifikanz	<i>In vitro</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vivo</i> signifikant reguliert waren [%]	<i>In vivo</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vitro</i> signifikant reguliert waren [%]
p<0.1	58.5	30.2
p>0.1	41.5	69.8

Tab. 30: Prozentuale Anteile und Signifikanz der *in vitro* bzw. *in vivo* durch Paraquat differenziell regulierten Gene im jeweils anderen Modell.

Aus **Tab. 30** ist ersichtlich, dass 58.5% der *in vitro* differenziell regulierten Gene auch *in vivo* signifikant ( $p < 0.1$ ) durch Behandlung mit Paraquat reguliert wurden. Der Anteil der *in vivo* differenziell regulierten Gene, die auch *in vitro* eine signifikante Regulation zeigten, betrug dagegen lediglich ca. 30%, während ca. 70% dieser Gene *in vitro* überhaupt keine Expressionsveränderungen zeigten.

### **3.6.8 Veränderungen der Genexpression im Nierencortexgewebe der Ratte nach Behandlung mit Puromycin**

Aus jeder Dosisgruppe der mit Puromycin behandelten Ratten wurden die Genexpressionsdaten von drei Tieren mit den Daten der gepoolten Kontrolltiere des entsprechenden Zeitpunktes in einem T-Test verglichen. Eine Ausnahme bildet die Dosisgruppe, die 45mg/kg Puromycin für 72h erhalten hat. Ein Tier erfüllte hier nicht alle Qualitätskriterien und wurde somit von den Analysen ausgeschlossen. Für die Auswertung der Puromycin-Experimente wurden die gleichen statistischen Kriterien angewandt wie bei den Paraquat-Experimenten. In **Tab. 31** ist die Anzahl der Gene aufgelistet, deren Expression sich zwischen den Puromycin-Dosisgruppen und den dazugehörigen Kontrollgruppen bei  $p = 0.05$  um mindestens den Faktor 1.7 unterschied.

$p = 0.05$	24h	72h	168h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
Puromycin 4.5mg/kg	6	9	14	21	45
45mg/kg	10	4	24	31	

Tab. 31: Anzahl der differenziell regulierten Gene ( $FC > |1.7|$ ) nach Puromycin-Behandlung. Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der Dosisgruppen mit denen der jeweiligen Kontrollgruppe im T-Test ( $p=0.05$ ) ermittelt.

Die Zahl an differenziell regulierten Genen erhöht sich bei der niedrigen Puromycin-Dosierung stetig mit zunehmender Behandlungsdauer. Auch in den Gruppen mit hoher Puromycin-Konzentration traten nach 168h die meisten differenziell exprimierten Gene auf (24 Gene). Allerdings ging bei der hohen Puromycin-Dosierung nach 72h die Anzahl der regulierten Gene (vier Gene) deutlich gegenüber dem 24h Zeitpunkt (zehn Gene) zurück.

Das *ranking* der biochemischen Kategorien, denen die differenziell regulierten Gene angehören, ist in **Abb. 51** dargestellt.

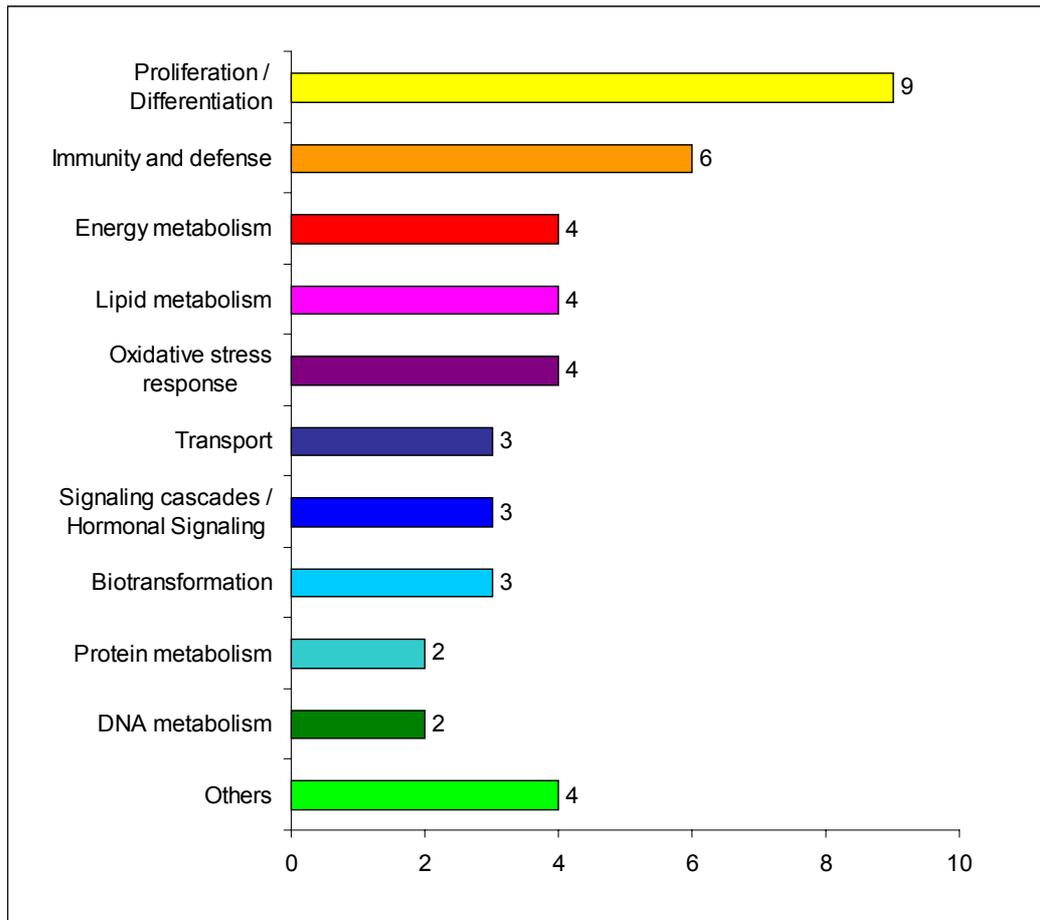


Abb. 51: „Ranking“ der durch Puromycin-Behandlung von Ratten veränderten biochemischen *pathways* in der Niere.

Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

Durch Puromycin-Behandlung der Ratten wurde im Nierencortex vor allem die Expression von Genen verändert, die eine Rolle bei der Zellproliferation oder Differenzierung spielen. Am zweithäufigsten wurde die Expression von Genen mit Funktionen in der Immunabwehr beeinflusst.

In **Abb. 52** wurden sämtliche *in vivo*-Puromycin-Experimente in einer Hauptkomponentenanalyse (PCA) miteinander verglichen.

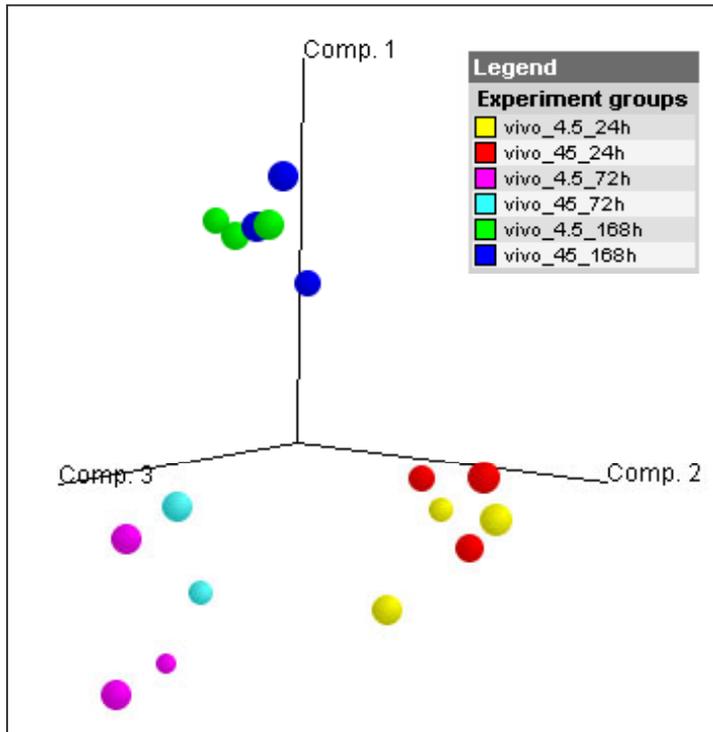


Abb. 52: PCA aller Puromycin-Experimente in vivo. Oben rechts ist die Farb-Zuordnung der Dosisgruppen angegeben.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Expressionsdaten eines Zeitpunktes sich immer in einem gemeinsamen Areal zusammenfinden, unabhängig davon, ob eine hohe oder eine niedrige Puromycin-Dosis verabreicht worden ist. Dies lässt darauf schließen, dass Puromycin hauptsächlich Zeit-abhängige und kaum Dosis-abhängige Veränderungen in der Genexpression hervorruft. Es muss folglich möglich sein, Gene zu identifizieren, deren Expression einem charakteristischen Zeitverlauf folgt. Tatsächlich konnten aus den differenziell regulierten Genen drei Gruppen mit unterschiedlichen Expressions-Zeit-Verläufen extrahiert werden (**Abb. 53**).

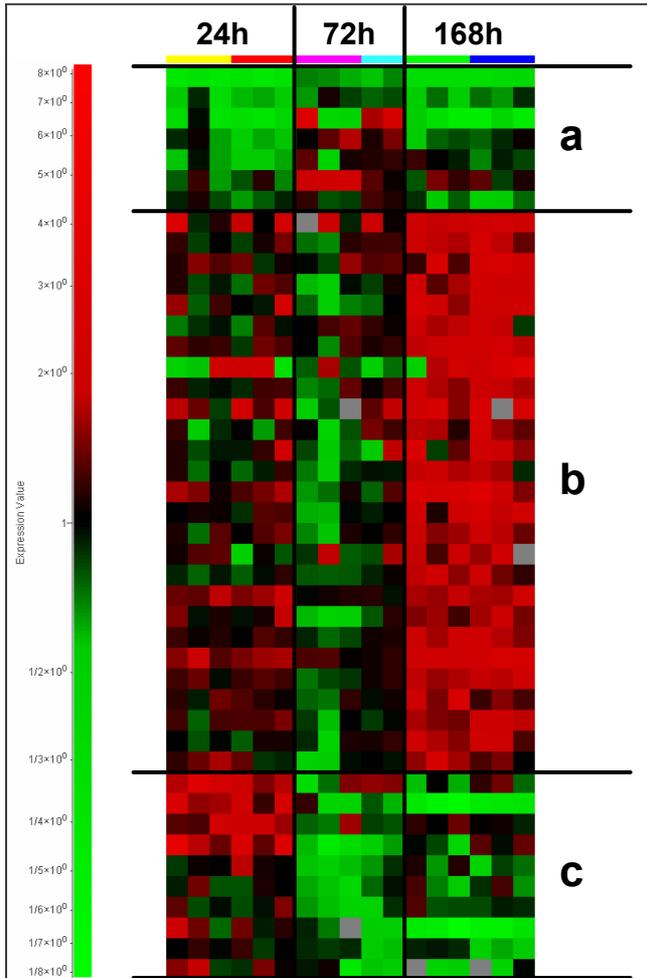


Abb. 53: *K-means* Analyse der durch Puromycin differenziell regulierten Gene. Horizontal: Darstellung der Dosisgruppen. Vertikal: Darstellung der Gene. Die Farbskala links gibt die Farbcodierung der Induktionsfaktoren wieder.

Gene, die nach 24h und 168h Puromycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle geringer exprimiert wurden, nach 72h jedoch eine gegenüber der Kontrolle vergleichbare oder höhere Expression aufwiesen, gruppierten sich in *cluster a*. In *cluster b* waren Gene zu finden, die nach 24h und 72h ein heterogenes Expressionsmuster zeigten, nach 168h jedoch deutlich gegenüber der Kontrolle induziert wurden. *cluster c* beinhaltete schliesslich Gene, die nach 24h leicht bis stark induziert waren, nach längerer Puromycin-Behandlung jedoch eine gegenüber der Kontrolle verminderte Expression aufwiesen. **Tab. 32** listet die Gene dieser drei *cluster* zusammen mit ihren biochemischen Funktionen auf.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion
<b>a</b>	J01435	Cytochrome c oxidase SU I	Energiemetabolismus
	D26439	CD1D	Antigenpräsentation / NK-Zell-Aktivierung
	AA891695	Ly6-A antigen	Adaptive Immunabwehr / T-Zell-Aktivierung
	AA926292	Trans-golgi network protein 1	Intrazellulärer Transport
	X15958	Enoyl-CoA hydratase 1	Fettsäureoxidation
<b>b</b>	AI044517	Excitatory amino acid transporter 2	Aminosäuretransport / synaptisch
	M30689	Ly6-B antigen	Adaptive Immunabwehr / T-Zell-Aktivierung
	D38061	UDP-glucuronosyltransferase 1A6	Biotransformation / Phase II
	M35826	NADH-ubiquinone oxidoreductase	Energiemetabolismus
	AI176422	e-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Energiemetabolismus
	U76714	Ferroportin I	Membrantransport (Eisen)
	D30649	Ectonucleotide pyrophosphatase 3	Nukleotidabbau
	X68041	Cu-Zn superoxide dismutase	Oxidativer Stress
	D49708	Arg/ser-rich splicing factor 10	Oxidativer Stress / Prä-mRNA-Splicing
	AA108277	HSP 105	Oxidativer Stress / Proteinreparatur
	AA685903	HSP 84	Oxidativer Stress / Proteinreparatur
	D90404	Cathepsin C	Proteinabbau
	Z22867	cGMP-inhibited phosphodiesterase B	Signaltransduktion / Insulin <i>Pathway</i>
	M57276	CD53	Signaltransduktion / PLC-PKC <i>Pathway</i>
	AI146195	Gamma adducin	Signaltransduktion / PLC-PKC <i>Pathway</i> / Zytoskelett
	M23572	Gene 33 polypeptide	Signaltransduktion / SAPK <i>Pathway</i>
	S74572	Protein phosphatase 2C beta	Signaltransduktion / Zellzyklus-Arrest
	L09656	Transcription factor 12	Transkriptionsfaktor
	AF069782	Nucleolar protein 5	Translation
	AI014135	Beta-carotene 15,15'-dioxygenase	Vitamin A Synthese
	X16043	Protein phosphatase 2A	Zellzyklus-Arrest
	D25233	Retinoblastoma protein	Zellzyklus-Arrest
	<b>c</b>	L13025	Polymeric-Ig receptor
D89375		Sulfotransferase 1B1	Biotransformation / Phase II
D45412		Protein tyrosine phosphatase BK	Differenzierung
X61295		L1 retroposon ORF2	DNA-Rekombination / Retrotransposon
M13100		LINE3	DNA-Rekombination / Retrotransposon
AI639233		Decorin	ECM
D00512		Acetyl-Co A acetyltransferase 1	Fettsäureoxidation

Tab. 32: Gene mit charakteristischem Expressions-Zeit-Profil nach Puromycin-Behandlung.

Gruppiert entsprechend den *clustern a-c* aus **Abb. 53**.

### 3.6.9 Veränderungen der Genexpression in PTC Zellen der Ratte nach Behandlung mit Puromycin

Für die Untersuchung der Genexpressionsveränderungen, die durch Puromycin-Behandlung von Ratten-PTC hervorgerufen werden wurden PTC aus zwei unabhängigen Präparationen mit 5µM und 15µM Puromycin für jeweils 24h und 72h behandelt. Signifikant differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Genexpression in den behandelten Gruppen mit der Genexpression in der jeweiligen Kontrollgruppe in einem T-Test ermittelt ( $p = 0.005$ ,  $FC > |1.7|$ ). Die Anzahl der differenziell regulierten Gene in den jeweiligen Gruppen ist aus **Tab. 33** zu entnehmen.

p = 0.005		24h	72h	Gesamt (ohne EST's)	Gesamt (beide Dosisgruppen, ohne EST's)
Puromycin	5µM	1	2	3	94
	15µM	47	58	91	

Tab. 33: Signifikant regulierte Gene ( $FC > |1.7|$ ) nach Behandlung von PTC mit Puromycin.

Differenziell regulierte Gene wurden durch Vergleich der Expressionswerte der behandelten Zellen mit denen der jeweiligen Kontrollzellen im T-Test ( $p=0.005$ ) ermittelt.

Die mit 5µM Puromycin inkubierten PTC zeigten kaum Veränderungen in ihrer Genexpression. Bei 15µM wurden nach 24h 47 Gene, nach 72h 58 Gene differenziell gegenüber der Kontrolle reguliert, wobei hier kaum Überschneidungen auftraten.

In **Abb. 54** wurden die biochemischen Kategorien nach Anzahl der zugeordneten regulierten Gene in einem *ranking* gruppiert.

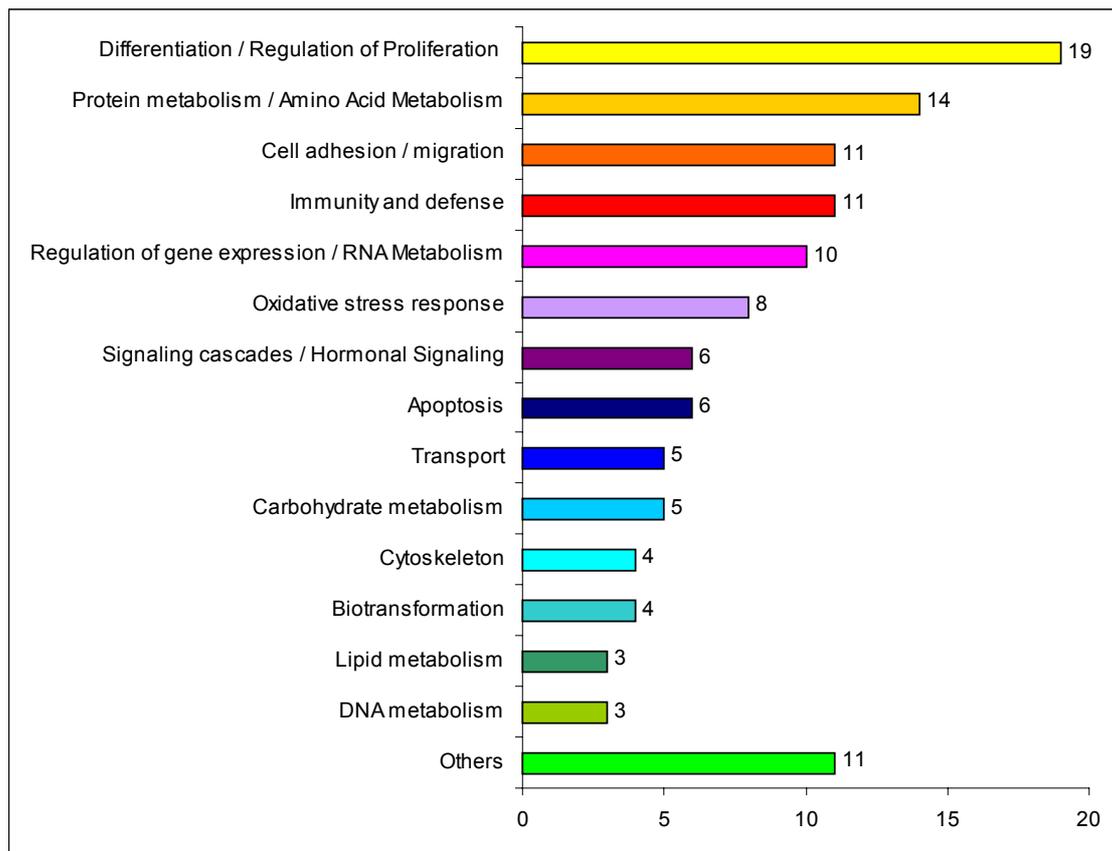


Abb. 54: *Ranking* der durch Puromycin-Behandlung von Ratten-PTC veränderten biochemischen *pathways*.

Die Zahl hinter den Balken gibt die Anzahl der Gene in der jeweiligen Kategorie an.

In Übereinstimmung mit den *in vivo* Ergebnissen wurden *in vitro* durch die Behandlung mit Puromycin ebenfalls hauptsächlich solche Gene differenziell reguliert, die eine Rolle bei der Zellproliferation oder –differenzierung spielen (19 Gene). Darauf folgten Gene mit Funktionen im Proteinmetabolismus (14 Gene), bei der Zelladhäsion und in der Immunabwehr (jeweils 11 Gene), bei der Regulation der Genexpression (10 Gene), sowie bei der Beantwortung von oxidativem Stress (8 Gene) oder bei der Signaltransduktion (7 Gene).

Bei der Untersuchung der Expressionsprofile der differenziell regulierten Gene aus diesen ersten acht biochemischen Kategorien stellte sich heraus, dass sämtliche Gene zwei unterschiedlichen Expressionsprofilen zugeordnet werden können (**Abb. 55**).

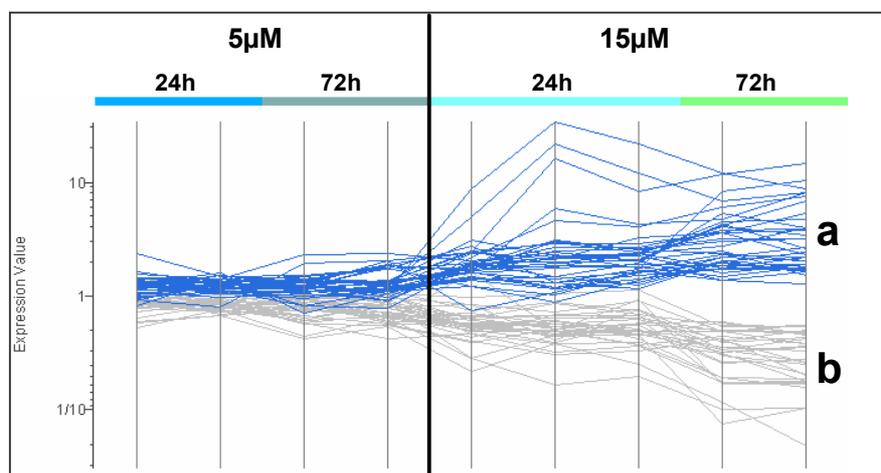


Abb. 55: Expressionsprofile der durch Puromycin in Ratten-PTC regulierten Gene aus den Kategorien 1-8.

Links: 5µM. Rechts: 15µM. Blau: *cluster a*. Grau: *cluster b*.

Während durch die Behandlung mit 5µM Puromycin praktisch keine Veränderungen in der Genexpression induziert wurden, nahm dagegen bei der Behandlung der Zellen mit 15µM Puromycin die Expression der Gene gegenüber der Kontrolle entweder mit der Dauer der Behandlung deutlich zu (*cluster a*) oder ab (*cluster b*).

Die Gene aus *cluster a* und *b* wurden in **Tab. 34**, **Tab. 35** und **Tab. 36** zusammen mit ihren biochemischen Funktionen aufgeführt.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Kategorie	
<b>a</b>	AI137043	Nerve growth factor beta	Differenzierung / Wachstumsfaktor	
	Z21780	Nucleoporin	Nuklearer Protein-Export	
	AJ007016	Protein tyrosine phosphatase 4A2	Proliferation / Differenzierung	
	AA799330	PELOTA	Proliferation	
	H33725	Assoc. molecule with SH3 domain of STAM	Regeneration / Proliferation	
	L13619	Growth response protein CL-6	Regeneration / Wachstum	
	AI014163	NGF- inducible protein PC4	Regeneration / Wachstumsfaktor	
	U49058	CTD-binding SR-like protein rA4	Transkription / Prä-mRNA Aufbereitung	
	U20796	Rev-ErbA-beta	Transkriptionsfaktor	
	AA900476	Cbp/p300-interacting transactivator 2	Transkriptionsfaktor / Co-Aktivator	
	M63282	Activating transcription factor 3	Transkriptionsfaktor / Regeneration	
	X52140	Integrin alpha-1	Zelladhäsion (ECM) / Regeneration	
	U30186	GADD 153	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung	
	L32591	GADD45	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung	
	AF020618	Progression elevated gene 3	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung	
	U77829	GAS5 Growth arrest specific 5	Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung / rRNA Aufbereitung	
	<b>b</b>	AB008538	CD166 antigen	Differenzierung
		L02529	Frizzled homolog 1	Differenzierung
AA900503		Jagged 1	Differenzierung (-), reguliert FGF	
U57362		Collagen type XII alpha 1	ECM	
AI179399		Collagen type V alpha 2	ECM	
AI169327		TIMP1	ECM / Regeneration	
M23697		t-PA	Fibrinolyse / Regeneration	
X14232		Fibroblast growth factor 1	Regeneration / Wachstumsfaktor	
AF030358		Small inducible cytokine D1	TNF / Zytokin Pathway / Chemotaxis	
M18416		EGR-1	Transkriptionsfaktor	
AJ001641		POU Transcription factor 3F3	Transkriptionsfaktor	
M83740		Dimerization cofactor of HNF1	Transkriptionsfaktor / Co-Aktivator	
AF003926		Orphan nuclear receptor EAR-2	Transkriptionsfaktor / Co-Repressor	
L26267		NFKB1	Transkriptionsfaktor / Zytokine	
X76489		CD9 antigen	Zelladhäsion	
AA891858		Cadherin 16 (KSP-cadherin)	Zelladhäsion	
M61875		CD44 antigen	Zelladhäsion (ECM) / Chemotaxis	
S61865		Syndecan 1	Zelladhäsion (ECM) / Chemotaxis	
AI231213		CD82 antigen	Zelladhäsion / T Zell Aktivierung	

Tab. 34: Gene mit Funktionen in der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Regulation der Genexpression und Zelladhäsion.

Gruppierung in *cluster a* und *b* entsprechend **Abb. 55**.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Kategorie
<b>a</b>	J04171	AST	Aminosäuremetabolismus
	AA893590	UIP48 UbcM4-interacting protein 48	Proteinabbau
	AB017188	Proteasome non-ATPase regulatory SU 4	Proteinabbau
	U30186	GADD 153	Reparatur oxidativer DNA-Schäden
	AA108308	Ubiquitin E3 ligase Mdm2	Reparatur oxidativer DNA-Schäden / antiapoptotisch
	U66322	Dithiolethione-inducible gene-1	Reparatur oxidativer Lipid-Schäden
	AA875620	HSP 70.3	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	L16764	HSP 70-1/2	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	M26686	Protein-L-isoaspartate O-methyltransferase	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	AJ011969	Growth differentiation factor 15	Signaltransduktion / Akt / ERK <i>Pathway</i> (antiapoptotisch)
	Z22867	cGMP-inhibited phosphodiesterase B	Signaltransduktion / Insulin <i>Pathway</i>
	H31907	G protein pathway suppressor 1	Signaltransduktion / MAPK <i>Pathway</i>
	S32038	c-Jun	Signaltransduktion / Stresskinase <i>Pathway</i>
	U05014	Eukaryotic initiation factor 5	Translation
<b>b</b>	U70825	5-oxoprolinase	Aminosäuresynthese
	AI230247	Selenoprotein P	Antioxidans
	S2856	Prolyl 4-hydroxylase alpha	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	AA859911	Sialyltransferase 5	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	D90404	Cathepsin C	Posttranslationelle Proteinmodifikation
	J04591	Dipeptidyl peptidase4	Proteinabbau / Signaltransduktion
	AF003926	Orphan nuclear receptor EAR-2	Signaltransduktion / Oestrogen <i>Pathway</i>

Tab. 35: Gene mit Funktionen im Proteinmetabolismus, bei der Beantwortung von oxidativem Stress und in der Signaltransduktion.

