

**Neue Ansätze zur Entwicklung von  
Alternativmethoden zur Prüfung auf chronische  
Nierentoxizität**

**Dissertation**

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

**Eva Katharina Rached**

aus Würzburg

**Würzburg 2009**

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Dandekar

1. Gutachter: Prof. Dr. W. Dekant

2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Brand

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

# Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 S. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation

**„Neue Ansätze zur Entwicklung von Alternativmethoden zur Prüfung auf chronische Nierentoxizität“**

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

---

Eva Rached

# Danksagung

Ich möchte mich bei all diesen Personen ganz herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit von März 2005 bis März 2008 beigetragen haben:

**PD Dr. Angela Mally** für die ständige Betreuung der Doktorarbeit und ihre Hilfsbereitschaft, das mir entgegengebrachte Vertrauen, und die Möglichkeit, an verschiedenen Tagungen teilzunehmen.

**Prof. Dr. Wolfgang Dekant** für die Ermöglichung der Doktorarbeit und die Erstellung des Erstgutachtens.

**Prof. Dr. Thomas Brand** für die Übernahme des Zweitgutachtens und seine Bereitschaft, Mitglied meiner Prüfungskommission zu sein.

**Prof. Dr. Georg Krohne** und dem gesamten Team in der Elektronenmikroskopie für Geduld, Hilfsbereitschaft und ein sehr angenehmes Arbeitsumfeld.

**RCC Ltd.** (jetzt Harlan Laboratories Ltd.) für die Finanzierung der Arbeit und insbesondere natürlich **Dr. Kai Blumbach, Dr. Klaus Weber und Regina Draheim** für ihre Mithilfe beim Tierversuch und ein stets offenes Ohr für Fragen.

**Dr. Gordon Hard** für die histopathologische Beurteilung.

**Dr. Sibel Özden** für die Durchführung der LC/MS-MS-Versuche.

**Dr. Ulrich Steger** für seine Mithilfe beim Pumpeneinbau.

**Elisabeth Rüb-Spiegel, Michaela Bekteshi und Carolin Kröcher** für ihre geduldige Mitwirkung beim Tierversuch.

**Ursula Tatsch** für ihre tatkräftige Mithilfe bei allem, was so anstand, sowie für ihre stets fröhliche Gelassenheit.

Allen Mitarbeitern von der „Toxi“ für eine gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ursachen und Folgen von Nierentoxizität .....	1
1.2	Zielorgan Niere .....	2
1.2.1	Struktur und Funktionen der Niere .....	2
1.2.2	Strukturelle und physiologische Unterschiede zwischen verschiedenen Typen von proximalen Tubulusepithelzellen.....	7
1.2.3	Ursachen und Folgen toxischer Effekte auf das proximale Tubulusepithel.....	8
1.3	Prüfung auf Nephrotoxizität: Konventionelle Testverfahren und die Entwicklung von Alternativmethoden.....	10
1.4	Neue Methoden zum frühzeitigen Nachweis von Nierentoxizität und -kanzerogenität.....	11
1.4.1	Entwicklung von neuen Biomarkern zum Nachweis von Nierenschädigung .....	11
1.4.1.1	Definition und Anwendungen von Biomarkern.....	11
1.4.1.2	Traditionelle Biomarker zur Bestimmung einer gestörten Nierenfunktion.....	12
1.4.1.3	Entwicklung neuer Biomarker zur frühen Diagnose von Nierenschäden.....	15
1.4.1.4	Neue Biomarker für akute Nierenschädigung.....	16
1.4.2	Identifizierung von Nierenkanzerogenen .....	24
1.4.2.1	Chemikalien-induzierte Kanzerogenese.....	24
1.4.2.2	Konventionelle und neue Teststrategien zur Prüfung auf kanzerogene Eigenschaften.....	25
1.4.2.3	Bekannte Mechanismen von nicht-gentoxischen Nierenkanzerogenen.....	29
1.5	<b><i>In vitro</i>-Alternativen zur Prüfung auf Nephrotoxizität.....</b>	<b>30</b>
1.5.1	Vorteile und Grenzen von <i>in vitro</i> -Systemen .....	30
1.5.2	Neue Ansätze zur <i>in vitro</i> -Prüfung auf Toxizität nach wiederholter Exposition – NOEC vs. NOAEL.....	30
1.5.3	<i>In vitro</i> -Modellsysteme zur Prüfung auf Nierentoxizität.....	33
1.5.4	Ansatzpunkte für die Entwicklung von zellkulturbasierten Testsystemen zur Prüfung auf chronische Nephrotoxizität.....	34
1.6	<b>Nephrotoxische Modellsubstanzen .....</b>	<b>35</b>
1.6.1	Ochratoxin A (OTA) .....	35
1.6.2	Cadmium .....	37

---

1.6.3	Cisplatin.....	39
1.6.4	Kaliumbromat (KBrO <sub>3</sub> ) .....	39
<b>1.7</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>42</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>42</b>
2.1.1	Technische Geräte.....	42
2.1.2	Verbrauchsmaterialien .....	44
2.1.3	Chemikalien.....	45
2.1.4	Kits und Mastermix-Lösungen.....	45
2.1.5	Puffer und Lösungen.....	46
2.1.6	Antikörper .....	49
2.1.7	Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	51
2.1.8	DNA- und Proteingrößenstandards .....	52
2.1.9	Verwendete Computerprogramme .....	52
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>53</b>
2.2.1	Zellbiologische Methoden .....	53
2.2.1.1	Desinfektion und Sterilisation.....	53
2.2.1.2	Normal Rat Kidney-Zellen (NRK-52E).....	53
2.2.1.3	Kultivierung von NRK-52E-Zellen.....	53
2.2.1.4	Kryokonservierung und Auftauen der Zellen .....	54
2.2.1.5	Behandlung der Zellen mit verschiedenen Nierentoxinen .....	54
2.2.1.6	Bestimmung der Zytotoxizität mit dem MTT-Assay .....	55
2.2.2	Tierversuch.....	56
2.2.2.1	Fischer-Ratten (F344/N) .....	57
2.2.2.2	Haltung von F344/N-Ratten .....	57
2.2.2.3	Behandlung mit Ochratoxin A .....	57
2.2.2.4	Bestimmung der Zellproliferation mit 5'-Bromdesoxyuridin (BrdU) .....	58
2.2.2.5	Entnahme von Urinproben .....	58
2.2.2.6	Blutentnahme .....	59
2.2.2.7	Tötung der Tiere, Organentnahme und Fixierung .....	59
2.2.2.8	Histopathologie .....	59
2.2.2.9	Klinische Chemie, Urinanalyse und Hämatologie.....	60
2.2.2.10	Bestimmung der Ochratoxin A-Konzentration in Plasma und Gewebe .....	60
2.2.2.11	Elektronenmikroskopie.....	61
2.2.3	Molekularbiologische Methoden.....	64
2.2.3.1	Arbeiten mit RNA.....	64
2.2.3.2	RNA-Isolierung .....	64
2.2.3.3	Quantifizierung der RNA .....	66
2.2.3.4	RNA-Elektrophorese.....	66
2.2.3.5	Synthese von komplementärer DNA ( <i>complementary</i> DNA, cDNA) .....	67

2.2.3.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	68
2.2.3.7	Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA .....	76
2.2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	77
2.2.4.1	Proteinisolierung.....	77
2.2.4.2	Proteingehaltbestimmung mit dem DC-Assay®.....	78
2.2.4.3	Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	78
2.2.4.4	Western Blot.....	80
2.2.4.5	Immunhistochemische Detektion von Proteinen im Nierengewebe .....	83
2.2.4.6	Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin in NRK-52E-Zellen.....	86

### **3 Ergebnisse 88**

#### **3.1 90 Tage-Toxizitätsstudie (oral, Schlundsonde) mit Ochratoxin A in männlichen F344/N-Ratten 88**

##### 3.1.1 Ochratoxin A-Konzentration in Plasma, Niere und Leber ..... 88

##### 3.1.2 Traditionelle Endpunkte für Toxizität ..... 91

###### 3.1.2.1 Klinische Symptome ..... 91

###### 3.1.2.2 Futter- und Wasseraufnahme ..... 91

###### 3.1.2.3 Körpergewicht..... 92

###### 3.1.2.4 Organgewichte..... 92

###### 3.1.2.5 Makroskopische Befunde..... 92

###### 3.1.2.6 Histopathologie..... 94

###### 3.1.2.7 Ultrastrukturelle Veränderungen in Nierenzellen..... 96

###### 3.1.2.8 Klinische Chemie und Urinanalyse..... 100

###### 3.1.2.9 Hämatologie ..... 102

###### 3.1.2.10 Zusammenfassung ..... 103

##### 3.1.3 Ochratoxin A-abhängige Effekte auf die Proliferation von Zellen in Niere und Leber ..... 104

##### 3.1.4 Expression von neuen Biomarkern für Nephrotoxizität..... 109

###### 3.1.4.1 Expression von Markergenen im Nierengewebe Ochratoxin A-behandelter Ratten ..... 109

###### 3.1.4.2 Immunhistochemische Lokalisation von Markerproteinen im Nierengewebe..... 112

###### 3.1.4.3 Exkretion von Markerproteinen in den Urin ..... 123

###### 3.1.4.4 Zusammenfassung ..... 129

#### **3.2 In vitro-Studien in NRK-52E-Zellen 130**

##### 3.2.1 Zytotoxizität nach Behandlung mit verschiedenen Nephrotoxinen ..... 130

##### 3.2.2 Veränderungen der Gen- und Proteinexpression neuer Biomarker für Nephrotoxizität in NRK-Zellen nach Behandlung mit Nephrotoxinen..... 132

##### 3.2.3 Zusammenfassung ..... 137

### **4 Diskussion 139**

#### **4.1 Frühe Endpunkte für Nierentoxizität nach wiederholter Exposition von Ratten gegenüber Ochratoxin A (OTA)..... 139**

---

4.1.1	Veränderungen von Histopathologie und Zellproliferation in der Niere sind frühe Marker für die nierenschädigenden und kanzerogenen Eigenschaften von OTA .....	140
4.1.2	Bewertung der Sensitivität neuer Biomarker zum Nachweis chronischer Nephrotoxizität.....	143
4.1.3	Aspekte zur Risikobewertung von OTA.....	155
4.1.4	Neue Aspekte zum molekularen Wirkungsmechanismus von OTA .....	156
4.1.5	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	159
4.2	<b>Bewertung neuer <i>in vivo</i>-Biomarker für Nephrotoxizität in NRK-52E-Zellen als <i>in vitro</i>-Testsystem .....</b>	<b>161</b>
<b>5</b>	<b>Ausblick</b>	<b>166</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>168</b>
<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>170</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>189</b>
9.1	Klinische Chemie und Hämatologie bei männlichen F344/N-Ratten nach subchronischer Exposition mit Ochratoxin A (Ergänzung) .....	189
9.2	Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten.....	193
9.3	Lebenslauf .....	198
9.4	Publikationen und Konferenzbeiträge .....	200



# 1 Einleitung

## 1.1 Ursachen und Folgen von Nierentoxizität

Die Niere stellt eines der Hauptzielorgane für toxische Substanzen dar (Hart und Kinter 2005; Pfaller und Gstraunthaler 1998). Zahlreiche Pharmaka und Chemikalien aus Umwelt oder Industrie, z.B. Schwermetalle wie Cadmium, verschiedene Schimmelpilzgifte oder organische Lösungsmittel, besitzen nierenschädigende Eigenschaften, und es ist bekannt, dass die Exposition mit solchen Substanzen ein Risikofaktor für die Entstehung von Niereninsuffizienz sowie von Nierenkrebs ist (Franchini *et al.*, 2005; Ilyasova und Schwartz 2005; Perazella 2005; Pfaller und Gstraunthaler 1998; Vaidya *et al.*, 2008; Vassalotti *et al.*, 2007).

Ursache für die hohe Anfälligkeit dieses Organs ist zum einen die hohe Durchblutungsrate der Niere (ca. 25% des Herzminutenvolumens), wodurch sie im Vergleich zu anderen Organen besonders gegenüber Fremdstoffen aus dem Blut exponiert wird. Zudem kann die Menge eines Stoffes durch Konzentrationsvorgänge in der Niere im Verhältnis zum systemischen Kreislauf stark erhöht werden und dabei toxische Spiegel erreichen. Daneben besitzt die Niere zahlreiche Transportmechanismen, durch die es zu einer Wiederaufnahme von Substanzen aus dem Primärharn und zu intrazellulärer Akkumulation kommen kann. Schließlich können Xenobiotika (z.B. Arzneimittel oder Naturstoffe) in der Niere durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme verstoffwechselt werden, wobei toxische Intermediate entstehen können (Hart und Kinter 2005).

Die Früherkennung von toxischen Wirkungen auf die Niere ist sehr schwierig, da die Niere zum einen eine enorme funktionelle Reservekapazität besitzt, sodass die grundlegenden Funktionen des Organs auch bei einer massiven Gewebeschädigung aufrechterhalten werden können (Pfaller und Gstraunthaler 1998). Zum anderen kann geschädigtes Gewebe in der Niere sehr schnell wieder repariert und die Funktionsfähigkeit wiederhergestellt werden (Regeneration). Insbesondere bei einem langsamen, progressiven Verlauf der Nierenschädigung, beispielsweise infolge einer chronischen Exposition gegenüber Nephrotoxinen, stellt die Messung der Nierenfunktion an sich somit eine unzureichende Methode zur Diagnose von Nierenschäden dar. Daher werden Substanzen mit chronisch nierenschädigenden

Wirkungen bei toxikologischen Prüfverfahren, z.B. während der Arzneistoffentwicklung, nicht selten erst in einer späten Testphase identifiziert, nachdem bereits ein hoher Aufwand an Kosten, Zeit und Versuchstieren betrieben wurde. Große Probleme bereiten die unzureichenden Möglichkeiten zur frühen Diagnose einer Nierenschädigung auch in der Klinik, da sich ein spätes Stadium einer Niereninsuffizienz meist nur noch mit einer Nierenersatztherapie (Dialyse oder Nierentransplantation) behandeln lässt. Dies ist nicht nur mit sehr hohen Kosten verbunden, sondern beeinträchtigt zudem stark die Lebensqualität der betroffenen Personen. Außerdem besitzen diese Patienten eine deutlich verringerte Lebenserwartung (Frei und Schober-Halstenberg 2006; Levey *et al.*, 2007). Es ist jedoch bekannt, dass sich chronische Nierenerkrankungen bei besseren Methoden zur Früherkennung sehr viel einfacher und besser behandeln ließen und der Eintritt von Spätfolgen verlangsamt werden könnte (El Nahas 2005).

Sensitive Indikatoren für eine Nierenschädigung werden nicht nur in der Klinik dringend benötigt, um frühe Stadien von Nierenerkrankungen besser zu diagnostizieren und damit besser therapieren zu können. Auch in der Toxikologie könnten empfindliche Marker für Nephrotoxizität zu einer deutlichen Verbesserung der Testverfahren führen. Daher ist es ein wichtiges Ziel, Methoden zu entwickeln, mit denen nephrotoxische Eigenschaften von Chemikalien früher und zuverlässiger nachgewiesen werden können. Zum einen könnten durch eine frühe Identifizierung nierentoxischer Substanzen Dauer, Kosten und Versuchstierzahl von Studien im Tier reduziert werden und es wäre leichter möglich, verschiedene, pharmakologisch ähnliche Substanzen hinsichtlich ihrer Verträglichkeit parallel zu testen (*screening*). Des Weiteren bieten sich dadurch auch Ansätze für eine alternative Testung *in vitro* als Ergänzung bzw. Ersatz von Tierexperimenten.

## 1.2 Zielorgan Niere

### 1.2.1 Struktur und Funktionen der Niere

Die Nieren sind paarige Organe, die im Retroperitonealraum liegen. Eine der wichtigsten Funktionen der Niere besteht darin, Abfallprodukte des Stoffwechsels (z.B. Harnstoff) oder Fremdstoffe wie Arzneimittel oder Umweltchemikalien aus dem Blut zu filtrieren und auszuscheiden, um eine Anreicherung zu toxischen Konzentrationen zu verhindern. Zu diesem Zweck produzieren die Nieren aus dem Filtrat stark

konzentrierten Urin, der über das Nierenbecken und die Harnleiter in die Blase geleitet wird (Abb. 1.1a). Neben dieser Funktion ist die Niere auch wesentlich an der Erhaltung des Wasserhaushaltes, am Metabolismus von Fremdstoffen und der Synthese von Hormonen beteiligt (Khan und Alden 2002; Sands und Verlander 2005).

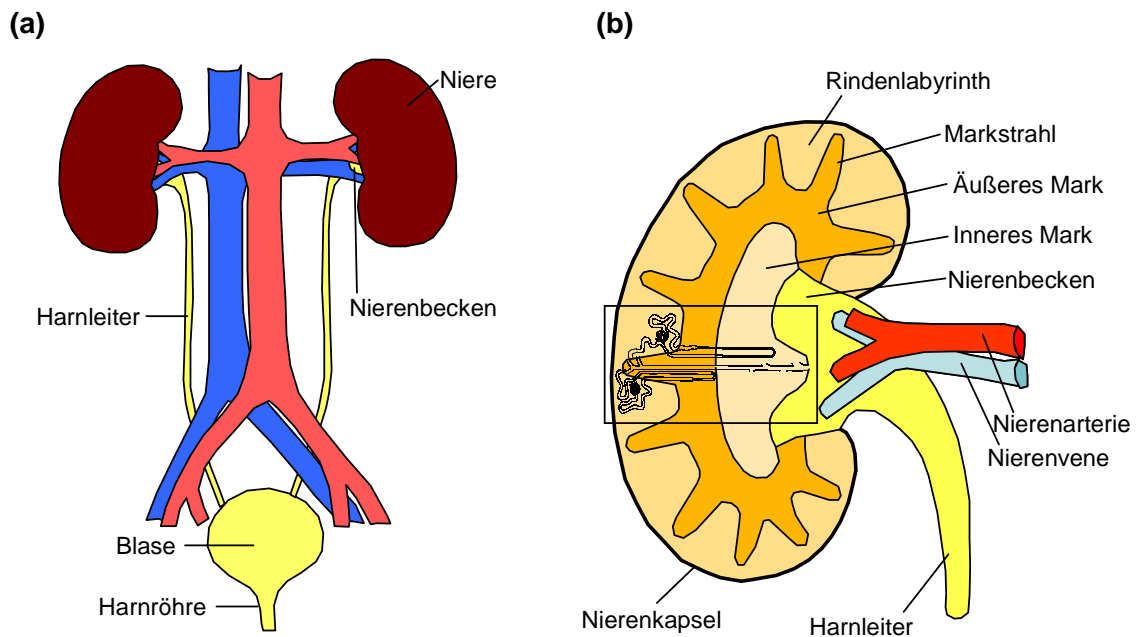


Abb. 1.1: (a) Anatomische Lage der Nieren; (b) Schematischer Längsschnitt durch eine Rattenniere; um die relative Lage in der Niere anzuzeigen, sind exemplarisch zwei Nephronen eingezeichnet (vergrößerter Bildausschnitt s. Abb. 1.2).

Makroskopisch wird die Niere in drei Bereiche unterteilt, die Nierenrinde (Kortex), das äußere Mark und das innere Mark (Papille). Der Kortex setzt sich zum einen aus dem Rindenlabyrinth und aus den Markstrahlen zusammen, welche funktionell zum Mark (Medulla) gehören (Abb. 1.1b). Die funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron, das aus dem Nierenkörperchen und einem daran anschließenden Nierenkanälchen besteht, das in ein Sammelrohr mündet. Je nach ihrer Länge unterscheidet man zwischen kortikalen und juxtamedullären Nephronen; erstere reichen nur bis in das äußere Mark, während letztere bis in das innere Mark verlaufen (Abb. 1.2).

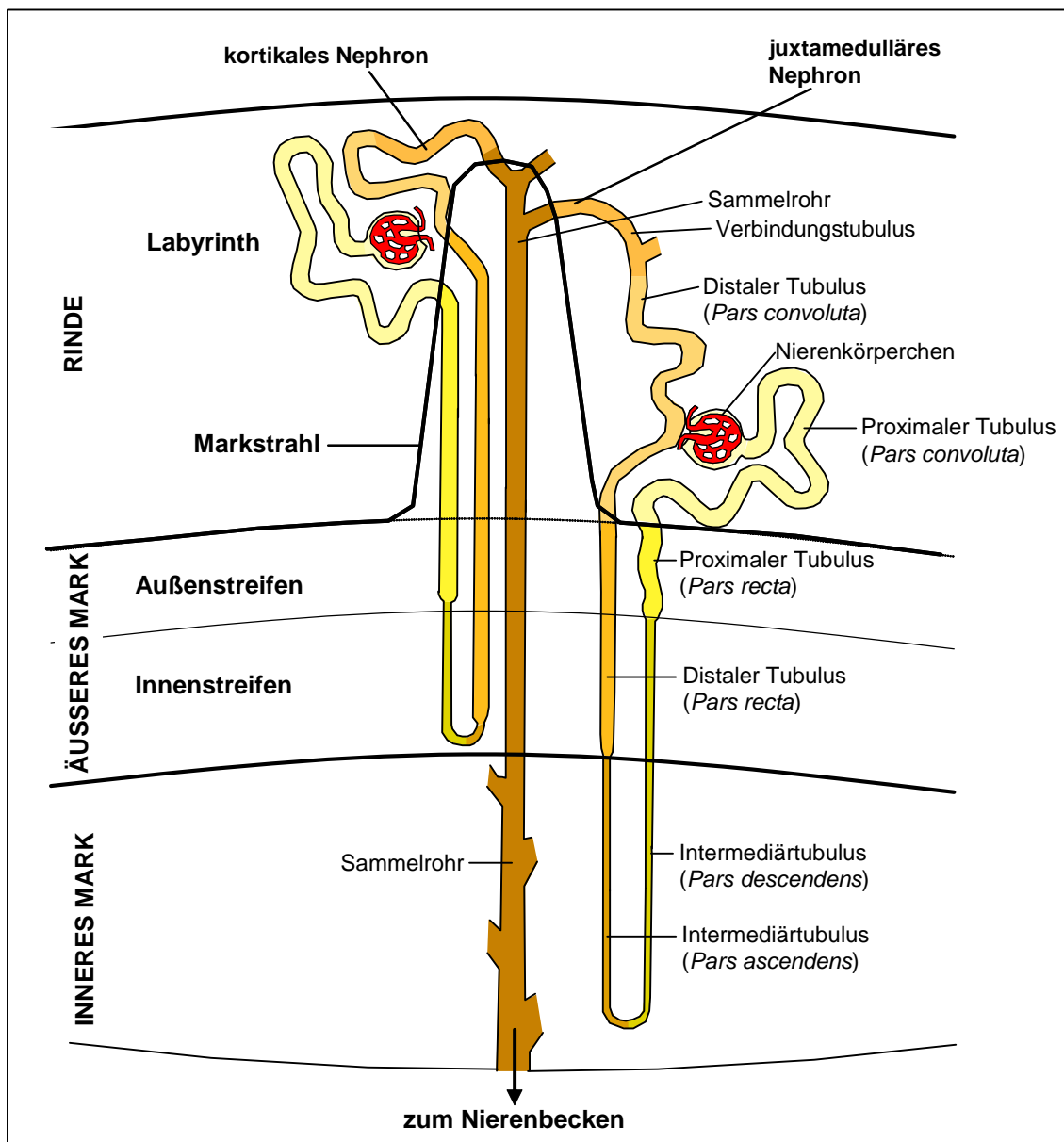


Abb. 1.2: Lage der Nierenkörperchen und Tubulus-Abschnitte bei kortikalen und juxtamedullären Nephronen (vergrößerter Ausschnitt aus Abb. 1.1b).

Im Rindenlabyrinth befinden sich zum einen die Nierenkörperchen, die sich aus einem Kapillarknäuel (Glomerulus) und einer umgebenden, doppelwandigen Kapsel (sog. „Bowman-Kapsel“) zusammensetzen. Dort wird das Blut filtriert, wobei Wasser sowie andere Substanzen mit einem geringen Molekulargewicht in den Kapselraum gelangen. Dieser sog. „Primärharn“ (Ultrafiltrat) gelangt dann in den anschließenden Tubulus (Nierenkanälchen). Dieser besteht aus einem einschichtigen Epithel und ist in

verschiedene Segmente untergliedert. Der Teil, der direkt am Ende der Bowman-Kapsel entspringt, wird als „proximaler Tubulus“ bezeichnet; er wird in zwei Abschnitte unterteilt, einen gewundenen (*Pars convoluta*) und einen geraden Teil (*Pars recta*). Aufgrund dieser Unterteilung spricht man in der englischen Literatur von *proximal convoluted tubules* (PCT) und *proximal straight tubules* (PST). Der gewundene Teil am Anfang eines proximalen Tubulus ist ausschließlich im Rindenlabyrinth enthalten, während die geraden Abschnitte nur im Mark vorkommen. Bei den kurzen, kortikalen Nephronen befinden sich die PST in den Markstrahlen, während sie sich bei juxtamedullären Nephronen im äußeren Mark befinden (Abb. 1.2) (Lüllmann-Rauch 2006; Sands und Verlander 2005).

Das gerade Segment des proximalen Tubulus mündet in den Intermediärtubulus, der zunächst weiter abwärts in das innere Mark zieht (*Pars descendens*) und nach einer U-Kurve wieder aufwärts Richtung äußeres Mark läuft (*Pars ascendens*). Im äußeren Mark erweitert sich der Nierenkanal zum distalen Tubulus, der zunächst in einem geraden Teil (*Pars recta*) weiter aufsteigt und dann – analog zum proximalen Tubulus – im Rindenlabyrinth als gewundener Teil (*Pars convoluta*) vorliegt. Hier geht der distale Tubulus in einen Verbindungstubulus über, der schließlich in das Sammelrohr mündet. Die geraden Teile der proximalen und distalen Tubuli sowie der Intermediärtubulus werden zusammen als „Henle-Schleife“ bezeichnet (Lüllmann-Rauch 2006).

Das Nierenmark wird in einen äußeren und inneren Teil untergliedert. Das äußere Mark wiederum besteht aus einem Außen- und einem Innenstreifen, deren Abgrenzung durch den Übergang des geraden Abschnitts der proximalen Tubuli in den Intermediärtubulus definiert ist. Im übrigen enthält das Mark noch den geraden Teil der distalen Tubuli und Sammelrohre.

Morphologisch und physiologisch unterscheiden sich Epithelzellen der einzelnen Abschnitte des Nephrons wesentlich. Grundsätzlich ist es die Aufgabe der Nierenkanälchen, aus dem Ultrafiltrat (Primärharn) physiologisch „wertvolle“ Moleküle (z.B. Elektrolyte, Glucose, Aminosäuren, Peptide und Proteine) und 99% des Wassers wieder aufzunehmen, sowie bestimmte Abfallstoffe zu sezernieren. Jedes Segment der Nierenkanälchen besitzt dabei spezielle Funktionen. So sind proximale Tubulusepithelzellen auf die Rückresorption von Glucose, Aminosäuren, Proteinen und einigen Ionen, sowie auf die Sekretion von harnpflichtigen Substanzen und von Fremdstoffen spezialisiert. Daher besitzen proximale Tubulusepithelzellen im

Gegensatz zu den anderen Zelltypen lange Mikrovilli (Bürstensaum), die zur Vergrößerung der Resorptionsoberfläche dienen. Des Weiteren verfügen diese Zellen über zahlreiche passive oder aktive Transportmechanismen, z.B. Carrierproteine und Ionenkanäle zur Aufnahme von Zuckern, Aminosäuren und Elektrolyten sowie Mechanismen zur rezeptorvermittelten Endozytose von Proteinen, welche in der Zelle dann in Lysosomen abgebaut werden. Treibende Kraft für die Rückresorption der meisten niedermolekularen Stoffe ist die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, welche  $\text{Na}^+$ -Ionen basolateral aus den Zellen herauspumpt, was zur Bildung von osmotischen und elektrischen Gradienten führt. Die Basalmembran ist vor allem in Epithelzellen der PCT stark eingefaltet, um eine große Oberfläche für die zahlreichen Transporter zu bieten. Auch besitzen diese Zellen sehr große Mitochondrien, die sich zwischen den Einfaltungen der Basalmembran befinden und die Energie für die Pumpfähigkeit bereitstellen (Abb. 1.3).

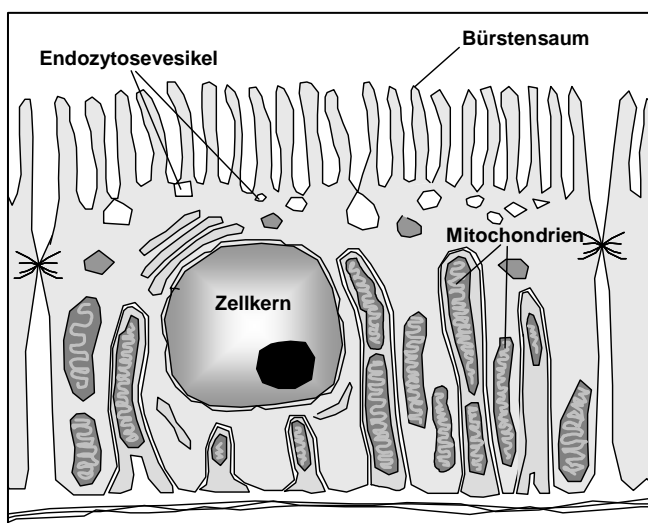


Abb. 1.3: Schematischer Aufbau einer proximalen Tubulusepithelzelle (*Pars convoluta*). Diese Zellen besitzen einen ausgeprägten Bürstensaum und zahlreiche, langgestreckte Mitochondrien, die sich zwischen Einfaltungen der Basalmembran befinden. An der apikalen Zellseite befinden sich zahlreiche Endozytosevesikel.