Gruppierung in *cluster a* und *b* entsprechend **Abb. 55**.

<i>cluster</i>	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Kategorie
<b>a</b>	S32038	c-Jun	Signaltransduktion / Stresskinase <i>Pathway</i>
	AI137043	Nerve growth factor beta	Akutphase Response
	AJ007016	Protein tyrosine phosphatase 4A2	Adhäsion / T Zell Aktivierung
<b>b</b>	AB008538	CD166 antigen	Adhäsion / T Zell Aktivierung
	M61875	CD44 antigen	Adhäsion / Chemotaxis
	AI231213	CD82 antigen	Adhäsion / T Zell Aktivierung
	M34253	Interferon regulatory factor 1	Antigenpräsentation
	AF065438	Cyclophilin C-associated protein	Unspezifische Immunabwehr (-)
	AF030358	Small inducible cytokine D1	TNF / Zytokin <i>Pathway</i> / Chemotaxis
	D90404	Cathepsin C	T Zell Aktivierung
L26267	NFKB1	Transkriptionsfaktor / Zytokine	

Tab. 36: Gene mit Funktionen in der Immunabwehr.

Gruppierung in *cluster a* und *b* entsprechend **Abb. 55**.

### 3.6.10 Vergleich der differenziell regulierten Gene in der Ratte *in vivo* und *in vitro* nach Behandlung mit Puromycin

Analog zu den Versuchen mit Quecksilber-II-chlorid und Paraquat wurde auch die Korrelation zwischen den durch Puromycin induzierten Expressionsveränderungen *in vivo* und *in vitro* mit Hilfe eines T-Tests verglichen. Die Signifikanzen, mit denen sich die Expression der *in vitro* durch Paraquat regulierten Gene *in vivo* von der Kontrolle unterschieden, wurden in **Tab. 37** (mittlere Spalte) zusammengefasst. In der rechten Spalte finden sich dagegen die Signifikanzen, mit denen sich die *in vivo* regulierten Gene *in vitro* von der Kontrolle unterschieden.

Signifikanz	<i>In vitro</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vivo</i> signifikant reguliert waren [%]	<i>In vivo</i> differenziell regulierte Gene, die auch <i>in vitro</i> signifikant reguliert waren [%]
p<0.1	50.6	37.9
p>0.1	49.4	62.1

Tab. 37: Prozentuale Anteile und Signifikanz der *in vitro* bzw. *in vivo* durch Puromycin differenziell regulierten Gene im jeweils anderen Modell.

Aus **Tab. 37** ist ersichtlich, dass 50.6% der *in vitro* differenziell regulierten Gene auch *in vivo* signifikant ( $p < 0.1$ ) durch Behandlung mit Paraquat reguliert wurden. Der Anteil der *in vivo* differenziell regulierten Gene, die auch *in vitro* eine signifikante Regulation zeigten, betrug dagegen nur ca. 38%, während ca. 62% dieser Gene *in vitro* überhaupt keine Expressionsveränderungen zeigten.

## 3.7 Vergleich der Genexpressionsprofile von drei verschiedenen Nephrotoxinen im Nierencortex der Ratte

Für die Extraktion von Nephrotoxin-spezifischen Expressionsprofilen wäre normalerweise ein Vergleich der gewonnenen Profile gegen eine Datenbank mit den Expressionsprofilen vieler verschiedener Toxine nötig. Eine solche Datenbank steht bisher nicht zur Verfügung. Aus diesem Grund konzentriert sich dieses Kapitel auf die Identifizierung von Genen, die von mehreren der Modell-Nephrotoxine

gemeinsam differenziell reguliert wurden und auf solche Gene, die charakteristisch für die toxische Wirkung eines einzelnen Nephrotoxins waren („Marker-Gene“).

In **Abb. 56** wurde in einem Venn-Diagramm dargestellt, wieviele der differenziell regulierten Gene welchen Nephrotoxinen gemeinsam sind.

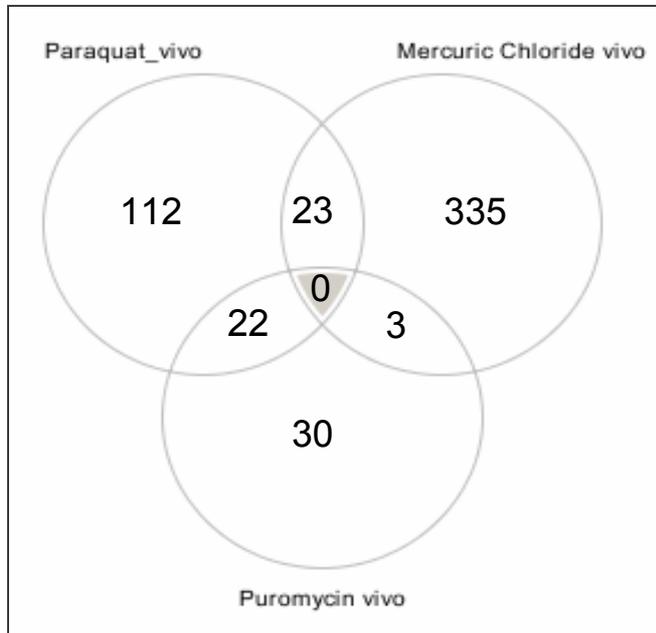


Abb. 56: Überschneidungen der differenziell regulierten Gene der drei Nephrotoxine HgCl<sub>2</sub>, Paraquat und Puromycin.

Zunächst fällt auf, dass kein einziges Gen durch alle drei Nephrotoxine im Nierencortex der Ratte differenziell reguliert wurde. Betrachtet man allerdings jeweils nur zwei Nephrotoxine gleichzeitig, lassen sich verschiedene gemeinsame Gene identifizieren. Zum Beispiel wurden 23 Gene sowohl durch Paraquat als auch durch HgCl<sub>2</sub> differenziell reguliert, 22 Gene wurden durch Paraquat und Puromycin gemeinsam differenziell reguliert und 3 Gene wurden durch HgCl<sub>2</sub> und Puromycin gemeinsam differenziell reguliert. **Tab. 38** führt die gemeinsam regulierten Gene zusammen mit ihren biochemischen Funktionen auf.

Gemeinsam reguliert durch	GenBank Acc.No.	Gename	Biochemische Funktion
<b>Hg + Pq</b>	AB000717	Methionine adenosyltransferase II	Aminosäuremetabolismus
	M60753	Catechol-O-methyltransferase	Biotransformation / Phase II
	D14045	DNA-topoisomerase 2-alpha	DNA Replikation
	M27207	Collagen type I alpha 1	ECM
	X51615	Connexin 26	Gap junction Protein
	X17053	Monocyte chemotactic protein 1	Immunabwehr / Chemotaxis
	AA891726	Solute carrier family 34	Ionentransport ( Na <sup>+</sup> / P)
	AF080507	Mannose-binding protein A	Komplementsystem
	AA891286	Thioredoxin reductase 1	Oxidativer Stress
	U97146	Lysophospholipase 1	Proapoptotisch / Lipidabbau
	L13619	Growth response protein CL-6	Regeneration / Differenzierung
	S78556	GRP 75	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	AA858640	HSP 60	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	AI013834	17-beta-hydroxysteroid dehydrogenase 4	Steroidhormonsynthese
	M83107	Transgelin	Zytoskelett / Baustein
	X06801	Alpha-actin, smooth muscle	Zytoskelett / Muskelkontraktion
<b>Hg + Py</b>	M57276	CD53 antigen	Adaptive Immunität   PLC-PKC Signaltransduktion
	D38061	UDP-glucuronosyltransferase 1A6	Biotransformation / Phase II
	X53581	LINE D Long interspersed repetitive DNA	Retrotransposon
<b>Pq + Py</b>	L13025	Polymeric-immunoglobulin receptor	Adaptive Immunabwehr
	AA891695	Ly6-A antigen	Adaptive Immunabwehr / T-Zell-Aktivierung
	AI044517	Excitatory amino acid transporter 2	Aminosäuretransport / synaptisch
	AI180442	Farnesyl pyrophosphate synthetase	Cholesterolsynthese
	J01435	Cytochrome c oxidase SU I	Energiemetabolismus
	AI176422	e-transferring-flavoprotein dehydrogenase	Energiemetabolismus
	M35826	NADH-ubiquinone oxidoreductase	Energiemetabolismus
	D30649	Ectonucleotide pyrophosphatase 3	Nukleotidabbau
	D49708	Arg/ser-rich splicing factor 10	Oxidativer Stress / Splicing-Faktor
	D90404	Cathepsin C	Proteinabbau
	AA685903	HSP 84	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	AA108277	HSP 105	Reparatur oxidativer Proteinschäden
	M13100	LINE3 Long interspersed repetitive DNA	Retrotransposon
	S74572	Protein phosphatase 2C beta	Signaltransduktion
	AI146195	Gamma adducin	Signaltransduktion PLC-PKC / Zytoskelett
	M23572	Gene 33 polypeptide	Stresskinase Pathway
	L09656	Transcription factor 12	Transkriptionsfaktor
	AF069782	Nucleolar protein 5	Translation
	D25233	Retinoblastoma protein	Zellzyklus-Arrest

Tab. 38: Gemeinsam regulierte Gene von jeweils zwei Nephrotoxinen.

Die Selektion von „Marker-Genen“, die es erlauben, die Wirkungsweise der einzelnen Nephrotoxine deutlich voneinander zu diskriminieren, erfolgte mit Hilfe eines T-Tests. Gene, die als spezifische Marker für die jeweiligen Toxine angesehen werden können, sind in **Tab. 39** zusammen mit ihrer jeweiligen Signifikanz (p-Wert) aufgelistet.

Selektive Marker für	GenBank Acc.No.	Genname	Biochemische Funktion	p-Wert
<b>HgCl<sub>2</sub></b>	K03039	CD45 antigen variant 4	Adaptive Immunabwehr	7.680E-04
	L33869	Ceruloplasmin	Akutphase Protein	9.147E-04
	E03229	Cysteine dioxygenase type I	Aminosäureabbau	4.475E-03
	M93297	Ornithine aminotransferase	Aminosäuremetabolismus	8.054E-04
	D17370	Cystathionine gamma-lyase	Aminosäuresynthese	3.401E-03
	D10757	Proteasome subunit beta 9	Antigenpräsentation	1.710E-03
	J03588	Guanidinoacetate-methyltransferase	ATP Synthese	3.960E-04
	M26125	Epoxide hydrolase 1	Biotransformation / Phase I	5.849E-08
	J02679	NADPH-Quinone Oxidoreductase	Biotransformation / Phase I	9.773E-06
	S72506	Glutathione-S-transferase A5	Biotransformation / Phase II	2.084E-09
	J02810	Glutathione-S-transferase M1	Biotransformation / Phase II	3.858E-04
	H32189	Glutathione-S-transferase M2	Biotransformation / Phase II	5.698E-04
	AI012589	Glutathione-S-transferase P1	Biotransformation / Phase II	1.651E-11
	L19998	Sulfotransferase 1A1	Biotransformation / Phase II	1.227E-04
	AA926193	Sulfotransferase 1C2	Biotransformation / Phase II	3.603E-03
	U06273	UDP-glucuronosyltransferase 2B12	Biotransformation / Phase II	2.901E-05
	AI012802	Glyoxalase 2	Biotransformation   Oxidativer Stress	2.430E-03
	S57478	Annexin I	Ca <sup>2+</sup> Freisetzung / Exozytose	1.107E-03
	X06916	Calcium-binding protein A4	Ca <sup>2+</sup> Lagerung	3.641E-03
	AA892916	Adipocyte membrane-assoc. protein	Differenzierung	3.805E-03
	AJ005394	Collagen type V alpha 1	ECM	1.016E-02
	AJ005396	Collagen Type XI alpha 1	ECM	6.476E-04
	L00191	Fibronectin 1	ECM	3.172E-03
	AA892897	Lysyl hydroxylase	ECM	3.762E-03
	AA800844	Lysyl oxidase	ECM	1.610E-03
	AF080468	Glucose-6-phosphate translocase	Glykogenolyse	2.591E-03
	L38615	Glutathione-synthetase	GSH Synthese	2.953E-03
	AA800745	Porphobilinogen synthase	Häm Biosynthese	2.296E-03
	AF048828	Voltage-dep. channel protein 1	Membrantransport (Anionen)	2.036E-03
	X76456	Alpha-albumin	Transport (extrazellulär)	5.250E-03
	U33500	Retinol dehydrogenase type II	Metabolismus, Biosynthese	8.221E-03
	M97662	Beta-ureidopropionase	Nukleotidabbau	8.183E-04
	X07467	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	Pentosephosphatweg	5.666E-04
	M83143	Sialyltransferase 1	Posttranslationelle Proteinmodifikation	5.744E-03
	X70900	Serine protease hepsin	Proliferation / Blutgerinnung	1.379E-03
	M15944	Neutral endopeptidase	Proteinabbau	3.476E-03
	S43408	Meprin A alpha-subunit	Proteinabbau	1.644E-03
	M88601	Meprin A beta-subunit	Proteinabbau	4.987E-03
	AA892468	Protease serine 8	Proteinabbau	3.134E-03
	X07944	Ornithine decarboxylase	Regeneration / Proliferation	3.724E-04
	D84418	High mobility group protein 2	Reparatur von DNA Schäden / Transkription	3.006E-04
M12156	Heterog. nuclear ribonucleoprotein A1	RNA Transport	3.243E-04	
U77829	Growth arrest specific 5	rRNA Aufbereitung / Zellzyklus-Unterbrechung nach DNA Schädigung	1.869E-04	
AA800786	GATA binding protein 6	Transkriptionsfaktor	2.809E-03	
<b>Paraquat</b>	X72792	Alcohol dehydrogenase I alpha	Biotransformation / Phase I	3.139E-02
	M57718	Cytochrome P450 4A1	Biotransformation / Phase I	5.143E-04
	AA924267	Cytochrome P450 4B1	Biotransformation / Phase I	7.031E-04
	S77900	Myosin regulatory light chain 2	Zytoskelett / Muskelkontraktion	5.963E-03
	L23148	Inhibitor of DNA binding 1	Regeneration / Differenzierung	5.047E-03
	AA799489	Acyl-CoA oxidase 1	Fettsäureoxidation	2.788E-02
	AI044900	Long-chain-fatty-acid-CoA ligase 2	Fettsäureoxidation	1.511E-05
	AA800587	Glutathione peroxidase 1	GSH Metabolismus	2.685E-04
<b>Puromycin</b>	D45412	Protein tyrosine phosphatase BK	Differenzierung	8.260E-03

Tab. 39: Marker-Gene für die jeweiligen Nephrotoxine.

Es konnten insgesamt 44 Gene identifiziert werden, die für die toxische Wirkung von Quecksilber-II-Chlorid spezifisch waren. Für Paraquat fanden sich acht Markergene, für Puromycin erwies sich unter den angewandten statistischen Bedingungen ein

Gen als spezifisch. Für die nephrotoxische Wirkung von Quecksilber-II-Chlorid war vor allem die differenzielle Regulation der Glutathion-S-Transferasen hochspezifisch.

## 4 Diskussion

Für die Untersuchung von Nephrotoxizität standen bisher verschiedene *in vitro* Modelle wie isolierte, perfundierte Nieren oder Tubuli sowie permanente Zelllinien zur Verfügung. *In vivo* fand vor allem die Untersuchung der Urinzusammensetzung mit Hilfe der NMR Spektroskopie oder die Messung der Aktivität nierenspezifischer Enzyme Anwendung. Seit einigen Jahren steht mit der Genexpressionsanalyse mit Hilfe von Mikroarrays eine Technologie zur Verfügung, die es ermöglicht, globale transkriptionelle Veränderungen, die durch ein potenzielles Nephrotoxin hervorgerufen werden, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gleichzeitig zu untersuchen. Eines der Ziele dieser Arbeit war es somit, diese Technologie im Hinblick auf die Untersuchung der Nephrotoxizität *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen. Hierfür sollte zunächst ein Zellkulturmodell charakterisiert und etabliert werden, dass sich als *in vitro* Modell für Genexpressionsanalysen geeignet erweist und das nach Möglichkeit mit *in vivo* Daten vergleichbare und reproduzierbare Ergebnisse liefert. Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich aus der Literatur bekannte Tatsachen über den Wirkmechanismus einiger Nephrotoxine mit Hilfe von toxikogenomischen Daten bestätigen lassen und ob eventuell neue Erkenntnisse auf bisher unbekannt, unklare oder strittige Wirkmechanismen dieser Nephrotoxine erlangt werden können.

### 4.1 Charakterisierung eines Modells zur Kultivierung von PTC der Ratte

#### 4.1.1 Allgemeine Eigenschaften (Zellzahl/Vitalität)

Die Kultivierung von proximalen Tubuluszellen der Ratte ist im Vergleich zu den Tubuluszellen anderer Spezies wie Kaninchen, Hund oder sogar Mensch nicht trivial. Die Zellausbeute ist sehr gering und die Tubulus-charakteristischen Zellfunktionen werden nur über einen bestimmten Zeitraum beibehalten [Schaaf et al., 2001].

Durch Modifikationen des Isolationsprotokolls von Boom und Kollegen (1992) konnten verschiedene Eigenschaften der PTC Kultur verbessert werden. In **Abb. 10** und **11** wurden die Zellzahl sowie die Vitalität der Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer dargestellt und es konnte gezeigt werden, dass die

Proliferationsrate und die Vitalität der Zellen zwischen dem siebten und dem zwölften Kultivierungstag optimal sind.

#### **4.1.2 Charakterisierung der Zellkultur**

Da die Niere ein multizelluläres Organ darstellt, musste zunächst sichergestellt werden, dass durch die verwendete Isolationsmethode nur der gewünschte Zelltyp, die proximalen Tubuluszellen, kultiviert wurde. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt mit Antikörpern gegen den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, Isoform NHE3, sowie gegen das Adhäsionsprotein N-Cadherin, beides PTC-spezifische Marker.

Die NHE3 Isoform des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers kommt ausschliesslich im proximalen Tubulus und im absteigenden Ast der Henle'schen Schleife vor [Biemesderfer et al., 1997] und ist dort viermal häufiger vertreten als die übrigen Isoformen dieses Protonenaustauschers [Azuma et al., 1996]. Der Natrium-Protonen-Austauscher besitzt im proximalen Tubulus die Funktion, Protonen im Austausch gegen  $\text{Na}^+$ -Ionen in das Tubuluslumen zu sezernieren. Hierdurch wird ein Konzentrationsgefälle für  $\text{Na}^+$  geschaffen, das wiederum für die Rückresorption von Wasser benötigt wird [Mahnensmith und Aronson, 1985].

Cadherine sind transmembrane Proteine, die für die Calcium-abhängige Zell-Zell-Adhäsion zuständig sind. Die klassischen Cadherine, zu denen auch N-Cadherin und E-Cadherin gehören, sind über  $\beta$ -Catenin und  $\alpha$ -Catenin mit dem Actin-Filament-Netzwerk des Zytoskeletts verbunden und können somit ausserdem Funktionen bei der Zellkommunikation erfüllen. Die Segment-spezifische Expression von N-Cadherin und E-Cadherin in Kulturen von fetalen und adulten humanen Nierenzellen wurde von Nouwen et al. (1993) beschrieben. In dieser Publikation wurde berichtet, dass die Expression von N-Cadherin auf den proximalen Tubulus und den absteigenden Ast der Henle'schen Schleife beschränkt ist, während E-Cadherin in der Bowman'schen Kapsel und in allen anderen Segmenten des Nephrons mit Ausnahme des proximalen Tubulus exprimiert wird.

Durch das angewandte Verfahren zur Perfusion von Rattennieren wurde somit nachweislich eine Kultur proximaler Tubuluszellen gewonnen, wie durch die Anfärbung des Protonenaustauschers (**Abb. 12**), sowie von N-Cadherin (**Abb. 13**) belegt werden konnte. Weiterhin konnte eine Verunreinigung mit anderen Zelltypen

des Nierencortex nahezu ausgeschlossen werden, da der Nachweis von E-Cadherin in den kultivierten Zellen nicht möglich war (**Abb. 14**).

In einem weiteren Versuch wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP), einem Marker-Enzym, nachgewiesen (**Abb. 15**). Die AP ist im Bürstensaum der proximalen Tubuluszellen lokalisiert und setzt durch Hydrolyse von Phosphateestern Phosphatanionen frei, die daraufhin im proximalen Tubulus rückresorbiert werden können.

Die kopfsteinpflasterartige Morphologie der Zellen war ebenfalls gut sichtbar, welche als typisch für proximale Tubuluszellen angesehen wird [Elliget und Trump, 1991]. Ausserdem konnte die Bildung von kleinen mehrzelligen Arealen beobachtet werden, die allgemein als „Dome“ bekannt sind. Die Formation von Domen wurde bereits häufig im Zusammenhang mit differenzierten Tubulus-Epithelzellen beschrieben, die in der Lage sind, charakteristische Transportfunktionen auszuüben [Elliget und Trump, 1991; Tang und Tannen, 1994].

Für eine weitere Charakterisierung der PTC wurde die mRNA Expression von einigen Marker-Genen untersucht, die typischerweise in funktionsfähigen PTC exprimiert sind. Dazu gehörten wiederum die alkalische Phosphatase und N-Cadherin sowie die  $\gamma$ -Glutamyltranspeptidase (GGT) und der Natrium-Glucose-Cotransporter 1 (SGLT1). Bei der GGT handelt es sich wie bei der AP um ein Bürstensaumenzym, dass vorwiegend in den proximalen Tubuluszellen exprimiert wird [Hanigan und Frierson, 1996]. Die GGT spielt eine Schlüsselrolle bei der Degradation und *de-novo*-Synthese von Glutathion, indem sie  $\gamma$ -Glutamylreste von Glutathion auf Akzeptoren wie Aminosäuren oder Peptide überträgt und umgekehrt. SGLT1 ist für den aktiven Transport von Glucose in proximale Tubuluszellen durch Cotransport mit zwei Natriumionen zuständig und wird in der Niere wie AP und GGT ausschliesslich im proximalen Tubulus exprimiert [Lee et al., 1994].

Die Ergebnisse aus **Abb. 18** zeigten deutlich, dass alle vier Marker-Gene exprimiert waren. Die Expression von AP und SGLT1 blieb über die Dauer der Kultivierung nahezu konstant, während die N-Cadherin-Expression leicht, die GGT-Expression jedoch bis Tag 7 stark anstieg, nachfolgend aber konstant blieb. Dies lässt vermuten, dass die Expression der GGT nach der Isolation zunächst abnahm, die Zellen aber nach der Ausbildung einer konfluenten Monoschicht an Tag 7 wieder in der Lage waren, GGT in gleichbleibender Höhe zu exprimieren.

### 4.1.3 Charakterisierung für den Einsatz in Genexpressionsanalysen

Die Untersuchung der Genexpression in einer unbehandelten PTC Kultur über eine Kultivierungsperiode von 14 Tagen diente dazu, transkriptionelle Veränderungen in der alternden Zellkultur zu erfassen. Für die spätere Expressionsanalyse von potenziellen Nephrotoxinen kann auf diese Weise ein optimaler Behandlungszeitraum definiert werden, in dem noch keine Alterungs-bedingten Veränderungen der Genexpression auftreten und somit sämtliche Genregulationen auf die Einwirkung des Nephrotoxins zurückgeführt werden können. Aus **Abb. 16** ist zu erkennen, dass lediglich neun Gene bei längerer Kultivierung der PTC transkriptionelle Veränderungen zeigten, wobei diese für Collagen Typ II, Lysyloxidase, Glutathion-S-Transferase Pi und ein EST mit unbekannter Funktion am deutlichsten hervortraten. Die Induktionen von Collagen I alpha 2 und Lysyloxidase wurden mit Hilfe der Echt-Zeit-PCR bestätigt. Collagen I alpha 2 und Lysyloxidase spielen eine grosse Rolle beim Aufbau und *turnover* von extrazellulärer Matrix sowie bei der Entstehung von Fibrose [Desmouliere et al., 1997]. Die alternde PTC Kultur zeigt folglich mit der Zeit zunehmende Merkmale von De-Differenzierung. Diese Ergebnisse bestätigen die lichtmikroskopischen Beobachtungen einer verstärkten Veränderung der PTC von kopfsteinpflasterartigen, kubischen Zellen zu flacheren, grossflächigeren Zellen, die nach 14 Tagen in Kultur dendritenförmige Ausläufer ausbilden (Daten nicht abgebildet). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde für die Untersuchung der Genexpression nach Nephrotoxin-Einwirkung ein optimaler Behandlungszeitraum der PTC Kultur von Tag 7 bis Tag 10 definiert, da hier die Alterungs-bedingt auftretenden Veränderungen noch minimal sind.

Dasselbe Zeitfenster wurde auch für die Behandlung von humanen PTC gefunden (**Abb. 17**), bei denen erste signifikante, transkriptionelle Veränderungen erst nach zwölf Tagen in Kultur auftraten.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob DMSO, welches als Lösungsmittel für die Modell-Toxine verwendet wurde, in der Lage ist, die Genexpression der PTC zu beeinflussen. Lediglich für die höchste untersuchte DMSO-Konzentration von 3% konnte eine deutliche Regulation der Genexpression nachgewiesen werden. Die in den Nephrotoxin-Verdünnungen eingesetzte maximale DMSO-Konzentration von 0.1% zeigte dagegen keinen Einfluss.

Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass Veränderungen in der Genexpression, die bei Behandlung von PTC Kulturen mit potenziellen Nephrotoxinen zwischen dem siebten und dem zehnten Tag nach der Gewinnung der Kultur und bei Einhaltung einer maximalen DMSO-Konzentration von 0.1% beobachtet werden, ausschliesslich auf die Einwirkung des Toxins zurückgeführt werden können.