Der durch die zahlreichen Rückresorptionsvorgänge entstehende osmotische Gradient führt zur Wiederaufnahme von mehr als 50% des Wassers aus dem Primärharn. In der Henle-Schleife findet dann eine weitere Konzentrierung des Primärharns statt, indem durch Zellen des distalen Tubulus (*Pars recta*)  $\text{NaCl}$  in das Interstitium gepumpt wird,

dieser Bereich für Wasser aber undurchlässig ist. Der hohe osmotische Druck im Mark lässt daraufhin Wasser aus dem geraden Teil der proximalen Tubuli sowie aus dem absteigenden Ast des Intermediärtubulus in das Interstitium nachfließen (Gegenstromprinzip). Am Ende gelangt somit über das Sammelrohr nur ein stark konzentrierter Endharn in das Nierenbecken (Khan und Alden 2002; Lüllmann-Rauch 2006; Sands und Verlander 2005).

### **1.2.2 Strukturelle und physiologische Unterschiede zwischen verschiedenen Typen von proximalen Tubulusepithelzellen**

Das Epithel des proximalen Tubulus besteht aus relativ großen Zellen, die zahlreiche Mitochondrien enthalten. Neben der Einteilung in PCT und PST (s. oben) findet man in der Literatur bei Ratten und anderen Tieren auch die Differenzierung in drei Segmente:  $S_1$  bis  $S_3$  (Khan und Alden 2002; Sands und Verlander 2005). Das  $S_1$ -Segment befindet sich am Beginn des gewundenen Teils des proximalen Tubulus. Die Zellen in diesem Bereich besitzen einen sehr langen Bürstensaum, eine stark eingefaltete Basalmembran und zahlreiche Lysosomen. Die Mitochondrien sind groß und befinden sich hauptsächlich auf der basolateralen Seite zwischen den Einfaltungen der Plasmamembran.  $S_1$ -Zellen nehmen sehr viele der filtrierte Proteine und andere Substanzen aus dem Ultrafiltrat auf und besitzen zudem eine hohe metabolische Aktivität (Sands und Verlander 2005).

Das zweite Segment ( $S_2$ ) besteht aus kleineren Zellen, die einen kürzeren Bürstensaum und weniger Mitochondrien haben.  $S_2$ -Zellen findet man sowohl in PCT als auch in den proximalen Tubuli der Markstrahlen. Im Vergleich zu  $S_1$ -Zellen haben  $S_2$ -Zellen weniger Einfaltungen der Basalmembran und auf der basolateralen Seite kleine fußförmige Ausläufer des Zytoplasmas (Micropedici). Auch diese Zellen besitzen sehr viele Lysosomen (Sands und Verlander 2005).

Der gerade Teil des proximalen Tubulus enthält neben einigen  $S_2$ -Zellen hauptsächlich  $S_3$ -Zellen. Diese besitzen einen sehr langen Bürstensaum, wenige Mitochondrien, nahezu keine Einfaltungen in der Basalmembran und den am schwächsten entwickelten endozytotischen Apparat (Sands und Verlander 2005). In der Rattenniere befinden sich in diesen Zellen der höchste Anteil an Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen; sie spielen daher eine große Rolle für die Metabolisierung von Fremdstoffen (Khan und Alden 2002).

Aufgrund ihrer Lage und ihrer Physiologie sind die Zellen des proximalen Tubulusepithels besonders empfindlich gegenüber toxischen Substanzen (Abschnitt 1.2.3). Allerdings bedingen die strukturellen und physiologischen Unterschiede zwischen Zellen aus PCT bzw. PST oft große Unterschiede bezüglich ihrer Anfälligkeit gegenüber verschiedenen Nephrotoxinen (Khan und Alden 2002).

### **1.2.3 Ursachen und Folgen toxischer Effekte auf das proximale Tubulusepithel**

Eine große Zahl von Fremdstoffen wirkt toxisch auf das proximale Tubulusepithel, einschließlich diverser Pharmazeutika (z.B. Cisplatin, Aminoglycosid-Antibiotika) sowie unterschiedlicher Chemikalien aus Industrie und Umwelt, unter anderem Schwermetalle (z.B. Cadmium, Quecksilberverbindungen) und einige Mykotoxine (z.B. Ochratoxin A, Citrinin) (Khan und Alden 2002). Die hohe Anfälligkeit dieser Nierenzellen liegt zum einen daran, dass sie sofort mit den aus dem Blut gefilterten Substanzen in Kontakt kommen. Des Weiteren besitzen sie eine sehr große Anzahl an Transportmechanismen zur aktiven Wiederaufnahme von Stoffen aus dem Primärharn, z.B. rezeptor-vermittelte Endozytose (hauptsächlich PCT) oder organische Anionentransporter (vor allem PST). Da auch verschiedene Fremdstoffe auf diese Weise in die Zellen des proximalen Tubulusepithels gelangen, kann es bei unzureichenden Abbau- oder Exportmechanismen zu einer intrazellulären Akkumulation solcher Substanzen bis zum Erreichen toxischer Konzentrationen kommen. Zusätzlich besitzen insbesondere  $S_3$ -Zellen zahlreiche fremdstoffmetabolisierende Enzyme, welche die Bildung reaktiver Intermediate aus ursprünglich ungiftigen Stoffen katalysieren können (Hart und Kinter 2005; Khan und Alden 2002; Pfaller und Gstraunthaler 1998).

Toxische Effekte auf proximale Tubulusepithelzellen zeichnen sich durch einen schnellen Verlust der Polarität und der Integrität des Zytoskeletts aus (Abb. 1.4). Die Zellen runden sich ab, Adhäsionsmoleküle (z. B. Integrine) erscheinen dadurch auch auf der apikalen Seite der Epithelzellen und der Bürstensaum bricht zusammen. Die schädigende Wirkung kann zum Absterben einiger Zellen durch Apoptose oder Nekrose führen. Abgelöste tote oder lebende Zellen können über Adhäsionsmoleküle mit adherenten Zellen oder Faktoren der extrazellulären Matrix (tubuläre Basallamina) interagieren, was eine Verstopfung der Nierenkanälchen und den Austritt von Flüssigkeit in das Interstitium (Bildung von Ödemen) zur Folge haben kann. Die Schädigung des Epithels löst in der Niere sehr rasch Reparaturmechanismen aus, an



denen überlebende Zellen im geschädigten Tubulusabschnitt beteiligt sind. Während dieser Regenerationsphase durchlaufen die Zellen eine sog. „epitheliale-mesenchymale Transition“ (EMT), d.h. sie verlieren grundsätzliche Merkmale von Epithelzellen (Dedifferenzierung), flachen ab, breiten sich aus und wandern über die Basallamina. Zur Wiederherstellung einer geschlossenen Zellschicht kommt es dann zur Proliferation. Schließlich wird die Funktionsfähigkeit des spezifischen Nephronabschnittes durch eine Re-Differenzierung zu Epithelzellen wiederhergestellt (El Nahas 2003; Vaidya *et al.*, 2008). Die Niere besitzt ein ausgeprägtes Regenerationspotential und kann aufgrund einer großen Reservekapazität die Schädigung einiger Tubulusepithelzellen ausgleichen. Eine kontinuierliche Schädigung, z.B. infolge einer chronischen Exposition mit nephrotoxischen Substanzen, kann jedoch zu einer unvollständigen / unzureichenden Reparatur führen. Die häufig damit verbundene chronische Entzündung kann letztlich dann zu einer Vernarbung des Gewebes (Fibrose) führen, die mit einem zunehmenden Funktionsverlust der Niere (Niereninsuffizienz) einhergeht (El Nahas und Bello 2005; Vaidya *et al.*, 2008). Zudem stellt die andauernde regenerative Proliferation infolge einer fortwährenden Schädigung einen bedeutenden Risikofaktor für die Entstehung von Nierenkrebs dar (s. Abschnitt 1.4.2.3).

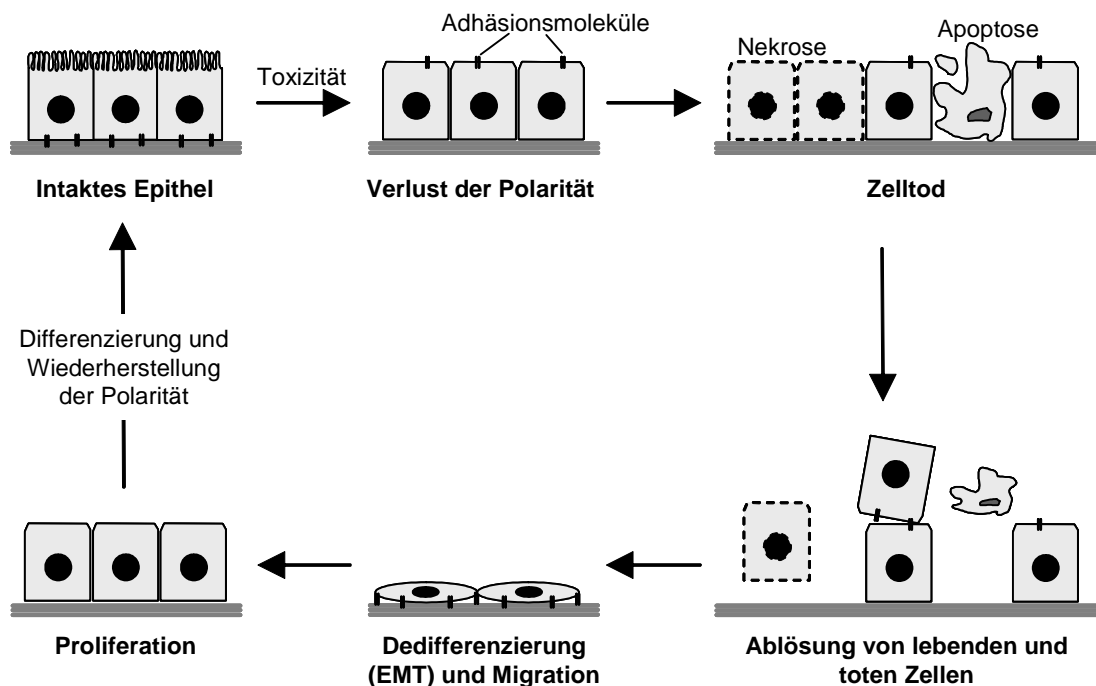


Abb. 1.4: Schematische Darstellung von toxischer Schädigung und Regeneration des proximalen Tubulusepithels (s. Text).

### 1.3 Prüfung auf Nephrotoxizität: Konventionelle Testverfahren und die Entwicklung von Alternativmethoden

Da die Niere ein bedeutendes Zielorgan für toxische Wirkungen von Fremdstoffen ist, müssen Arzneimittel oder Chemikalien aus Umwelt und Industrie in toxikologischen Testverfahren hinsichtlich möglicher nephrotoxischer Wirkungen überprüft werden, um ein Risiko für die Gesundheit des Menschen bei Exposition gegenüber der Substanz abzuschätzen. Zuverlässige Informationen über nierenschädigende Wirkungen können derzeit nur im Rahmen von toxikologischen Prüfungen am Tier erhalten werden. Während akute Nierentoxizität bereits in Kurzzeitstudien (bis zu 28 Tagen) festgestellt werden kann, sind zum Nachweis von Effekten infolge der längerfristigen, wiederholten Exposition mit der Prüfsubstanz (z.B. chronische Nierenschädigung oder Nierenkrebs) subchronische (90 Tage) oder chronische Studien (6 Monate bis 2 Jahre) erforderlich (Balls *et al.*, 2002a). Diese Studien sind jedoch sehr zeit- und kostenintensiv und erfordern eine große Anzahl an Versuchstieren. Als Marker für toxische Effekte dienen vor allem histopathologische Untersuchungen und die Messung von charakteristischen Biomarkern in Plasma bzw. Urin und Gewebe (s. Abschnitt 1.4.1.2).

Im Zuge der neuen Chemikalien-Richtlinie der Europäischen Union (REACH: Registrierung, Evaluierung und Autorisierung alter und neuer Chemikalien) sollen in den nächsten Jahren ca. 30100 Chemikalien überprüft werden, die bereits seit Jahren auf dem Markt sind, über deren mögliche toxische Effekte jedoch wenig bekannt ist. Da dies mit den herkömmlichen Testmethoden aufgrund des enormen Bedarfs an Versuchstieren, der hohen Kosten und des Zeitaufwands nicht zu realisieren ist, wurde von der Chemikalienindustrie und der Politik verstärkt die Entwicklung von Alternativmethoden gefordert. Des weiteren hat die pharmazeutische Industrie ebenfalls ein großes Interesse an alternativen Teststrategien, um eine schnellere und kostengünstigere Prüfung neuer Arzneimittel durchzuführen. Die Definition solcher Methoden ergibt sich aus dem sog. „3-R-Konzept“, das darauf abzielt, durch die Entwicklung von verbesserten Prüfmethode im Tier die Anzahl von Versuchstieren zu reduzieren (Reduction, Reduzierung). Des weiteren sollen die tierexperimentellen Methoden verbessert werden, um die Belastung von Versuchstieren zu verringern (Refinement, Verbesserung). Schließlich sollen Methoden entwickelt werden, die den Gebrauch von lebenden Wirbeltieren als Versuchstiere vollständig ersetzen (Replacement) (Balls *et al.*, 2002a; Prieto *et al.*, 2006).

In den nächsten Abschnitten werden nun verschiedene neue Ansätze für verbesserte Testsysteme zur Identifizierung nephrotoxischer Effekte erläutert. Abschnitt 1.4 befasst sich mit neuen Methoden, um *in vivo* eine schädigende (zytotoxische) bzw. eine krebserzeugende Wirkung von Substanzen früher und zuverlässiger nachzuweisen als mit den traditionellen Testmethoden. In Abschnitt 1.5 werden dann neue Ansätze vorgestellt, nephrotoxische Effekte ohne die Verwendung von Versuchstieren (*in vitro*) festzustellen.

## **1.4 Neue Methoden zum frühzeitigen Nachweis von Nierentoxizität und -kanzerogenität**

Eine Schädigung des festen Zellverbandes in den Nierentubuli durch nephrotoxische Verbindungen führt letztendlich zu einem zunehmenden Funktionsverlust der Niere. Um solche zytotoxischen Wirkungen möglichst frühzeitig zu erfassen, werden empfindliche Biomarker gesucht, die bereits vor dem relativ späten Eintritt der verschlechterten Nierenfunktion nachweisbar sind. Neue Ansätze zur Entwicklung von derartigen Biomarkern werden in Abschnitt 1.4.1 erläutert.

Einige Nephrotoxine induzieren bei wiederholter Exposition die Entwicklung von Nierentumoren. Kanzerogene Eigenschaften von Substanzen können jedoch erst in äußerst aufwendigen, zeit- und kostenintensiven Langzeitstudien im Tier aufgedeckt werden. Ein wichtiges Ziel bei der Suche nach Alternativmethoden ist es daher auch, Marker zu identifizieren, mit deren Hilfe krebserzeugende (Nephro-)Toxine in kürzerer Zeit erkannt werden können. Neue Ansätze auf diesem Gebiet werden in Abschnitt 1.4.2 beschrieben.

### **1.4.1 Entwicklung von neuen Biomarkern zum Nachweis von Nierenschädigung**

#### **1.4.1.1 Definition und Anwendungen von Biomarkern**

Ein Biomarker ist ein Parameter, der objektiv gemessen werden kann und bestimmte normale biologische Prozesse oder pathologische Veränderungen anzeigt. Dabei kann es sich um mRNA-Profile, Proteine, Lipide oder andere Parameter im Organismus handeln (Hewitt *et al.*, 2004). In der Klinik dienen Biomarker zur frühen und exakten Diagnose von Krankheiten, um diese möglichst schnell und richtig zu behandeln (Hewitt *et al.*, 2004). Idealerweise ist ein Biomarker spezifisch für das betroffene Organ bzw. die Zielzellen und sensitiv genug, um bereits geringe Funktionsstörungen

aufzuzeigen. Des Weiteren sollte seine Konzentration mit dem Grad der jeweiligen Schädigung korrelieren und erhöhte Messwerte für den Biomarker während des gesamten Verlaufs der Erkrankung zu messen sein. Insbesondere für die klinische Diagnostik ist es wichtig, dass der Biomarker mit Methoden ermittelt werden kann, die nicht die Entnahme von Gewebe erfordern, z.B. in Urin oder Plasma (nicht-invasive Diagnostik). Daher stellen unter pathologischen Bedingungen sezernierte Proteine oder Teile von Rezeptoren in Plasma und Urin aufgrund guter Zugänglichkeit die besten Marker dar. Die Konzentration des Biomarkers sollte bei gesunden Personen sehr niedrig sein und unter pathologischen Bedingungen so stark ansteigen, dass eine zuverlässige Diagnose erfolgen kann. Wichtig ist ebenso, dass der Biomarker in der Probe stabil ist und auch nach längerer Lagerung gemessen werden kann. Schließlich sollte die Messung des Biomarkers einfach und im Hochdurchsatzverfahren möglich sein (Hewitt *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2006).

Neben ihrer Bedeutung in der frühen Diagnose von Erkrankungen in der Klinik werden Biomarker auch zur Diagnose von toxischen Effekten in präklinischen und klinischen Phasen während der Arzneistoffentwicklung oder bei anderen Toxizitätstests eingesetzt. Hier dienen sie als Endpunktmarker für eine bestimmte toxische Wirkung (z.B. eine Nierenschädigung) und können somit zur Entwicklung eines toxikologischen Profils für eine Substanz, zum besseren Vergleich pharmakologisch ähnlicher Substanzen (*ranking*) oder zum schnellen *screening* unterschiedlicher Chemikalien hinsichtlich ihrer toxischen Wirkung beitragen (Hewitt *et al.*, 2004).

#### **1.4.1.2 Traditionelle Biomarker zur Bestimmung einer gestörten Nierenfunktion**

Eine der wichtigsten Aufgaben der Niere besteht darin, bestimmte Stoffwechselendprodukte, z.B. Harnstoff oder Kreatinin, aus dem Körper zu entfernen. Diese gelangen über das Blut zur Niere, wo sie frei filtriert werden und über den Harn ausgeschieden werden. Da diese Substanzen nicht wieder aufgenommen werden hängt ihre Exkretionsrate direkt mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zusammen, welche einen wichtigen Parameter der Nierenfunktion darstellt (Hart und Kinter 2005). Eine erhöhte Konzentration von Kreatinin oder Harnstoff im Blut weist somit auf eine gestörte Filter- oder Exkretionsleistung der Niere hin. Da diese Parameter relativ einfach zu messen sind, stellt die Bestimmung von Kreatinin oder Harnstoff im Plasma eine der wichtigsten Methoden zur Diagnose von Nierenerkrankungen dar. Allerdings sind solche Tests zur Bestimmung der GFR äußerst empfindlich gegenüber jedem

Faktor, der die Durchblutung der Niere beeinflusst (z.B. Blutverlust, Dehydration, verlangsamte Herz­­tätigkeit oder Alter). Des weiteren kommt es im Fall von Kreatinin, einem Nebenprodukt des Kreatin-Metabolismus in Muskeln, bei einem Verlust der Muskelmasse ebenfalls zu einem Anstieg des Plasmaspiegels, sodass dieser Parameter nicht spezifisch eine pathologische Veränderung der Nierenfunktion darstellt (Hart und Kinter 2005).

Kritisch bei der Messung der GFR als Indikator für eine Nierenschädigung ist außerdem, dass man keine Informationen über die genaue Stelle der Schädigung erhält und diese Methode nicht sensitiv genug ist, um geringe Funktionsverluste zu detektieren. Beispielsweise können einige Substanzen in der Niere zusätzlich sezerniert werden, und die normale Konzentration im Plasma erheblichen Schwankungen unterliegen. Schließlich besitzt die Niere eine enorme funktionelle Reserve, durch die sie den Verlust einiger Nephronen ausgleichen kann. Aus diesen Gründen kommt es nur dann zu einem deutlichen Anstieg der Kreatinin-Konzentration im Serum, wenn bereits 70-80% der funktionellen Nephronmasse verloren gegangen sind (Hart und Kinter 2005; Pfaller und Gstraunthaler 1998).

Der Urin bietet als Endprodukt der Niere eine sehr gute Alternative zu den klassischen Methoden zur Analyse des funktionellen Status des Organs über Parameter im Blut. Einerseits kann durch die Standard-Urinalyse (s. unten) eine Information über die Resorptions- und Konzentrationsfähigkeit der Niere erhalten werden, andererseits kann die Messung spezifischer Proteine aus den unterschiedlichen Typen von Tubulusepithelzellen oder von charakteristischen Metaboliten eine genauere Lokalisation der Gewebeschädigung ermöglichen (Hart und Kinter 2005; Vaidya *et al.*, 2008).

In der routinemäßigen Urinalyse werden unter anderem Farbe, Trübung, Volumen, Osmolalität, pH-Wert, Proteingehalt, Glukose-Konzentration und das Vorhandensein von Zellen oder Zell-Protein-Aggregaten bestimmt. Abnorme Veränderungen dieser Parameter können eine gestörte Nierenfunktion anzeigen, allerdings führen auch pathologische Veränderungen in anderen Organsystemen zu Effekten auf verschiedene Parameter im Urin (Hart und Kinter 2005) .

Eine erhöhte Ausscheidung von Proteinen über den Urin ist ein guter Hinweis auf einen Verlust der Nierenfunktion. Eine relativ sensitive Methode zum Nachweis einer gestörten Proteinexkretion bietet die Quantifizierung von Albumin, das die höchste

Proteinkonzentration im Urin aufweist. Trotz seines hohen Molekulargewichtes (69 kDa) wird in den Glomeruli ständig ein kleiner Anteil des Albumins im Blut filtriert und gelangt in den Primärharn (Ultrafiltrat). Dort wird es normalerweise von Epithelzellen des proximalen Tubulus über Endozytose aufgenommen, sodass nur noch eine geringe Menge über den Urin ausgeschieden wird. Bei zahlreichen Nierenerkrankungen kommt es aufgrund einer verschlechterten Filterleistung des Glomerulus oder einer Störung der endozytotischen Aufnahme von Proteinen in die proximalen Tubulusepithelzellen zu einer erhöhten Exkretion von Albumin (Birn und Christensen 2006). Somit weist die Erhöhung des Albumin-Spiegels im Urin zwar auf einen Funktionsverlust der Niere hin, allerdings gibt er keinen guten Hinweis auf den Ort der Schädigung. Sehr hohe Albuminkonzentrationen zusammen mit erhöhten Konzentrationen an weiteren hochmolekularen Proteinen sprechen jedoch in jedem Fall für den Verlust der Filterfunktion durch eine Schädigung der Glomeruli. Eine schwache Erhöhung der Albumin-Konzentration im Urin (Mikroalbuminurie) zusammen mit einem Anstieg der Konzentration von kleinen Proteinen spricht dagegen eher für eine Hemmung der Wiederaufnahme von filtrierten Proteinen in Zellen des proximalen Tubulus.  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa) stellt einen guten Indikator für die renale Exkretion von kleinen Proteinen dar, da es auf der Oberfläche aller kernhaltigen Zellen vorkommt und einen relativ konstanten Plasmaspiegel aufweist.  $\beta$ 2-Mikroglobulin wird im Glomerulus frei filtriert und in der Niere normalerweise vollständig resorbiert (Hart und Kinter 2005).

Zur genauen Lokalisation der Gewebeschädigung in der Niere wird häufig die Konzentration bestimmter Enzyme im Urin gemessen, die aus geschädigten Tubulusepithelzellen freigesetzt werden (Trof *et al.*, 2006; Vaidya *et al.*, 2008). Da Enzyme große Proteine sind und somit nicht durch den glomerulären Filter gelangen, ist ein Anstieg der Konzentration im Urin ein direkter Hinweis auf eine Schädigung des Nierengewebes. Zudem stellt die Messung der Enzymaktivität eine äußerst empfindliche Methode dar. Typische Beispiele für solche Enzyme sind das Bürstensaum-Enzym  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) oder das lysosomale Enzym N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG) aus proximalen Tubulusepithelzellen. Obgleich die Sensitivität und Spezifität dieser Enzyme zur Indikation einer Gewebeschädigung in zahlreichen Studien gezeigt wurde, schränkt ihre geringe Stabilität und die Beeinflussung ihrer Aktivität durch verschiedene Parameter im Urin die Verwendung als Biomarker erheblich ein (Hart und Kinter 2005; Trof *et al.*, 2006).

### 1.4.1.3 Entwicklung neuer Biomarker zur frühen Diagnose von Nierenschäden

Wie im vorigen Abschnitt erläutert wurde, sind bisher verwendete Biomarker wenig empfindlich und zumeist unspezifisch, um eine frühe Diagnose auf Nierenschädigung zu stellen. Daher ist der Bedarf an neuen, sensitiveren und zuverlässigeren Biomarkern zur Erkennung von Nierenschäden groß. Einerseits wäre mithilfe solcher Marker eine frühzeitige Diagnose und damit auch die frühzeitige Behandlung von akuten oder chronischen Nierenschäden möglich. Des Weiteren könnten sensitive Marker im Tierversuch als früher toxischer Endpunkt verwendet werden. Dadurch ließen sich sowohl Dauer von Tierversuchen, als auch die Anzahl der benötigten Versuchstiere deutlich reduzieren.

In den letzten Jahren wurden durch die Anwendung von „-omics“-Technologien (Transcriptomics/Toxicogenomics, Proteomics oder Metabonomics) verschiedene Ansätze zur Identifizierung neuer Biomarker unternommen. Mithilfe von NMR oder Massenspektrometrie können Stoffwechselprodukte, Zucker und Aminosäuren im Urin untersucht werden. (Metabonomics) (Nicholson *et al.*, 2002). Allerdings sind diese Methoden aufgrund des Bedarfs an sehr spezieller Technik und fachlich sehr gut ausgebildetem Personal nicht für Routine-Diagnosen in der Klinik geeignet. Proteomics-Technologien bieten den Vorteil, im gewünschten Medium (z.B. Urin) Proteinmarker für diagnostische Messtechniken zu identifizieren. Aufgrund der aufwendigen Methodik, der schwierigen Identifizierung der Proteine und der hohen Anfälligkeit für geringste Schwankungen wurden mit dieser Technik bis jetzt allerdings nur wenige neue Markerkandidaten gefunden (González-Buitrago *et al.*, 2007; Hewitt *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2006). Einige viel versprechende Marker für akute Nierenschädigung infolge von Ischämie oder nach Behandlung mit Nephrotoxinen wurden dagegen in den letzten Jahren durch Genexpressionsanalysen (Toxicogenomics) im Tierversuch identifiziert, unter anderem *kidney injury molecule-1*, Lipocalin-2, *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*, Osteopontin, Clusterin, Vimentin und Hämoxygenase-1 (Amin *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2001; Kharasch *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2003; Thompson *et al.*, 2004; Thukral *et al.*, 2005). Veränderungen der Genexpression zählen zu den frühesten Ereignissen infolge von Toxizität, sodass Effekte auf entsprechende Markergene als äußerst sensibler Nachweis einer Gewebeschädigung gelten. Daher sind diese neuen Biomarker als frühzeitige Indikatoren für Nephrotoxizität sowohl in der Klinik als auch in

toxikologischen Prüfverfahren von besonderem Interesse. Sie werden nun im nächsten Abschnitt genauer vorgestellt.

#### 1.4.1.4 Neue Biomarker für akute Nierenschädigung

##### **Kidney injury molecule-1 (KIM-1)**

*Kidney injury molecule-1* (KIM-1) ist ein glycosyliertes Typ 1-Membranprotein, dessen Expression in der Niere erstmals 1998 in einem Modell für akutes Nierenversagen beschrieben wurde (Ichimura *et al.*, 1998). Mittlerweile ist bekannt, dass KIM-1 zur Familie der TIM (*T-cell immunoglobulin mucin*)-Proteine gehört und auch unter der Bezeichnung TIM-1 bekannt ist (Kuchroo *et al.*, 2003). Des Weiteren ist KIM-1 mit dem Rezeptor für das Hepatitis A Virus (HAV) auf menschlichen Zellen identisch (*HAV cellular receptor 1*, HAVcr-1) (Kuchroo *et al.*, 2003). Die Bezeichnung TIM-1 wird vor allem im Bereich der Immunologie verwendet, wo das Protein als Marker für T-Helferzellen vom Typ 2 angesehen wird (Khademi *et al.*, 2004; Kuchroo *et al.*, 2003). In der Nephrologie hat sich dagegen die Bezeichnung KIM-1 eingebürgert.

KIM-1 besitzt wie alle Mitglieder der Tim-Proteinfamilie vier Domänen: auf der extrazellulären Seite befinden sich eine Immunglobulin V (Ig V)- und eine Mucin-Domäne, dann folgt die Transmembrandomäne und eine kurze zytoplasmatische Domäne (Kuchroo *et al.*, 2003). Die zytoplasmatische Domäne von KIM-1 ist zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert und kommt in zwei Spleißvarianten vor: das in der Niere exprimierte Protein besitzt dort ein Phosphorylierungsmotiv (KIM-1b), während in der Leber gebildetes KIM-1 kein Phosphorylierungsmotiv aufweist (KIM-1a) (Bailey *et al.*, 2002).

KIM-1 stellt sicherlich einen der vielversprechendsten neuen Biomarker für Nephrotoxizität dar. So zeigten verschiedene Human- und tierexperimentelle Studien, dass die Expression von KIM-1 in der gesunden Niere sehr niedrig ist, es jedoch infolge einer akuten Schädigung in proximalen Tubulusepithelzellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene zu einem deutlichen Anstieg der Expression kommt (Han *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2006; van Timmeren *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008). Des Weiteren wurde eine erhöhte Expression von KIM-1 auch bei verschiedenen Nierenerkrankungen und in bestimmten Nierentumoren nachgewiesen, die aus proximalen Tubulusepithelzellen stammen (de Borst *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007; van Timmeren *et al.*, 2007).