## 4.2 Veränderungen in der Genexpression nach Einwirkung von Ochratoxin A

Mit Hilfe eines T-Tests sind insgesamt 215 Gene identifiziert worden (dies entsprach 84.6% aller durch OTA *in vivo* und *in vitro* differenziell regulierten Gene), die in den *in vivo* und in den *in vitro* Experimenten durch OTA gleichermassen reguliert wurden und im Folgenden als „gemeinsame Gene“ bezeichnet werden. Die restlichen 15.4% der Gene wurden durch OTA *in vivo* und *in vitro* unterschiedlich reguliert und werden somit als „diskriminierende Gene“ bezeichnet, da sie eine Modell-abhängige Antwort auf die Behandlung mit OTA darstellen.

### 4.2.1 Modell-abhängige Genexpressionsveränderungen nach Behandlung mit OTA

In **Abb. 31** wurden die diskriminierenden Gene mit Hilfe eines hierarchischen *clusterings* entsprechend ihren Expressionsprofilen *in vivo* und *in vitro* in drei Gruppen eingeteilt. Zur ersten Gruppe gehörten *60S ribosomal protein L6* und *activin receptor II*, welche *in vivo* induziert wurden, *in vitro* aber nahezu keine Regulation zeigten (**Tab. 4**, *cluster 1*). *60S ribosomal protein L6* ist ein Bestandteil der 60S Untereinheit des Ribosoms und spielt somit bei der Translation eine Rolle. *Activin receptor II* ist nach der Aktivierung durch seinen Liganden Aktivin in Zellwachstum und Proliferation involviert. Die Induktion von *activin receptor II* könnte die Konsequenz einer möglicherweise verminderten Expression des Liganden Aktivin sein, ein Prozess, der für die Regeneration von geschädigtem renalen Gewebe essentiell ist [Maeshima et al., 2001]. Dies müsste jedoch durch weitere Untersuchungen bestätigt werden.

In der zweiten Gruppe fanden sich Gene, die *in vitro* deutlich runterreguliert wurden, *in vivo* jedoch kaum eine Veränderung ihrer Expression zeigten (**Tab. 4, cluster 2**). *Alpha-prothymosin* ist für seine Funktion als negativer Regulator der Zelldifferenzierung bekannt [Rodriguez et al., 1998]. Auch *ID-1* wurde als negativer Regulator der Zelldifferenzierung von Tubuluszellen in der regenerierenden Niere beschrieben [Matejka et al., 1998]. Die deutlich verminderte Expression dieser Gene gegenüber der Kontrolle scheint somit ebenfalls der Regeneration von proximalen Tubuluszellen zu dienen. Zusammenfassend kann für die Betrachtung der Gene aus *cluster 1* und *cluster 2* gesagt werden, dass sowohl *in vivo* als auch *in vitro* regenerierende Proliferations- und Differenzierungsprozesse ablaufen, die aber in den beiden Modellen unterschiedlich reguliert zu sein scheinen.

*Collagen II* und *protein kinase C alpha* wurden ebenfalls der zweiten Gruppe zugeordnet. *Collagen II* ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und führt bei Überexpression zur Entwicklung von Fibrose. Die Ergebnisse aus den Expressionsexperimenten mit unbehandelten PTC wiesen darauf hin, dass in der alternden Zellkultur die Expression von *collagen* und *lysyl oxidase* stark zunimmt. Eine scheinbar verminderte Expression von *collagen II* nach der Behandlung von PTC mit OTA könnte somit darauf zurückzuführen sein, dass die Expression dieses Gens in den Kontroll-PTC mit der Zeit zunimmt, in den behandelten PTC jedoch unverändert bleibt. *Protein kinase C alpha* ist ein wichtiger Bestandteil der intrazellulären Signaltransduktion. Krasagakis und Kollegen haben erst vor kurzem (2002) die Vermutung geäußert, dass eine verminderte Transkription von *protein kinase C alpha* einen hemmenden Effekt auf das Tumorwachstum in Melanom-Zellkulturen haben könnte.

Im dritten *cluster* wurden Gene gruppiert, die *in vivo* eine verminderte Expression aufwiesen, *in vitro* allerdings kaum eine Regulation zeigten (**Tab. 4, cluster 3**). Die meisten Gene aus dieser Gruppe kodieren für Enzyme, die im Stoffwechsel, bei der Biotransformation oder bei Entgiftungsprozessen eine Rolle spielen (*betaine homocysteine methyltransferase*, *cytochrome P450 2D18*, *D-dopachrome tautomerase*, *gamma-glutamyl-transpeptidase*, *paraoxonase*, *peroxisomal-3-ketoacyl-CoA thiolase 2*, *retinol dehydrogenase*). Andere Gene aus dieser Gruppe wie zum Beispiel *bile salt export pump*, *organic anion transporter K1*, *organic cation transporter 2*, *renal organic anion transporter* und *senescence marker protein* erfüllen Aufgaben beim Ionentransport oder beim transzellulären Transport. Es ist allgemein

bekannt, dass bestimmte Transportprozesse und Stoffwechselfvorgänge in Zellkulturen -verglichen mit der *in vivo* Situation- nur bedingt stattfinden [Dickmann und Mandel, 1989]. Bei Betrachtung der Rohdaten fiel auf <sup>(1)</sup>, dass tatsächlich einige der Gene aus *cluster 3 in vitro* im Vergleich zu *in vivo* nur sehr geringe Fluoreszenzintensitäten aufwiesen, die entsprechenden Gene also *in vitro* praktisch nicht exprimiert waren. Ein möglicher Grund für das Fehlen bestimmter Transportproteine *in vitro* könnte sein, dass viele Transporter auf einen Konzentrationsgradienten zwischen dem luminalen und dem basolateralen Kompartiment angewiesen sind. Die PTC wurden allerdings auf einer Collagenbeschichteten Plastikoberfläche kultiviert, wodurch das basolaterale Kompartiment wegfällt und folglich kein Konzentrationsgradient zustande kommen kann.

Im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen wurde *in vivo* durch die Behandlung mit OTA die Expression von Genen mit Funktionen bei Transport- und Stoffwechselprozessen deutlich vermindert. Der drastische Rückgang der Transportkapazitäten von proximalen Tubuluszellen nach OTA-Exposition wurde bereits früher beschrieben [Gekle und Silbernagl, 1994], allerdings wurden diese Veränderungen bis jetzt noch nicht auf transkriptionellem (mRNA) Level beschrieben, sondern lediglich auf Ebene der Proteinexpression.

Ein weiteres Gen aus *cluster 3*, *apolipoprotein C1*, wird hauptsächlich in der Leber exprimiert und nur zu einem sehr geringen Anteil in der Niere [Simonet et al., 1991]. Dies korreliert mit den geringen Fluoreszenzintensitäten, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* für *apolipoprotein C1* erhalten wurden. Aus diesem Grund muss die scheinbar verminderte Expression dieses ohnehin nur gering exprimierten Gens kritisch betrachtet werden.

Unterschiede in der Genexpression *in vivo* und *in vitro* nach der Behandlung mit OTA können ausserdem darauf zurückgeführt werden, dass die Niere *in vivo* aus einer grossen Vielzahl verschiedener Zelltypen besteht, die in der PTC Mono-Kultur nicht vorhanden sind. Folglich werden Gene wie *aspartoacylase*, die bekannterweise ausschliesslich in neuronalen Zellen exprimiert werden [Baslow et al., 1999], in der PTC Kultur nicht gefunden.

Das *CDK 108* Gen kodiert für ein NADP-reguliertes Thyroid-Hormon-bindendes Protein in der Niere [Vie et al., 1997] und die Transkription der *neutral endopeptidase 24.11* wurde als Androgen-Hormon-gesteuert beschrieben [Shen et al., 2000].

---

<sup>1</sup> Sämtliche Rohdaten sind bei der Autorin als CD-ROM oder DVD erhältlich.

Offensichtlich wird die Transkription dieser beiden Gene zumindest teilweise hormonell reguliert. Solche hormonellen Einflüsse fehlen in der PTC Kultur, wodurch transkriptionelle Veränderungen von Hormon-gesteuerten Genen nicht beobachtet werden können.

#### **4.2.2 Dosis- und Zeit-abhängige Regulierungen**

In diesem Teil der Diskussion wird das Hauptaugenmerk auf induzierte Gene gelegt. Gene, die gegenüber der Kontrolle als vermindert exprimiert erschienen, werden nur in Fällen diskutiert, in denen sie für das Verständnis des Toxizitätsmechanismus von OTA relevant sind.

Aus **Tab. 5-8** ist erkennbar, dass Veränderungen des Zellstoffwechsels und die Entstehung von oxidativem Stress eher Dosis-abhängig reguliert wurden, während inflammatorische Sofortreaktionen und Reaktionen auf DNA Schädigungen wie Reparaturprozesse und Apoptose eher Zeit-abhängig auftraten.

##### **4.2.2.1 Akutphase-Reaktionen und Entzündung**

In **Tab. 5** wurden Gene aufgelistet, die für Proteine mit bekannten Funktionen bei den Akutphase-Reaktionen (APR) und bei inflammatorischen Prozessen kodieren. Bei den meisten APR-Genen handelt es sich um Proteaseinhibitoren. Eine Induktion des universellen Proteaseinhibitors *alpha-2-macroglobulin* wird als Hinweis auf eine Sofortreaktion des Organismus auf eine Noxe gewertet [Schreiber et al., 1989]. Auch *ceruloplasmin*, ein Kupfer-bindendes Akutphaseprotein, wird in der Niere bei Entzündungsprozessen [Kalmovarin et al., 1991] und in ROS-bedingten Stress-Situationen exprimiert [DeSilva und Aust, 1993]. Unter hypoxischen Bedingungen wird die Transkription von *ceruloplasmin* durch die Bindung von *hypoxia-inducible factor1 (HIF-1)* an ein Hypoxie-responsives Element (HRE) in der Promotorregion des *ceruloplasmin* Gens reguliert [Mukopadhyay et al., 2000]. In den Nieren und PTC, die mit hochdosiertem OTA behandelt wurden, ist *HIF-1* ebenfalls hochreguliert (siehe Abschnitt „oxidativer Stress“).

Im Gegensatz zu *alpha-2-macroglobulin* und *ceruloplasmin* ist *contrapsin-like protease inhibitor* als ein Protein bekannt, dessen Expression bei Akutphase-

Reaktionen [Pages et al., 1990] sowie in Lungenadenokarzinomen der Maus gehemmt wird [Lin, L. et al., 2001]. In den OTA-exponierten Nieren und PTC wurden bei den hohen OTA-Konzentrationen verminderte Expressionswerte für *contrapsin-like protease inhibitor* gefunden, was somit die Akutphase-Reaktion unterstützt.

*Alpha-fibrinogen* und *tissue factor* zeigen nach der Behandlung mit OTA eine deutliche transkriptionelle Induktion. Beide Gene spielen eine Rolle bei der Blutgerinnung nach der Schädigung von Gewebe [Macfarlane et al., 2001; Riewald und Ruf, 2001]. *Ciliary neurotrophic factor (CNTF)* zeigt nach der Behandlung mit OTA eine Dosis-abhängige Induktion. *CNTF* ist ein Regenerations-Faktor, der normalerweise in Nekrose-angrenzenden Gebieten hochreguliert wird [Lin, T.N. et al., 1998]. Zinc finger protein wird bei akuten Gewebeverletzungen induziert und scheint ebenfalls eine Rolle bei der Regeneration des geschädigten Gewebes zu haben [Kojima et al., 2000]. Die Ergebnisse aus den OTA-Experimenten weisen somit auf starke Gewebeläsionen und die Aktivierung verschiedener Blutgerinnungsmechanismen hin. Dies korreliert mit den nekrotischen Befunden aus der Histopathologie (**Abb. 33**).

#### 4.2.2.2 DNA Schädigung, Reparatur und Apoptose

Einige der gewonnenen Resultate bestätigen die bereits bekannten DNA-schädigenden Effekte von OTA [Obrecht-Pflumio und Dirheimer, 2000]. Zum Beispiel wurde des Öfteren eine Induktion von *GADD153* und *GADD45* nach der Behandlung von Zellkulturen oder Versuchstieren mit DNA-schädigenden Agenzien wie UV-Licht oder Methylmethansulfonat berichtet [Beard et al., 1996]. Zusätzlich ist ein Zusammenhang zwischen der Induktion von *dynein light chain 1* und dem Transport von p53 zum Zellkern nach dem Auftreten von DNA-Schädigungen postuliert worden [Giannakakou et al., 2000]. Eine erhöhte Transkription von *calpactin I heavy chain* wurde schon früher in renalen Zellkarzinomen beobachtet, die durch die Behandlung von Ratten mit oxidativ schädigenden Substanzen hervorgerufen wurden [Tanaka et al., 2000]. Kumble und Mitarbeiter (1992) fanden weiterhin heraus, dass *calpactin I* einen Co-Faktor für die *DNA polymerase alpha* darstellt und Skouteris und Schroeder (1996) wiesen nach, dass *calpactin I* als Substrat für die *oncogen growth factor-associated protein tyrosine kinase* fungiert. Somit scheint die vermehrte Transkription von *calpactin I* ein allgemeines molekulares Ereignis bei der Reparatur von DNA

Schäden und bei der Entstehung verschiedener Karzinome zu sein. Auch die Induktion von *nucleosome assembly protein* nach OTA-Behandlung deutet auf vermehrte DNA Reparaturprozesse hin, da dieses Protein eine entscheidende Rolle beim Entpacken des Chromatins vor der DNA Replikation bzw. Reparatur spielt [Rodriguez et al., 1997].

Aus den Ergebnissen können ausserdem apoptotische Vorgänge abgeleitet werden. Zum Beispiel wurde die Überexprimierung von *annexin V* auf der Oberfläche von apoptotischen Zellen als Markierung für ihren phagozytotischen Abbau beschrieben [Bacso et al., 2000]. Weiterhin wurde für *clusterin* dokumentiert, dass es von nicht-apoptotischen Zellen in apoptotischen Arealen exprimiert wird und somit vermutlich eine Schutzfunktion für die gesunden Zellen ausübt [Miyake et al., 2002]. Die hier beschriebenen Veränderungen in der Genexpression nach Behandlung von Ratten oder PTC mit OTA liefern somit deutliche Hinweise auf eine Schädigung der DNA durch OTA sowie anschliessende Reparaturprozesse oder Apoptose.

#### 4.2.2.3 Zellulärer Stoffwechsel und Entgiftung

Die Gene aus dieser Kategorie, die gegenüber der Kontrolle eine verminderte Expression aufwiesen, spielen vor allem bei der Regulation des Energiehaushaltes (*NADP-dependent isocitrate dehydrogenase*, *NADPH quinone oxidoreductase 1*, *beta-alanine synthetase*, *ATP-stimulated glucocorticoid-receptor translocation promoter*) und bei der Biotransformation bzw. Entgiftung eine Rolle (*alcohol dehydrogenase 1*, *argininosuccinate lyase*, *glutamine synthetase*, *glutathione-S-transferase alpha*, *P1* und *Ya* sowie *sulfotransferase K2*). Diese drastische Verminderung von basalen Zellfunktionen trat vorwiegend Dosis-abhängig auf und ist vermutlich auf den weitreichenden nekrotischen Zelluntergang zurückzuführen, der bereits aus den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchung hervorging.

#### 4.2.2.4 Oxidativer Stress

Durch die Bindung an HRE in den Promoterregionen verschiedener Gene kann *hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)* die Transkription dieser Gene beeinflussen wie bereits für *ceruloplasmin* beschrieben [Caro, 2001; Mucopadhyay et al., 2000]. Die

transkriptionelle Expression von *catalase* und *glutathione synthetase*, welche bekannterweise wichtige Funktionen bei der Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies ausüben, wurde durch die Behandlung mit OTA herunterreguliert. Dobashi und Kollegen (2000) haben diesen Effekt für *catalase* bereits als typische Frühreaktion auf oxidativen Stress beschrieben. *Glutathione synthetase* wird normalerweise unter hypoxischen Bedingungen hochreguliert [Anderson, 1998]. Nach der Behandlung mit OTA war jedoch in Abhängigkeit von der Dosis eine verminderte Expression zu beobachten. Für *redox-factor 1 (ref1)* wurden zahlreiche Funktionen bei der DNA Reparatur, der Signaltransduktion unter oxidativen Stressbedingungen, sowie der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beschrieben [Evans et al., 2000]. Soweit der Autorin bekannt ist, gibt es in der Literatur jedoch keinerlei Hinweise auf die Funktion einer dauerhaft verminderten Expression von *ref1*.

Die Analyse der Genexpression von Rattennieren und PTC nach der Behandlung mit OTA zeigte, dass lediglich geringe Unterschiede zwischen dem *in vivo* und dem *in vitro* Modell bestehen. Weiterhin können die bestehenden Unterschiede auf drei Umstände zurückgeführt werden:

1. Gene, die bevorzugt in anderen Zellen als proximalen Tubuluszellen exprimiert werden, können in der PTC Mono-Kultur nicht nachgewiesen werden.
2. In der PTC-Kultur fehlen hormonelle oder immunologische Einflüsse.
3. Einige Transport- und Biotransformationsprozesse sind in den PTC in geringerem Umfang exprimiert als *in vivo*.

Trotzdem waren die meisten transkriptionellen Veränderungen, die in den PTC-Kulturen gefunden wurden, mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Experimenten vergleichbar. Die PTC Kultur ist somit in der Lage, einen Grossteil ihrer transkriptionellen Ansprechbarkeit aufrecht zu erhalten.

Des Weiteren konnten zahlreiche, aus der Literatur bekannte Toxizitätseffekte von OTA, sowie die histopathologischen Befunde bestätigt werden. Die Genexpressionsanalysen lieferten Hinweise darauf, dass durch OTA DNA Schäden verursacht wurden, die vermutlich auf die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies zurückzuführen sind. Es folgten Akutphase-Reaktionen, sowie schwere

Gewebeläsionen und eine massive Verminderung des zellulären Stoffwechsels. Schliesslich konnte die Tendenz der Transkriptionsveränderungen durch die Taqman<sup>®</sup> PCR-Ergebnisse bestätigt werden (**Abb. 32**). Die aus den Mikroarray-Experimenten ermittelten Induktionsfaktoren erschienen zwar niedriger als die PCR-basierten Faktoren; hierbei spielten vermutlich *Quenching*-Effekte zwischen den beiden unterschiedlichen Fluorophoren auf den Mikroarrays eine entscheidende Rolle. Die eingehende Diskussion dieser Effekte erfolgt im anschliessenden Kapitel.

### 4.3 Plattform-Vergleich: cDNA-Mikroarrays versus Oligonukleotid-Mikroarrays

Für die Untersuchung der Genexpression in der Niere standen zwei verschiedene technische Plattformen zur Verfügung: zum einen cDNA Mikroarrays, zum anderen Oligonukleotid-Mikroarrays. Die Herstellung und Hybridisierung der Arrays wurden in der Einleitung näher beschrieben. Die prinzipiellen Unterschiede zwischen beiden Plattformen wurden in **Tab. 40** zusammengefasst.

	<b>cDNA Mikroarrays</b>	<b>Oligonukleotid-Mikroarrays</b>
<b>Anzahl der Gene pro Array</b>	Ca. 700 (Ratte)	Ca. 8800 (Ratte)
<b>Länge der <i>probes</i></b>	300-400b	25b
<b><i>probe sets</i></b>	Vier Replikate derselben <i>probe</i>	16 verschiedene optimale <i>probe sets</i> pro Gen, zusätzlich 16 <i>probe sets</i> mit je einer vertauschten Base
<b>Aufbringen der <i>probes</i></b>	<i>Spotten</i>	<i>In situ</i> Synthese (Photolithographie)
<b>Amplifikationsschritt vor Hybridisierung des Testmaterials</b>	Nein	ja
<b>Markierung des Testmaterials</b>	Mit Fluoreszenzfarbstoffen: Cy3 = behandelt Cy5 = Kontrolle	Mit Biotin: Kopplung an Phycoerythrin-markiertes Streptavidin
<b>Hybridisierung</b>	Zweifach: Kontrolle und behandelte Probe werden auf denselben Array hybridisiert	Einfach: Kontrolle und behandelte Probe werden auf verschiedene Arrays hybridisiert
<b>Ergebnis</b>	Induktionsfaktoren (relativ)	Fluoreszenzsignale (absolut)

Tab. 40: Unterschiede zwischen cDNA Mikroarrays und Oligonukleotid-Mikroarrays.

Bereits Kuo et al., (2002) haben Ergebnisse, die mit diesen beiden Plattformen gewonnen wurden, miteinander verglichen. Sie fanden heraus, dass sich Ergebnisse, die mit cDNA Arrays gewonnen wurden, erheblich von den Ergebnissen der

Oligonukleotid-Arrays unterschieden. Die Autoren konnten keine Aussagen darüber machen, welche der beiden Plattformen die verlässlicheren Ergebnisse liefert, da die Daten nicht durch eine unabhängige, dritte Methode überprüft worden sind.

Im Gegensatz dazu zeigte die Hybridisierung der OTA-behandelten Cortex-Proben auf die zwei verschiedenen Plattformen, dass Gene, die auf dem cDNA Array als signifikant reguliert erschienen, in der Regel auch auf dem Oligonukleotid Array Induktionsfaktoren über zwei aufwiesen. Es fiel jedoch auf, dass die Induktionsfaktoren insgesamt auf dem Oligonukleotid Array höher ausfielen, als auf dem cDNA Array. Ein Grund hierfür kann sein, dass sich bei der gleichzeitigen Hybridisierung von Cy5-markierter Kontrolle und Cy3-markierter behandelte Probe auf einen Array die Signale der beiden Fluoreszenzfarbstoffe durch ihre geringe räumliche Distanz zueinander gegenseitig abschwächen („*Quenching*“) [Randolph und Waggoner, 1997].

Der Vergleich der Induktionsfaktoren, die mit den beiden Arrays ermittelt wurden, zeigte ausserdem, dass ein Gen auf den Plattformen in unterschiedliche Richtungen reguliert erschien (*caspase 3*) und zwölf weitere Gene auf den cDNA Arrays deutliche Induktion oder Inhibition zeigten, während auf den Oligonukleotid Arrays keine Veränderung zu erkennen war. Mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR als unabhängige Methode wurde die Verlässlichkeit dieser Ergebnisse überprüft. In allen Fällen konnten die Ergebnisse des Oligonukleotid Arrays bestätigt werden. Im Fall des *insulin-like growth factor binding protein 1* fiel besonders auf, dass der absolute Induktionswert, welcher mit Hilfe des Oligonukleotid-Arrays ermittelt worden war, wesentlich besser mit dem Induktionsfaktor aus der Echt-Zeit-PCR korrelierte als jener, der mit dem cDNA Array bestimmt wurde.

Dies lässt eine grössere Spezifität der Oligonukleotid Arrays vermuten. Allgemein wird die Meinung vertreten, dass längere cDNA *probes* eine geringere Spezifität der Hybridisierung zur Folge haben [Li et al., 2002]. Dies kann dadurch erklärt werden, dass mit Zunahme der *probe* Länge auch die Möglichkeit potenzieller Kreuzhybridisierungen steigt. Weiterhin ist bei längeren *probes* die Wahrscheinlichkeit grösser, dass sich Sekundärstrukturen ausbilden, was eine geringere Hybridisierungseffizienz zur Folge haben kann [Li et al., 2002].

Die höhere Spezifität der Oligonukleotid Arrays wird vermutlich dadurch erreicht, dass für jedes Gen *probe sets* auf den Array synthetisiert werden, die aus 16 unterschiedlichen Oligonukleotiden bestehen, die das Gen perfekt repräsentieren

(*perfect matches*) und 16 korrespondierenden Oligonukleotiden, bei denen jeweils eine Base vertauscht ist (*mismatches*). Durch den Vergleich der *perfect match* und *mismatch* Signale kann die Verlässlichkeit der Signale bewertet werden [Lipshutz et al., 1999]. Oligonukleotid Arrays bieten weiterhin die Möglichkeit, *probe sets* auszuwählen, die vor allem das 3' Ende der mRNA repräsentieren. Dies erlaubt eine Erhöhung der Sensitivität der Arrays, da der 3'-Bereich den Poly-(A)-Schwanz der mRNA enthält und somit bei der reversen Transkription mit Oligo-(dT)-Primern auf jeden Fall umgeschrieben wird. Als eindeutiger Vorteil der cDNA Arrays ist jedoch zu nennen, dass durch die gleichzeitige Hybridisierung von Kontrolle und behandeltem Testmaterial auf einen Array, technische Variationen, die durch Unterschiede beim Spotten oder Hybridisieren entstehen können, direkt ausgeschlossen werden [Kuo et al\_2002]. Durch umfangreiche Analyse der Array-Qualität und Applikation verschiedener Normalisierungsmethoden konnte jedoch gezeigt werden, dass die technische Variation bei Proben, die von derselben Person hybridisiert wurden, sehr gering war (<0.9%, Arbeitskreis-interne Daten, nicht veröffentlicht).

Abschliessend kann gesagt werden, dass Oligonukleotid-Arrays in den hier durchgeführten Experimenten die verlässlicheren Ergebnisse lieferten, wie durch quantitative Echt-Zeit PCR bestätigt werden konnte. Aus diesem Grund wurden für die Untersuchung der Genexpression in Nieren und in PTC nach Behandlung mit Quecksilber-II-chlorid, Paraquat und Puromycin Oligonukleotid-Mikroarrays anstelle der cDNA Mikroarrays eingesetzt.

#### **4.4 Veränderungen in der Genexpression nach Einwirkung von Quecksilber-II-chlorid**

Sicherlich gibt es zahlreiche Möglichkeiten, Genexpressionsdaten mechanistisch zu interpretieren. Ziel dieser Arbeit war es, vor allem solche Zusammenhänge zwischen den regulierten Genen aufzuzeigen, die am Besten durch bereits vorhandene Daten aus der Literatur gestützt werden konnten. Sämtliche Interpretationen beschreiben somit potenziell mögliche Mechanismen, die für eine definitive Aussage jedoch durch zusätzliche Experimente bestätigt werden müssten.

#### 4.4.1 *Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von HgCl<sub>2</sub> in vivo*

Bei der Behandlung von Ratten mit Quecksilber-II-chlorid fiel vor allem auf, dass bereits nach kurzer Behandlungszeit (24h) bei der niedrigen Konzentration zahlreiche Transkripte stark reguliert waren. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen für Quecksilber-II-Chlorid typischen Effekt, wonach durch geringe Konzentrationen die Synthese von mRNA induziert wird, während sie durch Applikation grosser Mengen eher gehemmt wird [Inamoto et al., 1976].

Im Folgenden werden die möglichen Effekte auf den Nierencortex von Ratten nach Behandlung mit Quecksilber-II-chlorid unter Berücksichtigung der biochemischen Funktionen der regulierten Transkripte diskutiert.

##### 4.4.1.1 *Proteinmetabolismus*

Die meisten durch HgCl<sub>2</sub>-Einwirkung transkriptionell veränderten Gene spielten eine Rolle im Proteinmetabolismus, wie aus dem *ranking* in **Abb. 38** ersichtlich war. Die weitere Analyse der Gene innerhalb der Kategorie „Proteinmetabolismus“ führte zur Identifizierung von vier verschiedenen Expressionsprofilen (**Abb. 39**). Bei genauer Betrachtung der Gene in diesen vier *clustern* fiel auf, dass die grösste Subkategorie (*cluster b*) nahezu ausschliesslich aus Genen bestand, die entweder für ribosomale Ribonukleinsäuren (*ribosomal Proteins of large subunit 3, 10a, 13, 13a, 18a, 21, 22, 23a, 24; ribosomal Proteins of small subunit 6, 7, 8, 11, 12, 19, 24*), für nukleäre Proteine (*dyskerin, nucleolin, nucleophosmin*), oder für nukleäre RNA Helikasen (*DDXL, DDX21, BAT1, HEL117*) kodierten. Die Induktion dieser Gene, sowie die Induktion des *eukaryotic translation initiation factor 2 (eif2A)*, deuten auf eine massive Biogenese von ribosomalen Bestandteilen im Zellkern, sowie auf die Bildung von initialen Translationskomplexen hin [Pestova et al., 2001]. Die ribosomalen Proteine stellen die Bausteine der beiden Ribosomen-Untereinheiten (60S und 40S) dar. Nukleäre RNA Helikasen wie *DDX21, DDXL* und *HEL117* besitzen die Fähigkeit, RNA zu entwinden, und somit eine Hybridisierung zwischen verschiedenen rRNA's oder eine Dissoziation von prä-rRNA's für anschliessende Modifikationen zu ermöglichen [Fromont-Racine et al., 2003]. *Nucleolin, nucleophosmin* und *dyskerin* üben ebenfalls wichtige Funktionen in der Biogenese der Ribosomen aus. Diese

nukleären Proteine interagieren direkt mit den prä-rRNA's, organisieren den Transport von ribosomalen Bestandteilen und ihre Packung zu fertigen Ribosomen [Meier und Blobel, 1994; Tuteja und Tuteja, 1998; Pinol-Roma, 1999]. Funktionsfähige Translationskomplexe gelangen schliesslich ins Zytosol und der Translationsprozess kann beginnen. Bereits 1975 wurde über eine stark erhöhte Ribosomendichte nach Inkubation mit  $\text{HgCl}_2$  *in vitro* berichtet [Kawahara et al., 1975]. Diese massive unspezifische Induktion der frühen Phase der Proteinbiosynthese spricht für eine erhöhte Proliferation des Nierengewebes und kann somit die histopathologisch sichtbare Geweberegeneration nach Schädigung durch Quecksilber-II-chlorid (**Abb. 35b-e**) erklären.

Auf eine gesteigerte Regenerationsrate deutet ebenfalls die transkriptionelle Aktivierung von *lysylhydroxylase* und *lysyloxidase* (**Abb. 39, cluster a**). Beide Enzyme sind für die posttranslationelle Modifikation von Collagen verantwortlich und tragen somit zum Aufbau von extrazellulärer Matrix bei [Smith-Mungo und Kagan, 1998; Ruotsalainen et al., 2001].

Die transkriptionelle Hemmung von Genen mit Protease-Funktion (**Abb. 39, cluster d**) durch die Einwirkung von  $\text{HgCl}_2$ , erscheint zunächst widersprüchlich. *Aminopeptidase N*, *meprin A* und *neutral endopeptidase* sind Metallopeptidasen, die für ihre katalytische Aktivität ein  $\text{Zn}^{2+}$  Ion benötigen.  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen sind in der Lage,  $\text{Zn}^{2+}$  Ionen von den aktiven Zentren zu verdrängen, und somit die Enzymaktivität zu hemmen [Holt et al., 1980; Nag Das und Battacharyya, 1988; Pan et al., 1991]. Um den Ausfall dieser Peptidasen zu kompensieren, wäre eine Induktion ihrer Transkription zu erwarten. Die Hemmung der Transkription durch  $\text{HgCl}_2$ , sowie die Hemmung weiterer Peptidasen wie *cathepsin H*, *prolylendopeptidase* und *dipeptidylpeptidase IV*, lassen allerdings einen anderen Mechanismus vermuten. Eine Möglichkeit besteht darin, dass der Abbau von neu synthetisierten Proteinen verhindert werden soll. Die regulierten Peptidasen verbindet weiterhin die Gemeinsamkeit, dass sie wichtige Rollen bei der Inaktivierung von regulatorischen Peptiden, wie z.B. Angiotensin II, Neuropeptiden oder Zytokinen [Gros et al., 1990; Ramirez et al., 1997; Vlahovic und Stefanovic, 1998] spielen. Der verminderte Abbau dieser Regulatoren ermöglicht im Gegenzug eine Verlängerung der Wirkdauer der Peptide, was wichtige Konsequenzen für Nierenfunktion und –stoffwechsel haben kann. Eine Verzögerung des Angiotensin II-Abbaus kann beispielsweise eine erhöhte Wachstumsrate und Hypertrophie der proximalen Tubuluszellen zur Folge haben

[Vlahovic und Stefanovic, 1998]. Diese Annahmen sind jedoch spekulativ, auch wenn Stefanovic et al. (1998) über die Bedeutung der transkriptionellen Hemmung von *aminopeptidase N* und *dipeptidylpeptidase IV* durch Behandlung von Ratten mit Quecksilber-II-chlorid ähnliche Vermutungen geäußert haben.

#### 4.4.1.2 Biotransformation

Quecksilber-II-chlorid hat einen besonderen Einfluss auf die Biotransformationsprozesse im Nierencortex der Ratten gezeigt. Es fiel auf, dass bereits 24h nach der Behandlung der Ratten mit  $\text{HgCl}_2$ , die Expression von Glutathion-S-Transferasen (4-8fach), sowie die *NADPH oxidoreductase* (11fach) und die *UDP-glucuronosyltransferase* (3fach) sehr stark induziert waren (**Abb. 42**). Die Induktion dieser Gene stellte also einen initialen Effekt dar, der im Folgenden genauer beleuchtet werden soll.

Die Analyse der Gen-Sequenzen der oben genannten Gene ergab, dass sich in der Promoter-Region aller dieser Gene ein sogenanntes *antioxidant responsive element* (ARE) befand. Durch Aktivierung dieses ARE wird die Transkription sowohl der Glutathion-S-Transferasen als auch der *NADPH oxidoreductase* und der *UDP-glucuronosyltransferase* erhöht [Presterer und Talalay, 1995]. Der Ablauf der Aktivierung von ARE's ist **Abb. 57** schematisch dargestellt.

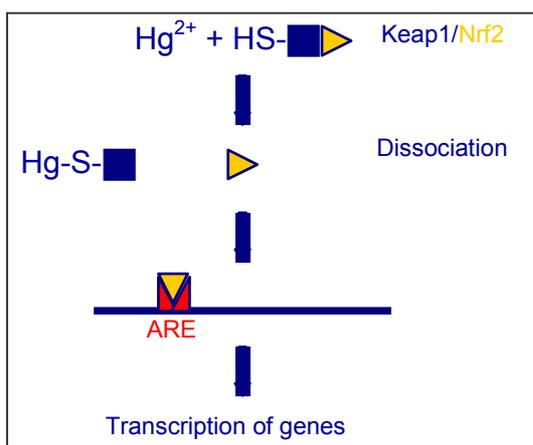


Abb. 57: Aktivierung von ARE durch Nrf2.

Nach Dinkova-Kostova et al. (2002) erfolgt die transkriptionelle Induktion durch Bindung des Transkriptionsfaktors Nrf2 an ein ARE. Nrf2 liegt im inaktiven Zustand als Komplex mit dem Protein Keap1 vor. Die Bindung an das ARE ist nur möglich, wenn Nrf2 zuvor durch eine Veränderung der Konformation des Keap1 / Nrf2-

Komplexes aus diesem freigesetzt wird. Dinkova-Kostova et al. haben weiterhin nachgewiesen, dass eine solche Konformationsänderung zustande kommt, wenn Substanzen mit hoher Affinität zu den Thiolgruppen des Keap1 Proteins, wie z.B.  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen, an den Komplex binden. Es scheint, dass Quecksilber-II-chlorid auf diesem Weg seine Toxizität verstärkt, da durch die vermehrt gebildeten Glutathion-S-Transferasen die Übertragung von Glutathion (GSH) auf die  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen forciert wird. Die vermehrte Bildung von GS-Hg-SG kann verschiedene Folgen haben. Zum einen erhöht sich die Aufnahme von Quecksilber in die Zellen, da der Transport von  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen durch die Zellmembranen vorwiegend in der Form von GS-Hg-SG erfolgt [Cannon et al., 2000]. Weiterhin sinkt der GSH-Gehalt der Zellen, wodurch die Inaktivierung von reaktiven Sauerstoff-Spezies beeinträchtigt ist. Die Zellen sind fortan vermehrtem oxidativen Stress ausgesetzt.

Eine weitere Beobachtung war, dass die Transkription vieler Cytochrom P450 Enzyme nach der Behandlung mit Quecksilber-II-Chlorid stark vermindert war (**Abb. 42, cluster a**). Dies wird allgemein als Begleiterscheinung von entzündlichen Reaktionen betrachtet [Morgan et al., 2002], welche im anschließenden Abschnitt diskutiert werden sollen.

#### 4.4.1.3 Immunabwehr, Zelladhäsion, Zytoskelett und Signaltransduktion

Gene, die in der Immunabwehr, sowie bei der Zelladhäsion, im Zytoskelett oder in der Signaltransduktion eine Rolle spielen und durch Quecksilber-II-chlorid reguliert wurden, erfuhren eine gemeinsame Auswertung und Interpretation, da die entsprechenden Proteine funktionell eng miteinander verknüpft waren.

Zunächst soll auf die Gene der unspezifischen Immunabwehr eingegangen werden. Die Komponenten des Komplement-Systems *C1q beta*, *C1s* und *C4a*, sowie *Lysozyme*, fanden sich zwar in unterschiedlichen *clustern* (**Abb. 40, cluster a, b und c**), zeigten jedoch eine interessante Induktionsreihenfolge. Während *C1q beta* und *C1s* zusammen mit *Lysozyme* schon nach 24h induziert wurden, erhöhte sich die Menge an *C4a* Transkript erst nach 72h (**Abb. 40, cluster c**). Dies korreliert mit dem zeitlichen Ablauf der Komplement-Kaskade, in der *C1q beta* zusammen mit *C1r* und *C1s* den initialen C1-Komplex bildet und *C4a* erst im späteren Verlauf der Kaskade aktiviert wird. Die Aktivierung der Komplement-Kaskade erfolgt auf klassische Weise durch die Fc-Regionen von IgG oder IgM, die in Immunkomplexen aggregiert sind.

Die Bildung von Immunkomplexen benötigt allerdings eine „Vorlaufzeit“, in der die entsprechenden Antikörper zuerst produziert werden müssen. Die Induktion der Transkription von Komplement-Komponenten setzte jedoch nahezu unmittelbar nach der Administration von  $\text{HgCl}_2$  ein. Dies könnte zum einen ein Hinweis auf andere Aktivierungswege sein wie z.B. durch direkte Bindung von *C1q beta* an veränderte Oberflächenstrukturen von geschädigten Zellen [Nauta et al., 2002]. Eine andere Erklärung könnte sein, dass  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen mit den Disulfidbrücken zwischen den Untereinheiten der Komplement-Komponenten interagieren, sie dadurch inaktivieren und somit neue, funktionsfähige Komplement-Einheiten gebildet werden müssen. Die Induktion der Komplement-Komponente C4 wurde bereits bei Galibert et al. (1997) als typische Folge von akuten Entzündungsprozessen und Gewebeschädigung beschrieben.

*Lysozyme* stellt ebenfalls einen wichtigen Bestandteil des unspezifischen Immunsystems dar. Keshav et al. (1991) konnten nachweisen, dass die Transkription von *Lysozyme* bereits in den ersten 24h nach einer Infektion oder nach Kontakt mit nicht-infektiösen Agentien in Gewebemakrophagen von Mäusen deutlich induziert war. Die frühe Induktion von *Lysozyme* wurde als Marker für aktive Phagozytose durch die Makrophagen angesehen.

Die potenziellen Zusammenhänge zwischen den Genen aus **Tab. 14**, *cluster a-d*, bzw. aus **Tab. 15**, *cluster a* und **b**, soll **Abb. 58** veranschaulichen. Gene, die für Adhäsionsmoleküle, Zytokine, Akutphase-Proteine oder Bestandteile des Zytoskeletts kodieren, wurden durch  $\text{HgCl}_2$  schon sehr früh induziert (**Tab. 14**, *cluster a*). Etwas zeitversetzt folgte die Induktion von z.B. *NFκB*, *interferon-inducible protein* oder verschiedener Signaltransduktionsgene wie *Fyn*, *ITPR3*, *c-jun*, *MEKK1* oder *14-3-3 protein* (**Tab. 14**, *cluster b*, **Tab. 15**, *cluster a*) und schliesslich von den Adhäsionsmolekülen *integrin alpha-1* und *integrin beta-1* sowie von Bestandteilen der extrazellulären Matrix wie verschiedenen Collagen Typen (**Tab 14**, *cluster c*).

Bereits bei der Diskussion der durch  $\text{HgCl}_2$  regulierten Biotransformationsprozesse wurde eine Beteiligung von oxidativem Stress an der Quecksilber-vermittelten Nephrotoxizität vermutet. Auch die Betrachtung der induzierten Immunabwehr-, Zelladhäsions- und Zytoskelett-Gene lässt auf einen veränderten Redox-Status der Zellen als eines der initialen toxischen Ereignisse schliessen. Insbesondere ist aus den Ergebnissen eine Induktion von verschiedenen Hitzeschock-Proteinen sowie von *thioredoxin* zu erkennen, was ebenfalls für die Bildung von ROS spricht [Miranda-

Vizuete et al., 2000]. Deshalb sollen an dieser Stelle kurz die möglichen Entstehungswege von oxidativem Stress nach HgCl<sub>2</sub>-Behandlung erläutert werden. Nach Lund et al. (1993) können zwei Folgen der Quecksilber-Exposition für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich gemacht werden: zum einen die Depletion von GSH, auf die bereits im Abschnitt „Biotransformation“ hingewiesen wurde. Zum anderen eine Depolarisation der inneren Mitochondrienmembran durch Hg<sup>2+</sup> Ionen, was eine gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Produktion zur Folge hat. Reaktive Sauerstoffspezies verursachen daraufhin Membranschädigungen und schliesslich das Absterben von Zellen, wodurch wiederum Akutphase-Reaktionen eingeleitet werden.

Eine weitere Ursache für die Induktion der Akutphase liegt in der Eigenschaft der Hg<sup>2+</sup> Ionen begründet, Membranen zu destabilisieren, und dadurch das Absterben von Zellen und Gewebeläsionen zu verursachen. Dies geschieht höchstwahrscheinlich durch eine Hemmung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, wodurch der Aufbau eines Ionengradienten an den Membranen verhindert wird. Die Zerstörung der Ionen-Homöostase hat schliesslich den Untergang der Zelle zur Folge [Wang und Horisberger, 1996; Yu, 2003].

Die Akutphase in den Quecksilber-behandelten Rattennieren wurde somit durch Gewebeschädigungen induziert, die zum einen durch Membran-Depolarisationen, zum anderen durch direkte Einwirkung von reaktiven Sauerstoffspezies hervorgerufen wurden. Sie war vor allem durch den Anstieg an Transkripten von *ceruloplasmin*, *early growth response protein 1 (Egr-1)*, *early growth response protein 2 (Egr-2)* und *annexin V* sowie durch eine verminderte Expression von *albumin* gekennzeichnet [Moshage et al., 1988]. Weiterhin wurden die proximalen Tubuluszellen in der Niere veranlasst, Zytokine zu produzieren und auszuschütten. PTC sind in der Lage, in oxidativen Stress-Situationen Zytokine zu produzieren wie zum Beispiel MCP-1 [Morigi et al., 2002]. Bereits nach 24h Behandlung mit HgCl<sub>2</sub> war eine Erhöhung der mRNA der Zytokine *macrophage chemoattractant protein-1 (MCP-1)*, *interferon-inducible protein 10 (IP-10)*, *osteopontin* und *CXCL13* besonders deutlich erkennbar. Weiterhin waren die Transkripte zahlreicher *interferon*- und *tumor necrosis factor*-induzierbarer Gene erhöht, die normalerweise nicht von den PTC produziert werden können (*interferon-regulatory factor 1*, *interferon-related developmental regulator 1*, *TNF intracellular domain-interacting protein*), was auf eine Ausschüttung von *INFγ* und *TNFα* aus infiltrierenden Makrophagen schliessen lässt,

auch wenn bei den angewandten Qualitätskriterien keine Induktion ihrer Transkription auf den Mikroarrays erkennbar war [Ohmori und Hamilton, 1995; Vilcek und Lee, 1991; Baumann und Gauldie, 1994].

Die induzierten Zytokine waren nun ihrerseits in der Lage, zahlreiche Prozesse zu aktivieren. Hierzu gehörte zum einen die Modulation der Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. *ICAM-1*, *integrin alpha* und *integrin beta* auf der Oberfläche der proximalen Tubulusepithelzellen. Des Weiteren unterstützt *IP-10* die Adhäsion von T-Zellen durch Induktion extrazellulärer Matrixproteine wie *fibronectin*, *laminin* und *collagen* [Lloyd et al., 1996]. Dies führte vermutlich zur Anlockung weiterer Makrophagen und aktivierter T-Zellen und ermöglichte ausserdem deren Einwanderung in das geschädigte Gewebe [Giachelli et al., 1998; Lu et al., 1998; Neville et al., 1997]. Zum anderen wurde die bereits durch ROS und *Egr-1* induzierte Expression des Transkriptionsfaktors *NFκB* durch die Zytokine unterstützt. Bindungsstellen für *NFκB* finden sich wiederum in den Promotoren zahlreicher Gene, wie zum Beispiel *TNFα*, *IFNγ*, *IL-6*, *MCP-1*, *IP-10*, *ICAM-1* und verschiedene Wachstumsfaktoren [Pahl, 1999]. *NFκB* kann somit als zentraler Schalter in der HgCl<sub>2</sub>-vermittelten Entzündungsreaktion gesehen werden [Bours et al., 2000].

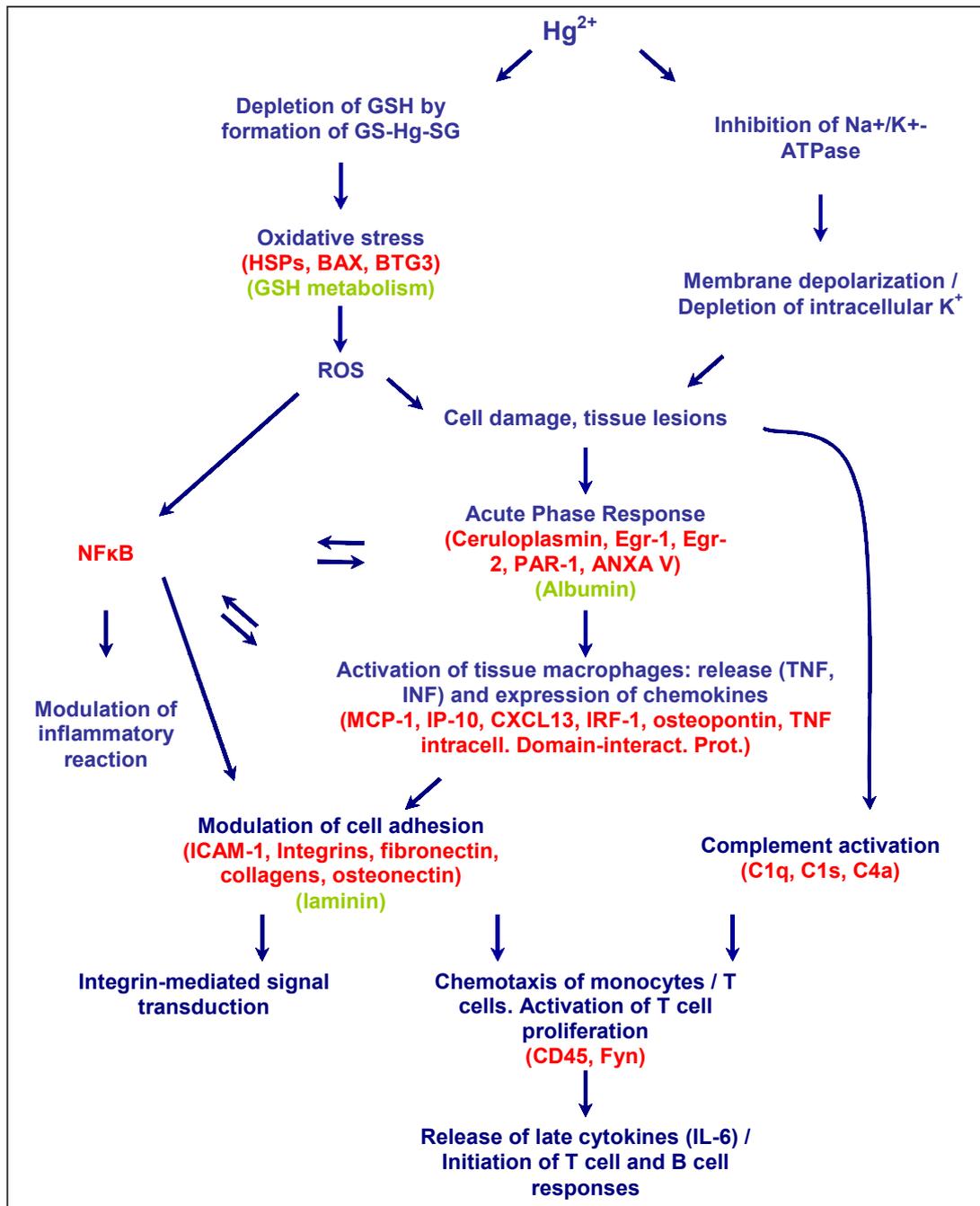


Abb. 58: Potenzielle molekulare Wechselwirkungen zwischen Immunabwehr, Zelladhäsion und Zytoskelett nach  $\text{HgCl}_2$  Behandlung.

Rot = hochregulierte Gene, grün = runterregulierte Gene.

In **Abb. 59** sind die weiterführenden Signaltransduktionswege dargestellt. Die Induktion und Aktivierung von *ICAM-1* und den Integrin-Untereinheiten *integrin alpha-1* und *integrin beta-1* führte mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Transmembran Proteine *TM4SF3* und *CD53* zur Aktivierung der *protein kinase C (PKC)* [Zhang et al., 2001]. Eine Aktivierung der *PKC* könnte auch durch *14-3-3 protein* hervorgerufen

worden sein sowie durch die Veränderungen in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase, die aufgrund der Induktion der *ITPR3* Expression, sowie der verminderten *ITPR1* und *regucalcin* (*SMP-30*) Expression angenommen werden können [Tzivion et al., 2001; Huang, 1990]. Weiterhin wurde von Bagenstose und Kollegen (1999) auch eine direkte Aktivierung der *PKC* durch  $\text{Hg}^{2+}$  diskutiert. Die Induktion von *protein kinase C delta binding protein* und *guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein 12.3* könnten ebenfalls als Hinweise auf eine Aktivierung der *PKC* gewertet werden.

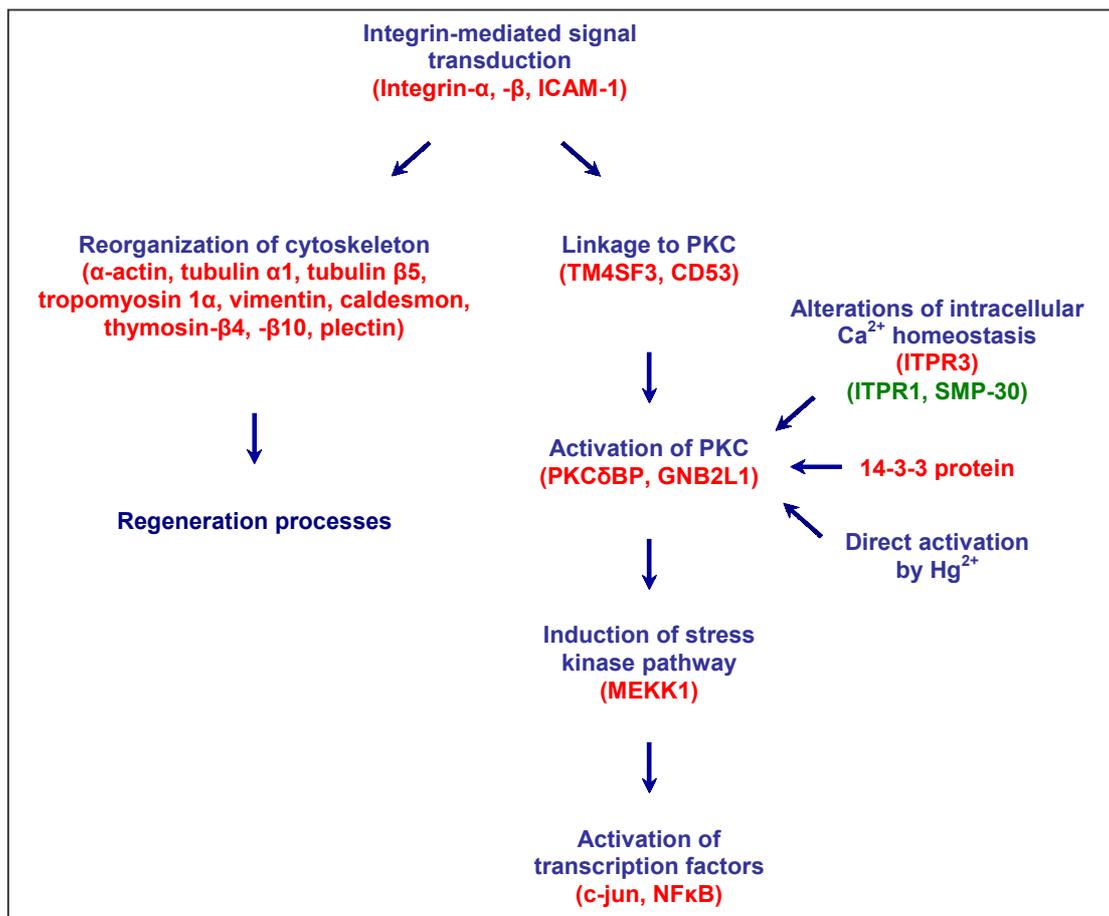


Abb. 59: Durch  $\text{Hg}^{2+}$ -Behandlung induzierte Signaltransduktionswege.