Infolge einer Nierenschädigung wird KIM-1 an der apikalen Seite von dedifferenzierten Zellen exprimiert, sodass eine Funktion des Proteins bei der Regeneration des Gewebes postuliert wurde (Ichimura *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2004; Prozialeck *et al.*, 2007; van Timmeren *et al.*, 2007). Die Ektodomäne von KIM-1 (Ig V- sowie ein Großteil der Mucin-Domäne) wird kontinuierlich durch Metalloproteinasen abgeschnitten und in den Urin abgegeben (*soluble* KIM-1, s-KIM-1), was die Möglichkeit einer einfachen und nicht-invasiven Messung von KIM-1 bietet (Bailly *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2006). Obgleich zahlreiche Humanstudien und Tierversuche bis heute die Bedeutung von KIM-1 im Urin als frühzeitigen und universellen Biomarker für akute Schäden der proximalen Nierentubuli bestätigt haben (Vaidya *et al.*, 2008), muss das Potential von KIM-1 zum sensitiven Nachweis einer chronischen Nierenschädigung noch untersucht werden.

### **Lipocalin-2 (LCN2)**

Lipocalin-2 (LCN2, NGAL) gehört zur Lipocalin-Superfamilie, deren Mitglieder kleine, protease-resistente Proteine sind, die ein gemeinsames Strukturelement besitzen, das es ihnen ermöglicht, niedermolekulare, hydrophobe Liganden zu transportieren (Kjeldsen *et al.*, 1993; Mori und Nakao 2007). Im Menschen wurde das Protein ursprünglich als ein 25 kDa-Protein identifiziert, das kovalent mit der 92 kDa-Gelatinase/Matrix-Metalloproteinase-9 aus Neutrophilen verbunden war, woher sich sein Name *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) ableitet (Kjeldsen *et al.*, 1993). NGAL ist das humane Analogon des 24p3-Proteins aus der Maus und des  $\alpha_1$ -related-microglobulin protein / neu-related lipocalin aus der Ratte (Kjeldsen *et al.*, 2000). Das zugrunde liegende Gen trägt in allen Spezies die Bezeichnung *Lcn2*, weshalb sich auch für das Protein der Name „LCN2“ eingebürgert hat, der im weiteren Verlauf verwendet wird.

LCN2 besitzt wie alle Mitglieder seiner Proteinfamilie die Fähigkeit, niedermolekulare Substanzen zu transportieren. Es wurde nachgewiesen, dass LCN2 den Siderophor Enterochelin transportiert, ein Eisen-bindendes Molekül aus Bakterien, das zur Aufnahme dieses essentiellen Spurenelements aus der Umgebung dient (Flo *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003). Die Entfernung von Enterochelin durch LCN2 scheint eine bedeutende Rolle für die Abwehr von Mikroorganismen zu spielen (Borregaard und Cowland 2006), weshalb es nicht verwunderlich ist, dass LCN2 unter normalen Umständen hauptsächlich an solchen Stellen im Organismus exprimiert wird, die häufig

mit Bakterien konfrontiert sind. So findet man das Protein z.B. in Epithelzellen in Magen, Dickdarm, Gallengängen oder der Lunge (Cowland und Borregaard 1997; Friedl *et al.*, 1999). Außerdem führen inflammatorische Prozesse zu einer erhöhten Expression von LCN2 (Kjeldsen *et al.*, 2000).

Im Jahr 2003 wurde LCN2 als eines der am stärksten deregulierten Gene infolge einer ischämischen Nierenschädigung in einem Maus-Modell identifiziert (Mishra *et al.*, 2003). Ähnlich wie KIM-1 wird LCN2 in der gesunden Niere nur sehr schwach exprimiert und bei einer akuten Nierenschädigung sowohl bei Menschen als auch beim Versuchstier dramatisch hochreguliert (Mishra *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005; Schmidt-Ott *et al.*, 2006). LCN2 stellt in der Niere ein sog. „Akute-Phase-Protein“ dar, da es bereits wenige Stunden nach einer Gewebeschädigung in der Niere nachgewiesen werden kann (Mishra *et al.*, 2003). In verschiedenen Modellen für akutes Nierenversagen wurde die Akkumulation von LCN2 in proximalen Tubulusepithelzellen gezeigt, die mit einer erhöhten Konzentration des Proteins in Urin und Serum korrelierte (Ding *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005). Somit scheint LCN2 ein spezifischer Marker für die Schädigung proximaler Tubulusepithelzellen zu sein. Die Funktion, die das Protein dort erfüllt, ist jedoch bis dato nicht aufgeklärt. Es wird diskutiert, dass LCN2 die Aufnahme von Eisen in die Zellen fördert, was die Induktion von Schutzmechanismen (z.B. von Hämoxxygenase-1) zur Folge hat (Mori *et al.*, 2005).

Untersuchungen an Patienten mit chronischen Nierenerkrankungen wiesen eine erhöhte Konzentration von LCN2 in Serum oder Urin auf, die der Erhöhung von Serum-Kreatinin vorausging (Schmidt-Ott *et al.*, 2006). Somit könnte dieser Marker neben dem sensitiven Nachweis akuter Effekte möglicherweise auch für die frühe Diagnose langsamer, progressiver Nierenschäden geeignet sein. Dies wurde jedoch im Tierexperiment noch nicht untersucht.

### **Clusterin (CLU)**

Clusterin (CLU) ist ein hochkonserviertes,  $\alpha\beta$ -heterodimeres Glycoprotein, das auch unter den Bezeichnungen *testosterone-repressed prostate message* (TRPM-2), *sulfated glycoprotein-2* (SGP-2), Apolipoprotein J, Glycoprotein 80, Serumprotein 40,40 und *complement lysis inhibitor* bekannt ist (Rosenberg und Silkensen 1995). Ursprünglich wurde das Protein 1983 aus der Flüssigkeit der Rete testis im Hoden

isoliert und aufgrund seiner Eigenschaft, Sertolli-Zellen miteinander zu verbinden (*clustering*), als Clusterin bezeichnet (Blaschuk *et al.*, 1983).

CLU wird in Zellen normalerweise aus einer Polypeptidkette durch proteolytische Spaltung in das  $\alpha\beta$ -dimere 80 kDa-Protein umgewandelt und sezerniert (s-CLU) (Rosenberg und Silkensen 1995; Shannan *et al.*, 2006). Mittlerweile ist bekannt, dass CLU in den meisten Organen vorkommt, wo es hauptsächlich von Epithelzellen gebildet und in umgebende Körperflüssigkeiten (einschließlich Urin, Plasma, Samenflüssigkeit und Muttermilch) abgegeben wird. In der Niere wird CLU konstitutiv in Zellen der distalen Tubuli im Kortex synthetisiert (Aronow *et al.*, 1993; Rosenberg und Silkensen 1995). Die Funktionen von CLU sind vielfältig. So ist das Protein unter anderem bei der Reproduktion, dem Lipidtransport, der Regulation des Komplementsystems und der Organogenese beteiligt. Des Weiteren vermittelt s-CLU als potentes Adhäsionsmolekül die Aggregation von Zellen und die Ausbildung von festen Zellkontakten. Zudem besitzt s-CLU zytoprotektive Eigenschaften und fungiert als konstitutives Chaperon in extrazellulären Flüssigkeiten (Girton *et al.*, 2002; Poon *et al.*, 2000; Rosenberg und Silkensen 1995; Trougakos *et al.*, 2005). Die Rolle von CLU in der Zelle wird kontrovers diskutiert, da sowohl pro- als auch anti-apoptotische Effekte beschrieben wurden (French *et al.*, 1994; Girton *et al.*, 2002; Hara *et al.*, 2001; Lakins *et al.*, 1998; Trougakos *et al.*, 2005). CLU wird unter Stressbedingungen induziert (Michel *et al.*, 1997; Trougakos *et al.*, 2005), wobei die Funktion des Proteins möglicherweise von verschiedenen intrazellulären Formen abhängt. So kann in menschlichen Zellen durch alternative Spleißung der mRNA eine nukleäre Form von CLU gebildet werden (n-CLU), die unter zytotoxischen Stressbedingungen mit der Induktion von Apoptose assoziiert ist (Leskov *et al.*, 2003).

Eine erhöhte Expression von CLU wurde in verschiedenen Krankheitszuständen beschrieben, u. a. bei neurodegenerativen Erkrankungen, Arteriosklerose und Krebs (Rosenberg und Silkensen 1995). Auch bei verschiedenen akuten und chronischen Nierenerkrankungen wurde eine Induktion von CLU mRNA und/oder Protein festgestellt, u.a. bei Nierentumoren, toxin-induzierter Nierenschädigung, renaler Atrophie nach Harnleiter-Obstruktion, Lupus-ähnlicher Nephritis, Glomerulonephritis, zystischen Erkrankungen und infolge einer kurzzeitigen Ischämie (Aulitzky *et al.*, 1992; Correa-Rotter *et al.*, 1998; Eti *et al.*, 1993; Gobe *et al.*, 1995; Hidaka *et al.*, 2002; Kharasch *et al.*, 2006; Moll *et al.*, 1998; Nath *et al.*, 1994; Parczyk *et al.*, 1994; Rosenberg und Silkensen 1995; Schlegel *et al.*, 1992; Silkensen *et al.*, 1997; Witzgall

*et al.*, 1994). Die Funktion von CLU bei pathologischen Prozessen im Gewebe ist jedoch unklar. In einigen Studien wurde ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der Induktion der CLU-Expression und Zellverlust durch Apoptose festgestellt (Gobe *et al.*, 1995; Lakins *et al.*, 1998; Witzgall *et al.*, 1994). Des Weiteren scheint CLU keine Funktion bei einer regenerativen Proliferation von Nierenzellen zu besitzen (Gobe *et al.*, 1995; Witzgall *et al.*, 1994). Allerdings wurde in zahlreichen Studien *in vivo* und *in vitro* unter zytotoxischen Stressbedingungen eine verstärkte Expression von CLU in lebensfähigen Zellen nachgewiesen (Correa-Rotter *et al.*, 1998; French *et al.*, 1994; Gobe *et al.*, 1995; Trougakos *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). Interessanterweise wurde eine erhöhte Expression von CLU auch in verschiedenen Tumoren (einschließlich Nierentumoren) und einigen Tumorzelllinien gezeigt, was in Zusammenhang mit anti-apoptotischen, zytoprotektiven Funktionen von s-CLU zu stehen scheint (Miyake *et al.*, 2002; Rosenberg und Silkensen 1995; Shannan *et al.*, 2006).

In verschiedenen Modellen für akute und progressive Nierenerkrankungen wurde neben der Induktion von CLU im Gewebe auch eine erhöhte Konzentration von s-CLU im Urin festgestellt (Aulitzky *et al.*, 1992; Correa-Rotter *et al.*, 1998; Eti *et al.*, 1993; Hidaka *et al.*, 2002). Zudem zeigten immunhistochemische Studien in geschädigtem Nierengewebe eine Assoziation zwischen s-CLU und Zelltrümmern im Tubuluslumen (Hidaka *et al.*, 2002; Witzgall *et al.*, 1994). Somit könnte s-CLU im Urin möglicherweise einen frühen Marker für Nierenschädigung darstellen. Dies wurde jedoch noch nicht ausreichend untersucht.

### **Osteopontin (OPN)**

Osteopontin (OPN; 44 kD bone phosphoprotein; sialoprotein I; secreted phosphoprotein I, SPP1; uropontin; early T-lymphocyte activation-1, Eta-1) wurde ursprünglich als Produkt von Zellen in der Knochenmatrix entdeckt und so bezeichnet, da es eine Brücke (lat. *pons*) zwischen Zellen und Mineral in der Matrix bilden kann (Xie *et al.*, 2001b). Inzwischen ist bekannt, dass OPN ein Glycoprotein ist, das von verschiedenen Epithelzellen konstitutiv gebildet und sezerniert wird (Brown *et al.*, 1992). Unter anderem wurde OPN in Zellen des Gastrointestinaltraktes, der Lunge, der Leber, der weiblichen Brust, der Niere und der Harnblase lokalisiert und kann in verschiedenen Körperflüssigkeiten (z.B. Serum, Urin, Galle und Milch) nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 1992; Rittling und Chambers 2004; Xie *et al.*, 2001b). Des Weiteren wird OPN von verschiedenen Zelllinien, u.a. NRK-52E, produziert (Singh *et*

*al.*, 1992). In Abhängigkeit von seinem Syntheseort existieren zahlreiche Formen von OPN, die unter anderem unterschiedliche Muster der Glycosylierung oder Phosphorylierung aufweisen (Brown *et al.*, 1992). OPN aus Knochenmatrix besitzt beispielsweise ein Molekulargewicht von 44 kDa (Xie *et al.*, 2001b), während NRK-52E-Zellen eine 69 kDa-Form des Proteins bilden (Singh *et al.*, 1992). Im Rattenurin wurden OPN-Spezies mit einer Masse zwischen 52 und 84 kDa detektiert (Khan *et al.*, 2002; Kleinman *et al.*, 1995; Kohri *et al.*, 1993). OPN besitzt verschiedene Funktionen, die über Rezeptoren aus der Integrin- oder der CD44-Familie vermittelt werden (Xie *et al.*, 2001b). So reguliert Osteopontin beispielsweise in Knochengewebe die Funktion der Osteoklasten, während es in der Niere für Hemmung des Wachstums und Anheftung von Nierensteinen verantwortlich ist. Des Weiteren wurden Funktionen von OPN bei der Tumorgenese und der Akkumulation von Makrophagen im Rahmen von Entzündungsprozessen nachgewiesen (Rittling und Chambers 2004; Shu *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2001b).

Die Expression von OPN in der Niere hängt sowohl von der Tierspezies als auch von Alter und Geschlecht des Tieres ab (Xie *et al.*, 2001b). In verschiedenen Studien wurde OPN in der gesunden Niere von ausgewachsenen Ratten im dünnen absteigenden Ast der Henle-Schleife und an Randzellen der Papille lokalisiert (Kleinman *et al.*, 1995; Verstrepen *et al.*, 2001), während man das Protein in der menschlichen Niere hauptsächlich in distalen Nephronen findet (Brown *et al.*, 1992).

Eine erhöhte Expression von OPN wurde sowohl im Tierversuch als auch im Menschen bei zahlreichen Nierenerkrankungen nachgewiesen, unter anderem bei Nierensteinen, tubulointerstitieller Nephritis, Glomerulonephritis, akuter Schädigung durch Nephrotoxine, interstitieller Fibrose, chronischem Nierenversagen und Nierentumoren (Davis *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2002; Magil *et al.*, 1997; Persy *et al.*, 1999; Verstrepen *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001a; Xie *et al.*, 2001b). Da OPN in geschädigtem Nierengewebe häufig in dedifferenzierten Tubulusepithelzellen lokalisiert wurde und die Expression des Proteins mit Markern für eine erhöhte Zellproliferation korreliert, wird ihm eine Funktion während der Regeneration zugeschrieben (Iguchi *et al.*, 2004; Magil *et al.*, 1997; Persy *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2002; Verstrepen *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001a). Zum einen fördert OPN vermutlich die Adhäsion und Migration von Zellen über die Basallamina, des Weiteren wirkt das Protein hemmend auf die Induktion von Apoptose (Brown *et al.*, 1992; Mazzali *et al.*, 2002; Rittling und Chambers 2004; Xie *et al.*, 2001b).

Mehrere Studien zur Genexpression in der Niere nach Exposition von Ratten mit nephrotoxischen Modellsubstanzen (z.B. Gentamicin, Cisplatin oder Quecksilberchlorid) zeigten, dass OPN bereits bei geringfügigen histopathologischen Effekten induziert wird und daher einen empfindlichen Marker für Nierenschädigung darstellen könnte (Amin *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Thukral *et al.*, 2005). Allerdings wurden frühe Effekte auf Proteinebene noch nicht nachgewiesen. Da OPN in den Urin sezerniert wird, könnte es sich bei dem Protein somit auch um einen neuen nicht-invasiven Biomarker zur Diagnose von Nephrotoxizität handeln. Eine Zunahme der Exkretion von OPN wurde bis jetzt jedoch nur bei Ratten mit Nierensteinen tatsächlich nachgewiesen (Khan *et al.*, 2002), während keine Daten über erhöhte Werte des Proteins bei akuter oder chronischer Nierentoxizität existieren.

### **Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)**

TIMP-1 ist ein glycosyliertes Protein, das zur Familie der Inhibitoren der Matrix-Metalloproteinasen (*tissue inhibitors of metalloproteinases*, TIMPs) gehört. Diese Proteine hemmen die proteolytische Aktivität von Metalloproteinasen, deren Funktion es ist, die extrazelluläre Matrix abzubauen (Matrix-Metalloproteinasen, MMPs) (Lambert *et al.*, 2004). TIMP-Proteine können über diesen Weg Matrix-abhängige Signale, wie z.B. die Freisetzung von Wachstumsfaktoren, beeinflussen (Chirco *et al.*, 2006).

Die TIMP-Familie besteht aus vier Mitgliedern (TIMP-1 bis TIMP-4), die in zahlreichen Gewebe exprimiert werden und auch in den meisten Körperflüssigkeiten (u. a. Plasma und Urin) zu finden sind (Lambert *et al.*, 2004). In der Niere werden TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-3 exprimiert, wobei die ersten beiden Proteine löslich sind, während TIMP-3 fest mit der extrazellulären Matrix assoziiert ist (Johnson *et al.*, 2002; Lambert *et al.*, 2004). Die Expression von TIMP-1 wird hauptsächlich auf Ebene der Transkription reguliert. Im Gegensatz zu TIMP-2, das konstitutiv exprimiert wird, ist die Genexpression von TIMP-1 induzierbar. *In vitro* wurde eine erhöhte Expression von TIMP-1 nach Behandlung mit verschiedenen Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Phorbolestern nachgewiesen (Lambert *et al.*, 2004).

TIMP-1 beeinflusst das Zellwachstum, wobei sowohl stimulierende als auch inhibitorische Wirkungen auf die Proliferation beschrieben wurden. Des Weiteren hemmt TIMP-1 die Induktion von Apoptose (Chirco *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2004). In der Niere wurde eine erhöhte Expression von TIMP-1 in verschiedenen Modellen für

tubulointerstitielle Fibrose (Gewebevernarbung) und in Tumoren nachgewiesen (Ahmed *et al.*, 2007; Duymelinck *et al.*, 1998; Eddy 1996; Eddy und Giachelli 1995; Engelmyer *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 2002; Kallakury *et al.*, 2001). Des weiteren wurde die Genexpression von TIMP-1 bei Kurzzeitstudien mit verschiedenen Nephrotoxinen bereits sehr frühzeitig und bei geringen pathologischen Effekten induziert, weshalb TIMP-1 auch als sensitiver Marker für akute Nierenschädigung gilt (Huang *et al.*, 2001; Kharasch *et al.*, 2006; Thukral *et al.*, 2005). Bis jetzt wurde die Expression von TIMP-1 auf Gen- und Proteinebene bei einer progressiven Schädigung des proximalen Tubulusepithels jedoch noch nicht untersucht.

### **Vimentin (VIM)**

Vimentin (VIM) ist ein Intermediärfilament, das in Mesenchymgewebe, Fibroblasten und dedifferenzierten Zellen in Kultur stark ausgebildet ist und dort ein ausgedehntes Netzwerk bildet, in normal ausdifferenzierten Nierenepithelzellen jedoch nicht vorkommt (Franke *et al.*, 1979; Hatzinger *et al.*, 1988; Wallin *et al.*, 1992; Witzgall *et al.*, 1994). Dagegen wird es infolge einer Schädigung des Tubulusepithels in dedifferenzierten Zellen (mesenchymaler Phänotyp) exprimiert und gilt daher als Marker für die Regeneration (El Nahas 2003; Wallin *et al.*, 1992; Witzgall *et al.*, 1994).

### **Hämoxygenase-1 (HO-1)**

Hämoxygenasen katalysieren den initialen Schritt beim Abbau von Häm, wobei der Porphyrinring oxidativ in Biliverdin, Kohlenmonoxid (CO) und zweiwertiges Eisen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) gespalten wird. Biliverdin wird im weiteren Verlauf zu dem potenten Antioxidans Bilirubin reduziert. Zudem besitzt CO in der Zelle eine anti-apoptotische Wirkung, sodass die Wirkung von Hämoxygenasen allgemein mit dem Schutz vor oxidativem und anderem zellulären Stress assoziiert wird. Es gibt drei Hämoxygenasen (HO-1 bis HO-3). HO-1 ist ein Mitglied der Familie von *heat shock proteins* (HSP32) und wird im Gegensatz zu den anderen Hämoxygenasen durch verschiedene Stressfaktoren (u. a. Häm, Hypoxie, Schwermetalle, UV-Strahlen, reaktive Sauerstoffspezies oder Zytokine) induziert (Sikorski *et al.*, 2004). Die Produktion des Enzyms wurde in verschiedenen Modellen einer akuten Nierenschädigung nachgewiesen und scheint dabei eine essentielle protektive Funktion zu besitzen (Amin *et al.*, 2004; Kanwar 2001; Kharasch *et al.*, 2006; Sikorski *et al.*, 2004). Des weiteren spielt HO-1 offensichtlich nicht nur bei akuter Nephrotoxizität eine wichtige Rolle, sondern schützt das Gewebe auch bei chronischen Nierenerkrankungen (Kanwar 2001).

## 1.4.2 Identifizierung von Nierenkanzerogenen

### 1.4.2.1 Chemikalien-induzierte Kanzerogenese

Es ist seit langem bekannt, dass Chemikalien zur Kanzerogenese beitragen können, indem sie die Bildung von Tumoren induzieren oder fördern (Poirier 2004). Die Entstehung von Krebs ist ein sehr komplexer Prozess, der sich aus zahlreichen Einzelereignissen zusammensetzt und sich über einen langen Zeitraum erstreckt. Man geht davon aus, dass die Tumorgenese durch eine Schädigung der DNA initiiert wird, z.B. durch kovalente Bindung von Substanzen an DNA-Basen, Modifikationen der DNA-Struktur durch Strangbrüche, Quervernetzungen oder chromosomale Aberrationen. Wird ein solcher Schaden nicht repariert, können bei Replikation der DNA Mutationen entstehen, die z.B. eine Aktivierung von Onkogenen oder den Verlust von Tumor-Suppressor-Genen bzw. weiteren Genen, die für die Kontrolle des Zellzyklus entscheidend sind, zur Folge haben (Initiation). Durch solche Mutationen können Zellen einen Wachstumsvorteil erhalten, der durch den Einfluss einer wachstumsstimulierenden Substanz zu einer selektiven Vermehrung dieser genetisch veränderten Zellen führt (Tumorpromotion). Weitere Mutationen sowie Veränderungen der Chromosomenzahl und -struktur resultieren schließlich in einer zunehmenden Malignität und der Bildung von Metastasen (Progression) (Abb. 1.5) (Dietrich und Swenberg 1991; Klaunig *et al.*, 2000; Poirier 2004).

Kanzerogene Substanzen werden anhand ihrer DNA-Reaktivität in zwei Klassen unterteilt: genotoxische bzw. nicht-genotoxische (epigenetische) Kanzerogene. Erstere interagieren direkt mit DNA, durch kovalente Bindung oder Störung der Struktur, und fördern dadurch die Bildung von Mutationen. Nicht-genotoxische Kanzerogene interagieren dagegen nicht direkt mit DNA, sondern besitzen andere, meist sehr spezifische Mechanismen, über die sie die Entstehung von Krebs auslösen oder begünstigen. Anders als bei DNA-reaktiven Substanzen ist die kanzerogene Wirkung bei diesen Chemikalien oft nur auf ein bestimmtes Organ, ein bestimmtes Geschlecht und eine bestimmte Spezies beschränkt, und zeigt sich selbst bei hohen Dosen erst nach langfristiger Exposition.



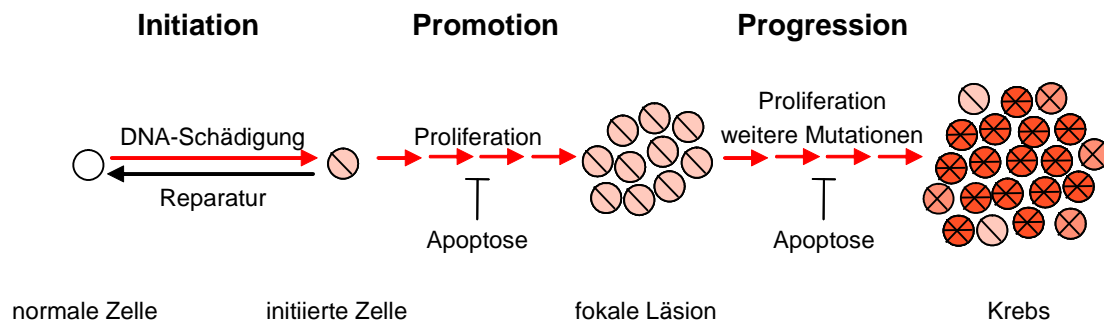


Abb. 1.5: Stadien der Krebsentstehung (s. Text).

Eine Gruppe nicht-gentoxischer Kanzerogene sind beispielsweise zytotoxische Substanzen, deren chronische Exposition zu einer kontinuierlichen Schädigung des Zielgewebes führt, was wiederum eine andauernde regenerative Zellproliferation zur Folge hat. Eine erhöhte Proliferationsrate begünstigt die Bildung von spontanen Mutationen infolge von Fehlern bei der DNA-Replikation oder durch eine unzureichende Reparatur von DNA-Schädigungen und kann dadurch für die Entstehung von Tumoren sowohl initiiierende als auch promovierende Wirkung zeigen. Eine zweite Gruppe von nicht-gentoxischen Kanzerogenen sind Substanzen, die eine Störung von Signalwegen verursachen, beispielsweise durch Interaktion mit zellulären Rezeptoren, und dadurch das Wachstum von spontan initiierten Zellen durch Stimulation von Proliferation oder Hemmung von Zelltod fördern (Mitogene) (Butterworth und Bogdanffy 1999). Somit ist es den meisten der nicht-gentoxischen Kanzerogene gemein, im Zielgewebe zu einer erhöhten Zellproliferation zu führen, auch wenn die ursächlichen, primären Wirkmechanismen sehr unterschiedlich sind (Klaunig *et al.*, 2000; Williams und Whysner 1996).

#### 1.4.2.2 Konventionelle und neue Teststrategien zur Prüfung auf kanzerogene Eigenschaften

Um Chemikalien auf kanzerogenes Potential zu testen, werden Untersuchungen zur Gentoxizität sowie 2 Jahres-Studien in Nagern (Ratten und Mäuse) durchgeführt. Die Prüfsubstanzen werden dabei chronisch in verschiedenen Dosen appliziert, einschließlich der „maximal tolerierten Dosis“. Grundsätzlich wird dabei angenommen, dass im Versuchstier positiv getestete Substanzen auch für den Menschen eine Gesundheitsgefährdung darstellen können (Cohen 2004; Jones *et al.*, 1996). Für die Abschätzung des Krebsrisikos für den Menschen bei Exposition mit diesen Chemikalien spielt die Unterscheidung zwischen gentoxischen und nicht-gentoxischen

Kanzerogenen eine entscheidende Rolle. Da bei DNA-reaktiven Substanzen theoretisch ein einziges Molekül ausreicht, um eine Mutation genomischer DNA hervorzurufen, wird ein linearer Zusammenhang für die kanzerogene Wirkung angenommen (kein Schwellenwert) (Klaunig *et al.*, 2000). Für viele nicht-gentoxische Kanzerogene wird dagegen angenommen, dass ein indirekter Wirkmechanismus und der Effekt erst oberhalb eines bestimmten Schwellenwerts eintritt (nicht-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung). Grenzwerte für die Exposition mit solchen Substanzen werden daher mithilfe eines sog. *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) festgelegt. Der NOAEL ist die höchste Dosis, bei der auch nach längerer Behandlung im empfindlichsten Versuchstier noch kein toxischer Effekt auftrat. Ausgehend von diesen im Tierversuch ermittelten wirkfreien Dosen können unter Berücksichtigung von Sicherheitsfaktoren duldbare Aufnahmemengen definiert werden, bei denen keine gesundheitsschädigende Wirkung zu erwarten sind (Balls *et al.*, 2002b; Cohen 2004; Jones *et al.*, 1996).

In den letzten Jahren ist verstärkt die Forderung aufgetreten, Alternativmethoden zu Langzeit-Kanzerogenitätsstudien zu entwickeln. Nicht nur sind diese Tests sehr zeit- und arbeitsaufwendig, sie verursachen zudem Kosten in Millionenhöhe und benötigen eine große Anzahl an Versuchstieren, sodass sie für eine Überprüfung zahlreicher Substanzen im *Screening*-Verfahren ungeeignet sind (Balls *et al.*, 2002b; Cohen 2004).

Für die Entwicklung von Alternativmethoden zur klassischen 2 Jahres-Studie werden verschiedene Ansätze diskutiert, darunter diverse *in vitro*-Verfahren zur Prüfung auf Gentoxizität, Induktion von Zellproliferation oder morphologische Transformation, computergestützte Modelle zur Vorhersage kanzerogener Wirkungen und neue Tiermodelle für eine schnellere Identifizierung von Kanzerogenen (z.B. heterozygote p53-Maus) (Balls *et al.*, 2002b; Cohen 2004). Die meisten dieser Methoden sind gut geeignet, DNA-reaktive und andere mutagene Eigenschaften von Prüfsubstanzen zu identifizieren. Problematisch ist jedoch weiterhin die zuverlässige Identifizierung von nicht-gentoxischen Kanzerogenen. Obgleich manche *in vitro*-Tests geeignet sind, indirekte gentoxische Effekte oder andere mit Krebs assoziierte Veränderungen aufzudecken, ist es aufgrund des oft sehr spezifischen Wirkmechanismus unwahrscheinlich, *in vitro* tatsächlich alle epigenetischen Kanzerogene zu identifizieren. Zudem ist bis jetzt keine dieser Methoden für den regulatorischen Gebrauch validiert. Da man bei nicht-gentoxischen Kanzerogenen von der Existenz eines Schwellenwerts ausgeht, unterhalb dessen keine toxische Wirkung eintritt, ist es

für die Risikoabschätzung weiterhin notwendig, im Tierversuch einen NOAEL zu definieren. Auch wenn es mittlerweile Ansätze hinsichtlich der Definition einer so genannten „*no-observed-effect-concentration*“ (NOEC) in *in vitro*-Testsystemen gibt (s. Abschnitt 1.5.2), ist es noch ein weiter Weg bis zur Entwicklung einer zuverlässigen *in vitro*-Alternativmethode zur Vorhersage kanzerogener Wirkungen von Substanzen in einem bestimmten Zielorgan (Balls *et al.*, 2002b; Prieto *et al.*, 2006).