Rot = hochregulierte Gene, grün = runterregulierte Gene.

Die Integrin-vermittelte Signaltransduktion führte weiterhin über ihre Verbindung mit dem Actin-Filament Netzwerk zu Veränderungen der Morphologie und Motilität der Zellen, sowie zur Reorganisation des Zytoskeletts [Calderwood et al., 2000]. Zahlreiche Gene, die beispielsweise für Bestandteile des Zytoskeletts oder der Microtubuli kodieren (*α-actin*, *myosin regulatory light chain*, *tropomyosin 1α*, *tubulin α1*, *tubulin β5*) waren deutlich hochreguliert. Ausserdem waren intermediäre

Filamente induziert (*vimentin*) und Gene, die an der Regulation und / oder der Organisation des Zytoskeletts beteiligt sind (*thymosin beta-4*, *-10*, *caldesmon 1*, *transgelin*, *ARP2/3 complex*, *plectin*). Durch *thymosin beta-4* und *beta-10* wird zum Beispiel die Polymerisation der Actin-Filamente kontrolliert. Sie spielen somit eine Rolle bei Differenzierungs- und De-differenzierungsprozessen [Huff et al., 2001]. Insgesamt deutet die massive Induktion von Bestandteilen und Regulatoren des Zytoskeletts auf Proliferationsprozesse und eine komplette Reorganisation der Zelle hin, wie sie bei der Regeneration von geschädigtem Gewebe beispielsweise nach Ischämie auftreten [Witzgall et al., 1994; Molitoris et al., 1992].

#### 4.4.1.4 Transport

Die Erhöhung der Motilität der Zelle durch Induktion der Mikrotubulus-Bestandteile *tubulin  $\alpha$ 1* und *tubulin  $\beta$ 5* kann weiterhin im Zusammenhang mit den Quecksilber-vermittelten Veränderungen der Transportprozesse diskutiert werden. Gene, die durch  $\text{HgCl}_2$  induziert wurden, spielen zum Teil beim intrazellulären Vesikel-Transport eine Rolle (*dynein*, *ras-related GTP-binding protein 11B*, *myosin regulatory light chain*). Solche intrazellulären Transportprozesse sind von essentieller Bedeutung für die Wiederherstellung der zellulären Integrität nach Membranschädigungen, wie es am Beispiel der axonalen Verletzung von retinalen Ganglionzellen von McKerracher und Hirscheimer (1992) gezeigt wurde.

Im Kapitel „Immunabwehr, Zelladhäsion, Zytoskelett und Signaltransduktion“ wurde die mögliche Hemmung der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase durch Bindung von  $\text{Hg}^{2+}$  Ionen diskutiert. Die rapide Verminderung der Natrium-abhängigen Transportprozesse durch  $\text{HgCl}_2$  (**Abb. 43**) könnte ebenfalls auf dieses Ereignis zurückgeführt werden. Durch das Ausschalten des  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Transports würde die intrazelluläre  $\text{Na}^+$  Konzentration stark ansteigen. Der Konzentrationsgradient für Natrium würde somit aufgehoben, der wiederum die treibende Kraft für den Natrium-gekoppelten Membrantransport darstellt. Hierbei handelt es sich jedoch um Spekulationen, die in weiteren Versuchen bestätigt werden müssten.

#### **4.4.2 Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von HgCl<sub>2</sub> in vitro – Vergleich mit in vivo**

**Tab. 20** machte deutlich, dass ein Grossteil der *in vitro* als reguliert erscheinenden Transkripte (84%) auch *in vivo* durch die Behandlung mit HgCl<sub>2</sub> signifikant reguliert wurden. Umgekehrt betrachtet war allerdings der Anteil der *in vivo* differenziell regulierten Gene, die auch *in vitro* eine signifikante Regulation zeigten wesentlich geringer (16.9%). Dies erlaubt die Schlussfolgerung, dass die Expressionsveränderungen, die *in vitro* beobachtet wurden nahezu vollständig *in vivo* wiedergefunden werden, das Zellkulturmodell aber nicht alle Transkriptionsveränderungen, die *in vivo* stattfinden, widerspiegelt. Dieses Ergebnis zeigt somit deutlich, dass das eingesetzte Zellkulturmodell sehr gut geeignet ist, um bestimmte Fragestellungen bezüglich der Genexpressionsveränderungen nach Toxineinwirkung zu beantworten, jedoch erwartungsgemäss nicht vollständig die *in vivo* Situation simulieren kann. Zum einen weil eine Mono-Kultur von proximalen Tubuluszellen eingesetzt wurde, in der andere Zelltypen, die typischerweise in der Niere vorkommen (distale Zellen, Sammelrohrzellen, mesangiale Zellen, Neuronen und Immunzellen) nicht vorhanden sind. Somit können Expressionsveränderungen die auf hormonelle oder nervöse Einflüsse zurückzuführen sind, sowie Regulationen, die aktivierte Immunzellen erfordern, nicht nachvollzogen werden. Dies wurde auch im Ranking der *in vitro* betroffenen biochemischen Kategorien sichtbar (**Abb. 44**), bei dem Kategorien wie „hormonelle Signaltransduktion“ und „Immunabwehr“ nur noch auf einem der unteren Plätze oder gar nicht vertreten sind.

Die Kategorie „Biotransformation“ war dagegen nach der Behandlung der PTC am stärksten betroffen. Interessanterweise zählten auch *in vitro* die Glutathion-S-Transferasen (ca. 6-27fach = GST A2, ca. 3-5fach = GST A3, ca. 2-3fach = GST A1 und GST A4) sowie die UDP-glucuronosyltransferase 1A6 (ca. 2-3fach) zu den am stärksten durch HgCl<sub>2</sub> induzierten Genen. Des Weiteren wurden einige Gene induziert, die auch *in vitro* auf einen veränderten oxidativen Status der Zellen hinweisen, wie zum Beispiel *catalase* (ca. 2-3fach), *glutathione peroxidase* (ca. 2fach) und *thioredoxin reductase 1* (ca. 3fach). Auch *in vitro* kann somit ein Toxizitätsmechanismus für HgCl<sub>2</sub> konstruiert werden, nachdem die Freisetzung von *Nrf2* aus dem *Keap1/Nrf2*-Komplex und die nachfolgende Aktivierung der *antioxidant responsive elements* in den Promoterregionen der Glutathion-S-Transferasen und

der *UDP-glucuronosyltransferase 1A6* das initiale Ereignis darstellt. Darauf folgt wiederum eine starke Depletion des Glutathion-Gehaltes der Zellen und eine verstärkte Transkription der mRNA antioxidativer Enzyme wie *catalase*, *glutathione peroxidase* und *thioredoxin reductase 1*.

Im Vergleich mit den Ergebnissen aus den *in vivo* Versuchen fiel auf, dass *in vitro* die biochemischen Kategorien „Zytoskelett“ und „Zelladhäsion“ Gene aufwiesen, die im Gegensatz zu *in vivo* allerdings gegenüber der Kontrolle weniger exprimiert erschienen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die *in vitro* verminderten Stimuli durch Zytokine sein. **Abb. 58** und **59** zeigen, dass *in vivo* die Induktion von Zelladhäsions- und Zytoskelett-Genen vor allem durch Zytokine wie *IP-10* oder *MCP-1* beeinflusst wurde. Diese wurden auch in den PTC *in vitro* induziert (Faktor 2,7 und 2,6 nach 72h Behandlung mit 10 $\mu$ M bzw. 30 $\mu$ M HgCl<sub>2</sub>), die Veränderungen waren allerdings unter den angewandten Kriterien nicht signifikant. Die Menge an gebildeten Zytokinen war somit vermutlich nicht ausreichend, um weitreichende Veränderungen im Zytoskelett zu bewirken, vor allem weil in der PTC Mono-Kultur keine zusätzliche Ausschüttung von Zytokinen durch Makrophagen auftritt.

## 4.5 Veränderungen in der Genexpression nach Einwirkung von Paraquat

### 4.5.1 Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von Paraquat *in vivo*

Bei der Behandlung von Ratten mit Paraquat fiel zunächst auf, dass die histopathologischen Untersuchungen der Nieren von behandelten Ratten keine erkennbaren Veränderungen zu den Kontrolltieren aufwiesen. Dennoch konnten durch Analyse der Genexpression insgesamt 142 signifikant gegenüber der Kontrolle veränderte Gene nachgewiesen werden. Die Zuordnung der regulierten Gene zu funktionellen Kategorien lieferte eine Hitliste, aus der die Kategorie „Lipidmetabolismus“ als die am stärksten betroffene hervorging (**Abb. 45**). Da die meisten Veränderungen der Lipidmetabolismus-Gene auf oxidativen Stress zurückzuführen sind, werden diese beiden Kategorien zusammen diskutiert.

#### 4.5.1.1 Oxidativer Stress und Lipidmetabolismus

Genexpressionsveränderungen, die nach der Behandlung mit Paraquat in den Nierencortices der Ratten schon sehr früh (nach 24h) zu beobachten waren, waren die Induktion des *thioredoxin interacting protein* (~2fach) und der *glutathione peroxidase 1* (~4fach). Die Proteine, für die diese Gene kodieren, üben wichtige Funktionen bei der Inaktivierung von ROS aus [Chae et al., 1999]. Nach 168h waren ausserdem verschiedene Hitzeschock-Proteine (*heat shock protein 84, 105*), sowie *glucose-regulated protein 75* und *94* deutlich induziert, deren Hauptaufgabe bekanntermassen die Reparatur oxidativer Schädigungen von Proteinen darstellt [Martindale und Holbrook, 2002]. Da in den Genexpressionsprofilen keine Veränderungen auffielen, die vor diesen Regulationen stattfanden und sie somit ausgelöst haben könnten, muss davon ausgegangen werden, dass Paraquat selbst für die Freisetzung reaktiver Sauerstoff-Spezies verantwortlich zu machen ist. Der Mechanismus der Bioaktivierung von Paraquat ist bereits weitgehend aufgeklärt und tatsächlich werden dabei hochreaktive Sauerstoffverbindungen wie das Superoxidanion gebildet, die zur Oxidation von Membranlipiden führen können [Smith et al., 1978; Bus und Gibson, 1984]. Ein weiterer Effekt dieser Reaktion ist der Verbrauch und die damit verbundene Depletion von NADPH. Dies kann wiederum eine Hemmung von NADPH-verbrauchenden Prozessen wie zum Beispiel der Fettsäuresynthese bzw. eine Induktion von NADPH-bildenden Prozessen wie beispielsweise der Fettsäure- $\beta$ -Oxidation zur Folge haben [Bus und Gibson, 1984; Smith, 1987]. In den Genexpressionsprofilen der Paraquat-behandelten Rattennieren wird dies durch die verminderte Expression der *acyl-CoA desaturase 2* deutlich, welche eine entscheidende Rolle bei der Synthese von ungesättigten Fettsäuren spielt und ausserdem bevorzugt NADPH als Elektronendonator verwendet [Wilson und Miller, 1978]. Bei der Untersuchung der Genexpressionsveränderungen in den Paraquat-behandelten Ratten fiel weiterhin auf, dass nahezu sämtliche Gene induziert waren, deren Produkte für die NADPH-liefernde  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren in Peroxisomen verantwortlich sind: *acetyl-CoA-acyltransferase*, *hydroxyacyl-coenzyme A - dehydrogenase/3-ketoacyl-coenzyme A - thiolase/enoyl-coenzyme A hydratase (trifunctional protein) alpha subunit*, *acyl-CoA oxidase*, *carnitine o-octanoyltransferase*, *long chain fatty acid coenzyme A ligase* und *dodecenoyl-coenzyme A delta isomerase* [Danis et al., 1981]. Parker und Engel fanden 2000

heraus, dass die Enzyme der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren während des Abbau-Prozesses mit Enzymen der Elektronentransportkette wie *electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase* und *NADH-ubiquinone oxidoreductase* assoziieren, die für eine rasche Wiederherstellung der verbrauchten Reduktionsäquivalente verantwortlich sind und in den Paraquat-behandelten Rattennieren ebenfalls induziert waren ( $\sim 2$ - $2.5$ fach nach 168h).

In **Abb. 60** sind die durch den Metabolismus von Paraquat hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen in den Rattennieren noch einmal in einem Diagramm zusammengefasst.

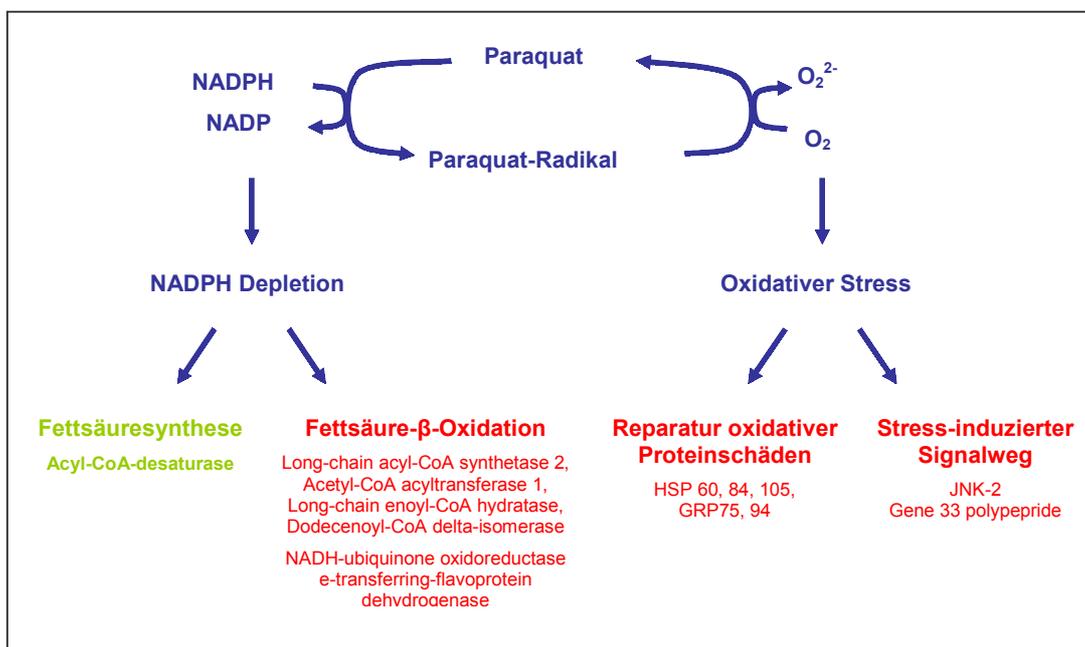


Abb. 60: Metabolismus von Paraquat und Folgereaktionen.

Rot = induzierte Reaktionen und Gene. Grün = runterregulierte Reaktionen und Gene

#### 4.5.1.2 Transport

In **Abb. 48** wurden Gene dargestellt, die nach der Behandlung mit Paraquat in den Cortices der Rattennieren differentiell reguliert waren und deren Transkripten eine Funktion im zellulären Transport zugeschrieben wird. In *cluster c* befanden sich Gene, die nach 168h stark induziert waren und entweder beim Transport von Golgi-Vesikeln oder beim  $Na^+$ -abhängigen Membrantransport eine Rolle spielen. Das *cop-coated vesicle membrane protein* spielt eine entscheidende Rolle bei der Knospung

von Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum für den Transport zum Golgi-Apparat [Kaiser und Ferro-Novick, 1998]. *SNAP-23* und *syntaxin 5* befinden sich auf der Oberfläche der Vesikel und sind für die Andockung an ihrem Ziel, dem Golgi-Apparat, und die nachfolgende Fusion der Vesikel mit der Golgi-Membran zuständig [Kaiser und Ferro-Novick, 1998]. Die *vacuolar proton pump* und das *trans-golgi-network protein 1* stellen wiederum Bestandteile des Golgi-Apparates dar, die die Voraussetzungen für die Sekretion und den Transport von neuen Vesikeln schaffen. [Yilla et al., 1993; McLauchlan et al., 2001].

#### **4.5.2 Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von Paraquat *in vitro* – Vergleich mit *in vivo***

Aus **Tab. 26** geht hervor, dass 58.5% der *in vitro* differenziell regulierten Gene auch *in vivo* signifikant reguliert wurden, während nur 30.2% der *in vivo* signifikant regulierten Gene sich auch *in vitro* wiederfanden. Bereits bei Quecksilber-II-chlorid fanden sich wesentlich mehr *in vitro* regulierte Gene *in vivo* wieder als *in vivo* regulierte Gene in den *in vitro* Experimenten. Auch bei Paraquat ist somit erkennbar, dass das Zellkulturmodell in einigen Bereichen die *in vivo* Situation nicht vollständig widerspiegeln kann. Beim *ranking* der durch Paraquat *in vitro* regulierten biochemischen Kategorien (**Abb. 49**) zeigt sich, dass sich zum Beispiel die Kategorie „Immunreaktionen“ nur noch auf Platz 7 wiederfindet im Gegensatz zu Platz 2 *in vivo*. Auch zahlreiche andere Kategorien wie zum Beispiel „Lipidmetabolismus“ und „Transport“, denen *in vivo* sehr viele regulierte Gene zugeordnet werden konnten, erscheinen im *ranking* der *in vitro* regulierten Kategorien entweder gar nicht oder deutlich weiter unten. Auf den ersten Blick schien Paraquat also in der Niere und in den PTC völlig unterschiedliche Einflüsse auf die Transkription der Gene zu haben. Bei genauerer Betrachtung gibt es jedoch einige Auffälligkeiten: In **Tab. 26** sind Gene aufgelistet, deren Produkte eine Funktion im Proteinmetabolismus ausüben. Es ist auffällig, dass die induzierten Gene in *cluster a* vor allem für die Reparatur oxidativer Proteinschäden verantwortlich sind (*GADD153*, *HSP 70.3*, *HSP 70.1/2*, *ubiquitin E3 ligase Mdm2*), während die runterregulierten Gene in *cluster b* vor allem bei der posttranslationalen Modifikation von Proteinen oder der Proteinfaltung eine Rolle spielen (*γ-glutamyl carboxylase*, *glycoprotein-processing glucosidase 1*, *mannosyl (alpha-1,6-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase*). Die

Veränderungen im Proteinmetabolismus scheinen also hauptsächlich eine Folge von oxidativem Stress zu sein. Bei den induzierten Genen in den Kategorien „Regulation der Genexpression und RNA Metabolismus“ sowie „Regulation der Proliferation“ handelt es sich vor allem um Transkriptionsfaktoren (*activating transcription factor 3*, *kruppel-like factor 6*, *CBP/p300-interacting transactivator 2*, *IKB alpha*, *C/EBP beta*) oder um Gene mit Funktionen bei der Regeneration nach oxidativer Zellschädigung (*kruppel-like factor 4*, *GADD45a*, *GAS5*, *progression elevated gene 3*, *hepatopoietin*). Die Induktion dieser Gene kann somit als deutlicher Hinweis auf umfangreiche Reparatur- und Regenerationsvorgänge nach Zellschädigungen durch ROS gewertet werden [Freedman et al., 2003; Tacchini et al., 2002; Patton et al., 1997; Yoon et al., 2003]. Somit sind die meisten Veränderungen in der Genexpression, die Paraquat in Ratten-PTC induziert auf die Bildung von reaktiven Sauerstoff-Spezies bei der Metabolisierung von Paraquat zurückzuführen. In den PTC konnten allerdings keine Veränderungen in der Genexpression festgestellt werden, die auf eine verminderte Verfügbarkeit von NADPH zurückgeführt werden könnten. Die bei der Metabolisierung von Paraquat entstehende Depletion von NADPH scheint somit keine Auswirkungen auf die PTC zu haben.

## 4.6 Veränderungen in der Genexpression nach Einwirkung von Puromycin

### 4.6.1 Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von Puromycin in vivo

Durch die Behandlung von Ratten mit Puromycin wurden lediglich 45 Gene in ihrer Expression signifikant gegenüber den Kontrolltieren verändert. Die eingesetzten Puromycin-Dosen (4.5mg/kg und 45mg/kg) waren folglich zu niedrig um umfangreiche Genexpressionsänderungen zu induzieren. Histopathologisch waren nach 168h jedoch einige regenerierende Tubuli zu erkennen (**Abb. 37**). Bei Betrachtung der nach 168h hochregulierten Gene aus **Tab. 32 cluster b** fiel auf, dass auch hier hauptsächlich Gene vertreten sind, die an der Reparatur von oxidativ geschädigten Proteinen (*HSP 105*, *HSP 84*, *cathepsin C*) oder Nukleinsäuren (*ectonucleotide pyrophosphatase 3*, *retinoblastoma protein 1*, *protein phosphatase 2C beta*, *protein phosphatase 2A*) und an Regenerationsprozessen (*arg/ser-rich splicing factor 10*, *transcription factor 12*, *nucleolar protein 5*, *CD53*, *gamma adducin*)

beteiligt sind, oder die benötigte Energie (*NADH-ubiquinone oxidoreductase*, *electron-transferring-flavoprotein dehydrogenase*) für die Regeneration des Gewebes liefern [Knudsen et al., 2000; Cheng et al., 2000; Goldberg, 1999; Wick et al., 1994; Bellacosa et al., 1991].

#### **4.6.2 Potenzieller toxischer Wirkmechanismus von Puromycin *in vitro* – Vergleich mit *in vivo***

*In vitro* wurden durch Puromycin deutlich mehr Gene differentiell gegenüber der Kontrolle reguliert (insgesamt 94 Gene, **Tab. 33**), wobei die meisten Veränderungen durch die hohe Puromycin-Konzentration (15µM) hervorgerufen wurden. Auch bei Puromycin konnten die vorherigen Beobachtungen bestätigt werden, dass sich deutlich mehr der *in vitro* regulierten Gene *in vivo* als reguliert wieder finden (50.6%) als umgekehrt (37.9%) (**Tab. 37**). Dies mag zum einen an den bereits früher erwähnten Gründen liegen, dass die PTC als Mono-Kultur keine hormonellen, neuralen oder Immun-gesteuerten Antworten widerspiegeln können, andererseits mag auch die niedrige Dosierung von Puromycin *in vivo* dazu geführt haben, dass einige der *in vitro* beobachteten Veränderungen *in vivo* nicht auftraten.

Das *ranking* der durch Puromycin *in vitro* regulierten Kategorien zeigt an erster Stelle Prozesse, die bei der Differenzierung und / oder der Regulation der Proliferation und Regeneration eine Rolle spielen. Durch Behandlung mit Puromycin sind auch die PTC einer oxidativen Stress-Situation ausgesetzt, was durch die Induktion von *GADD 153*, *GADD 45*, *progression elevated gene 3*, *GAS 5*, *ubiquitin E3 ligase Mdm2* (Reparatur oxidativer DNA-Schäden [Janssen et al., 1993]), *dithiolethione-inducible gene 1* (Reparatur oxidativer Lipid-Schäden [Dick et al., 2001]), *protein-L-isoaspartate O-methyltransferase*, *HSP 70.3* und *HSP 70.1/2* (Reparatur oxidativer Protein-Schäden [Lowenson et al., 2001; Martindale und Holbrook, 2002]) deutlich wird. Die Induktion von zahlreichen Regenerations- und Proliferationsprozessen wird durch die verstärkte Transkription von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (*rev-erbA-beta*, *cbp/p300-interacting transactivator 2*, *activating transcription factor 3* [Dussault und Giguere, 1997; Kranc et al., 2003; Allan et al., 2001]) und Wachstumsfaktoren bzw. –mediatoren (*nerve growth factor beta*, *growth response protein CL-6*, *NGF-inducible protein PC4*, *protein tyrosine phosphatase 4A2*, *associated molecule with SH3 domain of STAM*, *pelota* [Alpers et al., 1993; Diamond

et al., 1993; Tanaka et al., 1999; Adham et al., 2003]) sowie der Induktion von Translationsinitiatoren (*eukaryotic initiation factor 5* [Pestova et al., 2001]) reflektiert. Somit konnte für Puromycin *in vivo* und *in vitro* ein Toxizitätsmechanismus demonstriert werden, der durch Generation von reaktiven Sauerstoffspezies zu Protein- und DNA-Schädigungen führte und die Induktion von zahlreichen Regenerationsprozessen zur Folge hatte.

#### 4.7 Gemeinsame Expressionsprofile und Unterschiede zwischen Quecksilber-II-chlorid, Paraquat und Puromycin

Ein Vergleich der Expressionsprofile von Nephrotoxinen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen kann dazu dienen, eine Einschätzung des nephrotoxischen Potenzials einer toxikologisch unbekanntes Substanz zu erhalten. Für diesen Ansatz ist allerdings eine Datenbank mit Expressionsprofilen möglichst vieler, verschiedener Nephrotoxine nötig. Der Aufbau einer solchen Datenbank würde den Rahmen dieser Dissertation sprengen. Die Expressionsprofile von Quecksilber-II-chlorid, Paraquat und Puromycin können jedoch zur Selektion von „Marker-Genen“, die charakteristisch für den Toxizitätsmechanismus der jeweiligen Substanzen sind, herangezogen werden. **Abb. 56** machte deutlich, dass kein einziges Gen bei allen drei untersuchten Nephrotoxinen gleichzeitig als differenziell reguliert angezeigt wurde. Dies lässt zunächst darauf schließen, dass jede Substanz ihre nephrotoxische Wirkung durch einen anderen Mechanismus vermittelte. Bei genauer Betrachtung der Gene fällt jedoch auf, dass für die Nephrotoxine dennoch zum Teil ähnliche Wirkmechanismen angenommen werden können (**Tab. 38**). So finden sich bei HgCl<sub>2</sub> und Paraquat zahlreiche gemeinsam regulierte Gene wieder, die auf oxidative Schädigungen der Zellen (*thioredoxin reductase 1*, *GRP 75*, *HSP 60*, *MCP-1*, *lysophospholipase*) sowie auf umfangreiche Regenerationsvorgänge hinweisen (*DNA topoisomerase 2 alpha*, *collagen type I alpha 1*, *growth response protein CL-6*, *transgelin*, *alpha-actin*). Auch bei den Genen, die von Paraquat und Puromycin gemeinsam reguliert werden, stehen die Reaktion auf oxidativen Stress (*HSP 84*, *HSP 105*, *cathepsin C*, *gene 33 polypeptide*) und die Regeneration von geschädigtem Gewebe im Vordergrund (*ectonucleotide pyrophosphatase 3*, *protein phosphatase 2C beta*, *gamma adducin*, *transcription factor 12*, *nuclear protein 5*,

*retinoblastoma protein 1*). Zusätzlich ist zu erkennen, dass sowohl bei der Puromycin- als auch bei der Paraquat-vermittelten Toxizität eine Veränderung des Energiehaushaltes stattfindet (*cytochrome c oxidase*, *electron-transferring flavoprotein dehydrogease*, *NADH-ubiquinone oxidoreductase*). Somit liegt allen untersuchten Nephrotoxinen ein toxischer Wirkmechanismus zugrunde, der zumindest teilweise durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt wird.

Die auslösenden Faktoren, die jeweils zur Bildung der ROS führten, waren jedoch bei den drei Toxinen unterschiedlich. Quecksilber-II-chlorid bewirkte beispielsweise durch die Induktion von Genen, deren Transkription unter der Kontrolle eines *antioxidant responsive element* steht, eine Depletion von Glutathion und somit eine Veränderung des Redoxstatus der Zellen. Die *glutathion-S-transferase A5, M1, M2, P1* und die *UDP-glucuronosyltransferase 1A6*, die jeweils ein solches ARE in ihrer Promoterregion aufweisen, gehören somit zu den hochsignifikanten Marker-Genen für HgCl<sub>2</sub> (**Tab. 39**).

Die Bildung der ROS bei der Behandlung der Ratten mit Paraquat war dagegen auf den Redoxzyklus zwischen Paraquat-Molekül und Paraquat-Radikal zurückzuführen, wobei O<sub>2</sub><sup>2-</sup> gebildet und gleichzeitig NADPH verbraucht wird. Dementsprechend sind für die Paraquat-vermittelte Toxizität vor allem solche Gene charakteristisch, die an Prozessen beteiligt sind, die der NADPH-Depletion entgegenwirken (*long-chain-fatty-acid-CoA ligase 2*, *acyl-CoA oxidase 1*). Die beiden Cytochrome *CYP450 4A1* und *CYP450 4B1* sind mit einem p-Wert von 0.0005 und 0.0007 ebenfalls signifikante Marker-Gene für Paraquat. Auch diese Gene könnten an der Metabolisierung von Paraquat beteiligt sein. In der Leber wird hauptsächlich die *NADP-cytochrome P450 reductase* für die Umsetzung von Paraquat verantwortlich gemacht. Es wird allerdings diskutiert, dass in anderen Organen auch andere Enzyme der Cytochrom P450 Familie an der Aktivierung von Paraquat beteiligt sind [Hara et al., 1990; Hara et al., 1991].

Für Puromycin wurde nur ein einziges signifikantes Marker-Gen identifiziert, die *protein tyrosine phosphatase BK (PTP-BK)*. *PTP-BK* wird in der Literatur als spezifisch für das Glomerulum in der Niere beschrieben und ist vorwiegend an Differenzierungsprozessen beteiligt [Wiggins et al., 1995; Sharif et al., 1998]. Bereits Kim und Kollegen (2002) haben *PTP-BK* als einen geeigneten Marker für Puromycin induzierte toxische Schädigungen des Glomerulums beschrieben.

## 4.8 Abschliessende Bemerkungen und Ausblick

Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es, den Toxizitätsmechanismus verschiedener bekannter Nephrotoxine mit Hilfe von Mikroarray-basierten Methoden zu untersuchen. Hierbei war insbesondere von Interesse, ob sich aus der Literatur bekannte Daten zur Toxizität dieser Substanzen durch *Toxicogenomics* bestätigen lassen und ob eventuell neue, noch unbekannte Zusammenhänge aufgedeckt werden können. Für die Beantwortung dieser Fragen standen zwei verschiedene Mikroarray-Plattformen zur Verfügung: cDNA-Mikroarrays und Oligonukleotid-Mikroarrays. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Vor- und Nachteile beider Plattformen untersucht. Durch Verifizierung der Expressionsdaten mit Hilfe der quantitativen Echt-Zeit-PCR als unabhängiger Methode konnten die Oligonukleotid-Mikroarrays als die verlässlichere Plattform identifiziert werden.

Literatur-gestützte Daten über den toxischen Wirkmechanismus von Ochratoxin A, Quecksilber-II-chlorid, Paraquat und Puromycin konnten durch umfangreiche statistische und biologische Bewertung der aus Rattennieren gewonnenen Genexpressionsdaten auf transkriptioneller Ebene bestätigt werden. Am Beispiel von Quecksilber-II-Chlorid konnten anhand des Zeitverlaufes der Genregulationen Hypothesen über den initialen toxischen Effekt bis hin zur Manifestation der toxischen Schäden aufgestellt werden, die sich mit Hilfe der einschlägigen Literatur bestätigen liessen. Dies ist ein anschauliches Beispiel für den grossen Nutzen, den *Toxicogenomics* für die Aufklärung von Toxizitätsmechanismen bietet: die globale Genexpressionsanalyse ermöglicht es, potenzielle Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen, in den Toxizitätsmechanismus einer Substanz involvierten *pathways* aufzudecken, während sich die klassischen mechanistischen Endpunkte in der Regel auf einen einzigen *pathway* oder sogar nur eine bestimmte Reaktion in einem *pathway* konzentrieren.

Bei der Untersuchung der transkriptionellen Änderungen nach der Behandlung mit Paraquat konnten ausserdem Hinweise auf einen bisher unbekanntem Wirkmechanismus gefunden werden. Die Induktion zahlreicher Gene, deren Proteinprodukte normalerweise in den Transport von Golgi-Vesikeln involviert sind, wurde im Zusammenhang mit Paraquat-induzierter Toxizität bis jetzt noch nicht beschrieben. Anhand dieses Hinweises aus der Genexpressionsanalyse kann nun eine Hypothese über die mögliche Rolle dieser Beobachtung im Mechanismus

Paraquat-vermittelter Toxizität aufgestellt werden, was schliesslich die Entwicklung gezielter weiterführender Assays erlaubt. In diesem Zusammenhang seien Studien von Grenet und Kollegen (1998) sowie Steiner und Kollegen (1996) erwähnt, in welchen *Toxicogenomics* entscheidend zum besseren mechanistischen Verständnis von Cyclosporin A-induzierter Nephrotoxizität beigetragen hat [rezensiert von Guerreiro et al., 2003]. In diesen Studien wurde in Cyclosporin A-behandelten Nieren eine verminderte Expression von *calbindin-D28kDa* festgestellt. Durch anschliessende in situ-Hybridisierung konnte gezeigt werden, dass die Expression von *calbindin-D28kDa* auf die distalen Tubuli beschränkt ist und dass es genau dort nach Cyclosporin A-Behandlung bedingt durch den Mangel an *calbindin-D28kDa* zu intratubulären, corticomedullären Calcifizierungen kam, die schliesslich zum Nierenversagen führten.

Die Untersuchung der Genexpression in Paraquat-behandelten Rattennieren zeigte weiterhin, dass *Toxicogenomics* bereits früher als die klassischen toxikologischen Methoden Hinweise auf die Toxizität einer Substanz liefern kann, da histopathologische Veränderungen in den Nieren zum Zeitpunkt der Genexpressionsuntersuchungen noch nicht zu erkennen waren.

Am Beispiel von Ochratoxin A konnte ein weiterer entscheidender Vorzug von toxikogenomischen Untersuchungen gezeigt werden. Die anhand von Rattenstudien und PTC der Ratte durchgeführten mechanistischen Interpretationen führten zu einem potenziellen Toxizitätsmechanismus von Ochratoxin A, der auch in den humanen PTC wiedergefunden wurde. Die Extrapolation von tierexperimentellen und *in vitro* gewonnenen Daten auf den Menschen scheint somit durchaus realistisch zu sein, was besonders bei der Risikobewertung von Substanzen eine grosse Rolle spielt [Simmons und Portier, 2002].

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Genexpressionsprofile mehrerer Nephrotoxine mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zu vergleichen und eventuelle gemeinsame Muster herauszufinden. Bei der vergleichenden Untersuchung der Transkriptionsprofile von Quecksilber-II-chlorid, Paraquat und Puromycin fiel auf, dass zwar kein Gen gefunden werden konnte, das bei allen drei Toxinen gemeinsam als differenziell reguliert erkannt wurde; jedoch scheint die Induktion von oxidativem Stress ein Vorgang zu sein, der bei allen untersuchten Nephrotoxinen eine entscheidende Rolle im jeweiligen Toxizitätsmechanismus einnimmt und somit als gemeinsames Profil dieser Nephrotoxine gewertet werden kann. Durch Integration

der Genexpressionsprofile weiterer Nephrotoxine in eine Datenbank und anschliessende Anwendung komplizierter mathematischer Auswertungsmethoden wie zum Beispiel dem überwachten maschinellen Lernen mit sogenannten „*support vector machines*“ könnten sich spezifische Genexpressionsmuster herausfinden lassen, die schliesslich bei der Prädiktion des toxischen Potenzials von beispielsweise neuen pharmazeutischen Entwicklungssubstanzen ihren Einsatz finden [Storck et al., 2002; Bulera et al., 2001].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde weiterhin ein *in vitro* Modell zur Untersuchung von Nephrotoxizität mit Hilfe von Mikroarrays etabliert. Das Verfahren zur Gewinnung und Kultivierung von proximalen Tubuluszellen der Ratte wurde optimiert und der Erhalt einer reinen Kultur proximaler Tubuluszellen, die in der Lage ist, charakteristische Funktionen auszuüben, wurde nachgewiesen. Durch die Untersuchung der Genexpression während der Kultivierung der PTC konnte zum einen ein optimaler Zeitraum für den Einsatz des *in vitro* Modells in toxikogenomischen Studien festgelegt werden. Zum anderen konnten sogenannte „Alterungs-Gene“ der Zellkultur identifiziert werden, die bei der Interpretation der Expressionsprofile behandelter PTC-Kulturen auch unter dem Aspekt des Alters der Zellkultur berücksichtigt werden müssen. Auf den hohen Stellenwert von *in vitro* Modellen in der Toxikologie wurde bereits in der Einleitung ausführlich hingewiesen. Bei den drei mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays untersuchten Nephrotoxinen konnten die meisten der *in vitro* regulierten Gene auch *in vivo* wiedergefunden werden, während jedoch in der umgekehrten Richtung das Zellkulturmodell nicht alle Transkriptionsveränderungen, die *in vivo* stattfinden, widerspiegelte. Dieses Ergebnis zeigt somit, dass das Zellkulturmodell sehr gut geeignet ist, um bestimmte Fragestellungen bezüglich der Genexpressionsveränderungen nach Toxineinwirkung zu beantworten, jedoch erwartungsgemäss die *in vivo* Situation nicht vollständig simulieren kann. Als mögliche Gründe können angeführt werden, dass es sich bei dem *in vitro* Modell um eine Mono-Kultur proximaler Tubuluszellen handelt, während bei den *in vivo* Untersuchungen RNA aus dem Nierencortex verwendet wurde, der zum einen systemischen Einflüssen ausgesetzt ist und in dem weiterhin auch andere Zelltypen wie beispielsweise mesangiale Zellen, neurale Zellen oder infiltrierte Monozyten vorhanden sein können. Immunologische, neurale oder hormonelle Regulationen konnten *in vitro* nicht stattfinden und spiegeln sich somit im Genexpressionsprofil der Nephrotoxine *in vitro* nicht wieder. Im Laufe dieser Arbeit

konnte jedoch nachgewiesen werden, dass mit Hilfe des entwickelten *in vitro* Modells, trotzdem zahlreiche Aussagen über den potenziellen Wirkmechanismus der untersuchten Nephrotoxine gemacht werden konnten, die die Erkenntnisse aus den *in vivo* Experimenten stützten. Das entwickelte Modell ist somit geeignet, einen ersten Überblick über das nephrotoxische Potenzial einer Substanz und die möglichen involvierten biochemischen Mechanismen zu erlangen. Dies sind Aspekte, die wiederum die Zahl an nötigen Tierstudien deutlich reduzieren und somit zum einen im Sinne der „drei R“ zum Wohle von Versuchstieren (*reduction, replacement and refinement*, Russel und Burch, 1959) sowie zum anderen für eine deutliche Zeit- und Kostenersparnis einen wichtigen Beitrag leisten können [Snodin, 2002].

In der Einleitung wurden die verschiedenen Einsatzgebiete für *Toxicogenomics* ausführlich erläutert. Diese Arbeit konzentrierte sich vor allem auf die mechanistische Analyse der Genexpressionsprofile ausgewählter Modell-Nephrotoxine *in vivo* und *in vitro*. Neue Erkenntnisse über die Toxizitätsmechanismen bekannter und unbekannter Substanzen zu erhalten wird sowohl bei der Entwicklung neuer pharmazeutischer Wirkstoffe als auch bei der Risikobewertung eine immer grössere Rolle spielen. Auch der Einsatz in der prädiktiven Toxikologie wird an Bedeutung gewinnen, da die Menge an zur Verfügung stehenden Daten stetig zunimmt und die Toxizitätsvorhersagen somit immer präziser werden. In Zukunft wird ausserdem das Studiendesign der Expressionsanalysen stärker berücksichtigt werden müssen, um die Reproduzierbarkeit der Daten von Studie zu Studie sowie zwischen verschiedenen Laboratorien zu gewährleisten [Waring und Halbert, 2002]. Die Kombination von Daten aus *Toxicogenomics*, *Toxicoproteomics* und *Metabonomics* mit den klassischen toxikologischen Untersuchungsmethoden erlangt auch bei den regulatorischen Instanzen immer grössere Bedeutung. So forciert beispielsweise die FDA (*Food and Drug Administration*) bei der Beantragung von neuen Medikamentenzulassungen die Einreichung toxikogenomischer Daten im Rahmen eines „*safe harbor*“-Konzeptes, bei dem diese Daten zunächst nur zu Informationszwecken dienen und noch keinen Einfluss auf die Zulassungsentscheidung haben sollen.

## 5 Zusammenfassung

Die Niere stellt im Organismus einen der Hauptangriffspunkte für Toxine dar. Dies liegt zum einen in der Tatsache begründet, dass zahlreiche Substanzen renal eliminiert werden. Eine weitere Funktion der Niere ist die Regulation des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes durch Rückresorption von Wasser, Ionen, Aminosäuren und Glucose. Dies führt zu einer Aufkonzentrierung des Primärharns und folglich werden für die zu eliminierenden Toxine im Harn normalerweise höhere Konzentrationen erreicht, als beispielsweise im Blutplasma. Ein Portfolio von verschiedenen metabolisierenden Enzymen, die hauptsächlich in der Niere auftreten, sorgt weiterhin dafür, dass einige der gefilterten Substanzen erst in der Niere eine Bioaktivierung zum Toxin erfahren. Es ist somit von grosser Bedeutung, geeignete Testsysteme zu entwickeln, mit denen die Nephrotoxizität von Arzneistoffen, Chemikalien und anderen Substanzen untersucht werden kann. Die globale Analyse der Genexpression mit Hilfe von Mikroarrays bietet die Möglichkeit, die Veränderungen in der Expression von mehreren Tausend Genen gleichzeitig in der Niere oder in renalen Zellkulturen nach der Einwirkung eines potenziellen Nephrotoxins zu untersuchen. Eines der Ziele dieser Arbeit bestand darin, diese vielversprechende Methode für den Einsatz bei der Untersuchung von Nephrotoxizität zu evaluieren. In diesem Zusammenhang sollte geklärt werden, inwiefern sich aus der Literatur bekannte Tatsachen über den Toxizitätsmechanismus bestimmter Nephrotoxine bestätigen lassen und ob Hinweise auf bisher unbekannte Aspekte bezüglich der Vermittlung der Nephrotoxizität der Nephrotoxine gewonnen werden können. Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war es, ein Zellkulturmodell zu etablieren und zu charakterisieren, das es ermöglicht, Genexpressionsanalysen zur Untersuchung der Nephrotoxizität *in vitro* durchzuführen und das ausserdem mit *in vivo* vergleichbare Daten liefert. In verschiedenen Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass eine Kultur primärer Zellen etabliert werden konnte, die die funktionellen Eigenschaften von proximalen Tubuluszellen zeigt und keine Verunreinigung mit anderen Zelltypen des Nierencortex aufweist. Weiterhin wurden die optimalen Bedingungen für die Durchführung von Expressionsanalysen mit dieser Zellkultur definiert. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden das Expressionsprofil von Ochratoxin A mit Hilfe von cDNA-Mikroarrays, sowie die Profile von Quecksilber-II-chlorid,

Paraquat und Puromycin mit Hilfe von Oligonukleotid-Mikroarrays *in vivo* und *in vitro* untersucht und bewertet. Ein Vergleich der beiden verfügbaren Plattformen (cDNA-Mikroarrays und Oligonukleotid-Mikroarrays) mit der Echt-Zeit-PCR als unabhängiger Methode lieferte aufschlussreiche Erkenntnisse über ihre Vor- und Nachteile. Die Analyse der Genexpressionsveränderungen nach der Einwirkung von OTA, HgCl<sub>2</sub>, Paraquat und Puromycin zeigte, dass sich mit Hilfe des Genexpressionsprofils zahlreiche Erkenntnisse über den Toxizitätsmechanismus der Substanzen gewinnen lassen, die sowohl durch die histopathologischen Befunde als auch mit Hilfe der einschlägigen Literatur bestätigt werden konnten. Zum Teil konnten sogar bisher unbekannte Aspekte der nephrotoxischen Wirkungen der untersuchten Modell-Toxine aufgedeckt werden, wie zum Beispiel die verstärkte Induktion von Golgi-Transport-assoziierten Genen im Nierencortex der Ratte nach Behandlung mit Paraquat. Die Analyse des Genexpressionsprofils kann somit vielversprechende Hinweise für das umfassende Verständnis des Toxizitätsmechanismus von Nephrotoxinen liefern. Der Vergleich der Expressionsmuster von HgCl<sub>2</sub>, Paraquat und Puromycin machte weiterhin deutlich, dass es einerseits transkriptionelle Änderungen gibt, die für das jeweilige Toxin spezifisch waren, andererseits aber auch Expressionsmuster aufgezeigt werden konnten, die allen untersuchten Nephrotoxinen gemeinsam waren. Durch die Identifizierung solcher gemeinsamen Genexpressionsprofile aus einer Datenbank mit zahlreichen bekannten Nephrotoxinen, könnte es in Zukunft sogar möglich sein, die potenzielle Nephrotoxizität unbekannter Arzneistoffe oder Chemikalien mit Hilfe von Mikroarrays vorherzusagen oder beispielsweise aus mehreren Kandidaten für einen neuen Arzneistoff, denjenigen mit dem geringsten nephrotoxischen Potenzial bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Entwicklung herauszufiltern.

## 6 Literaturverzeichnis

- Aardema** MJ, MacGregor JT. Toxicology and genetic toxicology in the new era of "toxicogenomics": impact of "-omics" technologies. *Mutat Res.* 2002 Jan 29;499(1):13-25.
- Adham**, I.M., Sallam, M.A., Steding, G., Korabiowska, M., Brinck, U., Hoyer-Fender, S., Oh, C., Engel, W. Disruption of the pelota gene causes early embryonic lethality and defects in cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2003 Feb;23(4):1470-6.
- Aleo** MF, Morandini F, Bettoni F, Tanganelli S, Vezzola A, Giuliani R, Steimberg N, Boniotti J, Bertasi B, Losio N, Apostoli P, Mazzoleni G. In vitro study of the nephrotoxic mechanism of mercuric chloride. *Med Lav.* 2002 May-Jun;93(3):267-78.
- Allan**, A.L., Albanese, C., Pestell, R.G., LaMarre, J. Activating transcription factor 3 induces DNA synthesis and expression of cyclin D1 in hepatocytes. *J Biol Chem.* 2001 Jul 20;276(29):27272-80. Epub 2001 May 24.
- Alpers**, C.E., Hudkins, K.L., Ferguson, M., Johnson, R.J., Schatteman, G.C., Bothwell, M. Nerve growth factor receptor expression in fetal, mature, and diseased human kidneys. *Lab Invest.* 1993 Dec;69(6):703-13.
- Altschul**, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10.
- Anderson**, M.E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact.* 1998;111-112:1-14
- Andrews**, P.M. A scanning and transmission electron microscopic comparison of puromycin aminonucleoside-induced nephrosis to hyperalbuminemia-induced proteinuria with emphasis on kidney podocyte pedicel loss. *Lab Invest.* 1977 Feb;36(2):183-97.
- Aronow** R. Metal and inorganic agents in clinical management of poisoning and drug overdose. Huddad L.M., Winchester J.F., eds: W.B. Saunders Co. 1983; 637-647
- Azuma**, K.K., Balkovetz, D.F., Magyar, C.E., Lescale-Matys, L., Zhang, Y., Chambrey, R., Warnock, D.G., McDonough A.A. Renal Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Exchanger isoforms and their regulation by thyroid hormone. *Am J Physiol.* 1996 Feb;270(2 Pt 1):C585-92
- Bacso**, Z., Everson, R.B., Eliason, J.F. The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res.* 2000;60(16):4623-8
- Bagenstose**, L.M., Salgame, P., Monestier, M. Cytokine regulation of a rodent model of mercuric chloride-induced autoimmunity. *Environ Health Perspect.* 1999 Oct;107 Suppl 5:807-10.
- Bantle**, J.P., Nath, K.A., Sutherland, D.E., Najarian, J.S., Ferris, T.F. Effects of cyclosporine on the renin-angiotensin-aldosterone system and potassium excretion in renal transplant recipients. *Arch Intern Med.* 1985 Mar, 145(3): 505-8.
- Barabas**, K., Szabo, L., Matkovics, B., Berencsi, G. Effects of paraquat on peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Gen Pharmacol.* 1984;15(2):133-7.
- Baslow**, M.H., Suckow, R.F., Sapirstein, V., Hungund, B.L. Expression of aspartoacylase activity in cultured rat macroglial cells is limited to oligodendrocytes. *J Mol Neurosci.* 1999;13(1-2):47-43

- Baudrimont**, I., Betbeder, A.M., Gharbi, A., Pfohl-Leszkowicz, A., Dirheimer, G., Creppy, E.E. Effect of superoxididismutase and catalase on the nephrotoxicity induced by subchronical administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology*. 1994;89(2), 101-11
- Baumann**, H., Gauldie, J. The acute phase response. *Immunol Today*. 1994 Feb;15(2):74-80.
- Beard**, S.E., Capaldi, S.R., Gee, P. Stress responses to DNA damaging agents in the human colon carcinoma cell line RKO. *Mutat Res*. 1996;371(1-2):1-13
- Bellacosa**, A., Lazo, P.A., Bear, S.E., Tschlis, P.N. The rat leukocyte antigen MRC OX-44 is a member of a new family of cell surface proteins which appear to be involved in growth regulation. *Mol Cell Biol*. 1991 May;11(5):2864-72.
- Bennett**, W.M., Porter, G.A. Nephrotoxicity of common drugs used by urologists. *Urol Clin North Am*. 1990 Feb, 17(1): 145-56
- Biemesderfer**, D., Rutherford, P.A., Nagy, T., Pizzonia, J.H., Abu-Alfa, A.K., Aronson, P.S. Monoclonal Antibodies for high-resolution localization of NHE3 in adult and neonatal rat kidney. *Am J Physiol*. 1997 Aug; 273(2 Pt 2):F289-99
- Bjorkman**, L., Sandborgh-Englund, G., Ekstrand, J. Mercury in saliva and feces after removal of amalgam fillings. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 May;144(1):156-62.
- Bohle**, A., Kressel, G., Muller, C.A., Muller, G.A. The pathogenesis of chronic renal failure. *Pathol Res Pract*. 1989 Oct, 185(4): 421-40
- Boom**, S.P., Gribnau, F.W., Russel, F.G. Organic cation transport and cationic drug interactions in freshly isolated proximal tubular cells of the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;263(2):445-50
- Bours**, V., Bonizzi, G., Bentires-Alj, M., Bureau, F., Piette, J., Lekeux, P., Merville, M. NF-kappaB activation in response to toxic and therapeutical agents: role in inflammation and cancer treatment. *Toxicology*. 2000 Nov 16;153(1-3):27-38.
- Branches**, F.J., Erickson, T.B., Aks, S.E., Hryhorczuk, D.O. The price of gold: mercury exposure in the Amazonian rain forest. *J Toxicol Clin Toxicol*. 1993;31(2):295-306.
- Bulera**, S.J., Eddy, S.M., Ferguson, E., Jatcoe, T.A., Reindel, J.F., Bleavins, M.R., De La Iglesia, F.A. RNA expression in the early characterization of hepatotoxicants in Wistar rats by high-density DNA microarrays. *Hepatology*. 2001 May;33(5):1239-58.
- Burczynski**, M.E., McMillian, M., Ciervo, J., Li, L., Parker, J.B., Dunn, R.T. 2nd, Hicken, S., Farr, S., Johnson, M.D. Toxicogenomics-based discrimination of toxic mechanism in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol Sci*. 2000 Dec;58(2):399-415.
- Bus**, J.S., Gibson, J.E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. *Environ Health Perspect*. 1984 Apr;55:37-46.
- Calderwood**, D.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem*. 2000 Jul 28;275(30):22607-10.
- Cannon**, V.T., Barfuss, D.W., Zalups, R.K. Molecular homology and the luminal transport of Hg<sup>2+</sup> in the renal proximal tubule. *J Am Soc Nephrol*. 2000 Mar;11(3):394-402.
- Caro**, J. Hypoxia regulation of gene transcription. *High Alt Med Biol*. 2001;2(2):145-54
- Castegnaro**, M., Mohr, U., Pfohl-Leszkowicz, A., Esteve, J., Steinmann, J., Tillmann, T., Michelon, J., Bartsch, H. Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int J Cancer*. 1998;77(1), 70-5