Es ist allgemein bekannt, dass eine gesteigerte Zellproliferation ein wichtiger Schritt in der Kanzerogenese ist und der Wirkmechanismus vieler nicht-gentoxischer Kanzerogene die Stimulation der Zellteilung beinhaltet. Von S. M. Cohen (2004) wurde daher eine weitere Teststrategie zur frühen Identifizierung kanzerogener Chemikalien vorgeschlagen, die auf der Annahme beruht, dass Substanzen zu einem erhöhten Krebsrisiko beitragen, indem sie entweder durch DNA-Reaktivität oder durch eine Stimulation der DNA-Replikation die Anzahl an Mutationen in Zellen erhöhen (Cohen 2004). Des weiteren geht der Autor davon aus, dass Krebs aus einer Folge präneoplastischer Ereignisse entsteht, deren Eintritt deutlich vor der ultimativen Entwicklung von Tumoren gemessen werden kann.

Zur Prüfung von Substanzen auf kanzerogenes Potential sollen demnach weiterhin zunächst Standardverfahren durchgeführt werden, um DNA-reaktive Chemikalien zu identifizieren (mutagene Effekte *in vitro*, Bildung von spezifischen DNA-Addukten *in vivo*). Solche Chemikalien sollten direkt als potentielle Kanzerogene eingestuft werden.

Substanzen, die indirekt auf die DNA wirken, z.B. durch Induktion von Mikronuklei, chromosomale Aberrationen, Effekten auf DNA-Reparatur oder den mitotischen Apparat, besitzen einen Wirkmechanismus, der für den Menschen relevant sein kann, jedoch nicht sein muss. Diese Substanzen sollten in Kurzzeit- oder subchronischen Studien weiter untersucht und speziell Effekte auf die Zellproliferation untersucht werden. Eine Zunahme der Zellteilungsrate in einem Zielorgan infolge der Exposition mit einer Substanz stellt ein erhöhtes Risiko für Krebs dar (Butterworth und Bogdanffy 1999). Ursachen dafür sind zum einen die tumorpromovierende Wirkung einer kontinuierlichen Stimulation der Zellteilung. Des weiteren kann eine Erhöhung der Zellteilungsrate auch die Entstehung von spontanen Mutationen fördern, da unter diesen Bedingungen meist keine effiziente DNA-Reparatur stattfindet. Außerdem scheint die Aktivierung von Genen für die Zellzyklus-Kontrolle diese weitaus anfälliger für Mutationen zu machen (Butterworth und Bogdanffy 1999). Umgekehrt wird

postuliert, dass Substanzen, die weder DNA-reaktiv sind, noch zu einem erhöhten Zellwachstum führen, auch nicht kanzerogen sind (Alden 2000). In Übereinstimmung mit diesem Grundsatz wurde für zahlreiche Kanzerogene, die einen indirekten, epigenetischen Wirkungsmechanismus haben, ein direkter Zusammenhang zwischen der Stimulation von Zellteilung und der Entstehung von Tumoren aufgezeigt (Alden 2000; Elcombe *et al.*, 2002; Klaunig *et al.*, 2000; Lutz *et al.*, 1997; Mally und Chipman 2002).

Die Bestimmung der Zellproliferation als frühen Endpunkt für Kanzerogenität bietet eine Reihe von Vorteilen. Es handelt sich um eine sehr sensitive Methode zum Nachweis von Toxizität, mithilfe derer Veränderungen bereits vor dem Eintreten von offensichtlichen histopathologischen Effekten nachgewiesen werden könnten. Die Methode ist außerdem genau, reproduzierbar und quantifizierbar, sodass Dosis-Wirkungsbeziehungen für Toxizität im Zielgewebe und einem damit verbundenen Krebsrisiko aufgestellt werden können, ohne eine 2 Jahres-Kanzerogenitätsstudie durchzuführen. Zudem ermöglichen Zellproliferationsstudien im Gegensatz zu *in vitro*-Verfahren die Definition eines NOAEL als Anhaltspunkt für die Risikobewertung (Butterworth und Bogdanffy 1999).

Mithilfe der oben beschriebenen Vorgehensweise könnten somit Substanzen in relativ kurzer Zeit und ohne den hohen Aufwand an Kosten und Versuchstieren auf kanzerogenes Potential geprüft werden und zugleich Ansatzpunkte für die Risikoabschätzung geschaffen werden. Für diesen Prozess sollte jedoch auch stets überprüft werden, ob ein positives Ergebnis für nicht-gentoxische Substanzen auch Relevanz für den Menschen hat und die Substanz somit tatsächlich ein Risiko für die Gesundheit darstellt. Entscheidend ist es dabei, die Schlüsselereignisse im Prozess der Toxin-induzierten Kanzerogenese aufzuklären und zu beurteilen, ob diese Ereignisse auch im Menschen eintreten können. Als klassisches Gegenbeispiel ist hierbei sicherlich die  $\alpha_2\mu$ -Globulin-vermittelte Nierenkanzerogenese zu nennen, die nur bei männlichen Ratten auftritt (s. Abschnitt 1.4.2.3), oder auch die Erzeugung von Tumoren in Geweben oder unter physiologischen Bedingungen, die beim Menschen nicht existieren oder grundsätzlich verschiedenartig sind. Solche Fälle sind z.B. die Induktion von Tumoren im Vormagen von Nagern durch Butylhydroxyanisol; solch ein Teil des Magens existiert beim Menschen nicht. Auch sind hormonelle und physiologische Einflüsse bei der Entstehung von Tumoren der Hoden, Prostata und Brust in Nagern nicht gut mit den Kontrollmechanismen im Menschen zu vergleichen

(Cohen 2004; Williams und Whysner 1996). Selbst wenn der Wirkmechanismus für den Menschen relevant sein könnte, ist es für eine sinnvolle Risikoabschätzung notwendig, anhand von Dosis-Wirkungsbeziehungen zu untersuchen, in welchem Verhältnis die toxische Dosis im Tierversuch zu der tatsächlichen Exposition des Menschen steht (Cohen 2004).

#### **1.4.2.3 Bekannte Mechanismen von nicht-gentoxischen Nierenkanzerogenen**

Im Tierversuch wurden mittlerweile zahlreiche Nierenkanzerogene identifiziert, die über eine direkte Interaktion mit der DNA oder andere Mechanismen zur Entstehung von Tumoren führen. Kanzerogene, die direkt oder nach metabolischer Aktivierung mit genomischer DNA reagieren, zeichnen sich meist dadurch aus, dass sie in allen Versuchstieren Krebs auslösen, unabhängig von Spezies und Geschlecht. Die Tumorzinzidenz ist nach Exposition mit diesen Substanzen oft hoch, die Latenzzeit kann sehr kurz sein und nicht selten kommt es zur Bildung von Metastasen. Ähnliche Beobachtungen wurden auch bei Kanzerogenen gemacht, bei denen ein Zusammenhang mit oxidativen DNA-Schäden vermutet wird, z.B. Kaliumbromat oder Eisen (III)-Nitrilotriacetat ( $\text{Fe}^{\text{III}}$ -NTA) (Lock und Hard 2004).

Eine häufige Ursache für Nierenkanzerogenese im Tierversuch ist neben direkter und indirekter DNA-Schädigung die wiederholte Induktion von regenerativer Zellproliferation als Folge kontinuierlicher Gewebeschädigung. Dabei wird zwischen Substanzen, die direkt zytotoxisch auf die Zellen wirken (z.B. Chloroform), und indirekt zytotoxisch wirkenden Substanzen unterschieden. Letztere vermitteln eine Gewebeschädigung, indem sie an  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin binden (z.B. D-Limonen). Dabei handelt es sich um ein Protein, das ausschließlich im Urin von männlichen Ratten vorkommt und in der Niere dieser Tiere von  $\text{S}_2$ -proximalen Tubulusepithelzellen aufgenommen wird. Die Bindung von Substanzen an  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin führt zu einer Hemmung des Abbaus des Proteins und zur Akkumulation des Proteins in den Zellen, was eine permanente Schädigung des Tubulusepithels zur Folge hat und zur Hyperplasie führt. Die Inzidenz von Nierentumoren ist bei direkt oder indirekt zytotoxischen Substanzen meist relativ niedrig und die Latenzzeit in der Regel lang. Zudem treten bei der  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin-vermittelten Nephropathie Tumoren nur bei männlichen Ratten auf, da nur diese Tiere  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin produzieren (Lock und Hard 2004).

## 1.5 *In vitro*-Alternativen zur Prüfung auf Nephrotoxizität

### 1.5.1 Vorteile und Grenzen von *in vitro*-Systemen

Neben der Verbesserung von Tierversuchen ist es auch seit langem ein wesentliches Ziel der Forschung, *in vitro*-Alternativmethoden zur Prüfung auf Nephrotoxizität zu entwickeln. *In vitro*-Methoden anstelle von Tierexperimenten bieten zahlreiche Vorteile, allen voran sicherlich das Wegfallen der ethischen Bedenken aufgrund der Verwendung von Versuchstieren. Daneben könnten Kosten und Zeitaufwand von Toxizitätstests bei *in vitro*-Studien deutlich gesenkt werden und zahlreiche Substanzen gleichzeitig unter standardisierten Bedingungen im Hochdurchsatzverfahren getestet werden. Des Weiteren bietet sich die Möglichkeit, auch mit humanen Zellen zu arbeiten, um spezies-abhängige Unterschiede zu untersuchen. Gerade für die Entwicklung von Arzneistoffen wäre dies von großem Vorteil, da in kurzer Zeit und mit einem geringen Kostenaufwand mehrere pharmakologisch ähnliche Stoffe hinsichtlich ihrer Toxizität verglichen werden könnten (Pfaller und Gstraunthaler 1998; Prieto *et al.*, 2006).

Allerdings sind dem Einsatz von *in vitro*-Toxizitätstests auch Grenzen gesetzt. Zwar bietet das Studium einzelner Zellen bzw. Teilen von Organen oft einen gewissen Einblick in den toxischen Wirkmechanismus einer Substanz, jedoch können in solch einem vereinfachten Testsystem niemals alle substanzabhängigen Effekte im Organismus nachgeahmt werden, die durch das komplexe Zusammenspiel von verschiedenen Zellen und Organsystemen entstehen. Des Weiteren geben toxische Konzentrationen *in vitro* keinen Anhaltspunkt für toxische Dosen im Organismus, welche durch Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung der Substanz bestimmt werden (Pfaller und Gstraunthaler 1998; Prieto *et al.*, 2006). Allerdings sind gerade die toxischen und nicht-toxischen Dosen im Tierversuch der Ansatzpunkt für die Abschätzung von Gesundheitsrisiken für den Menschen bei einer Exposition gegenüber Fremdstoffen (NOAEL-Ansatz, s. Abschnitt 1.4.2.2). Ein NOAEL kann jedoch durch Studien *in vitro* nicht festgelegt werden.

### 1.5.2 Neue Ansätze zur *in vitro*-Prüfung auf Toxizität nach wiederholter Exposition – NOEC vs. NOAEL

Trotz der begrenzten Möglichkeiten, mithilfe von *in vitro*-Testmethoden tatsächlich eine realistische Risikoabschätzung für den Menschen durchzuführen, wächst der öffentliche Druck zur Einschränkung von Tierversuchen. Daher wurde vom „European

Centre for the Validation of Alternative Methods“ (ECVAM) eine neue Strategie für die Entwicklung von *in vitro*-Ersatzmethoden vorgeschlagen, deren wesentlicher Inhalt es ist, mithilfe von empfindlichen, spezifischen Endpunkten und verbesserten Testsystemen analog zum NOAEL im Tierversuch nun *in vitro* eine sog. „*no-observed-effect-concentration*“ (NOEC) zu ermitteln (Prieto *et al.*, 2006).

Ausgangspunkt für die Bestimmung einer NOEC wären zunächst, wie auch bei den herkömmlichen Testverfahren *in vivo*, Untersuchungen zur akuten Toxizität, d.h. die Ermittlung von zytotoxischen (letal) bzw. nicht direkt zytotoxisch wirksamen Konzentrationen der Prüfsubstanz. Für die weiteren Testverfahren sollten dann nur Konzentrationen verwendet werden, die nicht unmittelbar auf die Lebensfähigkeit der Zellen wirken, aber möglicherweise nach längerer Exposition toxische Effekte hervorrufen. Solche adversen, toxischen Effekte sollten dabei mithilfe verschiedener Endpunkte ermittelt werden. Einerseits sollten Wirkungen auf allgemeine Zellfunktionen wie z.B. mitochondriale Funktionen, Struktur des Zytoskeletts oder Zellproliferation untersucht werden; andererseits spielt es für die Identifizierung von Zielorganen der Substanz auch eine wesentliche Rolle, Wirkungen auf Funktionen zu betrachten, die spezifisch für das jeweilige Organ bzw. die jeweiligen Zielzellen sind, wie z.B. Wirkungen auf die Transportfunktion, den Metabolismus oder die Expression spezieller Gene/Proteine von Nierentubulusepithelzellen. Der empfindlichste Endpunkt für einen organspezifischen Effekt wäre dann der Ausgangspunkt für die Ermittlung der NOEC. Anhand von Kinetikmodellen oder bekannten Konzentrationen der Prüfsubstanz *in vivo* könnte daraufhin ein ungefährender Wert für den sog. „*margin-of-safety*“ (MOS) bestimmt werden, durch den beschrieben wird, inwieweit die NOEC die tatsächliche oder abgeschätzte Exposition übersteigt. Sollte der MOS sehr groß sein, würde man davon ausgehen, dass kein Risiko für den Menschen besteht – eine Prüfung *in vivo* wäre somit nicht mehr notwendig. Nur wenn der MOS klein ist, sollte die Toxizität der Prüfsubstanz noch einmal im Tierversuch untersucht werden. Des Weiteren sollte im Fall von fehlender Toxizität *in vitro* dies evtl. noch einmal im Tier überprüft werden.

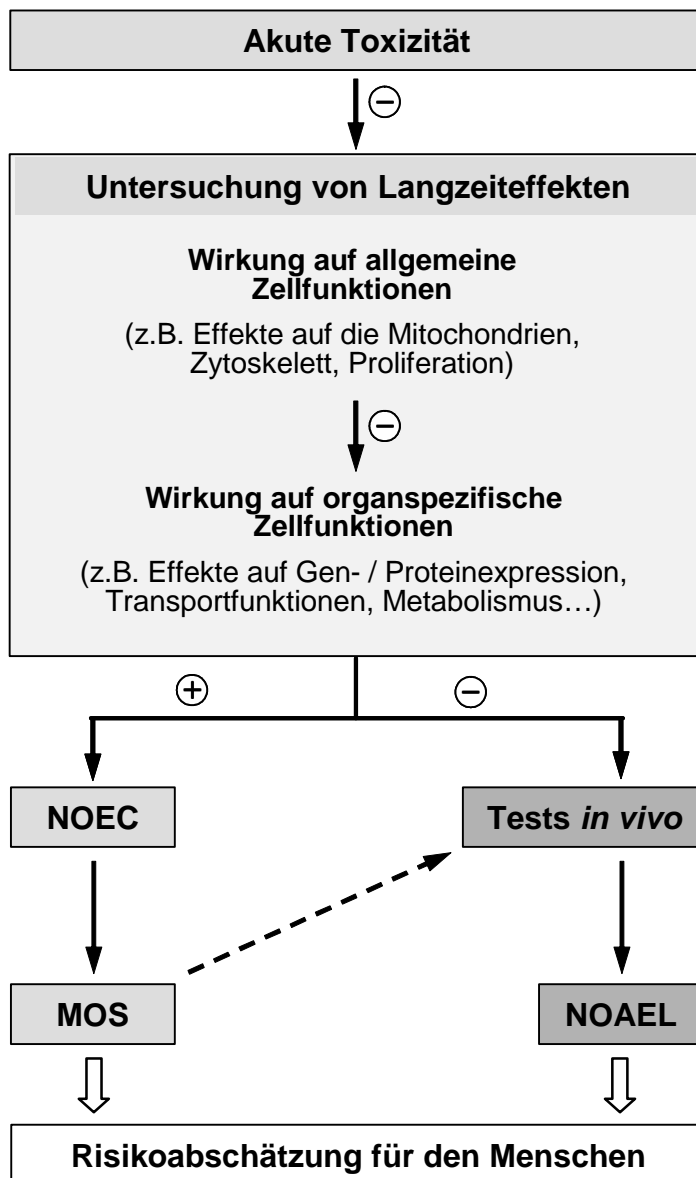


Abb. 1.6: NOEC-Ansatz zur Prüfung auf Toxizität *in vitro* (s. Text). Abkürzungen: NOEC, no-observed-effect-concentration; MOS, margin-of-safety; NOAEL, no-observed-adverse-effect-level; (-) / (+), keine Wirkung / Wirkung

Der NOEC-Ansatz würde somit eine gute Möglichkeit darstellen, zahlreiche Substanzen hinsichtlich ihrer toxischen Eigenschaften zu prüfen und wenig toxische bzw. stark toxische Stoffe bereits vor einer Testung am Tier auszuwählen. Dadurch könnte sowohl die Zahl der Tierversuche deutlich gesenkt werden als auch der Stress für Versuchstiere.



Obgleich es viele Ideen und Ansätze gibt, solche *in vitro*-Testsysteme zu entwickeln, steht man noch ganz am Anfang. Ein wesentliches Problem stellt dabei das geeignete *in vitro*-Modellsystem dar, das natürlich der Situation *in vivo* möglichst ähneln soll, zugleich aber auch praktisch zu handhaben und reproduzierbare Ergebnisse liefern soll. Zum anderen ist es schwierig, Endpunkte für Toxizität *in vitro* zu definieren, die empfindlich, spezifisch für ein bestimmtes Zielorgan/Zielgewebe und auch noch in etwa mit der Situation *in vivo* vergleichbar sind. Techniken wie Genomics, Proteomics oder Metabonomics bieten jedoch nun die Möglichkeit, derartige Biomarker für Toxizität zu identifizieren.

### 1.5.3 *In vitro*-Modellsysteme zur Prüfung auf Nierentoxizität

Aufgrund des komplexen Aufbaus der Niere und ihren zahlreichen, unterschiedlichen Zelltypen ist es besonders schwierig, geeignete *in vitro*-Testsysteme zu entwickeln (Pfaller und Gstraunthaler 1998). Um den heterogenen Aufbau dieses Organs möglichst wenig zu beeinflussen, wurden Studien in multizellulären Systemen wie dem isolierten Nephron oder Nierenschnitten durchgeführt. Allerdings eignen sich diese Testsysteme aufgrund ihrer komplizierten Herstellung, der äußerst kurzen Zeitspanne für Versuche (Stunden) und der begrenzten Reproduzierbarkeit nicht für *screening*-Verfahren (Hawksworth *et al.*, 1995).

Primärzellen bieten sich an, um toxische Effekte auf einen bestimmten Abschnitt des Nephrons (z.B. proximaler Tubulus) zu untersuchen, da diese Zellen noch zahlreiche Eigenschaften der Zellen im Organ besitzen. Die Kultivierung von Primärzellen führt jedoch stets zu einer Dedifferenzierung und zum Verlust von Transportsystemen und fremdstoffmetabolisierenden Enzymen (Hawksworth *et al.*, 1995; Weiland *et al.*, 2007). Des Weiteren ist sowohl die Isolierung als auch die Kultivierung von Primärzellen aus dem proximalen Tubulusepithel sehr schwierig. Auch bilden diese Zellen in der Regel keinen konfluenten Monolayer und stellen somit kein gutes Modell für das geschlossene Epithel in der Niere dar (Hawksworth *et al.*, 1995). Aus diesen Gründen werden zur Untersuchung nephrotoxischer Effekte stattdessen häufig Zelllinien eingesetzt, deren einfache Handhabung und unbegrenzte Lebensdauer die Möglichkeit bieten, in kurzer Zeit viele Experimente durchzuführen (Pfaller und Gstraunthaler 1998). Die Einhaltung von standardisierten Versuchsbedingungen ermöglicht außerdem die Durchführung von Tests in verschiedenen Laboren und führt zu einer guten Reproduzierbarkeit der Experimente. Des Weiteren können Zelllinien genetisch oder

durch eine Änderung der Kulturbedingungen modifiziert werden, um sie besser an die Situation *in vivo* anzupassen. Schließlich erlaubt es die Verwendung humaner Zelllinien, einen Hinweis auf toxische Effekte im Menschen zu erhalten. Zelllinien sind somit für die Entwicklung von *in vitro*-Screeningsystemen für Nephrotoxizität in vielerlei Hinsicht besser geeignet als Primärzellen (Balls *et al.*, 2002a; Hawksworth *et al.*, 1995; Pfaller und Gstraunthaler 1998).

Zur Untersuchung von nephrotoxischen Effekten werden zur Zeit verschiedene Zelllinien verwendet, z.B. LLC-PK1-, OK-, NRK-52E- oder MDCK-Zellen (Hawksworth *et al.*, 1995; Lash *et al.*, 2002; Morin *et al.*, 1997; Pfaller und Gstraunthaler 1998; Prozialeck *et al.*, 2006). Während MDCK-Zellen eher Eigenschaften von distalen Tubulusepithelzellen besitzen, stellen die anderen drei Zelllinien Modelle für proximale Tubulusepithelzellen dar. Nur die NRK-52E-Zelllinie (*Normal Rat Kidney cells*) stammt jedoch aus der Ratte und ermöglicht somit einen Vergleich der Effekte im Nager-Tierversuch mit den Effekten auf kultivierte Nierentubulusepithelzellen.

#### **1.5.4 Ansatzpunkte für die Entwicklung von zellkulturbasierten Testsystemen zur Prüfung auf chronische Nephrotoxizität**

Für die Entwicklung von Testmethoden *in vitro* ist es notwendig, einen Vergleich mit der Situation *in vivo* zu erhalten. Daher empfiehlt die ECVAM, für die ersten Studien Zelllinien aus den klassischen Versuchstieren Ratte oder Maus zu verwenden. Des Weiteren sollten zur Nachahmung der geschlossenen Epithelschicht in einem Nierentubulus nur konfluente Zellen mit der Prüfsubstanz behandelt werden. Zur Beurteilung der Sensitivität und der Spezifität des Testverfahrens sollten zunächst nur gut charakterisierte Modellsubstanzen verwendet werden, die unterschiedliche primäre Wirkmechanismen, aber gemeinsame Zielzellen besitzen. Nach Bestimmung der zytotoxischen Eigenschaften dieser Substanzen sollen empfindliche, nierenspezifische Endpunkte gefunden werden, die auch bei Behandlung mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen eine Funktionsstörung der Zellen signalisieren (Hawksworth *et al.*, 1995; Morin *et al.*, 1997). Als Endpunkte werden von der ECVAM unter anderem Störungen der Barrierefunktion, von Transportvorgängen oder der Biotransformation von Fremdstoffen vorgeschlagen. Des Weiteren können auch verschiedene intrazelluläre Vorgänge, z.B. Effekte auf die Signaltransduktion, Veränderungen der Genexpression oder Induktion von Proliferation oder Apoptose, untersucht werden. Auf Basis solcher empfindlicher Endpunkte könnte dann die NOEC ermittelt werden.

## 1.6 Nephrotoxische Modellsubstanzen

### 1.6.1 Ochratoxin A (OTA)

Ochratoxin A (OTA) (N-[[[(3R)-5-Chlor-8-hydroxy-3-methyl-1-oxo-7-isochromanyl]-carbonyl]-3-phenyl-L-alanin) (Abb. 1.7) ist ein Mykotoxin, das von verschiedenen Schimmelpilzarten der Gattungen *Aspergillus* (u.a. *A. ochraceus*) und *Penicillium* synthetisiert wird. Diese Schimmelpilze kontaminieren landwirtschaftliche Erzeugnisse vor der Ernte oder während deren Lagerung. Da OTA eine äußerst stabile Substanz ist und bei der normalen Verarbeitung von Lebensmitteln nicht zerstört wird, kommt es durch den Verzehr von kontaminierten Nahrungsmitteln, z.B. Getreideprodukten, Bier, Wein und Kaffee, zu einer chronischen Aufnahme durch den Menschen. In der Europäischen Union beträgt die tägliche Aufnahmemenge beim durchschnittlichen erwachsenen Verbraucher ca. 2-3 ng/kg Körpergewicht (KG) OTA, während die Menge bei besonders exponierten Personen auf zwischen 6 und 8 ng/kg KG/Tag geschätzt wird (EFSA 2006; SCOOP 2002).

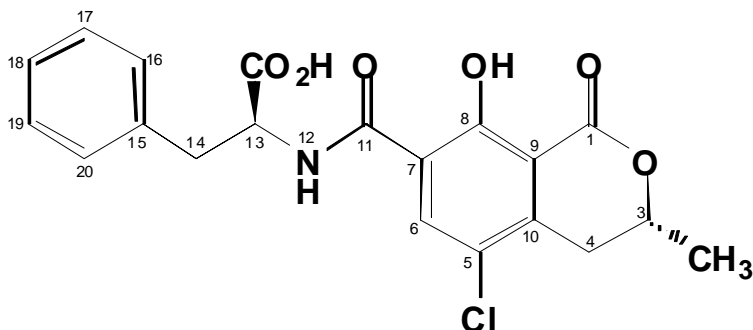


Abb. 1.7: Chemische Struktur von Ochratoxin A.

OTA besitzt nephrotoxische, immuntoxische und teratogene Eigenschaften (EFSA 2006). In Nagern ist OTA zudem ein potentes Nierenkanzerogen (NTP 1989). Die Exposition mit OTA wurde lange Zeit mit einer endemischen Nephropathie in bestimmten Regionen des Balkangebietes in Zusammenhang gebracht. Diese sog. „*Balkan endemic nephropathy*“ (BEN) ist eine chronische tubulointerstitielle Nierenkrankheit, die mit einem erhöhten Risiko für Tumore im Bereich des Urogenitaltraktes assoziiert ist (Fuchs und Peraica 2005). Da ein klarer

Zusammenhang zwischen einer erhöhten Exposition mit OTA und dem Auftreten von BEN aus epidemiologischen Studien nicht abgeleitet werden kann, wurde OTA von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) 1993 als im Menschen möglicherweise krebserzeugend (Klasse 2B) eingestuft (IARC 1993b).

OTA bindet zu mehr als 99% an Serumproteine und wird nur sehr langsam aus dem Körper ausgeschieden (Hagelberg *et al.*, 1989; Zepnik *et al.*, 2003). Das primäre Zielorgan von OTA ist die Niere (EFSA 2006). OTA wird in der Niere über organische Anionentransporter spezifisch in proximalen Tubulusepithelzellen aufgenommen und akkumuliert dort. Durch OTA induzierte Läsionen sind die Vergrößerung von Zellkernen (Karyomegalie) und Apoptose in proximalen Tubuli im äußeren Streifen des äußeren Markes (S<sub>3</sub>-Segment, *Pars recta*) (Boorman *et al.*, 1992; Maaroufi *et al.*, 1999; Petrik *et al.*, 2003; Rasonyi *et al.*, 1999; Stoev *et al.*, 2001). Neben seinen nephrotoxischen Eigenschaften induziert OTA in Ratten Nierentumoren, wobei männliche Tiere deutlich empfindlicher reagieren als weibliche Tiere (Brown *et al.*, 2007; NTP 1989). In einer 2 Jahres-Studie führte die Behandlung mit niedrigen Dosen Ochratoxin A (70 und 210 µg/kg KG) in männlichen F344/N-Ratten zu einer hohen Inzidenz an Nierenzelladenomen und -karzinomen, während bei Tieren, die mit 21 µg/kg KG OTA exponiert worden waren, keine erhöhte Tumorrare auftrat (NTP 1989). Die Nierentumoren besaßen eine sehr kurze Latenzzeit und entwickelten sich aus dem spezifischen Zielgewebe von OTA, dem geraden Segment der proximalen Tubuli. Des Weiteren wiesen die Tumoren einen ungewöhnlich aggressiven Phänotyp sowie eine starke Tendenz zur Metastasenbildung auf (Boorman *et al.*, 1992; NTP 1989).

Die potente Kanzerogenität von OTA im Tierversuch wies zunächst auf eine direkte Interaktion des Toxins mit DNA hin. Obgleich diesbezüglich kontroverse Ergebnisse veröffentlicht wurden, weisen neuere Daten darauf hin, dass OTA kein mutagenes, DNA-reaktives Potential hat. Weder OTA noch seine Metaboliten binden an DNA; des Weiteren waren Mutagenitätstests in bakteriellen Systemen in den meisten Fällen negativ (Mally und Dekant 2005). Nur in einigen Säugerzellsystemen wurden bei hohen OTA-Konzentrationen schwache gentoxische Effekte nachgewiesen, wie es häufig bei nicht-gentoxischen Kanzerogenen vorkommt (Balls *et al.*, 2002b; Cohen 2004; Mally und Dekant 2005).

In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene mögliche epigenetische Mechanismen der OTA-abhängigen Kanzerogenese vorgeschlagen, unter anderem

eine Hemmung der Proteinsynthese, Veränderungen der Signaltransduktion, toxische Wirkungen auf Mitochondrien und oxidativer Stress (Schilter *et al.*, 2005). Mittlerweile mehren sich die Hinweise darauf, dass OTA die Bildung antioxidativer Substanzen hemmt und dadurch indirekt oxidativen Stress auslöst (Cavin *et al.*, 2007). In Nieren von OTA-behandelten Ratten wurde DNA-Strangbrüche nachgewiesen, die auf eine oxidative DNA-Schädigung hinweisen. Allerdings wurden auch in der Leber derartige DNA-Schäden nachgewiesen, obwohl OTA in diesem Organ bei Ratten keinen Krebs induziert (Kamp *et al.*, 2005a; Mally *et al.*, 2005a; NTP, 1989). Daher ist die Beteiligung von oxidativem Stress an der OTA-abhängigen Nierenkanzerogenese weiterhin unklar.

Für zahlreiche Kanzerogene, die einen indirekten Wirkungsmechanismus haben, wurde ein Zusammenhang zwischen der Stimulation von Zellteilung und der Entstehung von Tumoren aufgezeigt (Elcombe *et al.*, 2002; Klaunig *et al.*, 2000; Mally und Chipman 2002). In der Niere ist die wiederholte Induktion von regenerativer Zellproliferation als Folge kontinuierlicher Gewebeschädigung ein wichtiger Mechanismus der Tumorentstehung (s. oben). Verschiedene Nierenkanzerogene wirken über diesen Weg, indem sie an  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin binden. Nach Behandlung von männlichen Ratten mit 1 mg/kg KG OTA über sieben Tage wurde jedoch keine Anreicherung von  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin und eine damit verbundene regenerative Zellproliferation beobachtet (Rasonyi *et al.*, 1999). Im Gegensatz dazu führte die Exposition mit 0,5-2 mg/kg KG über zwei Wochen zu einer erhöhten Expression des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) in der Niere, nicht aber in der Leber (Mally *et al.*, 2005b). Allerdings wurden diese Studien mit sehr hohen Dosen OTA durchgeführt. Bis jetzt wurden frühe Veränderungen der Zellproliferation nach Gabe niedriger Dosen OTA, die im Langzeitversuch kanzerogen wirkten bzw. keinen adversen Effekt hatten (NOAEL), noch nicht untersucht.

Alles in allem stellt OTA somit ein sehr ungewöhnliches Nierenkanzerogen dar, dessen molekularer Wirkmechanismus in jedem Fall näher untersucht muss, um das Gesundheitsrisiko für den Menschen bei täglicher Aufnahme besser einschätzen zu können.

### 1.6.2 Cadmium

Das Schwermetall Cadmium ist ein natürliches Element der Erdkruste, das in Verbindung mit anderen Elementen (z.B. als Cadmiumsulfid oder -carbonat) in Gestein und im Boden vorkommt. Cadmium und Cadmiumverbindungen werden in

verschiedenen Industrien verwendet, z.B. zur Herstellung von Batterien, Pigmenten, Metalloberflächen und Plastikartikeln (IARC 1993a). Obgleich Cadmium in der Natur relativ selten ist, kann es durch Industrieabfälle, Verbrennungsprozesse, Schmelzen von Erzgestein und einer Ansäuerung des Bodens zu einer Kontamination von Böden und Gewässern mit hohen Konzentrationen an Cadmium kommen. Durch Aufnahme und Anreicherung von Cadmium in Pflanzen und Wassertieren gelangt das Schwermetall in die Nahrungskette. Aus diesem Grund stellt der Verzehr cadmiumhaltiger Lebensmittel (z.B. Reis, Weizen, Wurzelgemüse, innere Organe, Fische und Meeresfrüchte) die Hauptquelle der Exposition von Menschen dar, die nicht berufsbedingt gegenüber dem Schwermetall exponiert sind. Auch Rauchen führt zur Aufnahme relativ großer Mengen an Cadmium (1-2 µg pro Zigarette), da die Tabakpflanze das Schwermetall anreichert (IARC 1993a; Il'yasova und Schwartz 2005).

Die Aufnahme von Cadmium erfolgt in der Regel inhalativ oder oral. Verschiedene Studien in Mensch und Tier haben erwiesen, dass eine wiederholte, chronische Exposition gegenüber größeren Mengen Cadmium zu Nierenschädigung führt (Brzoska *et al.*, 2003; IARC 1993a; Prozialeck *et al.*, 2003). Dies beruht darauf, dass Cadmium nach der Aufnahme rasch aus dem Blutkreislauf entfernt wird und in verschiedenen Organen akkumuliert, hauptsächlich Leber und Niere (Ando *et al.*, 1998; IARC 1993a). Diese Organe synthetisieren Metallothionein (MT), ein kleines Protein, das Schwermetalle mit einer hohen Affinität bindet und dadurch eine Anreicherung der freien Ionen in der Zelle verhindert (IARC 1993a; Thevenod 2003). In der Niere wird das freie Cadmium-Ion ( $\text{Cd}^{2+}$ ) oder MT-gebundenes  $\text{Cd}^{2+}$  spezifisch von Zellen des proximalen Tubulusepithels aufgenommen und angereichert (Thevenod 2003). Da es keine Mechanismen zur Ausscheidung von Cadmium gibt, akkumuliert das Schwermetall in den Zellen mit einer sehr langen Halbwertszeit (beim Menschen zwischen 10 und 30 Jahren) (Brzoska *et al.*, 2003; Il'yasova und Schwartz 2005). Intrazellulär führt freies  $\text{Cd}^{2+}$  in Abhängigkeit seiner Konzentration zu toxischen Wirkungen, einschließlich Störungen der Zelladhäsion, oxidativem Stress, Apoptose sowie zu Effekten auf den Zellzyklus und auf DNA-Reparaturmechanismen (Il'yasova und Schwartz 2005; Prozialeck *et al.*, 2003; Thevenod 2003; Xie und Shaikh 2006a, b). Im Versuchstier induziert Cadmium in verschiedenen Organen Krebs, u. a. in Niere, Lunge und Prostata, und auch im Menschen wurde ein Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber Cadmium und der Entwicklung von Lungenkrebs nachgewiesen

(IARC 1993a; Il'yasova und Schwartz 2005). Anhand von Daten aus epidemiologischen Studien geht man mittlerweile davon aus, dass die kontinuierliche Nierenschädigung durch Cadmium auch im Menschen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Nierenkrebs verbunden ist (Il'yasova und Schwartz 2005).

### 1.6.3 Cisplatin

Cisplatin (*cis*-Dichlordiaminplatin II) wird in der Krebstherapie als Zytostatikum zur Behandlung verschiedener Tumoren eingesetzt. Die Substanz wirkt durch die Vernetzung von DNA-Strängen, was zu einer Hemmung der DNA-Replikation führt. Der therapeutische Einsatz von Cisplatin ist jedoch aufgrund seiner stark nephrotoxischen Nebenwirkung begrenzt (Aktories und Unger 2001). Die Niere dient als Ausscheidungsorgan für Cisplatin, allerdings kommt es nach Gabe hoher Dosen zu einer aktiven Aufnahme der Substanz in proximale Tubulusepithelzellen (S<sub>3</sub>-Segment) (Huang *et al.*, 2001). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führt Cisplatin in Nierenzellen dosisabhängig zur Induktion von Apoptose und Nekrose (Amin *et al.*, 2004; Baek *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2001; Imamdi *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Sheikh-Hamad *et al.*, 2004). Hinsichtlich der nephrotoxischen Wirkung von Cisplatin werden verschiedene mögliche Wirkmechanismen diskutiert, u. a. Störungen der Zelladhäsion, Induktion von oxidativem Stress und/oder Störungen der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Homöostase (Baek *et al.*, 2003; Cetin *et al.*, 2006; Imamdi *et al.*, 2004).

### 1.6.4 Kaliumbromat (KBrO<sub>3</sub>)

Kaliumbromat (KBrO<sub>3</sub>) ist eine stark oxidierende Substanz, die bei der Brotherstellung verwendet wird. Außerdem entsteht das Bromat-Ion (BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>) als Nebenprodukt während der Wasseraufbereitung durch die Desinfektion des Trinkwassers mit Ozon. Somit wird der Mensch gegenüber KBrO<sub>3</sub> hauptsächlich über die Nahrung und das Trinkwasser exponiert (Bonacquisti 2006; IARC 1999). KBrO<sub>3</sub> ist eine hochtoxische Verbindung, die in hohen Dosen zu gastrointestinalen Beschwerden, akutem Nierenversagen, Taubheit und im Extremfall zum Tod führt (IARC 1999; Kurokawa *et al.*, 1990). Sowohl in männlichen als auch weiblichen Ratten führt die wiederholte Exposition gegenüber

KBrO<sub>3</sub> (ab 125-250 ppm<sup>1</sup>) im Trinkwasser zur Schädigung des proximalen Tubulusepithels und zu Nierenkrebs (IARC 1999; Kurokawa *et al.*, 1990; Umemura und Kurokawa 2006). KBrO<sub>3</sub> wurde daher von der IARC als mögliches Kanzerogen für den Menschen (Klasse 2B) eingestuft (IARC 1999). Hauptursache für Krebsentstehung in der Niere ist wohl die Induktion von oxidativem Stress, der zu Lipidperoxidation und DNA-Schädigung führt (Delker *et al.*, 2006; Lock und Hard 2004; Moore und Chen 2006; Umemura *et al.*, 1998).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die Früherkennung einer langsam fortschreitenden Nierenschädigung infolge der wiederholten Exposition gegenüber nephrotoxischen Verbindungen stellt ein großes Problem dar, da traditionelle Marker für Nierenfunktionsstörungen wenig empfindlich sind. Häufig werden toxische Effekte auf die Niere erst in zeit- und kostenintensiven Langzeitstudien im Tier erkannt. Ökonomische, praktische und ethische Gründe machen es somit unabdingbar, alternative, verbesserte Methoden für Routineuntersuchungen auf nephrotoxische Eigenschaften zu entwickeln.

Im Rahmen der Doktorarbeit sollten daher mögliche neue Teststrategien zur Prüfung auf Nierentoxizität untersucht werden. Schwerpunkt war zum einen die Untersuchung von potentiellen neuen Markern zum frühzeitigen Nachweis chronischer Nephrotoxizität und Nephrokanzerogenität. Daneben sollten neue *in vivo*-Biomarker für Nephrotoxizität auch in einem *in vitro*-Modell als mögliche Ersatzmethode zum Tierversuch getestet werden.

Für die Untersuchung von möglichen neuen Biomarkern für chronische Nephrotoxizität *in vivo* sollte ein Tierexperiment mit OTA durchgeführt werden, da die Gewebeschädigung und die kanzerogenen Effekte dieses Nephrotoxins nach Langzeitexposition gut charakterisiert sind. Um einen Aufschluss über die frühen Ereignisse und die Dosisabhängigkeit dieser Prozesse zu erhalten, sollte eine 90-Tage-Studie nach dem Protokoll der 2-Jahres-Studie von NTP (NTP 1989) durchgeführt werden. Zum einen sollten dabei traditionelle Endpunkte für Toxizität

---

<sup>1</sup> ppm (engl. „parts per million“) = 10<sup>-6</sup>



(Histopathologie, Elektronenmikroskopie, klinische Chemie und Urinanalyse) bestimmt werden. Im weiteren galt es, die mRNA- und Proteinexpression von potentiellen neuen Biomarkern für Nephrotoxizität, einschließlich KIM-1, LCN2, TIMP-1, OPN, CLU, VIM und HO-1, mittels quantitativer Real-time PCR bzw. immunhistochemisch im Nierengewebe zu analysieren. Zudem sollte die Ausscheidung von KIM-1, LCN2, OPN und CLU im Urin bestimmt werden, um eine mögliche Verwendung in nicht-invasiven Diagnoseverfahren zu bewerten. Ein wesentlicher Schwerpunkt dieses Teils der Arbeit sollte dann darin bestehen, die Empfindlichkeit der neuen Biomarker im Vergleich zu den klassischen Methoden zur Prüfung auf Nierentoxizität zu beurteilen.

Neben Markern für Stress und Gewebeschädigung sollte untersucht werden, ob Veränderungen der Zellproliferation einen möglichen frühen Marker für die OTA-abhängige Nierenkanzerogenese darstellen. Die Untersuchungen sollten mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) als Marker für neue DNA-Synthese immunhistochemisch sowohl in der Niere (Zielorgan für die kanzerogene Wirkung von OTA) als auch in der Leber (kein Zielorgan) erfolgen.

Schließlich sollte die Konzentration von OTA in Plasma, Nieren- und Lebergewebe mittels chromatographischer Methoden bestimmt werden, um einen Aufschluss über den Zusammenhang zwischen Dosis und nephrotoxischer Wirkung zu erhalten.

Da die oben genannten neuen Biomarker in verschiedenen *in vivo*-Modellen für akute Nephrotoxizität eine hohe Sensitivität und Spezifität zum Nachweis einer Schädigung des proximalen Tubulusepithels gezeigt hatten, sollte untersucht werden, ob sie sich auch in einem *in vitro*-Modell als Toxizitätsmarker eignen. Als Modell wurde dafür eine Zelllinie aus der Ratte gewählt, die Eigenschaften von proximalen Tubulusepithelzellen besitzt (NRK-52E), um einen Vergleich zwischen der Situation *in vivo* und *in vitro* zu ermöglichen. Die Zellen sollten mit unterschiedlichen Nephrotoxinen behandelt werden, die *in vivo* Zellen des proximalen Tubulus schädigen, einschließlich OTA, KBrO<sub>3</sub>, Cadmiumchlorid und Cisplatin. Die Messung der Biomarker sollte hauptsächlich auf mRNA-Ebene (Real-time PCR) erfolgen und eine Änderung der Genexpression gegebenenfalls auch auf Proteinebene durch Immunoblotting oder über immunhistochemische Methoden überprüft werden. Analog zum Tierversuch sollte auch bei dem *in vitro*-Testsystem die Sensitivität der Marker im Vergleich mit klassischen Zytotoxizitätstests bewertet werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

Tab. 2.1: Typ und Hersteller der verwendeten technischen Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Typen 23, 28	MELAG, Berlin
Binokular	FB/WPp4	Zeiss, Oberkochen
Brutschrank	HERA cell	Heraeus, Hanau
Elektrophorese-Kammern		
Polyacrylamid-Gele	SE 250	Hofer, San Francisco, USA
Agarose-Gele		Eigenbau der Institutswerkstatt
Elektronenmikroskop	EM 10	Carl Zeiss, Göttingen
Entwicklermaschine für Röntgenfilme	X-OMAT	Kodak, Stuttgart
Gefrierschrank (-80°C)	HFU 686 Basic	Heraeus, Hanau
Geldokumentation	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories, München
Gelgieß-Apparatur (Polacrylamidgele)	SE 245	Hofer, San Francisco, USA
Heizblock	Dri-Block DB-2A	Techne, Burlington, USA
Heizplatte	IKAMAG RCT	IKA Labortechnik, Staufen
Homogenisator	Ultra-Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Kolbenhubpipetten	Transferpette	Brand, Wertheim
Kühl- und Gefrierschrank (+4°C, -20°C)	KS17593	Privileg, Fürth
Magnetrührer	GLWM23	Hartenstein, Würzburg
Mikroskope		
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 135	Carl Zeiss, Göttingen
Lichtmikroskope		
Zellkultur	TMS	Nikon, Düsseldorf
Immunhistochemie	CH-2	Olympus, Hamburg
	Eclipse 55i	Nikon, Düsseldorf
Mikroskopkameras		
Lichtmikroskopie	MS-Reihe	Intas, Göttingen
Fluoreszenzmikroskopie	Spot Insight Color	Visitron Systems, Puchheim

Gerät	Typ	Hersteller
Mikrotome		
Paraffin-Schnitte	RM 2165	Leica, Wetzlar
Ultramikrotome	Om U3 MT-7000 ULTRA	C. Reichert, Österreich RMC, Tuscon, USA
Mikrowelle	MW 309	DeLonghi, Treviso, Italien
Nassblot-Apparatur	TE Series	Hoefler, San Francisco, USA
Netzgeräte	EPS 600 PowerPac 200	Pharmacia Biotech, Freiburg Bio-Rad Laboratories, München
Ofen		
37°C / 60°C	BKE-30	Memmert, Schwabach
300°C	T6120	Heraeus, Hanau
pH-Meter	pH 526	Wissenschaftlich-Technische- Werkstätten GmbH, Weilheim
Photometer		
96 well-Reader	Spectramax 340	Molecular Devices, Ismaning
Proteinkonzentration (750 nm)	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Freiburg
RNA-Konzentration (260 nm)	UV-1601	Shimadzu, Duisburg
PCR		
RT-PCR	PTC-100, PTC-200	MJ Research, Massachusetts, USA
Real-time PCR	ABI Prism 7000	Applied Biosystems, Darmstadt
Scanner	Perfection 4990 Photo	Epson, Meerbusch
Schüttler	KL-2	Edmund Bühler, Hechingen
Sterilbank	Antair BSK 6	Anthos, Siegburg
Ultraschallbad	Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin
Vortexer	Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich, Schweiz
Waagen		
Grob- und Feinwaage	PC 440	Mettler, Giessen
Analysenwaage	AG 245	Mettler-Toledo, Giessen
Wasserbad	U3	Julabo, Seelbach
Zentrifugen		
Tischzentrifuge	5415 C	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge (1,5-2 ml-Gefäße)	5402	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge (15 ml-Röhrchen)	Universal 320R	Hettich, Tuttlingen
96 well-Platten	Labofuge GL	Heraeus, Hanau

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2: Verbrauchsmaterial

Material	Firma
0,2 ml-PCR-Gefäße	Biozym, Hess. Oldendorf Sarstedt, Nümbrecht
1,5 ml- und 2 ml-Gefäße	Sarstedt, Nümbrecht
15 ml- und 50 ml-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe
Frischhaltefolie Saran®	Hartenstein, Würzburg
Handschuhe	
FLEXAM®-Schutzhandschuhe	Hartenstein, Würzburg
Nitrilhandschuhe	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen Dispomed®	Hartenstein, Würzburg
Kryoröhrchen	Hartenstein, Würzburg
Küvetten	
Plastikküvetten (Proteingehalt)	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvetten (RNA)	Carl Roth, Karlsruhe
Membranen	
Polyvinylidenfluorid (PVDF): Biotrace™ (0,45 µm)	Pall, Dreieich
Nitrozellulose (NZ): Protran® (0,45 µm)	Whatman, Dassel
Objektträger	
Superfrost®Plus	Hartenstein, Würzburg
Elka	Hartenstein, Würzburg
PCR-Platten (96 well) und Abdeckfolien	ABgene, Hamburg
Pipetten (5, 10, 20 ml)	
Plastikpipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Glaspipetten	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	
Filterlose Spitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterspitzen	Carl Roth, Karlsruhe
Probenbehälter aus Polyethylen (für gefrorene Organe)	Hartenstein, Würzburg
Probenbehälter aus Glas (für formalinfixierte Organe)	neoLab, Heidelberg
Röntgenfilme Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Freiburg
Skalpelle	B. Braun, Melsungen
Spritzen Omnifix®	B. Braun, Melsungen
Rotilabo®-Spritzenfilter 0,22 µm	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturgefäße	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien

Die während dieser Arbeit benötigten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

- ABgene, Hamburg
- AppliChem, Darmstadt
- Axxora, Grünberg
- BD Biosciences, Heidelberg
- BioRad Laboratories, München
- Carl Roth, Karlsruhe
- GE Healthcare, Freiburg
- PAA Laboratories, Cölbe
- PEQLAB, Erlangen
- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

### 2.1.4 Kits und Mastermix-Lösungen

Für diese Arbeit wurden folgende Kits und Mastermix-Lösungen verwendet:

- ABsolute™QPCR SYBR® Green ROX Mix, Abgene, Hamburg
- BrdU In-Situ Detection Kit, BD Biosciences, Heidelberg
- DC Assay®, BioRad Laboratories, München
- ECL Western Blotting Reagents, GE Healthcare, Freiburg
- Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit, Abgene, Hamburg
- RNeasy Mini Kit und DNase, Qiagen, Hilden
- 2x Sample Buffer, Laemmli, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Streptavidin-HRP (vorverdünnt) und DAB (3,3-Diaminobenzidin)-Substrat, BD Biosciences, Heidelberg
- 2x Thermo-Start® PCR Master Mix (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), Abgene, Hamburg
- Trypsin-Tabletten, Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Vectastain Elite ABC Kit und DAB Substrate Kit (Vector Laboratories), Linaris, Wertheim-Bettingen

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tab. 2.3: Puffer und Lösungen

Puffer oder Lösung	Reagenzien und Herstellung
Bleicitrat (nach Reynold's)	1,33 g Bleicitrat und 1,76 g Natriumcitrat in 30 ml abgekochtem (entgasten) H <sub>2</sub> O (MP, Millipore <sup>1</sup> ) lösen und 30 Min. stehen lassen. 8 ml 1 M NaOH zugeben und auf 50 ml mit H <sub>2</sub> O (MP) ergänzen.
Blockierlösungen (Western Blot)	5% Magermilchpulver (AppliChem) in PBS oder TBST 3% BSA (bovines Serumalbumin) in PBST 1:10-Verdünnung von Roti <sup>®</sup> -Block (Carl Roth) mit H <sub>2</sub> O (VE, vollentsalzt <sup>2</sup> )
0,1 M Cacodylat	21,4 g/l Cacodylsäure in H <sub>2</sub> O (MP); pH 7,2 einstellen
10 mM Citratpuffer	2,1 g Citronensäure (Monohydrat), 12 ml 2 N NaOH, ad 1 l H <sub>2</sub> O (VE), pH 6,0 einstellen
2x Einfriermedium für NRK-52E-Zellen	40% NRK-Zellkulturmedium ohne Antibiotika, 40% fötales Kälberserum (FCS), 20% Dimethylsulfoxid (DMSO)
Epon 812 Komponente A (weich) Komponente B (hart)	97,1 g Epon 812, 130,8 g Dodecenylnsuccinicanhydrid 90 g Epon 812, 81,37 g Methylnadicanhydrid ⇒ 4 Teile A + 3 Teile B + 2% Dimethylaminomethylphenol (DMP-30)
Färbelösung für Proteingele	60% H <sub>2</sub> O (VE), 20% Methanol, 20% Roti <sup>®</sup> -Blue (Carl Roth)
Färbelösungen für Membranen Nitrozellulose-Membran PVDF-Membran	95% H <sub>2</sub> O (VE), 5% Essigsäure, 0,1% Ponceau S (Sigma-Aldrich) 60% H <sub>2</sub> O (VE), 40% Methanol, 0,025% Serva Blue (Coomassie)

<sup>1</sup> Millipore-Wasser stellt ultrareines Wasser (Typ I) dar ([www.millipore.com](http://www.millipore.com)).

<sup>2</sup> Vollentsalztes Wasser stellt Wasser mit einem Reinheitsgrad von doppelt-distilliertem Wasser dar und ist für allgemeine Laborarbeiten (Waschpuffer) ausreichend.

Puffer oder Lösung	Reagenzien und Herstellung
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	1:10-Verdünnung von 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Fluka) in 1x PBS
Hämalaun	1 g/l Hämatoxylin, 200 mg/l Natriumiodat, 50 g/l Kaliumaluminiumsulfat, 50 g/l, Chloralhydrat, 1 g/l Citronensäure in H <sub>2</sub> O (MP) lösen und unter Rühren 14 Tage in einem offenen Gefäß reifen lassen.
Karnovsky's Fixativ (modifiziert)	2% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylat
1x Laemmli-Puffer	1:1-Verdünnung des 2x-Puffers (Sigma-Aldrich) mit VE-Wasser
6x Laemmli-Puffer	12% Natriumdodecylsulfat (SDS), 50% Glycerin, 25% $\beta$ -Mercaptoethanol, 0,0125% Bromphenolblau in 250 mM Tris, pH 6,8
10x Laufpuffer (SDS-PAGE)	30,4 g/l Tris (250 mM), 144 g/l Glycin (1,92 M), 1% SDS in H <sub>2</sub> O (VE)
1x Laufpuffer (SDS-PAGE)	1:10-Verdünnung des 10x-Konzentrats mit VE-Wasser
Methylenblau / Azur II	1% Methylenblau in 1% Natriumborat mit 1% Azur II in H <sub>2</sub> O (MP) im Verhältnis 1:1 mischen und filtrieren
10x MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	41,9 g/l MOPS (200 mM), 4,1 g/l Natriumacetat (50 mM), 3,72 g/l EDTA (10 mM) in H <sub>2</sub> O (MP); pH 7,0 einstellen und mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeln
5x MOPS, 1x MOPS	Verdünnungen des 10x-Konzentrats mit DEPC-behandeltem H <sub>2</sub> O
MTT (3,[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Stocklösung	5 mg/ml MTT in PBS
MTT-Arbeitslösung	1:10-Verdünnung der Stocklösung in Zellmedium
MTT <i>solubilisation solution</i>	89% Isopropanol, 10% Triton X-100, 1% konz. Salzsäure

Puffer oder Lösung	Reagenzien und Herstellung
Nephrotoxin-Stocklösungen 25,7 mM Ochratoxin A 100 mM Kaliumbromat 10 mM Cadmiumchlorid 100 mM Cisplatin	500 µg OTA in 45 µl Ethanol (100%) 16,7 mg KBrO <sub>3</sub> in 1 ml NRK-Medium lösen und steril filtrieren 22,28 mg CdCl <sub>2</sub> · 2 ½ H <sub>2</sub> O in 10 ml H <sub>2</sub> O (MP) lösen und steril filtrieren 3 mg/100 µl Cisplatin in DMSO lösen
10x PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung), pH ~ 7	2 g/l KCl (26,8 mM), 82 g/l NaCl (1,4 M), 5,72 g/l Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O) (32,1 mM), 2 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) (14,7 mM) in H <sub>2</sub> O (MP)
1x PBS	1:10-Verdünnung des 10x-Konzentrats mit VE-Wasser, pH 7,4 einstellen
PBST (PBS-Tween)	0,1% Tween-20 in 1x PBS
RIPA-Lysepuffer	7,88 g/l Tris-HCl (50 mM), 8,77 g/l NaCl (150 mM), pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,25% Natriumdesoxycholat, 1% Nonidet p-40 Substitute (Fluka) in H <sub>2</sub> O (MP).  Am Versuchstag 10 µl/ml 200 mM Natriumfluorid in H <sub>2</sub> O, 10 µl/ml 200 mM Natriumorthovanadat in H <sub>2</sub> O und 5 µl/ml Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma-Aldrich # P 8340) zugeben.
10x RNA-Ladepuffer	50% Glycerin, 49,75% H <sub>2</sub> O (RNase-frei), 0,25% Bromphenolblau, 1 mM EDTA
5x TBE (Tris-Borat-EDTA-Puffer)	54 g/l Tris (446 mM), 27,5 g/l Borsäure (445 mM), 20 ml/l 0,5 M EDTA (10 mM) in H <sub>2</sub> O (MP); pH 8,0 einstellen
1x TBE	1:5-Verdünnung des 5x Konzentrats mit VE-Wasser
10x TBS (Tris-gepufferte Salzlösung)	78,80 g/l Tris-HCl (500 mM), 87,66 g/l NaCl (1,5 M) in H <sub>2</sub> O (VE); pH 7,4 einstellen
1x TBS	1:10-Verdünnung des 10x-Konzentrats mit VE-Wasser
TBST (TBS-Tween)	0,1% Tween-20 in 1x TBS



Puffer oder Lösung	Reagenzien und Herstellung
Transferpuffer (Western Blot)	3 g/l Tris (25 mM), 14,4 g/l Glycin (192 mM), 20% Methanol in H <sub>2</sub> O (VE)
20% Trichloressigsäure	12,3 ml Trichloressigsäure, 87,7 ml H <sub>2</sub> O (MP)
0,1% Trypsin-Arbeitslösung	Pro 1 ml 1 Tablette Trypsin (Sigma-Aldrich # T 7168) in H <sub>2</sub> O (MP) lösen
Zellkulturmedium für NRK-52E-Zellen	500 ml DMEM ( <i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i> ) mit hohem Glukosegehalt (4,5 g/l), 50 ml FCS (10%), 5 ml Glutamin (2 mM), 5 ml nicht-essentielle Aminosäuren (PAA Lab.), 5 ml Streptomycin / Penicillin (PAA Lab.)

### 2.1.6 Antikörper

Die in der Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabellen 2.4 und 2.5 aufgelistet. Sie wurden von folgenden Firmen bezogen:

- AbD Serotec, Düsseldorf
- Acris Antibodies, Hiddenhausen
- GE Healthcare, Freiburg
- Immunology Consultants Laboratory, Newberg, USA
- R&D Systems, Wiesbaden
- Santa Cruz, Heidelberg
- Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Stressgen, Victoria, BC, Kanada
- Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Vertrieb durch Linaris, Wertheim-Bettingen)

Tab. 2.4: Verzeichnis der verwendeten primären Antikörper. Abkürzungen: p, polyklonal; m, monoklonal, WB, Western Blot; IHC, Immunhistochemie; IF, Immunfluoreszenz

Antigen	Klon	Spezies	p/m	Vertreiber	Verdünnung	
					WB	IHC / IF
Albumin	M-13	Ziege	p	Santa-Cruz	1:1000	
β2-Mikroglobulin	TLD-3H12B	Maus	m	AbD Serotec	1:1000	
Clusterin (CLU)	M-18	Ziege	p	Santa Cruz	1:1000-1:2500	1:50
Hämoxxygenase-1 (HO-1)	H-105	Kaninchen	p	Santa Cruz	1:1000	
		Kaninchen	p	Stressgen	1:2000	
Kidney injury molecule -1 (KIM-1)		Ziege	p	Immunology Consultants Laboratory	1:1000	1:400
		Ziege	p	R&D Systems		1:200
Lipocalin-2 (LCN2)		Ziege	p	R&D Systems	1:1000	1:50
Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)		Kaninchen	p	Acris Antibodies		1:200
Osteopontin (OPN)	P-18	Ziege	p	Santa Cruz	1:200	1:50
	AKm2A1	Maus	m	Santa Cruz	1:200	1:50
Vimentin (VIM)	V9	Maus	m	Santa Cruz		1:50

Tab. 2.5: Verzeichnis der sekundären Antikörper. Abkürzungen: HRP, *horseradish peroxidase* (Meerrettich-Peroxidase); FITC, Fluoresceinisothiocyanat

Antigen	Spezies	Konjugat	Vertreiber	Verdünnung	
				WB	IHC / IF
Kaninchen IgG	Esel	HRP	GE Healthcare	1:2000	
Kaninchen IgG	Ziege	FITC	Sigma-Aldrich		1:80
Kaninchen IgG	Ziege	Biotin	Vector Laboratories		1:100
Maus IgG	Ziege	HRP	Santa Cruz	1:5000	
	Schaf	HRP	GE Healthcare	1:2000	
Maus IgG	Ziege	FITC	Sigma-Aldrich		1:50
Maus IgG	Ziege	Biotin	Santa Cruz		1:100
Ziege IgG	Esel	HRP	Santa Cruz	1:5000	
Ziege IgG	Kaninchen	FITC	Sigma-Aldrich		1:400
Ziege IgG	Esel	Biotin	Santa Cruz		1:100

### 2.1.7 Oligonukleotide für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

In Tab. 2.6 sind die verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Die Synthese und Reinigung der Oligonukleotide erfolgte durch Biomers.net GmbH, Ulm.