- Chae**, H.Z., Kim, H.J., Kang, S.W., Rhee, S.G. Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin. *Diabetes Res Clin Pract.* 1999 Sep;45(2-3):101-12.
- Chan**, B.S., Lazzaro, V.A., Seale, J.P., Duggin, G.G. The renal excretory mechanisms and the role of organic cations in modulating the renal handling of paraquat. *Pharmacol Ther.* 1998 Sep;79(3):193-203.
- Cheng**, A., Kaldis, P., Solomon, M.J. Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem.* 2000 Nov 3;275(44):34744-9.
- Corton**, J.C., Anderson, S.P., Stauber A.J., Janszen, D.B., Kimbell, J.S., Conolly, R.B. Entering the era of toxicogenomics with DNA microarrays, *CIIT Activities* 19 (2) (1999) 1–9.
- Corton**, J.C., Stauber, A.J. Toward construction of a transcript profile database predictive of chemical toxicity. *Toxicol Sci.* 2000 Dec;58(2):217-9.
- Courjault-Gautier**, F., Chevalier, J., Abbou, C.C., Chopin, D.K., Toutain, H.J. Consecutive use of hormonally defined serum-free media to establish highly differentiated human renal proximal tubule cells in primary culture. *J Am Soc Nephrol.* 1995 May, 5(11): 1949-63
- Cutler**, P., Bell, D.J., Birrell, H.C., Connelly, J.C., Connor, S.C., Holmes, E., Mitchell, B.C., Monte, S.Y., Neville, B.A., Pickford, R., Polley, S., Schneider, K., Skehel, J.M. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis.* 1999 Dec;20(18):3647-58.
- Danis**, M., Kauffman, F.C., Evans, R.K., Thurman, R.G. Role of reducing equivalents from fatty acid oxidation in mixed-function oxidation: studies with 2-bromooctanoate in the perfused rat liver. *J Pharmacol Exp Ther.* 1981 Nov;219(2):383-8.
- Debouck**, C., Goodfellow, P.N. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):48-50.
- DeGray**, J.A., Rao, D.N., Mason, R.P. Reduction of paraquat and related bipyridylum compounds to free radical metabolites by rat hepatocytes. *Arch Biochem Biophys.* 1991 Aug 15;289(1):145-52.
- Dekant**, W. Biotransformation and renal processing of nephrotoxic agents. *Arch Toxicol Suppl.* 1996, 18: 163-72
- Dekant**, W., Vamvakas, S. Biotransformation and membrane transport in nephrotoxicity. *Crit Rev Toxicol.* 1996 May, 26(3): 309-34
- DeSilva**, D.M., Aust, S.D. Ferritin and ceruloplasmin in oxidative damage: review and recent findings. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1993;71(9):715-20
- Desmouliere**, A., Darby, I., Costa, A.M., Raccurt, M., Tuchweber, B., Sommer, P., Gabbiani, G. Extracellular matrix deposition, lysyl oxidase expression, and myofibroblastic differentiation during the initial stages of cholestatic fibrosis in the rat. *Lab Invest.* 1997 Jun;76(6):765-78.
- Diamond**, J.R., Bonventre, J.V., Karnovsky, M.J. A role for oxygen free radicals in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 1986 Feb;29(2):478-83.
- Diamond**, R.H., Du, K., Lee, V.M., Mohn, K.L., Haber, B.A., Tewari, D.S., Taub, R. Novel delayed-early and highly insulin-induced growth response genes. Identification of HRS, a potential regulator of alternative pre-mRNA splicing. *J Biol Chem.* 1993 Jul 15;268(20):15185-92.
- Diamond**, G.L., Zalups, R.K. Understanding renal toxicity of heavy metals. *Toxicol Pathol.* 1998 Jan-Feb, 26(1): 92-103

- Dick**, R.A., Kwak, M.K., Sutter, T.R., Kensler, T.W. Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. A new role for leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase/15-oxoprostaglandin 13-reductase. *J Biol Chem.* 2001 Nov 2;276(44):40803-10. Epub 2001 Aug 27.
- Dickmann** K.G., Mandel L.J. Glycolytic and oxidative metabolism in primary renal proximal tubule cultures. *Am. J. Physiol.* 1989;257(2Pt1):C333-40
- Dietrich**, D.R., Swenberg, J.A. The presence of alpha 2u-globulin is necessary for d-limonene promotion of male rat kidney tumors. *Cancer Res.* 1991 Jul 1, 51(13): 3512-21
- Dinkova-Kostova**, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., Talalay, P. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Sep 3;99(18):11908-13.
- Dirheimer**, G., Creppy, E.E. Mechanism of action of ochratoxin A. *IARC Sci Publ.* 1991;115, 171-86
- Dobashi**, K., Ghosh, B., Orak, J.K., Singh, I., Singh, A.K. Kidney ischemia-reperfusion: modulation of antioxidant defenses. *Mol Cell Biochem.* 2000;205(1-2):1-11
- Dopp**, E., Muller, J., Hahnel, C., Schiffmann, D. Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A. *Food Chem Toxicol.* 1999;37(7), 713-21
- Drews**, J. Antibiotics: inhibitors of protein synthesis *Med Klin.* 1966 Jan 21;61(3):81-6.
- Duggan**, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P., Trent, J.M. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4.
- Dussault**, I., Giguere, V. Differential regulation of the N-myc proto-oncogene by ROR alpha and RVR, two orphan members of the superfamily of nuclear hormone receptors. *Mol Cell Biol.* 1997 Apr;17(4):1860-7.
- Dyall-Smith**, D.J., Scurry, J.P. Mercury pigmentation and high mercury levels from the use of a cosmetic cream. *Med J Aust.* 1990 Oct 1;153(7):409-10, 414-5.
- Eddy**, A.A., Michael, A.F. Acute tubulointerstitial nephritis associated with aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 1988 Jan;33(1):14-23.
- Eikmans**, M., Baelde, H.J., de Heer, E., Bruijn, J.A. RNA expression profiling as prognostic tool in renal patients: toward nephrogenomics. *Kidney Int.* 2002 Oct;62(4):1125-35.
- Elliget**, K.A., Trump, B.F. Primary cultures of normal rat kidney proximal tubule epithelial cells for studies of renal cell injury. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991 Sep;27A(9):739-48.
- Evans**, A.R., Limp-Foster, M., Kelley, M.R. Going APE over ref-1. *Mutat. Res.* 2000;461(2):83-108
- Fanos**, V., Cataldi, L. Renal transport of antibiotics and nephrotoxicity: a review. *J Chemother.* 2001 Oct, 13(5): 461-72
- Farr**, S., Dunn, R.T. 2nd. Concise review: gene expression applied to toxicology. *Toxicol Sci.* 1999 Jul;50(1):1-9.
- Favis**, R., Barany, F. Mutation detection in K-ras, BRCA1, BRCA2, and p53 using PCR/LDR and a universal DNA microarray. *Ann N Y Acad Sci.* 2000 Apr;906:39-43.

- Florell**, S.R., Coffin, C.M., Holden, J.A., Zimmermann, J.W., Gerwels, J.W., Summers, B.K., Jones, D.A., Leachman, S.A. Preservation of RNA for functional genomic studies: a multidisciplinary tumor bank control. *Mod. Pathol.* 2001;14(2):116-28
- Freedman**, S.J., Sun, Z.Y., Kung, A.L., France, D.S., Wagner, G., Eck, M.J. Structural basis for negative regulation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  by CITED2. *Nat Struct Biol.* 2003 Jul;10(7):504-12.
- Frenk**, S., Antonowicz, I., Craig, J.M., Metcalf, J. Experimental nephrotic syndrome induced in rats by aminonucleoside; renal lesions and body electrolyte composition. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1955 Jul;89(3):424-7.
- Fromont-Racine**, M., Senger, B., Saveanu, C., Fasiolo, F. Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene.* 2003 Aug 14;313:17-42.
- Fuke**, C., Ameno, K., Ameno, S., Kinoshita, H., Ijiri, I. Detection of two metabolites of diquat in urine and serum of poisoned patients after ingestion of a combined herbicide of paraquat and diquat. *Arch Toxicol.* 1996;70(8):504-7.
- Gabutti**, L., Gugger, M., Marti, H.P. Impaired kidney function in lithium therapy. *Ther Umsch.* 1998 Sep, 55(9): 562-4
- Galibert**, M.D., Boucontet, L., Goding, C.R., Meo, T. Recognition of the E-C4 element from the C4 complement gene promoter by the upstream stimulatory factor-1 transcription factor. *J Immunol.* 1997 Dec 15;159(12):6176-83.
- Gekle**, M., Silbernagl, S. The role of the proximal tubule in ochratoxin A nephrotoxicity in vivo: toxodynamic and toxokinetic aspects. *Ren. Physiol. Biochem.* 1994;17(1):40-9
- Ghiggeri**, G.M., Cercignani, G., Ginevri, F., Bertelli, R., Zetta, L., Greco, F., Candiano, G., Trivelli, A., Gusmano, R. Puromycin aminonucleoside metabolism by glomeruli and glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int.* 1991 Jul;40(1):35-42.
- Giachelli**, C.M., Lombardi, D., Johnson, R.J., Murry, C.E., Almeida, M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol.* 1998 Feb;152(2):353-8.
- Giannakakou**, P., Sackett, D.L., Ward, Y., Webster, K.R., Blagosklonny, M.V., Fojo, T. P53 is associated with cellular microtubules and is transported to the nucleus by dynein. *Nat Cell Biol.* 2000;2(10):709-17
- Gillman**, I.G., Clark, T.N., Manderville, R.A. Oxidation of ochratoxin A by an Fe-porphyrin system: model for enzymatic activation and DNA cleavage. *Chem Res Toxicol.* 1999;12(11), 1066-76
- Goldberg**, Y. Protein phosphatase 2A: who shall regulate the regulator? *Biochem Pharmacol.* 1999 Feb 15;57(4):321-8.
- Goldsworthy**, T.L., Lyght, O., Burnett, V.L., Popp, J.A. Potential role of alpha-2 mu-globulin, protein droplet accumulation, and cell replication in the renal carcinogenicity of rats exposed to trichloroethylene, perchloroethylene, and pentachloroethane. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988 Nov, 96(2): 367-79
- Grenet**, O., Varela, M.C., Staedtler, F., Steiner, S. The cyclosporine A-induced decrease in rat renal calbindin-D28kDa protein as a consequence of a decrease in its mRNA. *Biochem Pharmacol.* 1998 Apr 1;55(7):1131-3.

- Grills, G., Griffin, C., Massimi, A., Lilley, K., Knudtson, K., VanEe, J.** A current profile of microarray laboratories: results of the 2000-2001 ABRF Microarray Research Group Survey of Laboratories using microarray technologies. 2001; presented at the ABRF Conference in San Diego, USA
- Gros, C., Souque, A., Schwartz, J.C.** Inactivation of atrial natriuretic factor in mice in vivo: crucial role of enkephalinase (EC 3.4.24.11). *Eur J Pharmacol.* 1990 Apr 10;179(1-2):45-56.
- Gstraunthaler, G.J.** Epithelial cells in tissue culture. *Ren Physiol Biochem.* 1988 Jan-Feb, 11(1-2): 1-42
- Guay-Woodford, L.M.** Overview: the genetics of renal disease. *Semin Nephrol.* 1999 Jul;19(4):312-8.
- Guerreiro, N., Staedtler, F., Grenet, O., Kehren, J., Chibout, S.D.** Toxicogenomics in drug development. *Toxicol Pathol.* 2003 Sep-Oct;31(5):471-9.
- Halbach, S.** Amalgam tooth fillings and man's mercury burden. *Hum Exp Toxicol.* 1994 Jul;13(7):496-501.
- Hald, B.** Porcine nephropathy in Europe. *IARC Sci Publ.* 1991;115, 49-56
- Hanigan, M.H., Frierson, H.F. Jr.** Immunohistochemical detection of gamma-glutamyl transpeptidase in normal human tissue. *J Histochem Cytochem.* 1996 Oct;44(10):1101-8.
- Hara, S., Endo, T., Kuriwa, F., Kano, S.** NADPH-dependent reaction of paraquat in mouse brain microsomes. *Toxicol Lett.* 1990 Dec;54(2-3):271-7.
- Hara, S., Endo, T., Kuriwa, F., Kano, S.** Different effects of paraquat on microsomal lipid peroxidation in mouse brain, lung and liver. *Pharmacol Toxicol.* 1991 Apr;68(4):260-5.
- Hartigan, J.A.** Clustering Algorithms. 1975. Wiley, Chichester.
- Hartigan, J.A., Wong, M.A.** A k-means clustering algorithm. *Applied Statistics* 1979;28:100-108
- Hilmy, M.I., Rahim, S.A., Abbas, A.H.** Normal and lethal mercury levels in human beings. *Toxicology.* 1976 Aug-Sep;6(2):155-9.
- Holmes, E., Bonner, F.W., Sweatman, B.C., Lindon, J.C., Beddell, C.R., Rahr, E., Nicholson, J.K.** Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury(II) chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol.* 1992 Nov;42(5):922-30.
- Holt, D., Magos, L., Webb, M.** The interaction of cadmium-induced rat renal metallothionein with bivalent mercury in vitro. *Chem Biol Interact.* 1980 Oct;32(1-2):125-35.
- Hori, R., Okamura, M., Takayama, A., Hirozane, K., Takano, M.** Transport of organic anion in the OK kidney epithelial cell line. *Am J Physiol.* 1993 Jun;264(6 Pt 2):F975-80.
- Huang, K.P.** Role of protein kinase C in cellular regulation. *Biofactors.* 1990 Jul;2(3):171-8.
- Huang, Q., Dunn, R.T. 2nd, Jayadev, S., DiSorbo, O., Pack, F.D., Farr, S.B., Stoll, R.E., Blanchard, K.T.** Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci.* 2001 Oct;63(2):196-207
- Huff, J.E.** Carcinogenicity of ochratoxin A in experimental animals. *IARC Sci Publ.* 1991;115, 229-44
- Huff, J.** Chemicals associated with tumours of the kidney, urinary bladder and thyroid gland in laboratory rodents from 2000 US National Toxicology Program/National Cancer Institute bioassays for carcinogenicity. *IARC Sci Publ.* 1999, (147): 211-25
- Huff, T., Müller, C.S.G., Otto, A.M., Netzker, R., Hannappel, E.**  $\beta$ -Thymosins, small acidic peptides with multiple functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001;33:205-220.

- Ideker**, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Hood, L. Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 2001 May 4;292(5518):929-34
- Imai**, E., Takenaka, M., Nagasawa, Y., Kaimori, J., Hori, M. Application of microarray assay to nephrology. *Nephrol Dial Transplant*. 2000;15 Suppl 6:78-80.
- Inamoto**, H., Ino, Y., Inamoto, N., Wada, T., Kihara, H.K. Effect of HgCl<sub>2</sub> on rat kidney cells in primary culture. *Lab Invest*. 1976 May;34(5):489-94.
- Jaffe**, J.J. Nucleoside analogs as antiparasitic agents. *Ann N Y Acad Sci*. 1975 Aug 8;255(751106-751230-2):306-16.
- Janssen**, Y.M., Van Houten, B., Borm, P.J., Mossman, B.T. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab Invest*. 1993 Sep;69(3):261-74.
- Jung**, K.Y., Takeda, M., Kim, D.K., Tojo, A., Narikawa, S., Yoo, B.S., Hosoyamada, M., Cha, S.H., Sekine, T., Endou, H. Characterization of ochratoxin A transport by human organic anion transporters. *Life Sci*. 2001 Sep 21;69(18):2123-35.
- Kaiser**, C., Ferro-Novick, S. Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Aug;10(4):477-82.
- Kalmovarin**, N., Friedrichs, W.E., O'Brien, H.V., Linehan, L.A., Bowman, B.H., Yang, F. Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation. *Inflammation* 1991;15(5):369-79
- Kaloyanides**, G.J. Antibiotic-related nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant*. 1994, 9 Suppl 4: 130-4
- Kang-Yum**, E., Oransky, S.H. Chinese patent medicine as a potential source of mercury poisoning. *Vet Hum Toxicol*. 1992 Jun;34(3):235-8.
- Kaputlu**, I., Sadan, G., Karayalcin, B., Boz, A. Beneficial effects of pentoxifylline on cyclosporine-induced nephrotoxicity. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1997 May, 24(5): 365-9
- Kawahara**, H., Takashima, Y., Nakamura, M., Yamagami, A. Electron microscopic study of the cytotoxicity of cadmium and mercury in vitro. *J Dent Res*. 1975 Jan-Feb;54(1):125-30.
- Kawaguchi**, M., Yamada, M., Wada, H., Okigaki, T. Roles of active oxygen species in glomerular epithelial cell injury in vitro caused by puromycin aminonucleoside. *Toxicology*. 1992;72(3):329-40.
- Keshav**, S., Chung, P., Milon, G., Gordon, S. Lysozyme is an inducible marker of macrophage activation in murine tissues as demonstrated by in situ hybridization. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1049-58.
- Kim**, Y.H., Goyal, M., Wharram, B., Wiggins, J., Kershaw, D., Wiggins, R. GLEPP1 receptor tyrosine phosphatase (Ptpro) in rat PAN nephrosis. A marker of acute podocyte injury. *Nephron*. 2002 Apr;90(4):471-6.
- Knudsen**, K.E., Booth, D., Naderi, S., Sever-Chroneos, Z., Fribourg, A.F., Hunton, I.C., Feramisco, J.R., Wang, J.Y., Knudsen, E.S. RB-dependent S-phase response to DNA damage. *Mol Cell Biol*. 2000 Oct;20(20):7751-63.
- Kohonen**, T. The Self-Organizing Map. *Proceedings of the IEEE* 1990;78(9):1464-1480
- Kojima**, S., Hayashi, S., Shimokado, K., Suzuki, Y., Shimada, J., Crippa, M.P., Friedmann, S.L. Transcriptional activation of urokinase by the kruppel-like factor ZF9/COPEB activates latent TGF- $\beta$ 1 in vascular endothelial cells. *Blood* 2000;95(4):1309-1316)

- Koren, G.** The nephrotoxic potential of drugs and chemicals. Pharmacological basis and clinical relevance. *Med Toxicol Adverse Drug Exp.* 1989 Jan-Feb, 4(1): 59-72
- Kranc, K.R., Bamforth, S.D., Braganca, J., Norbury, C., van Lohuizen, M., Bhattacharya, S.** Transcriptional coactivator Cited2 induces Bmi1 and Mel18 and controls fibroblast proliferation via Ink4a/ARF. *Mol Cell Biol.* 2003 Nov;23(21):7658-66.
- Krasagakis, K., Fimmel, S., Genten, D., Eberle, J., Quas, P., Ziegler, W., Haller, H., Orfanos, C.E.** Lack of protein kinase C (PKC)-beta and low PKC-alpha, -delta, -epsilon, and -zeta isozyme levels in proliferating human melanoma cells. *Int. J. Oncol.* 2002;20(4):865-71
- Kumble, K.D., Iversen, P.L., Vishwanatha, J.K.** The role of primer recognition proteins in DNA replication: inhibition of cellular proliferation by antisense oligodeoxyribonucleotides. *J. Cell Sci.* 1992;101(Pt 1):35-41
- Kunin, C.M., Chesney, R.W., Craig, W.A., England, A.C., DeAngelis, C.** Enzymuria as a marker of renal injury and disease: studies of N-acetyl-beta-glucosaminidase in the general population and in patients with renal disease. *Pediatrics.* 1978 Nov, 62(5): 751-60
- Kuo, W.P., Jenssen, T.K., Butte, A.J., Ohno-Machado, L., Kohane, I.S.** Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics.* 2002 Mar;18(3):405-12.
- Kurisaki, E., Sato, H.** Tissue distribution of paraquat and diquat after oral administration in rats. *Forensic Sci Int.* 1979 Nov;14(3):165-70.
- Lee, W.S., Kanai, Y., Wells, R.G., Hediger, M.A.** The high affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter. Re-evaluation of function and distribution of expression. *J Biol Chem.* 1994 Apr 22;269(16):12032-9.
- Li, J., Pankratz, M., Johnson, J.A.** Differential gene expression patterns revealed by oligonucleotide versus long cDNA arrays. *Toxicol Sci.* 2002 Oct;69(2):383-90
- Li, W., Choy, D.F., Lam, M.S., Morgan, T., Sullivan, M.E., Post, J.M.** Use of cultured cells of kidney origin to assess specific cytotoxic effects of nephrotoxins. *Toxicol In Vitro.* 2003 Feb;17(1):107-13
- Liang, P., Pardee, A.B.** Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science.* 1992 Aug 14;257(5072):967-71.
- Lin, L., Wang, Y., Bergmann, G., Kelloff, G.J., Lubet, R.A., You, M.** Detection of differentially expressed genes in mouse lung adenocarcinomas. *Exp. Lung Res.* 2001;27(3):217-29
- Lin, T.N., Wang, P.Y., Chi, S.I., Kuo, J.S.** Differential regulation of ciliary neurotrophic factor (CNTF) and CNTF receptor alpha (CNTFR alpha) expression following focal cerebral ischemia. *Mol. Brain Res.* 1998;55(1):71-80
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R., Lockhart, D.J.** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 1999 Jan;21(1 Suppl):20-4.
- Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., Kelvin, D.J., Taub, D.D.** Chemokines regulate T cell adherence to recombinant adhesion molecules and extracellular matrix proteins. *J Immunol.* 1996 Feb 1;156(3):932-8.
- Lowenson, J.D., Kim, E., Young, S.G., Clarke, S.** Limited accumulation of damaged proteins in L-isoaspartyl (D-aspartyl) O-methyltransferase-deficient mice. *J Biol Chem.* 2001 Jun 8;276(23):20695-702.

- Lu, B., Rutledge, B.J., Gu, L., Fiorillo, J., Lukacs, N.W., Kunkel, S.L., North, R., Gerard, C., Rollins, B.J.** Abnormalities in monocyte recruitment and cytokine expression in monocyte chemoattractant protein 1-deficient mice. *J Exp Med.* 1998 Feb 16;187(4):601-8.
- Lund, B.O., Miller, D.M., Woods, J.S.** Studies on Hg(II)-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1993 May 25;45(10):2017-24.
- Macfarlane, S.R., Seatter, M.J., Kanke, T., Hunter, G.D., Plevin, R.** Proteinase-activated receptors. *Pharmacol. Rev.* 2001;53(2):245-82
- Madias, N.E., Harrington, J.T.** Platinum nephrotoxicity. *Am J Med.* 1978 Aug, 65(2):307-14
- Maeshima, A., Zhang, Y., Nojima, Y., Naruse, T., Kojima, I.** Involvement of the activin-follistatin system in tubular regeneration after renal ischemia in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2001;12:1685-1695
- Mahnensmith, R.L., Aronson, P.S.** The Plasma-membrane Sodium-hydrogen Exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ. Res.* 1985;56:773-788
- Martindale, J.L., Holbrook, N.J.** Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002 Jul;192(1):1-15.
- Matejka, G.L., Thornemo, M., Kernholt, A., Lindahl, A.** Expression of Id-1 mRNA and protein in the post-ischemic regenerating rat kidney. *Exp. Nephrol.* 1998;6(3):253-64
- McKerracher, L., Hirscheimer, A.** Slow transport of the cytoskeleton after axonal injury. *J Neurobiol.* 1992 Jul;23(5):568-78.
- McLauchlan, H.J., James, J., Lucocq, J.M., Ponnambalam, S.** Characterization and regulation of constitutive transport intermediates involved in trafficking from the trans-Golgi network. *Cell Biol Int.* 2001;25(8):705-13.
- Meier, U.T., Blobel, G.** NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(6 Pt 1):1505-14. Erratum in: *J Cell Biol* 1998 Jan 26;140(2):447.
- Meisner, H., Cimbala, M.** Effect of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys. *Dev Toxicol Environ Sci.* 1986;12, 261-71
- Mertens, B.J.** Microarrays, pattern recognition and exploratory data analysis. *Stat Med.* 2003 Jun 15;22(11):1879-99.
- Miranda-Vizueté, A., Damdimopoulos, A.E., Spyrou, G.** The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal.* 2000 Winter;2(4):801-10.
- Miyake, H., Gleave, M.E., Arakawa, S., Kamidono, S., Hara, I.** Introducing the clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their metastatic potential. *J Urol.* 2002;167(5):2203-8
- Molitoris, B.A.** The potential role of ischemia in renal disease progression. *Kidney Int Suppl.* 1992 May;36:S21-5.
- Morgan, E.T., Li-Masters, T., Cheng, P.Y.** Mechanisms of cytochrome P450 regulation by inflammatory mediators. *Toxicology.* 2002 Dec 27;181-182:207-10.
- Morigi, M., Macconi, D., Zoja, C., Donadelli, R., Buelli, S., Zanchi, C., Ghilardi, M., Remuzzi, G.** Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> through a PKC-dependent pathway. *J Am Soc Nephrol.* 2002 May;13(5):1179-89.
- Morrison, A.R., Pascoe, N.** Modification of renal cortical subcellular membrane phospholipids induced by mercuric chloride. *Kidney Int.* 1986 Feb;29(2):496-501.

- Moshage**, H.J., Kleter, B.E., van Pelt, J.F., Roelofs, H.M., Kleuskens, J.A., Yap, S.H. Fibrinogen and albumin synthesis are regulated at the transcriptional level during the acute phase response. *Biochim Biophys Acta*. 1988 Sep 7;950(3):450-4.
- Mukhopadhyay**, C.K., Mazumder, B., Fox, P.L. Role of hypoxia-inducible factor-1 in transcriptional activation of ceruloplasmin by iron deficiency. *J. Biol. Chem.* 2000;275(28):21048-54
- Murray**, M.D., Brater, D.C., Tierney, W.M., Hui, S.L., McDonald, C.J. Ibuprofen-associated renal impairment in a large general internal medicine practice. *Am J Med Sci*. 1990 Apr, 299(4): 222-9
- Nag Das** S.K., Bhattacharyya, A.K. Purification and characterization of human seminal plasma aminopeptidase. *Ital J Biochem*. 1988 May-Jun;37(3):148-64.
- Nath**, K.A., Croatt, A.J., Likely, S., Behrens, T.W., Warden, D. Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury. *Kidney Int*. 1996 Sep;50(3):1032-43.
- Nauta**, A.J., Trouw, L.A., Daha, M.R., Tijisma, O., Nieuwland, R., Schwaeble, W.J., Gingras, A.R., Mantovani, A., Hack, E.C., Roos, A. Direct binding of C1q to apoptotic cells and cell blebs induces complement activation. *Eur J Immunol*. 2002 Jun;32(6):1726-36.
- Neville**, L.F., Mathiak, G., Bagasra, O. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): a novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine Growth Factor Rev*. 1997 Sep;8(3):207-19.
- Ng**, W.L., Kazmierczak, K.M., Robertson, G.T., Gilmour, R., Winkler, M.E. Transcriptional regulation and signature patterns revealed by microarray analyses of *Streptococcus pneumoniae* R6 challenged with sublethal concentrations of translation inhibitors. *J Bacteriol*. 2003 Jan;185(1):359-70.
- Nicholson**, J.K. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and pattern recognition analysis of the biochemical processes associated with the progression of and recovery from nephrotoxic lesions in the rat induced by mercury-(II)-chloride and 2-bromoethanamine. *Mol Pharmacol*. 1992 Nov, 42(5): 922-30
- Nicholson**, J.K., Lindon, J.C., Holmes, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999 Nov;29(11):1181-9.
- Nouwen**, E.J., Dauwe, S., van der Biest, I, and De Broe, M.E. Stage- and segment-specific expression of cell-adhesion molecules N-CAM, A-CAM, and L-CAM in the kidney. *Kidney Int*. 1993;44(1), 147-58
- Nuwaysir**, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C., Afshari, C.A. Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog*. 1999 Mar;24(3):153-9.
- Obrecht-Pflumio**, S., Dirheimer, G. In vitro DNA and dGMP adducts formation caused by ochratoxin A. *Chem Biol Interact*. 2000 Jun 15, 127(1): 29-44
- Ohmori**, Y., Hamilton, T.A. The interferon-stimulated response element and a kappa B site mediate synergistic induction of murine IP-10 gene transcription by IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*. 1995 May 15;154(10):5235-44.
- Omar**, R.F., Hasinoff, B.B., Mejilla, F., Rahimtula, A.D. Mechanism of Ochratoxin A stimulated lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*. 1990;40(6), 1183-91
- Ou**, Z.L., Natori, Y., Natori, Y. Gene expression of CC chemokines in experimental acute tubulointerstitial nephritis. *J Lab Clin Med*. 1999 Jan;133(1):41-7.