Tab. 2.6: Oligonukleotide; Abkürzungen: FW, *forward* (vorwärts); RV, *reverse* (rückwärts)

Gen	Bezeichnung	Zugangs-Nr.	Primer (5'-3')	Referenz
<b>Primer für die Realtime-PCR</b>				
<i>Kim-1</i>	Kidney injury molecule-1	AF035963	FW: CGCAGAGAAACCCGACTAAG RV: CAAAGCTCAGAGAGCCCATC	(Amin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lcn2</i>	Lipocalin-2	NM_130741	FW: TCTGGGCCTCAAGGATAACAAC RV: AGACAGGTGGGACCTGAACCA	(Chen <i>et al.</i> , 2006)
<i>Timp-1</i>	Tissue inhibitor of metalloproteinase-1	NM_053819	FW: ATCAAGATGACTAAGATGCTCAAAGG RV: GGCCGCGATGAGAACT	(Bolbrinker <i>et al.</i> , 2006)
<i>Spp1</i>	Secreted phosphoprotein-1 (Osteopontin)	M99252	FW: CCAGCACACAAGCAGACGTTT RV: CAGTCCGTAAGCCAAGCTATCA	(Amin <i>et al.</i> , 2004)
<i>Vim</i>	Vimentin	NM_031140	FW: GATGCTCCAGAGGGAGGAAG RV: AAGGTCAAGACGTGCCAGAG	–
<i>Clu</i>	Clusterin	M64723	FW: CACTACGGCCTCTGAGCTT RV: ACGTCCATGGCCTGTTGAG	(Luhe <i>et al.</i> , 2003)
<i>Hmox</i>	Hämoxygenase-1	NM_012580	FW: CTAAGACCGCCTTCCTGCT RV: CCTCTGGCGAAGAACTCTG	–
<i>Actb</i>	$\beta$ -Aktin	NM_031144	FW: GGGAAATCGTGCGTGACATT RV: GCGGCAGTGGCCATCTC	(Depreter <i>et al.</i> , 2002)
<i>Rplp1</i>	Ribosomal protein, large, P1	NM_001007604	FW: AAAGCAGCTGGTGTCAATGT RV: GCAGATGAGGCTTCCAATGT	–
<b>Primer für die klassische Reverse-Transkriptase-PCR</b>				
<i>Kim-1</i>	Kidney injury molecule-1	AF035963	FW: GGACCAATGGATACCAAGTCA RV: AGTAGTTGTGGGCCTTGTGG	–
<i>Actb</i>	$\beta$ -Aktin	NM_031144	FW: ATGGTGGGTATGGGTCAGAA RV: AACACAGCCTGGATGGCTAC	–

### 2.1.8 DNA- und Proteingrößenstandards

DNA- und Proteingrößenstandards sind in Abb. 2.1 angegeben. Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen wurde eine Charge des „peqGOLD Prestained Protein Marker IV“ verwendet, für den die Molekulargewichte der Markerproteine mit 11, 17, 26, 34, 43, 55, 72, 95, 130 und 170 kDa angegeben wurden (Datenblatt des Herstellers).

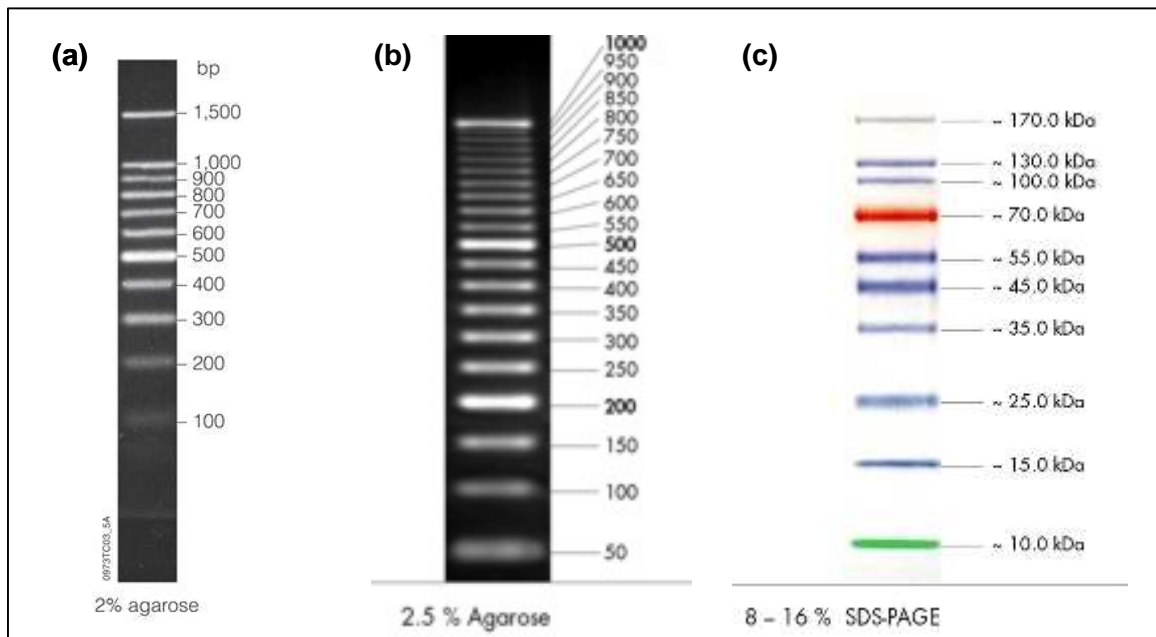


Abb. 2.1: DNA- bzw. Proteingrößenstandards. (a) DNA-Größenstandard BenchTop 100bp DNA ladder (Promega, Mannheim), (b) DNA-Größenstandard peqGOLD O'range 50 bp Leiter (PEQLAB, Erlangen) (c) Protein-Molekulargewichtsstandard peqGOLD Prestained Protein Marker IV (PEQLAB, Erlangen).

### 2.1.9 Verwendete Computerprogramme

- Adobe® Acrobat Reader 8.0
- Adobe® Photoshop CS
- Rat BLAT Search (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>)
- Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi))
- Microsoft® Excel 2003
- Microsoft® Word 2003
- Microsoft® Powerpoint 2003
- Microsoft® Office Picture Manager
- SigmaPlot 10.0
- SPSS 14.0 für Windows

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Desinfektion und Sterilisation

Um das Auftreten unerwünschter Keime in der Zellkultur zu verhindern, wurden grundsätzlich sämtliche zellbiologischen Arbeiten unter der Sterilbank und mit Handschuhen durchgeführt. Vor den Arbeiten wurde die Arbeitsfläche 15 Min. mit UV-Licht bestrahlt und danach gründlich mit 70% Ethanol desinfiziert. Zur Abtötung von Keimen auf Gebrauchsmaterialien oder in Gebrauchslösungen wurden verschiedene Verfahren angewandt:

- Autoklavieren: Hitzestabile Puffer (z.B. PBS), Pipettenspitzen, Plastikgefäße und Deckgläser wurden im Autoklaven sterilisiert. Dabei werden Bakterien durch 20-minütige Behandlung mit hohem Druck (1,1 bar) und hoher Temperatur abgetötet.
- Sterilisierung von Glasgefäßen: Glasgefäße und Glaspipetten wurden nach dem Spülen 3-4 h bei 300°C im Ofen gebacken. Neben dem Abtöten von Bakterien diente dies auch zur Entfernung von Ribonukleasen (s. 2.2.3.1).
- Sterilfiltration: Zur Entfernung von Keimen aus kleinen Flüssigkeitsmengen bzw. aus Substanzen, die nicht hitzestabil waren, wurden Spritzenfilter (Porengröße 0,22 µm) verwendet.

#### 2.2.1.2 Normal Rat Kidney-Zellen (NRK-52E)

Normal Rat Kidney-52E-Zellen (NRK-52E-Zellen) (de Larco und Todaro 1978) wurden von der Europäischen Sammlung von Zellkulturen (*European Collection of Cell Cultures*, ECACC) erworben (Passage-Nummer 28). Bei den Zellen handelt es sich um Nierenzellen mit Charakteristika des proximalen Tubulusepithels (Lash *et al.*, 2002; Prozialeck *et al.*, 2006).

#### 2.2.1.3 Kultivierung von NRK-52E-Zellen

Zur Kultivierung der NRK-52E-Zellen wurden  $2 \cdot 10^3$  Zellen / cm<sup>2</sup> in 75 cm<sup>2</sup> große Zellkulturflaschen (Greiner) in 12 ml Kulturmedium ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Zum Umsetzen wurden die Zellen mit 5 ml erwärmter, autoklavierter PBS gewaschen und anschließend 3 Min. bei 37°C mit 1,5 ml Trypsin/EDT A (1:250, PAA Laboratories)

behandelt. Danach wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Boden abgelöst und sofort mit 3,5 ml Kulturmedium versetzt, um die Trypsinreaktion zu stoppen. Die Zellsuspension wurde danach 5 Min. bei 1200 rpm (220 g) zentrifugiert (Hettich-Zentrifuge) und das Pellet anschließend in 5 ml Medium aufgenommen. Nun wurde die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt und das gewünschte Volumen mit der entsprechenden Anzahl an Zellen in eine neue Flasche mit angewärmten Medium überführt.

#### **2.2.1.4 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden NRK-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase trypsinisiert, abzentrifugiert und anschließend in eiskaltem Medium ohne Zusatz von Antibiotika resuspendiert ( $2 \cdot 10^6$  Zellen / ml). Zur Zellsuspension wurde dann das gleiche Volumen eiskaltes 2x Einfriermedium gegeben. Jeweils 1 ml der Suspension wurden nun in Kryoröhrchen überführt und sofort auf Eis gestellt. Im Anschluss erfolgte ein langsames Einfrieren der Zellen, indem die Röhrchen zunächst für einige Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  und danach 48h bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert wurden. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen nun in flüssigen Stickstoff eingefroren.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurden diese rasch bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut und die Suspension sofort in 10 ml Kulturmedium ( $37^\circ\text{C}$ ) gegeben, um die zytotoxische Wirkung von DMSO zu reduzieren. Die Zellen wurden abzentrifugiert, in 5 ml Medium aufgenommen und zum Anwachsen über Nacht (ÜN) im Brutschrank in eine Flasche mit  $25 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen dann in größere Kulturgefäße umgesetzt und bis zu den Experimenten noch 1-2x subkultiviert.

#### **2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit verschiedenen Nierentoxinen**

NRK-52E-Zellen wurden mit vier verschiedenen Substanzen behandelt, die *in vivo* nachgewiesenermaßen toxisch auf das proximale Tubulusepithel wirken: Ochratoxin A (Mally *et al.*, 2005b), Kaliumbromat (Kurokawa *et al.*, 1990), Cadmiumchlorid (Thevenod 2003) und Cisplatin (Huang *et al.*, 2001).

Zur Behandlung wurden  $2 \cdot 10^5$  NRK-Zellen aus den Passagen 33-45 in 5 ml Medium in Zellkulturschalen mit  $21 \text{ cm}^2$  Wachstumsfläche ausgesät und bis zur vollständigen Konfluenz im Brutschrank wachsen gelassen (3 Tage). Dann wurde das Medium abgenommen und der Zellrasen mit PBS gewaschen, bevor das Medium mit der toxischen Substanz zugegeben wurde. Die Behandlung erfolgte über 24 oder 48 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ .

### **Behandlung mit Ochratoxin A**

Ochratoxin A (OTA; 403,8 g/mol; freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Peter Mantle, Imperial College of Sciences, London bzw. käuflich erworben bei Axxora (Reinheitsgrad 99%) wurde in 0,5 mg Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und kurz vor der Behandlung in 45  $\mu\text{l}$  100% Ethanol gelöst (27,5 mM). Von dieser Stocklösung wurde dann das entsprechende Volumen in NRK-Medium gegeben, um Konzentrationen von 0-100  $\mu\text{M}$  zu erhalten. Der Gehalt an Ethanol wurde anschließend auf eine einheitliche Konzentration ergänzt und lag maximal bei 0,36%, was keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zellen hatte (MTT Test, s. 2.2.1.6).

### **Behandlung mit Kaliumbromat**

Kaliumbromat ( $\text{KBrO}_3$ ; 167,0 g/mol; Sigma-Aldrich) wurde bei RT gelagert und kurz vor der Behandlung in Medium gelöst (100 mM Stocklösung). Die Lösung wurde steril filtriert und anschließend zur Herstellung von Konzentrationen von 0-10 mM in Medium verdünnt.

### **Behandlung mit Cadmiumchlorid**

Cadmiumchlorid Hemipentahydrat ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2\frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ ; 228,36 g/mol; Sigma-Aldrich) wurde zur Herstellung einer 10 mM Stocklösung in  $\text{H}_2\text{O}$  (MP) gelöst, aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz vor der Behandlung wurde ein Aliquot der Lösung aufgetaut und mit Medium verdünnt, um Konzentrationen von 0-100  $\mu\text{M}$  herzustellen.

### **Behandlung mit Cisplatin**

Cisplatin (Sigma-Aldrich) wurde kurz vor der Behandlung in DMSO gelöst (100 mM) und mit Medium auf eine 1 mM Stocklösung verdünnt. Diese wurde steril filtriert und anschließend zur Herstellung von Konzentrationen von 0-100  $\mu\text{M}$  verwendet. Die DMSO-Konzentration in allen Ansätzen betrug 0,1%.

#### **2.2.1.6 Bestimmung der Zytotoxizität mit dem MTT-Assay**

Mit dem MTT-Assay wird die Zellvitalität anhand der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen bestimmt. Der Tetrazoliumring von MTT (3,[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird durch die Dehydrogenasen von lebenden Zellen gespalten, wobei wasserunlösliche, farbige Formazankristalle gebildet werden. Diese können dann in angesäuertem Isopropanol gelöst und durch Messung der Absorption bei 570 nm quantifiziert werden. Ihre Menge ist der metabolischen Aktivität von Zellen

proportional und dient daher zum Nachweis der Wirkung von Substanzen auf die Lebensfähigkeit.

Um zytotoxische Effekte von nephrotoxischen Substanzen auf NRK-52E-Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen 48 h vor der Behandlung in 96 well-Platten ausgesät (3200 Zellen / well) und im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PBS (150 µl / well) gewaschen und 150 µl Behandlungslösung zugegeben. Es wurden Dreifach-Ansätze hergestellt. Die Behandlung erfolgte über 24 und 48 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Im Anschluss wurde der Kulturüberstand vorsichtig abpipettiert und 100 µl MTT-Arbeitslösung auf die Zellen gegeben. Zusätzlich wurden noch 3 wells ohne Zellen mit MTT-Lösung gefüllt. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen wurde dann durch eine 2-stündige Inkubation im Brutschrank (37°C) angeregt. Danach wurden die unlöslichen MTT-Kristalle durch Zugabe von 150 µl MTT *solubilisation solution* und häufigem Auf- und Abpipettieren gelöst. Am Photometer wurde nun die Absorption bei 570 nm und 690 nm (Hintergrund) gemessen. Zur Auswertung wurden sowohl die Werte vom Hintergrund (A<sub>690</sub>) als auch die A<sub>570</sub>-Werte von reinem Medium ohne Zellen von der A<sub>570</sub> der Ansätze mit Zellen subtrahiert. Die Lebensfähigkeit der Zellen wurde anschließend wie folgt berechnet:

$$\text{Zellvitalität} = (A_{570_{\text{behandelte Zellen}}} / A_{570_{\text{Kontrolle}}}) \times 100\%$$

Zur statistischen Auswertung des Ergebnisses wurde mit dem Statistikprogramm SPSS eine einfache Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) gefolgt von Dunnett's Post Hoc-Test durchgeführt. Unbehandelte Zellen bildeten die Kontrollgruppe. p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikante Unterschiede betrachtet.

### 2.2.2 Tierversuch

OTA ist ein Nephrotoxin und in Nagern ein potentes Nierenkanzerogen. In einer 90 Tages-Studie sollte zum einen die Sensitivität von neuen Biomarkern im Vergleich zu traditionellen Methoden zur Detektion von Nierenschäden bestimmt werden. Ein weiteres Ziel des Tierexperimentes lag in der Untersuchung von frühen Ereignissen der OTA-abhängigen Nierenkanzerogenese. Daher wurde die Studie in Anlehnung an das Protokoll der 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie des *National Toxicology Program* (NTP, USA) durchgeführt (NTP 1989).



### 2.2.2.1 Fischer-Ratten (F344/N)

Fischer- (F344/N-) Ratten sind ein gut charakterisierter Albino-Rattenstamm, der lange Zeit vom *National Toxicology Program* (USA) in den chronischen Nagerstudien verwendet wurde (King-Herbert und Thayer 2006), so auch für die 2-Jahres-Studie mit OTA (NTP 1989).

### 2.2.2.2 Haltung von F344/N-Ratten

Männliche F344/N-Ratten (Harlan Winkelmann, Borcheln; zum Studienstart 6-7 Wochen alt) wurden in Macrolon-Typ IV-Käfigen gehalten (5 Tiere pro Käfig). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Futter (pelletiertes Standardfutter für Ratten, SNIFF, Soest) und Wasser. Durch die Haltung in Klimaschränken wurde die Raumtemperatur kontinuierlich bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  und die relative Luftfeuchtigkeit bei  $55 \pm 10\%$  gehalten. Alle 12 h wurde ein Tag/Nacht-Wechsel durchgeführt. Die Tiere wurden zweimal täglich auf Krankheitsanzeichen hin inspiziert und jeden dritten Tag wurde das Gewicht der Tiere bestimmt. Futter- und Wasserverbrauch der Tiere wurden wöchentlich bestimmt.

### 2.2.2.3 Behandlung mit Ochratoxin A

#### Herstellung und Lagerung der OTA-Lösung

Die Behandlungslösungen mit OTA wurden jede Woche bzw. alle zwei Wochen hergestellt und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. OTA (Axxora; Batch Nr. L16528/a, Reinheitsgrad 99%) wurde zur Herstellung einer Stocklösung in Maiskeimöl (Sigma-Aldrich) gelöst. Dazu wurde die Mischung 30-45 Min. in ein Ultraschallbad gestellt und anschließend unter einer UV-Lampe überprüft, ob sich die gesamte Menge OTA vollständig gelöst hatte. Da OTA unter UV-Licht fluoresziert, lassen sich ungelöste Partikel gut nachweisen. Die Stocklösung wurde dann zur Herstellung weiterer Lösungen mit niedrigerem OTA-Gehalt mit Maiskeimöl verdünnt. Vor der Behandlung wurden die Lösungen auf  $37^\circ\text{C}$  angewärmt.

#### Behandlung mit OTA

Die Ratten wurden zufällig in Gruppen zu fünf Tieren eingeteilt und für 14, 28 oder 90 Tage mit 0, 21, 70 oder  $210 \mu\text{g}/\text{kg}$  Körpergewicht (KG) Ochratoxin A behandelt. Die Behandlung erfolgte über eine Schlundsonde an 5 Tagen pro Woche durch die Tierpflegerin Carolin Kröcher. Die Behandlungszeit lag zwischen 9 und 10 Uhr am Vormittag.

#### **2.2.2.4 Bestimmung der Zellproliferation mit 5'-Bromdesoxyuridin (BrdU)**

##### **Implantation von osmotischen Minipumpen**

Die Zellteilungsrate kann durch den Einbau von 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) in DNA untersucht werden. BrdU wird während der S-Phase anstelle von Thymidin in die neu-synthetisierte DNA inkorporiert und kann dort mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Um eine längerfristige Veränderung der Zellproliferation in Niere und Leber zu untersuchen, wurde BrdU über einen Zeitraum von einer Woche über osmotische Minipumpen kontinuierlich verabreicht. Die Implantation der Pumpen erfolgte 7 Tage vor dem Töten der Tiere. BrdU (Fluka) wurde am Versuchstag im Dunkeln unter leichtem Erhitzen in PBS gelöst (15 mg/ml) und rasch auf RT abgekühlt. Anschließend wurde der pH-Wert mit 0,1 N NaOH auf 7,4 eingestellt und die Lösung steril filtriert. Danach wurden 2 ml der Lösung in osmotische Minipumpen vom Typ 2ML1 (ALZET; Flussrate 9,8 µl/h; Charles River Laboratories, Sulzfeld) gespritzt. Um sicherzugehen, dass keine Luftblasen entstanden waren, wurden die Pumpen nach dem Befüllen abgewogen und nur dann verwendet, wenn die Differenz zum Leerwert mind. 1,8 g betrug. Anschließend wurden die Pumpen bis zur Implantation einige Stunden in abgedunkelten, sterilen Schalen aufbewahrt. Die Implantation erfolgte subkutan im Rückenbereich der Tiere, nachdem diese mit einer Mischung aus Ketamin (90 mg/kg KG, i.p.) und Xylazin (10 mg/kg KG, i.p.) narkotisiert worden waren. Anschließend wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten.

##### **Detektion von BrdU im Gewebe**

Die direkte Lokalisation von BrdU im Nieren- und Lebergewebe erfolgte mit immunhistochemischen Methoden und wird ausführlich in Abschnitt 2.2.4.5 erläutert.

#### **2.2.2.5 Entnahme von Urinproben**

48 h vor Versuchsende wurden die Tiere für 20 h in Stoffwechsellkäfige überführt, wo sie ausschließlich freien Zugang zu Wasser, jedoch kein Futter, erhielten. Während dieser Zeit wurde der Urin in 50 ml-Sammelröhrchen auf Eis aufgefangen. Nach diesem Zeitraum wurden die Tiere wieder in ihren normalen Käfigen gehalten.

Der Urin wurde auf Eis aliquotiert. 2,5 ml wurden am selben Tag auf Eis zu RCC Ltd. (Füllinsdorf, Schweiz) gebracht und sofort analysiert. Die übrigen Aliquots wurden bei -20°C gelagert.

### **2.2.2.6 Blutentnahme**

Nach dem Sammeln von Urin wurde den Tieren aus dem retroorbitalen Plexus Blut entnommen. Dazu wurden die Ratten kurz mit Isofluran narkotisiert und das Blut mithilfe von dünnen Glasröhrchen aus den Gefäßen im Auge direkt in Proberöhrchen überführt. Für hämatologische Untersuchungen wurde EDTA als Antikoagulans verwendet, während Blut für die klinische Chemie in heparinisierten Röhrchen gesammelt wurde. Insgesamt wurden den Tieren ca. 1,5 ml Blut entnommen. Die Blutproben wurden zusammen mit den Urinproben (s. oben) auf Eis zu RCC Ltd. gebracht und sofort untersucht. Da die Blutentnahme für die Tiere der 14-Tage-Gruppe aufgrund des jungen Alters eine starke Belastung darstellte, wurden diesen Ratten nur Blutproben für die klinische Chemie (0,5 ml), jedoch nicht für hämatologische Untersuchungen, entnommen.

### **2.2.2.7 Tötung der Tiere, Organentnahme und Fixierung**

Am Ende des Behandlungszeitraumes wurden die Tiere durch Behandlung mit CO<sub>2</sub> und Entbluten (Herzpunktur) getötet. Das Blut wurde in heparinisierten Röhrchen (S-Monovette<sup>®</sup>, Sarstedt) gesammelt und bei 4°C abzentrifugiert (Hettich-Zentrifuge), um die Blutzellen abzutrennen. Das Plasma wurde anschließend aliquotiert und bei –20°C gelagert. Die Organe Leber, Nieren, Blase und Milz wurden herausgenommen und abgewogen. Die Nieren wurden der Länge nach geteilt. Für elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden aus einer Hälfte der rechten Niere ca. 1 mm<sup>3</sup> kleine Würfel im Bereich des Kortex bzw. der Grenze zwischen Kortex und Medulla ausgeschnitten und über Nacht bei 4°C in 500 µl Karnovsky's Fixativ inkubiert. Ein Drittel des linken Leberlappens, die Hälfte der rechten Niere und die übrigen Organe wurden in 10% gepufferter Formalinlösung fixiert. Die anderen Leber- und Nierenteile wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert. Von den formalin-fixierten Organen wurden nach 4 Tagen ein Stück der Leber und die halbe Niere in Paraffin eingebettet (Durchführung bei RCC Ltd.).

### **2.2.2.8 Histopathologie**

4 µm dünne Paraffinschnitte von Niere und Leber wurden auf Objektträger gebracht und mit Hämatoxylin/Eosin angefärbt (Durchführung im histopathologischen Labor von RCC Ltd., Schweiz). Hämatoxylin färbt Zellkerne blau, während Eosin Bindegewebe und Zytoplasma rot anfärbt. Die Präparate wurden anschließend von zwei

unabhängigen Pathologen (Dr. Gordon Hard, Tairua, Neuseeland und Dr. Klaus Weber, RCC Ltd., Schweiz) auf histopathologische Veränderungen hin untersucht.

### **2.2.2.9 Klinische Chemie, Urinanalyse und Hämatologie**

Die Analyse von Blut und Urin auf verschiedene Parameter erfolgte bei RCC Ltd. in der Abteilung für Diagnostik (Füllinsdorf, Schweiz). Standardparameter im Plasma wurden an einem Hitachi 917 *Analyzer* (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Schweiz) bestimmt. Die Analyse von Parametern im Urin wurden mithilfe eines Mditron *Semiautomated Urine Chemistry Analyzer* und Urin-Teststreifen (Roche Diagnostics) durchgeführt. Spezifische Gravität und Osmolalität der Urinproben wurden mit einem *Clinical Refractometer* SU-202 (Kernco Instruments, El Paso, USA) bzw. einem Osmometer Fiske Type 2400 (IG Instrumenten-Gesellschaft, Zürich, Schweiz) durchgeführt. Hämatologische Analysen wurden am ADVIA 120 *Hematology System* (Bayer Healthcare, Zürich, Schweiz) gemacht. In jedem Fall wurden Standardprotokolle zur Bestimmung der Parameter anhand der Anweisungen des Herstellers angewandt.

Die Untersuchung des Enzyms  $\gamma$ -GT im Urin von Ratten nach 28 Tagen konnte aufgrund eines technischen Problems und der geringen Haltbarkeit von  $\gamma$ -GT in der Probe nicht erfolgen (s. 3.1.4).

### **2.2.2.10 Bestimmung der Ochratoxin A-Konzentration in Plasma und Gewebe**

Die Bestimmung der OTA-Konzentration in Plasma und Gewebe erfolgte mit einer im Arbeitskreis etablierten LC/MS-MS-Methode (*liquid chromatography / mass spectrometry-mass spectrometry*) (Mally *et al.*, 2004; Zepnik *et al.*, 2003) und wurde freundlicherweise von Dr. Sibel Özden (Institut für Toxikologie, Universität Würzburg) durchgeführt. Dazu wurden 200-400 mg gefrorenes Gewebe mit einem Homogenisator in dem 4-fachen Volumen an eiskaltem 50 mM Natrium-Phosphatpuffer, pH 6,5 zerkleinert. Proteine wurden daraufhin durch Zugabe des gleichen Volumens an eiskaltem Ethanol präzipitiert und durch 30 Min. Zentrifugation bei 15800 g und 4°C pelletiert. Entsprechend wurden Plasmaproben mit dem gleichen Volumen an eiskaltem Ethanol versetzt und die Proteine durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde unverdünnt oder mit H<sub>2</sub>O verdünnt über einen Autosampler (Agilent 1100 Series, Applied Biosystems, Darmstadt) direkt in ein LC/MS-MS-System (Agilent 1100 Series LC / API 3000 Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer, Applied Biosystems, Darmstadt) gespritzt. Die Auftrennung erfolgte über eine Nucleosil C18-Säule (150 x 2.0 mm, 100 Å, 5 µm; Phenomenex, Aschaffenburg) mit einer Flussrate

von 0.3 ml/Min. Zur Elution wurde ein Gradient aus reinem Wasser (Solvens A) und Acetonitril (Solvens B) hergestellt: 100% A für 2 Min., gefolgt von einem linearen Gradienten zu 60% A / 40% B in 5 Min und einem zweiten Gradienten zu 50% A / 50% B in 5 Min; nach 3 Min. wurde in 2 Min. auf 95% B erhöht. Das Massenspektrometer wurde mit einer Turbo-Ionenstrahlquelle im negativen Modus bei einer Spannung von -4000 Volt betrieben. Die Spektraldaten wurden mit N<sub>2</sub> als Kollisionsgas (CAD = 4) im multiple reaction monitoring mode (MRM) aufgenommen. Zur Quantifizierung von OTA wurden die folgenden Masse-zu-Ladung (m/z)-Übergänge analysiert: m/z 402.0 ⇒ 357.8 sowie 402.0 ⇒ 166.8.

### 2.2.2.11 Elektronenmikroskopie

#### Fixierung und Kontrastierung von Gewebeproben

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung von Gewebe wird dieses mit Glutaraldehyd und Osmiumtetroxid fixiert. Ersteres führt zu einer Protein-Quervernetzung, während letzteres zusätzlich an Lipid-Doppelschichten bindet und dadurch Membranstrukturen fixiert (Luttmann *et al.*, 2004).