- Ou, Z.L., Natori, Y., Natori, Y.** Transient and sequential expression of chemokine mRNA in glomeruli in puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephron*. 2000 Jul;85(3):254-7.
- Pages, G., Rouayrenc, J.F., Le Cam, G., Mariller, M., Le Cam, A.** Molecular characterization of three rat liver serine-protease inhibitors affected by inflammation and hypophysectomy. Protein and mRNA analysis and cDNA cloning. *Eur. J. Biochem*. 1990;190(2):385-91
- Pahl, H.L.** Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene*. 1999 Nov 22;18(49):6853-66.
- Paller, M.S.** Drug-induced nephropathies. *Med Clin North Am*. 1990 Jul, 74(4): 909-17
- Pang, J.X., Ginanni, N., Dongre, A.R., Hefta, S.A., Opitek, G.J.** Biomarker discovery in urine by proteomics. *J Proteome Res*. 2002 Mar-Apr, 1(2): 161-9
- Pan, L.P., He, Q.Z., Chan, S.I.** The nature of zinc in cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 1991 Oct 5;266(28):19109-12.
- Parker, A., Engel, P.C.** Preliminary evidence for the existence of specific functional assemblies between enzymes of the beta-oxidation pathway and the respiratory chain. *Biochem J*. 2000 Feb 1;345 Pt 3:429-35.
- Parkinson, C.** The changing pattern of paraquat poisoning in man. *Histopathology*. 1980 Mar;4(2):171-83.
- Patton, G.W., Paciga, J.E., Shelley, S.A.** NR8383 alveolar macrophage toxic growth arrest by hydrogen peroxide is associated with induction of growth-arrest and DNA damage-inducible genes GADD45 and GADD153. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997 Nov;147(1):126-34.
- Pennie, W.D., Tugwood, J.D., Oliver, G.J., Kimber, I.** The principles and practice of toxigenomics: applications and opportunities. *Toxicol Sci*. 2000 Apr;54(2):277-83
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., Hellen, C.U.** Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jun 19;98(13):7029-36.
- Pfaller, W., Gstraunthaler, G.** Nephrotoxicity testing in vitro - what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect*. 1998 Apr, 106 Suppl 2: 559-69
- Pfohl-Leszkowicz, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Dirheimer, G.** DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin a. *IARC Sci Publ*. 1991;115, 245-53
- Pinol-Roma, S.** Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis. *Mol Biol Cell*. 1999 Jan;10(1):77-90.
- Prester, T., Talalay, P.** Electrophile and antioxidant regulation of enzymes that detoxify carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Sep 12;92(19):8965-9.
- Price, R.G., Ellis, B.G.** Urinary enzyme excretion in aminonucleoside nephrosis in rats. *Chem Biol Interact*. 1976 Jun;13(3-4):353-8.
- Ramirez, M., Prieto, I., Martinez, J.M., Vargas, F., Alba, F.** Renal aminopeptidase activities in animal models of hypertension. *Regul Pept*. 1997 Oct 31;72(2-3):155-9.
- Randolph, J.B., Waggoner, A.S.** Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. *Nucleic Acids Res*. 1997 Jul 15;25(14):2923-9.
- Rasmussen, H.H., Orntoft, T.F., Wolf, H., Celis, J.E.** Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J Urol*. 1996 Jun, 155(6): 2113-9

- Rezzani**, R., Angoscini, P., Borsani, E., Rodella, L., Bianchi, R. Cyclosporine A-induced toxicity in two renal cell culture models (LLC-PK1 and MDCK). *Histochem J.* 2002 Jan-Feb;34(1-2):27-33
- Ricardo**, S.D., Bertram, J.F., Ryan, G.B. Antioxidants protect podocyte foot processes in puromycin aminonucleoside-treated rats. *J Am Soc Nephrol.* 1994 Jun;4(12):1974-86.
- Riewald**, M., Ruf, W. Mechanistic coupling of protease signaling and initiation of coagulation by tissue factor. *PNAS* 2001;98(14):7742-7
- Risher** J.F. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. 2003; Concise International Chemical Assessment Document 50, Draft, WHO
- Rockett**, J.C., Dix, D.J. Application of DNA arrays to toxicology. *Environ Health Perspect.* 1999 Aug;107(8):681-5.
- Rodi**, C.P., Bunch, R.T., Curtiss, S.W., Kier, L.D., Cabonce, M.A., Davila, J.C., Mitchell, M.D., Alden, C.L., Morris, D.L. Revolution through genomics in investigative and discovery toxicology. *Toxicol Pathol.* 1999 Jan-Feb;27(1):107-10.
- Rodriguez**, P., Munroe, D., Prawitt, D., Chu, L.L., Bric, E., Kim, J., Reid, L.H., Davies, C., Nakagama, H., Loebbert, R., Winterpacht, A., Petrucci, M.J., Higgins, M.J., Nowak, N., Evans, G., Shows, T., Weissman, B.E., Zabel, B., Housman, D.E., Pelletier, J. Functional characterization of human nucleosome assembly protein-2 (NAP1L4) suggests a role as a histone chaperone. *Genomics* 1997;44(3), 253-65
- Rodriguez**, P., Vinuela, J.E., Alvarez-Fernandez, L., Buceta, M., Vidal, A., Dominguez, F., Gomez-Marquez, J. Overexpression of prothymosin alpha accelerates proliferation and retards differentiation in HL-60 cells. *Biochem. J.* 1998;331(Pt3):753-61
- Roos**, A., Claessen, N., Weening, J.J., Aten, J. Enhanced T lymphocyte expression of LFA-1, ICAM-1, and the TNF receptor family member OX40 in HgCl<sub>2</sub>-induced systemic autoimmunity. *Scand J Immunol.* 1996 May;43(5):507-18.
- Ruotsalainen**, H., Vanhatupa, S., Tampio, M., Sipila, L., Valtavaara, M., Myllyla, R. Complete genomic structure of mouse lysyl hydroxylase 2 and lysyl hydroxylase 3/collagen glucosyltransferase. *Matrix Biol.* 2001 Apr;20(2):137-46.
- Russell**, W., Burch, R. The principles of humane experimental technique. 1959; Methuen, London, UK. (reprinted by Universities Federation for Animal Welfare, Potters Bar, UK).
- Ryan**, G.B., Karnovsky, M.J. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int.* 1975 Oct;8(4):219-32.
- Sambrook**, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 1989; Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA
- Sandborgh-Englund**, G., Elinder, C.G., Langworth, S., Schutz, A., Ekstrand, J. Mercury in biological fluids after amalgam removal. *J Dent Res.* 1998 Apr;77(4):615-24.
- Schaaf**, G.J., de Groene, E.M., Maas, R.F., Commandeur, J.N., Fink-Gremmels, J. Characterization of biotransformation enzyme activities in primary rat proximal tubular cells. *Chem Biol Interact.* 2001 Apr 16;134(2):167-90.
- Schena**, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):467-70.

- Schena**, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O., Davis, R.W. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Oct 1;93(20):10614-9.
- Scherer**, A., Krause, A., Walker, J.R., Korn, A., Niese, D., Raulf, F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation*. 2003 Apr 27;75(8):1323-30.
- Schreiber**, G., Tsykin, A., Aldred, A.R., Thomas, T., Fung, W.P., Dickson, P.W., Cole, T., Birch, H., De Jong, F.A., Milland, J. The acute phase response in the rodent. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1989;557:61-85
- Schwartz**, G.G. Hypothesis: does ochratoxin A cause testicular cancer? *Cancer Causes Control*. 2002;13(1), 91-100
- Sharif**, K., Goyal, M., Kershaw, D., Kunkel, R., Wiggins, R. Podocyte phenotypes as defined by expression and distribution of GLEPP1 in the developing glomerulus and in nephrotic glomeruli from MCD, CNF, and FSGS. A dedifferentiation hypothesis for the nephrotic syndrome. *Exp Nephrol*. 1998 May-Jun;6(3):234-44.
- Shen**, R., Sumimoto, M., Dai, J., Hardy, D.O., Navarro, D., Usmani, B., Papandreou, C.N., Hersh, L.B., Shipp, M.A., Freedman, L.P., Nanus, D.M. Identification and characterization of two androgen response regions in the human neutral endopeptidase gene. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2000;170(1-2):131-42
- Simmons**, P.T., Portier, C.J. Toxicogenomics: the new frontier in risk analysis. *Carcinogenesis*. 2002 Jun;23(6):903-5.
- Simonet**, W.S., Bucay, N., Pitas, R.E., Lauer, S.J., Taylor, J.M. Multiple tissue-specific elements control the apolipoprotein E/C-I gene locus in transgenic mice. *J. Biol. Chem*. 1991;266(14):8651-4
- Skouteris**, G.G., Schroder, C.H. The hepatocyte growth factor receptor kinase-mediated phosphorylation of lipocortin-1 transduces the proliferating signal of the hepatocyte growth factor. *J Biol Chem*. 1996;271(44):27266-73
- Skubitz**, K.M., Skubitz, A.P. Differential gene expression in renal-cell cancer. *J Lab Clin Med*. 2002 Jul;140(1):52-64.
- Smith**, L.L., Rose, M.S., Wyatt, I. The pathology and biochemistry of paraquat. *Ciba Found Symp*. 1978 Jun 6-8;(65):321-41.
- Smith**, L.L. Mechanism of paraquat toxicity in lung and its relevance to treatment. *Hum Toxicol*. 1987 Jan;6(1):31-6.
- Smith-Mungo**, L.I., Kagan, H.M. Lysyl oxidase: properties, regulation and multiple functions in biology. *Matrix Biol*. 1998 Feb;16(7):387-98.
- Snodin**, D.J. An EU perspective on the use of in vitro methods in regulatory pharmaceutical toxicology. *Toxicol Lett*. 2002 Feb 28;127(1-3):161-8.
- Stefanovic**, V., Polenakovic, M.H. Balkan nephropathy. Kidney disease beyond the Balkans? *Am J Nephrol*. 1991;11(1):1-11
- Stefanovic**, V., Vlahovic, P., Savic, V., Ilic, S., Mitic-Zlatkovic, M. Kidney ectopeptidases in gentamicin and mercuric chloride-induced acute renal failure. *Cell Physiol Biochem*. 1998;8(5):278-84.

- Steiner, S., Aicher, L., Raymackers, J., Meheus, L., Esquer-Blasco, R., Anderson, N.L., Cordier, A.** Cyclosporine A decreases the protein level of the calcium-binding protein calbindin-D 28kDa in rat kidney. *Biochem Pharmacol.* 1996 Feb 9;51(3):253-8.
- Steiner, S., Anderson, N.L.** Expression profiling in toxicology--potentials and limitations. *Toxicol Lett.* 2000 Mar 15;112-113:467-71.
- Stoev, S.D.** The role of ochratoxin A as a possible cause of Balkan endemic nephropathy and its risk evaluation. *Vet Hum Toxicol.* 1998;40(6), 352-60
- Stoev, S.D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T., and Creppy, E.E.** Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Vet Res Commun.* 2001;25(3), 205-23
- Storck, T., von Brevern, M.C., Behrens, C.K., Scheel, J., Bach, A.** Transcriptomics in predictive toxicology. *Curr Opin Drug Discov Devel.* 2002 Jan;5(1):90-7.
- Swan, S.K.** Aminoglycoside nephrotoxicity. *Semin Nephrol.* 1997 Jan;17(1):27-33.
- Tacchini, L., Fusar-Poli, D., Bernelli-Zazzera, A.** Activation of transcription factors by drugs inducing oxidative stress in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 2002 Jan 15;63(2):139-48.
- Tanaka, N., Kaneko, K., Asao, H., Kasai, H., Endo, Y., Fujita, T., Takeshita, T., Sugamura, K.** Possible involvement of a novel STAM-associated molecule "AMSH" in intracellular signal transduction mediated by cytokines. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):19129-35.
- Tanaka, T., Kondo, S., Iwasa, Y., Hiai, H., Toyokuni, S.** Expression of stress-response and cell proliferation genes in renal cell carcinoma induced by oxidative stress. *Am J Pathol.* 2000;156(6):2149-2157
- Tang, M.J., Tannen, R.L.** Metabolic substrates alter attachment and differentiated functions of proximal tubule cell culture. *J Am Soc Nephrol.* 1994 May;4(11):1908-11.
- Thomas, R.S., Rank, D.R., Penn, S.G., Zastrow, G.M., Hayes, K.R., Pande, K., Glover, E., Silander, T., Craven, M.W., Reddy, J.K., Jovanovich, S.B., Bradfield, C.A.** Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays. *Mol Pharmacol.* 2001 Dec;60(6):1189-94.
- Thomas, R.S., Rank, D.R., Penn, S.G., Zastrow, G.M., Hayes, K.R., Hu, T., Pande, K., Lewis, M., Jovanovich, S.B., Bradfield, C.A.** Application of genomics to toxicology research. *Environ Health Perspect.* 2002 Dec;110 Suppl 6:919-23.
- Thuvander, A., Dahl, P., Breitholtz-Emanuelsson, A.** Influence of perinatal ochratoxin A exposure on the immune system in mice. *Nat Toxins* 1996;4(4), 174-80
- Tomita, M., Nohno, T., Okuyama, T., Nishimatsu, S., Adachi, J.** Paraquat-induced gene expression in rat lung tissues using a differential display reverse transcription-polymerase chain reaction. *Arch Toxicol.* 2002 Sep;76(9):530-7.
- Tunnessen, W.W. Jr., McMahon, K.J., Baser, M.** Acrodynia: exposure to mercury from fluorescent light bulbs. *Pediatrics.* 1987 May;79(5):786-9.
- Tuteja, R., Tuteja, N.** Nucleolin: a multifunctional major nucleolar phosphoprotein. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1998;33(6):407-36.
- Tzivion, G., Shen, Y.H., Zhu, J.** 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene.* 2001 Oct 1;20(44):6331-8.

- Umemura**, T., Takagi, A., Sai, K., Hasegawa, R., Kurokawa, Y. Oxidative DNA damage and cell proliferation in kidneys of male and female rats during 13-weeks exposure to potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>). *Arch Toxicol.* 1998 Apr, 72(5): 264-9
- Vaziri**, N.D., Ness, R.L., Fairshter, R.D., Smith, W.R., Rosen, S.M. Nephrotoxicity of paraquat in man. *Arch Intern Med.* 1979 Feb;139(2):172-4.
- Velculescu**, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995 Oct 20;270(5235):484-7.
- Venkatesan**, N., Punithavathi, D., Arumugam, V. Curcumin prevents adriamycin nephrotoxicity in rats. *Br J Pharmacol.* 2000 Jan, 129(2): 231-4
- Vie**, M.P., Evrard, C., Osty, J., Breton-Gilet, A., Blanchet, P., Pomerance, M., Rouget, P., Francon, J., Blondeau, J.P. Purification, molecular cloning, and functional expression of the human nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate-regulated thyroid hormone-binding protein. *Mol. Endocrinol.* 1997;11(11):1728-36
- Vilcek**, J., Lee, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. *J Biol Chem.* 1991 Apr 25;266(12):7313-6.
- Vlahovic**, P., Stefanovic, V. Kidney ectopeptidases. Structure, functions and clinical significance. *Pathol Biol (Paris).* 1998 Dec;46(10):779-86.
- Wada**, J., Zhang, H., Tsuchiyama, Y., Hiragushi, K., Hida, K., Shikata, K., Kanwar, Y.S., Makino, H. Gene expression profile in streptozotocin-induced diabetic mice kidneys undergoing glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2001 Apr;59(4):1363-73.
- Walker**, R. Risk assessment of ochratoxin: current views of the European Scientific Committee on Food, the JECFA and the Codex Committee on Food Additives and Contaminants. *Adv Exp Med Biol.* 2002;504, 249-55
- Wanders**, R.J., Vreken, P., Ferdinandusse, S., Jansen, G.A., Waterham, H.R., van Roermund, C.W., Van Grunsven, E.G. Peroxisomal fatty acid alpha- and beta-oxidation in humans: enzymology, peroxisomal metabolite transporters and peroxisomal diseases. *Biochem Soc Trans.* 2001 May;29(Pt 2):250-67.
- Wang**, X., Horisberger, J.D. Mercury binding site on Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: a cysteine in the first transmembrane segment. *Mol Pharmacol.* 1996 Sep;50(3):687-91.
- Waring**, J.F., Halbert, D.N. The promise of toxicogenomics. *Curr Opin Mol Ther.* 2002 Jun;4(3):229-35.
- Waters**, M., Boorman, G., Bushel, P., Cunningham, M., Irwin, R., Merrick, A., Olden, K., Paules, R., Selkirk, J., Stasiewicz, S., Weis, B., Van Houten, B., Walker, N., Tennant, R. Systems toxicology and the Chemical Effects in Biological Systems (CEBS) knowledge base. *EHP Toxicogenomics.* 2003 Jan;111(1T):15-28.
- Weber**, W.W. Populations and genetic polymorphisms. *Mol Diagn.* 1999 Dec;4(4):299-307.
- Wei**, X., Sulik, K.K. Pathogenesis of craniofacial and body wall malformations induced by ochratoxin A in mice. *Am. J Med Genet.* 1993;47(6), 862-71
- Wei**, H., Qiu, L., Divine, K.K., Ashbaugh, M.D., McIntyre, L.C. Jr., Fernando, Q., Gandolfi, A.J. Toxicity and transport of three synthesized mercury-thiol-complexes in isolated rabbit renal proximal tubule suspensions. *Drug Chem Toxicol.* 1999 May;22(2):323-41.

- Werner**, M., Costa, M.J., Mitchell, L.G., Nayar, R. Nephrotoxicity of xenobiotics. *Clin Chim Acta*. 1995 Jun 15;237(1-2):107-54.
- Wick**, M., Burger, C., Brusselbach, S., Lucibello, F.C., Muller, R. Identification of serum-inducible genes: different patterns of gene regulation during G0-->S and G1-->S progression. *J Cell Sci*. 1994 Jan;107 ( Pt 1):227-39.
- Wiggins**, R.C., Wiggins, J.E., Goyal, M., Wharram, B.L., Thomas, P.E. Molecular cloning of cDNAs encoding human GLEPP1, a membrane protein tyrosine phosphatase: characterization of the GLEPP1 protein distribution in human kidney and assignment of the GLEPP1 gene to human chromosome 12p12-p13. *Genomics*. 1995 May 1;27(1):174-81.
- Wilson**, A.C., Miller, R.W. Growth temperature-dependent stearyl coenzyme A desaturase activity of *Fusarium oxysporum* microsomes. *Can J Biochem*. 1978 Dec;56(12):1109-4.
- Witzgall**, R., Brown, D., Schwarz, C., Bonventre, J.V. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogeneous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest*. 1994 May;93(5):2175-88.
- Wright**, S.H., Wunz, T.M. Paraquat<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in isolated renal brush-border membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Nov 22;1240(1):18-24.
- Yeh**, T.F., Pildes, R.S., Firor, H.V. Mercury poisoning from mercurochrome therapy of an infected omphalocele. *Clin Toxicol*. 1978;13(4):463-7.
- Yilla**, M., Tan, A., Ito, K., Miwa, K., Ploegh, H.L. Involvement of the vacuolar H(+)-ATPases in the secretory pathway of HepG2 cells. *J Biol Chem*. 1993 Sep 5;268(25):19092-100.
- Yoon**, H.S., Chen, X., Yang, V.W. Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2003 Jan 24;278(4):2101-5.
- Yu**, S.P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. *Prog Neurobiol*. 2003 Jul;70(4):363-86.
- Zalups**, R.K. Method for studying the in vivo accumulation of inorganic mercury in segments of the nephron in the kidneys of rats treated with mercuric chloride. *J Pharmacol Methods*. 1991 Sep;26(2):89-104.
- Zhang**, X.A., Bontrager, A.L., Hemler, M.E. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta (1) integrins. *J Biol Chem*. 2001 Jul;276(27):25005-13.
- Zychlinski**, L., Raska-Emery, P., Montgomery, M.R. Influence of bipyridylum compounds on microsomal mixed-function oxidation activities. *J Biochem Toxicol*. 1988 Fall;3:173-89.

## 7 Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Anke Lühe  
geboren am 21.07.1975 in Worms

### Schulbildung

1981-1994

Abitur am Gymnasium Laupheim  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Note: 1.0

### Hochschulausbildung

10/1994-10/1998

Studium der Pharmazie, Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

09/1996

Erstes Staatsexamen Pharmazie

10/1998

Zweites Staatsexamen Pharmazie

09/1998-04/1999

Pharmaziepraktikum, Bergheimer Apotheke, Heidelberg

05/1999-10/1999

Pharmaziepraktikum, Bayer Health Care in Wuppertal, Abteilung  
Forschungstoxikologie. Forschungsthema: „Vergleichende  
zytologische Untersuchungen von primären Ratten-Hepatozyten in  
Sandwich- und Trockenkollagen-Kultur mit H4-II-E-C3 Zellen und V79-  
Zellen“

12/1999

Drittes Staatsexamen Pharmazie

01/2000

Approbation als Apothekerin

### Promotion

04/2000-06/2003

Promotion unter der Aufsicht von Prof. Dr. T. Dingermann, Frankfurt,  
durchgeführt bei Bayer Health Care in Wuppertal, Abteilung für  
molekulare und genetische Toxikologie. Forschungsthema:  
“Genexpressionsanalyse in der Niere in vitro und in vivo mit DNA  
Microarrays“

Termin der Disputation: 02/2004 (?)

### Postdoc

Seit 10/03

Postdoc-Tätigkeit bei F. Hoffmann-La Roche, Pharma Research Non-  
Clinical Drug Safety, Basel

### Akademische Lehrer

Dr. Dr. H.-J. Ahr, Prof. Dr. H.P.T. Ammon, Prof. Dr. Th. Dingermann, Prof. Dr. L. Heide, Prof. Dr. K.-A.  
Kovar, Prof. Dr. P.C. Schmidt, Prof. Dr. J. Schultz, Prof. Dr. H.-W. Vohr

## 8 Publikationen und Poster

### Publikationen:

**Luehe A.**, Hildebrand H., Bach U., Dingermann T. und Ahr H.-J. (2003) „A new approach to study Ochratoxin A (OTA) induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro using cDNA microarrays“. *Toxicol Sci.* **73** (2), 315-328.

**Luehe A.**, Hildebrand H. „Toxicogenomics applied to the kidney“, to be published in Borlak J. „Toxicogenomics“ in 2004.

### Poster:

**Luehe A.**, Hildebrand H., Dingermann T. und Ahr H.-J. Toxicogenomics in the kidney: gene expression analysis under toxicological aspects. 2002. Posterpräsentation, vorgestellt auf der 43. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz

**Luehe A.**, Hildebrand H., Dingermann T. und Ahr H.-J. A new approach to study Ochratoxin A (OTA) induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro using DNA-microarrays. 2002. Posterpräsentation, vorgestellt auf der Eurotox-Tagung in Budapest.

## 9 Danksagung

Hiermit möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt und damit zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Herrn Dr. Dr. Hans-Jürgen Ahr danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten und anspruchsvollen Themas, sowie für seinen grossartigen Einsatz für seine Doktoranden. Meinem Doktorvater Prof. Dr. Theo Dingermann danke ich vielmals für die externe Betreuung dieser Arbeit sowie für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Herrn Prof. Dr. Hans-Werner Vohr möchte ich für die Begutachtung der Dissertation und für seine Anregungen danken.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meinen direkten Betreuer Dr. Heinz Hildebrand für seine Ausdauer, seine Anregungen, seine Hilfsbereitschaft, und natürlich für unsere kleinen „Streit“-Gespräche sowie für seinen nie enden wollenden Vorrat an Kaffee und Schokolade.

Weiterhin danke ich Dr. Heidrun Ellinger-Ziegelbauer sowie Dr. Gabi Scholz, Dr. Josef Straub und Dr. Gabi Schmuck für ihre Diskussionsbereitschaft und ihre zahlreichen Anregungen. Dr. Ute Bach, Dr. Elke Hartmann, Dr. Franc Krötlinger, Dr. Matthias Rinke und Andreas Brockes danke ich für die Durchführung der Tierstudien sowie die histopathologischen Bewertungen.

Weiterhin möchte ich Kerstin Lotz, Sabine Michel-Kaulmann und Margot Thiel für die gute Zusammenarbeit im Labor danken und dafür, dass sie meinen Hang zu einer manchmal chaotischen Arbeitsweise wohlwollend toleriert haben. Ausserdem möchte ich Margots goldenen Fingern danken, die meine Nackenmuskeln und Wirbel regelmässig wieder an den richtigen Platz massiert haben.

Unserer „guten Seele“ Sigrid Weber möchte ich für unzählige Gummi-Bärchen, ihre unermüdliche Hilfsbereitschaft und für die „kleinen Schwätzchen zwischendurch“ danken und ihr alles Gute für den wohlverdienten Ruhestand wünschen.

Meinem Leidensgenossen Ecki Heisler möchte ich dafür danken, dass aus unserem ursprünglich geplanten „Doktoranden-Seminar“ ein (un)regelmässiger Austausch der allgemeinen Sorgen und Nöte des Doktoranden von heute wurde.

Wibke und Lutz Lofink möchte ich für ihre herzliche Freundschaft danken und für ihre Aufbauarbeit und Unterstützung wenn mal wieder alles nicht so lief wie es sollte.

Unserem „Supporter-Team“ Ulrich Arndt, Martin Müller und Timo Velleuer gilt ein ganz besonderer Dank, da sie es geschafft haben, trotz stetiger Misshandlungen meinerseits, meinen Computer bis zum Ende meiner Arbeit am Laufen zu halten und gleichzeitig mit Kaffee und gutem Zureden einen halbwegs kompetenten „User“ aus mir gemacht haben.

Meiner „Nachbarin“ Martina Wingenroth möchte ich für ihre Freundschaft, ihr grosses Herz und ihre stetige Hilfsbereitschaft in sämtlichen Lebenslagen danken.

Ein besonderer Dank geht an meine Eltern und meine Oma, die mir all dies ermöglicht und immer an mich geglaubt haben, sowie an Ingo, dessen Liebe und Verständnis mir immer wieder die nötige Kraft gegeben haben.