Zur Untersuchung von Veränderungen der Ultrastruktur infolge der Behandlung mit OTA wurden sofort nach Tötung der Tiere Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie entnommen und ÜN in Kanrovsky's Fixativ gegeben (s. 2.2.2.7). Am nächsten Tag wurde der Puffer abgezogen und die Gewebeproben ÜN bei 4°C in 300 µl 0,1 M Cacodylat gelagert. Anschließend wurden die Proben auf Eis 3 x 10 Min. mit 0,1 M Cacodylat gewaschen, bevor sie 1 h bei 4°C in 100 µl 2% Osmiumtetroxid in 0,1 M Cacodylat nachfixiert wurden. Danach erfolgten drei Waschschriffe (10 Min.) mit ultrareinem Wasser. Zur Kontrastierung wurden die Gewebestücke dann ÜN bei 4°C in 100 µl 2% Uranylacetat in H<sub>2</sub>O gegeben. Das Uranylacetat wurde anschließend schnell mit H<sub>2</sub>O ausgewaschen (3 x 3 Min.).

#### Einbetten der Proben

Im Anschluss an die Kontrastierung mit Uranylacetat wurden die Proben entwässert (Tab. 2.7) und in Epon 812 eingebettet. Dies ist ein hartes, hydrophobes Epoxidharz, das für die Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten gut geeignet ist (Luttmann *et al.*, 2004).

Nach dem letzten Entwässerungsschritt wurden 500 µl einer 1:1 Mischung aus Propylenoxid und Epon 812 auf die Proben gegeben und die Röhrchen offen ÜN bei RT unter dem Abzug stehen gelassen, um bereits einen Teil des Propylenoxids zu

verdampfen. Am nächsten Tag wurde das Epon 812 mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Proben kurz trocknen gelassen, bevor 400 µl einer 100%-igen Eponlösung zugegeben wurden. Diese wurde noch zweimal alle drei Stunden erneuert. Zur Einbettung wurden die Proben in Epon 812 dann für 2-3 Tage bei 60°C inkubiert, bis sie vollständig erhärtet waren. Die Proben wurden dann bis zur weiteren Verwendung bei RT gelagert.

**Tab. 2.7:** Entwässerung von Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie

Lösung	Zeit	Temperatur
50% Ethanol	30 Min.	4°C
70% Ethanol	30 Min.	4°C
90% Ethanol	30 Min.	4°C
95% Ethanol	30 Min.	4°C
100% Ethanol	30 Min.	4°C
100% Ethanol	30 Min.	4°C
Propylenoxid	30 Min.	RT
Propylenoxid	30 Min.	RT

### Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten

Vor der Herstellung von Semidünnschnitten wurden die Proben unter dem Binokular mit einer Rasierklinge angetrimmt, um geeignete Stücke aus dem Epon herauszuarbeiten (ca. 1-2 mm<sup>2</sup> kleine, rechteckige Gewebeflächen). Anschließend wurden am Ultramikrotom (Om U3) mit einem Glasmesser 0,5 µm dünne Schnitte gemacht und auf einen Tropfen destillierten Wassers auf einem sauberen Objektträger gebracht. Das Wasser wurde auf einer Heizplatte verdampft und die Schnitte dann 15-20 Sek. mit Methylenblau/Azur II gefärbt. Die Färbelösung wurde gut mit Wasser abgespült und die Schnitte auf der Heizplatte getrocknet. Danach erfolgte die Begutachtung der Schnitte unter dem Lichtmikroskop. Proximale Tubuli ließen sich anhand der dunkleren Färbung der Zellen und der starken Blaufärbung von endozytotischen / lysosomalen Vesikeln gut von den heller gefärbten distalen Tubuli unterscheiden (Abb. 2.1). Bereiche aus der Nierenrinde konnten durch das Vorkommen von Nierenkörperchen und proximalen Tubuli mit einem stark ausgebildeten endozytotischen Apparat leicht identifiziert und von Bereichen des äußeren Marks abgegrenzt werden.

Geeignete Gewebebereiche wurden dann entweder nochmals getrimmt und mit einem Diamantmesser ultradünn (60-80 nm) geschnitten. Alternativ wurden von dem Präparat 2 µm dünne Semidünnschnitte hergestellt und diese erneut in Epon eingebettet. Dazu wurde eine mit Epon 812 gefüllte Gelatinekapsel auf den Schnitt gestellt und dieser 48h bei 60°C eingebettet. Mit einer Rasierklinge wurde das Präparat anschließend vom Objektträger entfernt. Anhand der Färbung konnte nun eine spezielle Stelle für die Herstellung der Ultradünnschnitte herausgetrimmt werden.

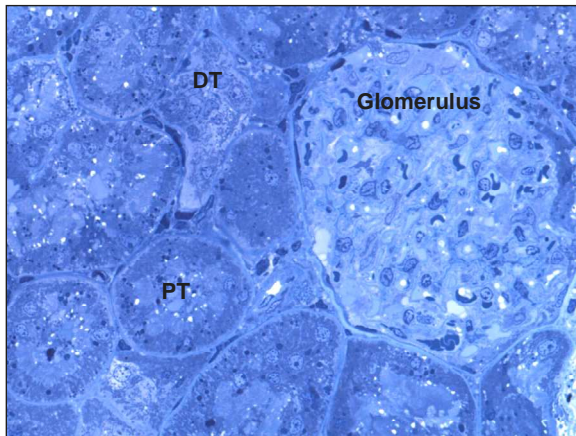


Abb. 2.1: Semidünnschnitt aus der Nierenrinde einer F344/N-Ratte. Abkürzungen: DT, distaler Tubulus; PT, proximaler Tubulus

Ultradünne Schnitte wurden durch Bedampfung mit Chloroform geglättet und auf mit Parlodionfolie befilmte 1-Loch-Netzchen gebracht. Die Herstellung der Ultradünnschnitte erfolgte am Ultramikrotom MT-7000 ULTRA.

### **Nachkontrastierung von Ultradünnschnitten**

Um Gewebestrukturen unter dem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) sichtbar zu machen, muss ihr Kontrast durch die Anlagerung von Schwermetallionen erhöht werden. Zur Kontrastierung wurden die Netzchen mit den Ultradünnschnitten daher 15-20 Min. auf einen Tropfen (50 µl) 2,5% Uranylacetat in Ethanol gelegt und abgedeckt. Anschließend wurden sie kurz in 100% Ethanol, 50% Ethanol und zuletzt in abgekochtem (entgastem) Wasser gewaschen und gut mit Filterpapier getrocknet. Die Nachkontrastierung erfolgte dann mit Bleicitrat für 8-10 Min. unter einem Glasdeckel in Gegenwart von NaOH-Plätzchen, um eine Reaktion des Bleicitrats mit CO<sub>2</sub> zu festem Bleicarbonat zu minimieren. Die Schnitte wurden dann erneut mit abgekochtem Wasser gewaschen und getrocknet, bevor sie unter dem TEM untersucht wurden.

## **Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)**

Die TEM wurde am Zeiss EM 10 durchgeführt. Entwickelte Negative von der Plattenfilmkamera wurden dann eingescannt und mit dem Programm Adobe® Photoshop CS in Schwarzweiß-Aufnahmen umgewandelt.

### **2.2.3 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.3.1 Arbeiten mit RNA**

RNA-Proben können durch bakterielle Ribonukleasen (RNasen) aus der Luft oder auf der Haut schnell abgebaut werden. Daher wurden bei sämtlichen molekularbiologischen Arbeiten mit RNA Handschuhe getragen. Zudem wurden ausschließlich sterilisierte Glasgefäße, sterile Plastikröhrchen, autoklavierte Plastikgefäße sowie Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Arbeitsfläche und Geräte (z.B. Elektrophoresekammern) wurden zur Entfernung von RNasen mit RNase AWAY® (Molecular BioProducts, San Diego, USA) behandelt. Außerdem wurden Wasser und Pufferlösungen mit dem RNase-Inhibitor DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandelt. DEPC wurde dazu in einer Endkonzentration von 0,1% zu den Lösungen gegeben und diese ÜN bei 37°C stehen gelassen. Anschließend wurde das DEPC durch Autoklavieren aus der Flüssigkeit entfernt (Spaltung in CO<sub>2</sub> und Ethanol).

#### **2.2.3.2 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung von RNA wurden Zellen bzw. Gewebe mit einer Guanidinisothiocyanat-(GTC-) Lösung lysiert und RNA, DNA und Protein freigesetzt. GTC denaturiert Proteine sehr effektiv, sodass RNA mit dieser Methode vor dem Abbau durch RNasen geschützt ist. Zur Abtrennung von DNA und Proteinen wurden zwei verschiedene Methoden angewandt: Die Isolierung von RNA aus Zellen bzw. die Aufreinigung von RNA aus Gewebe erfolgte mit der Methode von Qiagen, während sich bei der Gewinnung von RNA aus Gewebe die traditionelle Methode mit Phenol und Chloroform als sehr viel effektiver erwies. Die Methode von Qiagen beruht auf der selektiven Bindung von RNA an eine Reinigungssäule in Gegenwart von Ethanol, sodass andere Zellinhaltsstoffe ausgewaschen werden können und am Ende qualitativ hochwertige RNA mit Wasser von der Säule eluiert werden kann (RNeasy Handbuch, Qiagen). Die zweite Methode beruht auf der Zugabe von Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen, und Chloroform. Durch Zentrifugation kommt es anschließend zur Trennung von drei



Phasen, wobei die wässrige Phase RNA enthält, während die phenolische Phase und die Interphase DNA und Proteine enthalten (Mülhardt 2006).

### **RNA-Isolierung aus Zellen**

Zur RNA-Isolierung aus Zellen wurde das RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Darin wurde der *on column*-DNase-Verdau (Qiagen) eingeschlossen, um eine Kontamination der gewonnenen RNA mit genomischer DNA weitestgehend auszuschließen. Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

Konfluente NRK-Zellen in 21 cm<sup>2</sup>-Zellkulturschalen wurden nach Entfernung des Mediums 1x mit PBS gewaschen und anschließend in 600 µl RLT-Puffer (mit β-Mercaptoethanol) lysiert. Das Lysat wurde mit einem sterilen Zellschaber abgeschabt und in eine QIAshredder-Säule (Qiagen) überführt. Durch 2 Min. Zentrifugation bei 14000 rpm (16000 g) wurde das Lysat zerkleinert und unlösliche Bestandteile in der Säule aufgefangen. Das Homogenat (Eluat) wurde nun mit 600 µl 70% Ethanol vermischt und in zwei Schritten auf die RNeasy-Säule gegeben. RNA wurde dadurch an die Säule gebunden und das übrige Homogenat durch Zentrifugation (15 Sek., 10000 rpm = 8161 g) ausgewaschen. Nach Zugabe und Zentrifugation (15 Sek., 10000 rpm) von 350 µl RW1-Puffer erfolgte dann der DNase-Schritt. 80 µl DNase-Lösung wurden direkt auf die Säule pipettiert und dort 15 Min. bei RT inkubiert. Anschließend wurden erneut 350 µl RW1-Puffer auf die Säule gegeben und abzentrifugiert. Zum Waschen wurden nun 2x 500 µl RPE-Puffer zugegeben und 15 Sek. bzw. 2 Min. bei 10000 rpm zentrifugiert. Durch 1 Min. Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Waschpuffer vollständig entfernt und die Säule getrocknet, bevor die RNA in zwei Schritten mit insgesamt 60 µl H<sub>2</sub>O eluiert wurde. Die RNA-Lösung wurde dann sofort auf Eis gestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

### **RNA-Isolierung aus Gewebe**

Die Isolierung von RNA aus Nierengewebe erfolgte mit TRIR<sup>®</sup> (*Total RNA isolation reagent*, ABgene). 50-100 mg Gewebe wurden mit einem Glas-Homogenisator in 1 ml TRIR<sup>®</sup> zerkleinert. Unlösliches Material wurde bei 10800 rpm (9260 g) abzentrifugiert (10 Min., 4°C) und der Überstand in ein neues Tube überführt. Nach 5 Min. Inkubation bei RT wurden 200 µl Chloroform zugegeben, 15 Sek. geschüttelt und die Mischung 5 Min. auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Homogenat 15 Min. bei 10800 rpm und 4°C zentrifugiert, was zur Bildung von drei Phasen führte, einer oberen, wässrigen Phase (mit RNA), einer Interphase (Proteine), sowie einer unteren Phenol-Chloroform-

Phase (mit DNA). 450 µl der oberen Phase wurden in ein neues Tube überführt, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol vermischt und zur Präzipitation der RNA 10 Min. bei 4°C inkubiert. RNA wurde im Anschluss daran durch Zentrifugation (10800 rpm, 10 Min., 4°C) pelletiert und 2x mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen. Nach kurzer Trocknung der RNA (15-20 Min.) wurde sie durch Vortexen und Erhitzen auf 55-60°C in 50 µl H<sub>2</sub>O gelöst und quantifiziert (s. unten).

Zur Aufreinigung der RNA wurde anschließend das RNeasy Mini Kit verwendet. Um eine Überladung der Säule mit RNA zu verhindern, wurden etwa 70 µg RNA eingesetzt. Diese Menge wurde in 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 350 µl RLT-Puffer (ohne β-Mercaptoethanol) vermischt. Nach Zugabe von 250 µl 100% Ethanol wurde die Lösung auf die RNeasy Säule gebracht und RNA nach dem oben beschriebenen Verfahren gereinigt. Eluiert wurde die RNA mit 40 µl H<sub>2</sub>O. RNA wurde bei -80°C gelagert.

### 2.2.3.3 Quantifizierung der RNA

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration in Proben wurden diese mit H<sub>2</sub>O verdünnt und in Quarzküvetten am Photometer die Absorption bei 260 nm gegen Wasser bestimmt. Zur Berechnung der RNA-Menge [µg/ml] wurde folgende Formel verwendet:

$$40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Gesamtmenge an RNA aus Zelllysaten lag im Allgemeinen bei 50-70 µg, aus Nierengewebe wurden etwa 1,7 µg/mg RNA isoliert.

### 2.2.3.4 RNA-Elektrophorese

Um die Integrität der RNA zu untersuchen, bevor die Proben weiterverwendet wurden, wurden diese gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt. Ist die RNA intakt, liegt eine große Menge ribosomaler RNA (rRNA) vor und es sind zwei scharfe Banden im Gel zu erkennen (18 S und 28 S rRNA). Banden mit degradierter RNA erscheinen dagegen aufgrund teilweise abgebauter rRNA-Moleküle schmierig.

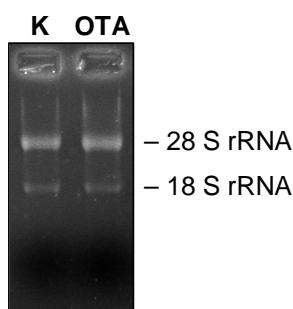
Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 1,2 g Agarose NEEO (Carl Roth) durch Erhitzen in der Mikrowelle in 85 ml H<sub>2</sub>O gelöst, das Gel nach Zugabe von 10 ml 10x MOPS und 5 ml 37% Formaldehyd gegossen, und mit 1x MOPS überschichtet. Anschließend wurden die RNA-Proben vorbereitet. Dazu wurde ein Mastermix

angesetzt, der Formamid und Formaldehyd zur Herstellung und Erhaltung einzelsträngiger RNA enthielt (Tab. 2.8).

**Tab. 2.8:** Mastermix für die RNA-Elektrophorese (Volumen pro Probe)

Substanz	Volumen
5x MOPS	2,0 $\mu$ l
37% Formaldehyd	3,3 $\mu$ l
Formamid	10,0 $\mu$ l

15,3  $\mu$ l Mastermix wurden in sterile Tubes pipettiert, mit 4,7  $\mu$ l RNA-Lösung (2  $\mu$ g) vermischt und kurz abzentrifugiert. Zur Denaturierung doppelsträngiger RNA wurde die Mischung anschließend 10 Min. auf 65°C erhitzt und kurz abzentrifugiert. Nach Zugabe von 2  $\mu$ l 10x RNA-Ladepuffer wurde die Lösung dann in die Taschen des äquilibrierten Gels pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 1 h bei 80 V und RT durchgeführt. Danach wurde das Gel 20 Min. in Ethidiumbromidlösung (0,5  $\mu$ g/ml) gefärbt und 1-2x in Wasser entfärbt, um die Hintergrundfluoreszenz zu reduzieren. Die Auswertung erfolgte am Gel Doc 2000. Für eine cDNA-Synthese wurde ausschließlich RNA verwendet, die im Gel zwei scharfe Banden mit rRNA aufwies, wobei die höhere Bande (28 S rRNA) ungefähr die doppelte Intensität der unteren Bande (18 S rRNA) besaß (Abb. 2.2).



**Abb. 2.2:** Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA aus unbehandelten NRK-Zellen (K, Kontrolle) und Zellen, die mit 25  $\mu$ M OTA behandelt wurden. 28 S und 18 S ribosomale RNA sind als scharfe Banden auf dem Gel zu erkennen.

### 2.2.3.5 Synthese von komplementärer DNA (*complementary* DNA, cDNA)

Um die Menge an Transkripten eines Gens zu quantifizieren, wurde RNA mit dem Reverse-iT™ 1st Strand Synthesis Kit (Abgene) in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben. 1  $\mu$ g RNA wurde in 11  $\mu$ l H<sub>2</sub>O verdünnt und mit 1  $\mu$ l Primerlösung (zufällige Dekamere, *random decamers*, DNA-Einzelstränge mit unterschiedlichen

Sequenzen) vermischt. Um Sekundärstrukturen aufzulösen, wurde die Lösung anschließend 5 Min. auf 70°C erhitzt und danach auf Eis 8 µl Mastermix mit der Reversen Transkriptase zugegeben (Tab. 2.9). Als Kontrolle für eine erfolgreiche cDNA-Synthese und um gleichzeitig sicherzustellen, dass die RNA nicht mit genomischer DNA verunreinigt war, wurden zusätzliche Ansätze ohne Reverse Transkriptase mitgeführt, welche eine definierte Mischung der verschiedenen RNA-Proben (je 1 µl) enthielten (ohne-RT-Kontrolle, *no RT control*).

**Tab. 2.9:** Mastermix für die cDNA-Synthese (Volumen pro Probe)

Substanz	Volumen
5x 1 <sup>st</sup> strand buffer	4 µl
dNTP mix	2 µl
Reverse iT <sup>TM</sup> RTase blend	1 µl
DTT (100 mM)	1 µl

Die Proben wurden nun im PCR Cycler (PTC-100) 50 Min. bei 47°C inkubiert und das Enzym anschließend durch 10 Min. Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Die cDNA (20 µl) wurde durch Zugabe von 80 µl H<sub>2</sub>O (Roth) 1:5 verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert.

### 2.2.3.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung einer bestimmten DNA-Sequenz. Doppelsträngige Ausgangs-DNA mit der Zielsequenz (*template*) wird dabei zunächst durch Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge aufgetrennt (Denaturierung). Anschließend wird die Lösung rasch auf 50-60°C abgekühlt, wodurch sich Oligonukleotidprimer anlagern können, die komplementär zu den beiden Enden der gesuchten Sequenz sind (Annealing). Während der Elongationsphase (60-72°C) werden an den 3'-Enden der Primer in Gegenwart von Desoxyribonukleotidtriphosphaten durch eine Taq-Polymerase neue DNA-Stränge synthetisiert, sodass am Ende dieses Schrittes eine Kopie der *template*-DNA hergestellt wurde. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte kann eine große Anzahl an Kopien der gesuchten DNA-Sequenz synthetisiert werden.

### Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR)

Die Real-time quantitative PCR (RTQ-PCR) ist eine sensitive Methode zur Quantifizierung der Expression eines bestimmten Gens. Dabei wird die Menge an

Kopien der gesuchten Zielsequenz von einer *template*-cDNA während des gesamten Ablaufs der PCR gemessen. Das hat den Vorteil, dass die Menge an PCR-Produkt in verschiedenen Proben während der exponentiellen Phase der PCR verglichen werden kann. Für die Versuche wurde zur Detektion von PCR-Produkten SYBR Green I verwendet, das an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet und dabei fluoresziert. Somit kann bei jedem PCR-Zyklus während der DNA-Synthese ein Fluoreszenz-Signal gemessen werden. Dadurch ergibt sich in Abhängigkeit von der Zyklenzahl eine charakteristische, sigmoidale Kurve für die Amplifikation einer Zielsequenz (Abb. 2.3): Während der ersten Zyklen ist noch wenig Produkt vorhanden, sodass das Fluoreszenzsignal entsprechend schwach ist. Diese erste Phase, in der es noch keinen messbaren Anstieg der Fluoreszenz gibt, wird als *baseline* bezeichnet. Auf diese Phase folgt die exponentielle Phase, in der sich – theoretisch – pro Zyklus die Menge der PCR-Produkte verdoppelt. Im Graphen sieht man dabei einen scharfen Anstieg der Fluoreszenz. Der Übergang zwischen diesen beiden Phasen wird durch den Schwellenwert (*threshold*) markiert. Entsprechend wird der Zyklus, bei dem die Fluoreszenz diesen Schwellenwert erreicht als *threshold cycle*,  $C_T$ -Wert, bezeichnet. Auf die exponentielle Phase der PCR folgt nach wenigen Zyklen die Sättigungsphase, in der es durch Verlust an Reagenzien und Polymerase-Aktivität nur noch zu einem sehr geringen Anstieg an Produktbildung (und damit Fluoreszenz) kommt (Abb. 2.3).

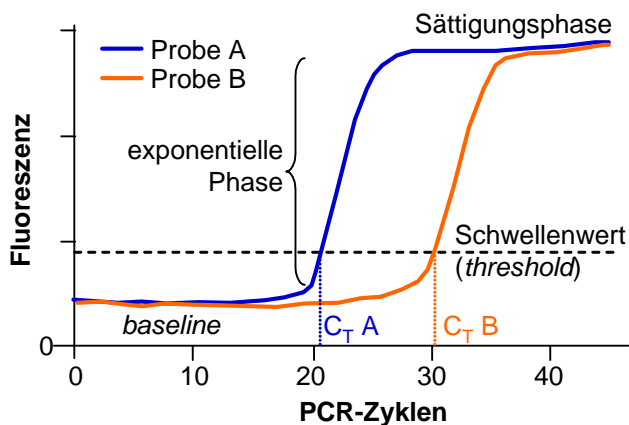


Abb. 2.3: Amplifikationskurven zweier Proben A und B während der Real-time PCR. Von Probe B liegt zu Beginn eine geringere Menge an *template*-cDNA vor als in Probe A, so dass mehr PCR-Zyklen durchgeführt werden müssen, um eine messbare Zunahme an Produkt zu erhalten (Anstieg an Fluoreszenz). Der  $C_T$ -Wert für B ist daher höher als der  $C_T$ -Wert von A.

Der  $C_T$ -Wert dient zur Quantifizierung der Menge an PCR-Produkt. Je höher der  $C_T$ -Wert ist, desto weniger Produkt liegt in der entsprechenden Probe vor. Zum Vergleich der Expression eines bestimmten Gens, z.B. *Kim-1*, zwischen zwei Proben (z.B. behandelt und unbehandelt) wird normalerweise eine relative Quantifizierung bezogen auf ein in allen Proben gleich exprimiertes Gen (Haushaltsgen, Referenzgen), z.B.  $\beta$ -Aktin, durchgeführt (Abb. 2.4). Eine Methode zur Bestimmung der Expression des Zielgens in verschiedenen Proben stellt die sog.  $\Delta\Delta C_T$ -Methode dar. Dabei wird zunächst das Verhältnis zwischen der Expression des Zielgens und des Referenzgens durch den sog. „ $\Delta C_T$ -Wert“ ausgedrückt, der die Differenz der  $C_T$ -Werte dieser Gene ist:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\text{Referenzgen})$$

Der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert stellt anschließend die Differenz zwischen den  $\Delta C_T$ -Werten für die behandelten Tiere oder Zellen und den jeweiligen Kontrollen dar:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{behandelte Probe}) - \Delta C_T (\text{unbehandelte Probe})$$

Die normalisierte Expression des gesuchten Gens berechnet sich schließlich durch

$$2^{-\Delta\Delta C_T}$$

Für Kontrollen liegt dieser Wert ungefähr bei 1, bei behandelten Proben weicht der Wert entsprechend der Änderung der Genexpression ab.

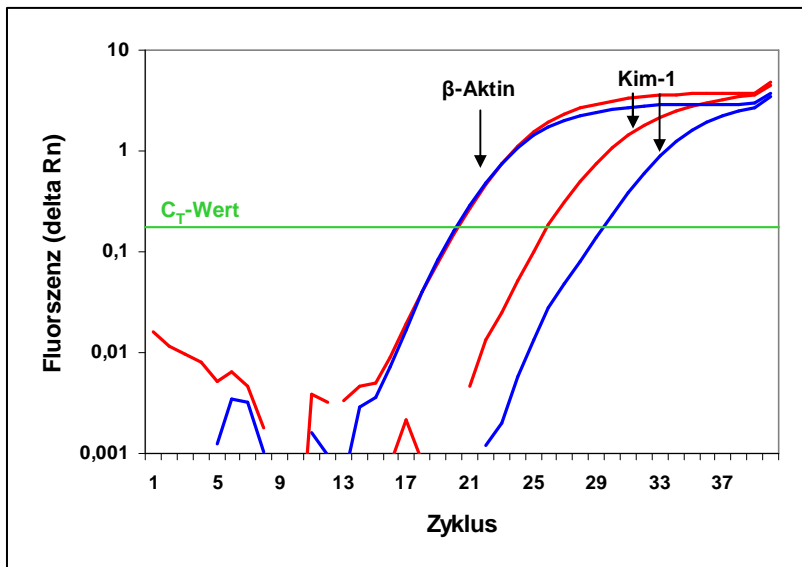


Abb. 2.4: Bestimmung der *Kim-1*-Expression in der Niere von einem Kontrolltier (blaue Kurven) und einer OTA-behandelten Ratte (rote Kurven) mit quantitativer Real-time-PCR. Die Behandlung mit OTA führt zu einer deutlichen Reduzierung des C<sub>T</sub>-Wertes von *Kim-1* (Induktion), während die Expression von *Actb* ( $\beta$ -Aktin, Haushaltsgen) gleich bleibt.

### Design von Primern und Etablierung der Realtime-PCR-Methode

Für die PCR wurden Primer aus der Literatur verwendet (Abschnitt 2.1.7) sowie neue Primer entworfen. Dazu wurden mithilfe der ENSEMBLE-Datenbank (<http://www.ensembl.org>) zunächst Exons und Introns des gesuchten Gens angezeigt. Die Zielsequenz sollte auf verschiedenen Exons liegen, die durch ein großes Intron getrennt werden. Aufgrund der kurzen Elongationszeit während der PCR wird somit eine Amplifikation von eventuell vorhandener genomischer DNA vermieden. Das Primer-Design wurde dann mit dem Programm Primer3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) durchgeführt. Ein wichtiger Punkt bei der Auswahl der Primer war zum einen eine Produktgröße von maximal 150 bp. Des weiteren wurden nur Primer verwendet, die folgende Kriterien besaßen:

- Ca. 20 Nukleotide
- GC-Gehalt 40-60%
- T<sub>M</sub> = 60°C
- Kein Thymin am 3'-Ende
- Maximal eine Sequenz von drei gleichen Nukleotiden
- Geringe Tendenz zur Bildung doppelsträngiger Bereiche

Mit der entsprechenden Zielsequenz wurde anschließend noch ein BLAT (BLAST-Like Alignment Tool) durchgeführt, um zu überprüfen, ob im Ratten-Genom gleiche oder ähnliche Sequenzen existieren (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>). Nur wenn dies ausgeschlossen werden konnte, wurden die Primer für die PCR verwendet.

Primer wurden bei verschiedenen Annealing-Temperaturen ausgetestet. Um bei der Realtime-PCR möglichst viele Proben gleichzeitig zu messen, wurden nur Primer verwendet, die eine Annealing-Temperatur von 60°C besaßen. Die Zusammensetzung des Mastermix für die Realtime-PCR ist in Tabelle Tab. 2.10 beschrieben.

Tab. 2.10: Mastermix für die Realtime-PCR (pro Probe)

Substanz	Volumen	Endkonzentration
ABolute™QPCR SYBR® Green ROX Mix (ABgene)	12,5 µl	1x
Forward primer (21 µM)	0,083 µl	70 nM
Reverse primer (21 µM)	0,083 µl	70 nM
H <sub>2</sub> O für die Molekularbiologie (Carl Roth)	9,83 µl	
cDNA	2,5 µl	

Die PCR-Ansätze wurden in weiße 96 well-Platten (ABgene) pipettiert, welche abschließend mit einer speziellen optischen Klebefolie versiegelt und kurz abzentrifugiert wurden. Die Realtime-PCR wurde am ABI Prism 7000 Cycler (Applied Biosystems) nach dem folgenden Programm durchgeführt (Tab. 2.11).

Tab. 2.11: Programm für die Realtime-PCR am ABI Prism 7000 Cycler

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl an Zyklen
Enzymaktivierung	15 Min.	95 °C	
Denaturierung	15 Sek.	95 °C	40
Annealing	30 Sek.	60 °C	
Extension	30 Sek.	72 °C	
Schmelzkurve		60-95 °C	
Ende	∞	4 °C	

Zur Überprüfung der Primer (spezifische Produktbildung aus cDNA) wurden folgende Kontrollen mitgeführt:

- Positivkontrolle: cDNA von Gewebe oder Zellen, die das gesuchte Gen stark exprimieren (z.B. durch Behandlung mit einer toxischen Substanz).



- *No template control*: Keine Zugabe von cDNA zur Sicherstellung, dass keine Kontamination mit genomischer DNA vorliegt.
- Genomische DNA aus der Ratte (gDNA): Anhand der Bildung von PCR-Produkten von genomischer DNA konnte die Spezifität des Primers für cDNA festgestellt werden

Die Auswertung erfolgte beim Austesten der Primer hinsichtlich ihrer Spezifität durch eine Gelelektrophorese der PCR-Produkte (s. 2.2.3.7). Als Beispiel ist in Abb. 2.5 die gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte nach einer PCR mit Primern für *Kim-1* gezeigt. Die Primer wurden sowohl bei cDNA von RNA aus der Niere eines gesunden Tieres als auch aus der Niere einer Ratte, die mit dem Nephrotoxin Aristolochiasäure behandelt worden war (Positivkontrolle), getestet. In beiden Proben ist die spezifische Bildung eines Produktes mit ca. 150 bp zu erkennen, was der erwarteten Länge des Amplifikats entspricht. In genomischer DNA aus der Ratte gibt es die Zielsequenz nicht, sodass die PCR spezifisch für die *Kim-1*-cDNA ist.

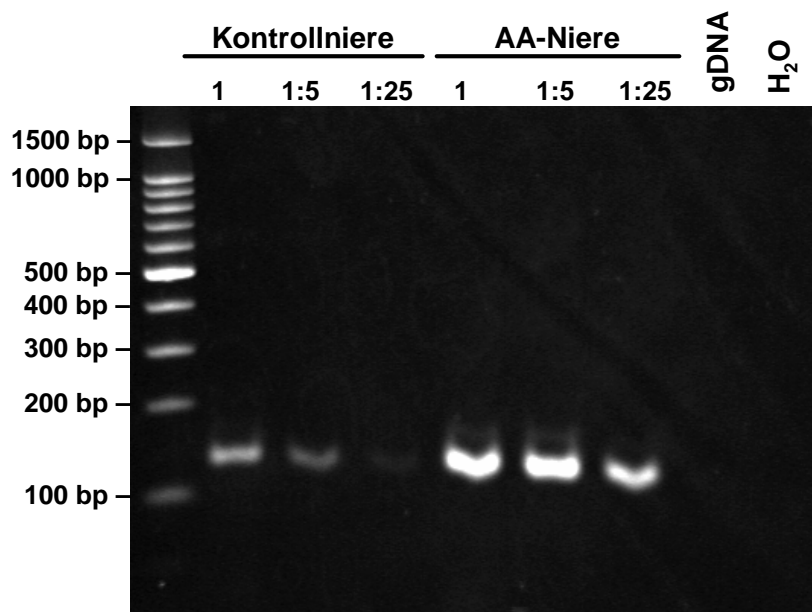


Abb. 2.5: *Kim-1*-Primer-Test. Verwendet wurden verschiedene cDNA-Konzentrationen (unverdünnt bis 1:25 verdünnt) von RNA aus der Niere einer unbehandelten Ratte und der Niere einer Ratte, die mit 10 mg/kg KG des Nephrotoxins Aristolochiasäure (AA) behandelt worden war. Als Kontrollen dienten genomische DNA (gDNA) und Ansätze ohne *template* (H<sub>2</sub>O).

Bei der Realtime-PCR ist neben der Spezifität auch die Effizienz der Produktbildung entscheidend für eine zuverlässige Quantifizierung der Transkripte mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode. Dazu wurden Standardkurven anhand des  $C_T$ -Wertes für verschiedene cDNA-Verdünnungsstufen einer Probe erstellt. Die Steigung der Gerade ist ein wichtiger Faktor zur Berechnung der Effizienz ( $E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$ ). Für die Anwendung

der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist es notwendig, dass die Effizienz der Produktbildung bei Ziel- und Normalisierungsgenen gleich ist (Handbuch „Critical Factors for Successful Real-Time PCR“, Qiagen). Ist die Steigung der Standardkurven für die beiden Sequenzen ungefähr gleich (s. Abb. 2.6), ist auch die PCR-Effizienz ähnlich und die  $\Delta\Delta C_t$ -Methode kann zur Quantifizierung angewandt werden.

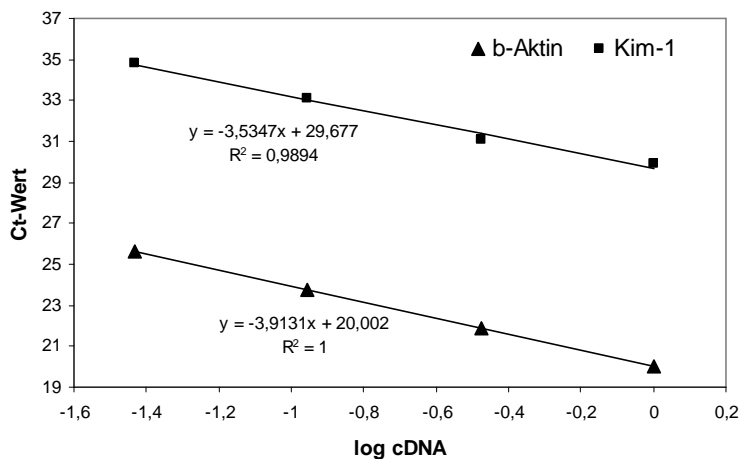


Abb. 2.6: Standardkurven für *Kim-1* und *Actb* ( $\beta$ -Aktin). Die PCR-Effizienz ist über mehrere Verdünnungsstufen der cDNA für beide Gene vergleichbar.

Da SYBR Green I unspezifisch an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle bindet, können Messungen bei der Realtime-PCR durch Primer-Dimere oder weitere PCR-Produkte verfälscht werden. Um falsch positive Messungen auszuschließen, wurden nach der PCR stets Schmelzkurven erstellt, wobei durch eine allmähliche Temperaturerhöhung alle doppelsträngigen DNA-Moleküle in der Probe aufgeschmolzen (denaturiert) werden. Jedes DNA-Molekül besitzt seine spezifische Denaturierungstemperatur, die in der Schmelzkurve durch einen Peak zu erkennen ist. Primer-Dimere schmelzen vor größeren Produkten auf und sind daher durch solch eine Analyse leicht zu identifizieren.

### Durchführung der Realtime-PCR zur Quantifizierung der Genexpression von Biomarkern für Nephrotoxizität

Zur Quantifizierung der Genexpression von Biomarkern für Nephrotoxizität in der Niere bzw. in Nierenzellen wurden die gesuchten Gene mithilfe spezifischer Primer durch Realtime-PCR amplifiziert (s. voriger Abschnitt und Abschnitt 2.1.7). Zur Normalisierung wurden die Haushaltsgene *Actb* bzw. *Rplp1* verwendet.  $\beta$ -Aktin war in

den meisten Fällen gut geeignet, da seine Expression auch nach Behandlung mit toxischen Substanzen nicht verändert wurde. Nur bei den *in vitro*-Experimenten (2.2.1.5) kam es in einigen Fällen (Behandlung mit Cadmium) zu einer Störung der *Actb*-Expression, sodass in diesen Fällen *Rplp1* zur Normalisierung verwendet wurde.

Die Berechnung der Veränderung der Genexpression infolge der Behandlung mit einer toxischen Substanz erfolgte mit der  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. *In vitro* wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die mittlere Änderung der Genexpression bestimmt. Statistisch signifikante Unterschiede der Genexpression *in vivo* wurden mit ANOVA und Dunnett's Post Hoc-Test ermittelt. Unbehandelte Tiere dienten als Kontrollgruppe.

### **Klassische Reverse Transkriptase (RT)-PCR zur Bestimmung der Genexpression von *Kim-1 in vitro***

Die Bildung von spezifischen *Kim-1*-Transkripten wurde in den *in vitro*-Experimenten zusätzlich zur Real-time PCR auch mithilfe der sog. „klassischen“ Reverse Transkriptase (RT)-PCR nachgewiesen, da die Primer für die Real-time PCR insbesondere bei einer sehr niedrigen Expression der Transkripte zur Dimerisierung neigten, was zur Hemmung der PCR-Reaktion führt. Als externer Standard wurde das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin verwendet. Da man bei der klassischen RT-PCR die Menge der gebildeten Produkte nur über die Bandendicke im Gel bestimmt, ist diese Methode nur semi-quantitativ.

Für die RT-PCR wurden in 0,2 ml PCR Tubes 25  $\mu\text{l}$ -Reaktionen angesetzt (Tab 2.12). Sowohl die Primer für *Kim-1* als auch für  $\beta$ -Aktin hatten eine optimale Annealing-Temperatur von 56 °C und führten zur Bildung spezifischer Produkte mit einer Größe von ca. 250 bp.

Tab. 2.12: Ansatz für die RT-PCR

<b>Substanz</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
2x Thermo-Start <sup>®</sup> PCR Master Mix (ABgene)	12,5 $\mu\text{l}$	1x
FW Primer (30 $\mu\text{M}$ )	0,25 $\mu\text{l}$	300 nM
RV Primer (30 $\mu\text{M}$ )	0,25 $\mu\text{l}$	300 nM
H <sub>2</sub> O für die Molekularbiologie (Carl Roth)	9,5 $\mu\text{l}$	
cDNA	2,5 $\mu\text{l}$	

Die PCR wurde entweder im PTC-100 oder PTC-200 Cycler (MJ Research) nach dem Programm in Tab. 2.13 durchgeführt. Um eine Kondensation der Flüssigkeit am Deckel

zu verhindern, wurde stets mit einem vorgeheizten Deckel (100°C) gearbeitet. Für die Detektion von  $\beta$ -Aktin wurden 25 PCR-Zyklen durchgeführt. Zum Nachweis von *Kim-1*-Transkripten wurden bei cDNA von Nieren-RNA 28 Zyklen durchgeführt, bei cDNA von NRK-52E-Zellen wurde die PCR nach 35 Zyklen beendet.

Tab. 2.13: Programm für die RT-PCR

Schritt	Zeit	Temperatur	Anzahl an Zyklen
Enzymaktivierung	15 Min.	95 °C	
Denaturierung	30 Sek.	95 °C	25-35
Annealing	30 Sek.	56 °C	
Elongation	60 Sek.	72 °C	
Finale Elongation	5 Min.	72 °C	
Ende	$\infty$	4 °C	

Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid analysiert (s. 2.2.3.7).

### 2.2.3.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese von DNA

Zur Analyse der PCR-Produkte wurden diese in Polyacrylamidgelen aufgetrennt, da diese Gele kleine DNA-Fragmente, wie sie bei der Real-time PCR verwendet werden, sehr gut auflösen.

Ein 5%-iges Polyacrylamidgel (Tab. 2.14) wurde zwischen einer Glasplatte und einer Aluminiumoxid-Platte gegossen und zur Polymerisation ca. 30 Min. bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 12,5  $\mu$ l PCR-Produkt auf Eis mit 2,5  $\mu$ l 6x DNA-Ladepuffer (Orange G Ladepuffer, PEQLAB) vermischt. Die Proben (15  $\mu$ l) und der Marker (6  $\mu$ l) wurden auf das Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese 60 Min. bei 60 V und RT in 1x TBE durchgeführt. Anschließend wurde das Gel 30 Min. in 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid in 1x TBE gefärbt, in Frischhaltefolie (Saran<sup>®</sup>) eingepackt und im Gel Doc 2000 (BioRad) analysiert.

Tab. 2.14: Zusammensetzung eines 5%-igen Polyacrylamidgeles für die DNA-Elektrophorese; Abkürzung: TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

Substanz	Volumen
30% Acrylamid-Lösung	2,1 ml
H <sub>2</sub> O (VE)	7,8 ml
5x TBE	2,5 ml
10% Ammoniumpersulfat	87,5 µl
TEMED	12,5 µl

## 2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.4.1 Proteinisolierung

#### Proteinisolierung aus Zellen

Zur Isolierung von Proteinen aus Zellen und Gewebe wurde RIPA-Puffer verwendet, der Zellen effektiv lysiert und sowohl lösliche als auch membrangebundene Proteine extrahiert.

Zur Herstellung von Ganzzelllysaten wurden Zellen in Schalen mit einer Fläche von 21 cm<sup>2</sup> ausgesät und behandelt. Nach der Behandlung wurden die Schalen auf Eis gestellt. Das Medium wurde abgezogen und die Zellen zweimal mit eiskalter PBS gewaschen. Im Anschluss wurden der Puffer vollständig abgezogen und 180 µl Ripa-Lysepuffer direkt auf die Zellen pipettiert und die Schale kurz geschwenkt. Mit einem gekühlten Zellschaber wurden die Zellen dann sofort abgeschabt und das Lysat in ein 1,5 ml-Tube überführt. Danach wurden die Proben 15 Min. bei 4°C geschüttelt und unlösliche Bestandteile durch Zentrifugation (16000 g, 4°C, 15 Min.) pelletiert. Der Überstand wurde in neue Tubes überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

#### Proteinisolierung aus Urin

Gefrorener Urin wurde auf Eis aufgetaut und 15 Min. bei 4°C zentrifugiert (16000 g), um Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde in 1,5 ml-Tubes überführt und zur Normalisierung mit H<sub>2</sub>O (MP) auf eine einheitliche Kreatinin-Konzentration eingestellt. Normalisierter Urin wurde dann entweder direkt in 6x Laemmli-Puffer verdünnt oder die Proteine wurden durch Fällung mit Trichloressigsäure aufkonzentriert. Dazu wurden 300 µl Urin mit dem gleichen

Volumen an eiskalter, 20%-iger Trichloressigsäure versetzt und 15 Min. auf Eis inkubiert. Die ausgefallenen Proteine wurden danach durch Zentrifugation (16000 g, 4°C, 15 Min.) pelletiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Proteinpellet wurde daraufhin noch zweimal mit eiskaltem Ethanol (99%) gewaschen und jeweils 5 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Alkohol durch Abdampfen vollständig entfernt und das Pellet in 50 µl 1x Laemmli-Puffer gelöst. Bei einer Gelbfärbung des Puffers (zu saurer pH-Wert) wurden 2-5 µl 1 M Tris, pH 6,8, zugegeben, bis sich der Puffer wieder blau färbte (pH ~ 6,8). Danach wurden die Proben bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

#### **2.2.4.2 Proteingehaltsbestimmung mit dem DC-Assay®**

Die Bestimmung des Proteingehalts von lysierten Zellen und Gewebe wurde mit dem DC Assay® (BioRad) durchgeführt. Dieser Test basiert auf der Methode von Lowry (Lowry *et al.*, 1951), wird jedoch nicht durch die Anwesenheit von Detergentien im Puffer (z.B. NP-40) beeinflusst. Zur Herstellung einer Eichgerade wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA in Lysepuffer hergestellt (0-1,47 mg/ml BSA). 20 µl mit Puffer verdünntes Lysat bzw. verdünnte BSA-Lösung wurden dann bei RT mit 100 µl Reagenz AS (20 µl Reagenz S / 1 ml Reagenz A) versetzt und gevortext. Im Anschluss daran wurden 800 µl Reagenz B zu den Proben pipettiert, diese dann sofort gevortext und 15 Min. bei RT inkubiert. Das Vorhandensein von Proteinen wurde durch eine Blaufärbung der Probe angezeigt, deren Intensität durch Messung der Absorption bei 750 nm bestimmt wurde. Der Proteingehalt der Proben wurde dann anhand der Eichgerade ermittelt.

#### **2.2.4.3 Auftrennung von Proteinen über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrer Masse getrennt. SDS (*sodium dodecyl sulfate*, Natriumlaurylsulfat) ist ein Detergens, das Proteine denaturiert und an die entfalteten Proteinketten bindet. Dadurch erhalten die Proteine eine stark negative Ladung, sodass sie während einer Elektrophorese einheitlich von Anode in Richtung Kathode wandern. Die Laufgeschwindigkeit der Proteine wird dabei nur durch deren Molekulargewicht beeinflusst – leichtere Proteine wandern schneller durch die Poren des Polyacrylamid-Gels als schwere Proteine. Je nach der Größe des gesuchten Proteins sollten daher Acrylamid-Konzentrationen zwischen 8-16% verwendet werden.

Zur Bildung scharfer Proteinbanden wurde eine diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei werden die Proteine zunächst in einem weitmaschigen Sammelgel mit pH 6,8 fokussiert, bevor sie im engmaschigen Trenngel (pH 8,8) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden.

### Herstellung der Polyacrylamidgele

In Abhängigkeit der gesuchten Proteinmasse wurden Polyacrylamidgele mit unterschiedlicher Konzentration (Tab. 2.15) zwischen einer Aluminiumoxid- und einer Glasplatte gegossen.

Tab. 2.15: Zusammensetzung eines Polyacrylamidgels für die Protein-Elektrophorese

	Trenngel			Sammelgel
	10,0%	12,5%	16,0%	6,0%
30% Acrylamid-Lösung	3,3 ml	4,15 ml	5,4 ml	800 µl
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	–
0,5 M Tris, pH 6,8	–	–	–	125 µl
H <sub>2</sub> O	4,1 ml	3,1 ml	1,95 ml	4,0 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10% Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	5 µl

Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um eine gleichmäßige, gerade Linie zu erhalten. Danach wurde das Isopropanol durch gründliches Spülen mit VE-Wasser entfernt, die Mischung für das Sammelgel zugegeben und ein Kamm aus Teflon<sup>®</sup> hineingesteckt. Hier wurde darauf geachtet, dass die Höhe des Sammelgels 1 cm ab dem Ende der Taschen betrug. Nach vollständiger Polymerisation (ca. 45 Min.) der Gele wurden die Platte an der Elektrophorese-Apparatur befestigt und diese bis zum oberen Ende der Platte mit 1x Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden der Kamm entfernt und die Taschen mit der Proteinlösung beladen.

### Herstellung der Proteinlösungen

Zelllysate wurden mit Lysepuffer auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und dann mit 2- oder 6-fach konzentriertem Laemmli-Puffer versetzt. Dieser Puffer enthält β-Mercaptoethanol, das Disulfidbrücken von Proteinen spaltet und somit zu deren Denaturierung beiträgt. Die Proben wurden dann 4 Min. im Heizblock aufgeköcht, auf Eis rasch abgekühlt und abzentrifugiert. Für die Auftragung der Proben

auf ein Gel wurde die Proteinlösung bei Raumtemperatur verwendet. Ansonsten wurden die Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Urinproteine in Laemmli-Puffer wurde n ebenfalls durch 4 Min. Kochen denaturiert und entsprechend verwendet oder gelagert.

### **SDS-PAGE**

Abhängig von der Proteinkonzentration wurden die Taschen der Gele mit maximal 20  $\mu\text{l}$  Proteinlösung gefüllt. Bei Zelllysaten wurden 10-40  $\mu\text{g}$  aufgetragen. Im Fall von Urinproben wurden entweder 10  $\mu\text{l}$  Konzentrat in 2x Laemmli-Puffer oder 20  $\mu\text{l}$  einfacher Urin in 6x Laemmli-Puffer aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteinmasse wurde ein Proteinmarker (PEQLAB) aufgetragen (5  $\mu\text{l}$  / Spur).

Die SDS-PAGE wurde bei RT durchgeführt. Zur Konzentrierung der Proteine lief die Elektrophorese zunächst 5 Min. bei 60 V und anschließend bei ca. 2 h 100 V oder 1 h bei 100 V und 30 Min. bei 200 V, bis die Lauffront das untere Ende der Platte erreicht hatte.

### **Färbung der Proteingele**

Zur Analyse von Konzentration und Trennung der Proteine wurden die Gele direkt nach der SDS-PAGE oder nach dem Western Blot (s. 2.2.4.4) ÜN mit Roti<sup>®</sup>-Blue-Färbelösung gefärbt und anschließend kurz mit 75% Methanol entfärbt. Roti<sup>®</sup>-Blue basiert auf der Proteinfärbung mit Coomassie, ist jedoch sensitiver als die herkömmlichen Färbelösungen. Die Gele wurden dann in Frischhaltefolie eingepackt aufbewahrt.

#### **2.2.4.4 Western Blot**

Beim Western Blot werden die negativ geladenen Proteine in Polyacrylamid-Gelen auf eine positiv geladene Membran aus Nitrocellulose (NZ) oder Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert, wo sie dann mit spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Die Detektion von bestimmten Proteinen erfolgt dann mithilfe antigenspezifischer primärer Antikörper, an die im Folgenden dann *horseradish peroxidase* (HRP)-gekoppelte sekundäre Antikörper anlagern. Das Enzym HRP setzt dann das Substrat ECL in einer Licht produzierenden Reaktion um, sodass ein Röntgenfilm belichtet werden kann. Das Protein ist dann als schwarze Bande auf dem Film zu erkennen.

Vor dem Blot wurden Gel, Membran, Filterpapiere und Schwämme für ca. 20 Min. in Transferpuffer eingelegt und dann nach dem Schema in Abb. 2.7 zu dem Blot-



„Sandwich“ zusammengebaut. Aufgrund ihrer starken Hydrophobie mussten PVDF-Membranen davor noch in Methanol angefeuchtet werden.

Der Transfer erfolgte abhängig von der Proteingröße für 1-1,5 h bei 4°C in einer Nassblot-Apparatur (Hoefler). Als erste Kontrolle für den vollständigen Transfer diente die Detektion der angefärbten Proteinmarkerbanden. Des Weiteren wurden die Membranen stets gefärbt, um den Proteintransfer zu begutachten. NZ-Membranen wurden dazu für 1 Min. mit Ponceau S gefärbt und anschließend mehrmals mit VE-Wasser gewaschen, bis Proteinbanden zu erkennen waren. PVDF-Membranen wurden entsprechend 20 Sek. in Coomassie-Lösung gefärbt und längere Zeit in 50% Methanol entfärbt.

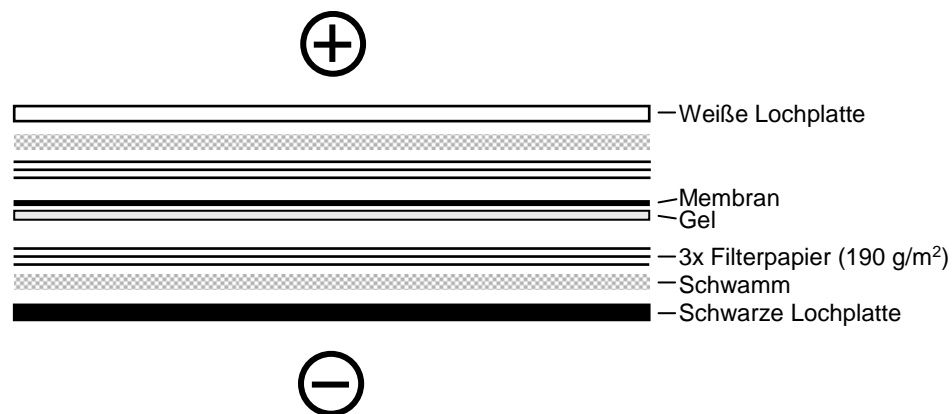


Abb. 2.7: Schematische Darstellung des Nassblot-„Sandwich“-Aufbau

Für die Immundetektion wurden ausschließlich Membranen verwendet, die keine Luftblasen und eine gleichmäßige Proteinkonzentration aufwiesen. Die Membran wurde nach diesem Schritt vollständig entfärbt und für 2 h bei RT in Blockierlösung geschüttelt, um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper zu blockieren. In der Regel wurde zum Blocken Milchpulver in TBST oder PBS verwendet. Da die Blockierlösung einen Einfluss auf den anschließenden Proteinnachweis haben kann, wurden bei schwer zu detektierenden Antigenen weitere Lösungen getestet (Tab. 2.16).

Tab. 2.16: Blockierlösungen zur Detektion von Proteinen im Western Blot

	5% Milch/TBST	5% Milch/PBS	BSA	Roti-Block
β2-Mikroglobulin		+		
CLU	+			
HO-1	+			
LCN2	+			
KIM-1	+			
OPN	+	+	+	+
VIM	+	+	+	+

Anschließend wurden die Membranen kurz in Waschpuffer gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Als Waschpuffer wurde der Puffer verwendet, in dem die Blockierlösung angesetzt worden war (TBST oder PBST). Im Fall von Roti<sup>®</sup>-Block wurde TBST verwendet. Der Antikörper (s. Abschnitt 2.1.6) wurde in 100% oder 20% Blockierlösung verdünnt.

Vor der Behandlung mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen 3 x 15 Min. bei RT gewaschen. Die Inkubation erfolgte dann für 1 h bei RT in 100% Blockierlösung. Anschließend wurden die Membranen erneut gründlich mit TBST bzw. PBST/PBS gewaschen, bevor das ECL-Substrat zugegeben wurde (1,6 ml pro Membran). Nach 1 Min. wurde das Substrat abgekippt und die Membran in Frischhaltefolie eingepackt. Röntgenfilme wurden nun über verschiedene Zeiträume (10 Sek. – 2 h) belichtet und in einer Maschine (KODAK X-OMAT) entwickelt.

### Densitometrische Auswertung

Zur densitometrischen Auswertung wurden Proteinbanden im Gel Doc 2000 (BioRad) fotografiert, einzeln eingerahmt und die Pixeldichte unter Berücksichtigung des Hintergrundes mithilfe der Software berechnet. Bei *in vitro*-Experimenten wurden die Ergebnisse aus 3 unabhängigen Versuchen zur Bestimmung der Proteinexpression in behandelten Zellen im Verhältnis zu Kontrollzellen verwendet. Zur Analyse der Konzentration des gesuchten Proteins im Urin wurden die Messwerte für die einzelnen Tiere aus einem Blot verwendet und statistisch ausgewertet (ANOVA und Dunnett's Test). Auch hier wurde die Proteinexpression relativ zur Kontrollgruppe untersucht.

### 2.2.4.5 Immunhistochemische Detektion von Proteinen im Nierengewebe

#### Detektion von Biomarker-Proteinen in Nierengewebe

Zur Detektion von Proteinen in formalin-fixierten, paraffin-eingebetteten Gewebeschnitten wurde die sog. „Labeled-Streptavidin-Biotin“ (LSAB)-Methode angewandt. Die gesuchten Proteine werden dabei im Gewebe von spezifischen primären Antikörpern gebunden, an welche sich dann sekundäre, Biotin-gekoppelte Antikörper anlagern. Das Biotinmolekül bindet im Anschluss daran einen Komplex aus Streptavidin und einem daran gebundenen Enzym, z.B. HRP. Dieses Enzym kann dann ein Substrat, beispielsweise 3,3-Diaminobenzidin (DAB), zu einem farbigen Präzipitat umsetzen, das unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden kann. Diese Methode ermöglicht dadurch die genaue Lokalisation des gesuchten Proteins in einem heterogenen Gewebe.

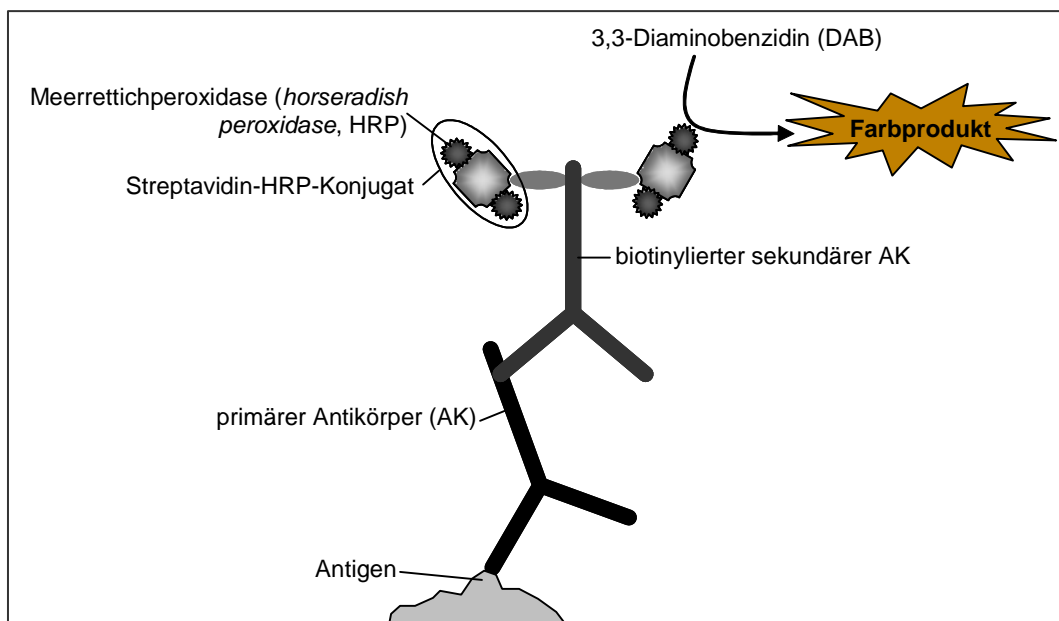


Abb. 2.8: Indirekte Immunhistochemie mit der LSAB-Methode. Ein primärer Antikörper (AK) bindet an sein spezifisches Substrat und wird selbst von einem biotinylierten, sekundären AK gebunden. Streptavidin-HRP-Konjugate binden an das Biotin des zweiten AK. Anschließend wandelt die Peroxidase aus dem Komplex 3,3-Diaminobenzidin (DAB) in ein braunes Farbprodukt um.

Für immunhistochemische Untersuchungen wurden zunächst am Mikrotom 5 µm dünne Schnitte von in Paraffin eingebetteten Nieren hergestellt, auf saubere Objektträger (Superfrost) gebracht und ÜN bei 45-50°C getrocknet. Um die Schnitte vor der Behandlung fest auf dem Objektträger zu fixieren, wurden sie vor Durchführung

der Immunhistochemie 1 h bei 60°C inkubiert. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte anschließend in Xylol bzw. Roti<sup>®</sup>-Histol (Xylol-Ersatz; Carl Roth) und Ethanol gestellt (Tab. 2.17).

Tab. 2.17: Entparaffinierung von Gewebeschnitten

Lösung	Zeit
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	4 Min.
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	4 Min.
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	4 Min.
100% Ethanol	2 Min.
100% Ethanol	2 Min.
100% Ethanol	2 Min.
70% Ethanol	2 Min.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS (jeweils 5 Min.) wurde eine Epitop-Demaskierung durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 4 Min. in Citratpuffer autoklaviert. Zur Detektion von TIMP-1 und LCN2 wurde zusätzlich noch ein kurzer Verdau (1-3 Min.) mit 0,1% Trypsin bei 37°C durchgeführt. Anschließend erfolgten mehrere kurze Waschschrirte mit PBS, bevor unspezifische Bindungsstellen für Antikörper durch Inkubation der Schnitte mit 10% Ziegenerum bzw. 5% Eselserum in PBS für 1,5 h bei RT blockiert wurden. Die Schnitte wurden dazu in eine feuchte Kammer gelegt. Für diesen Schritt wurde jeweils das Serum aus der Spezies verwendet, aus welcher der Zweitantikörper stammte. Im Anschluss daran wurde die endogene Peroxidase durch eine 15-minütige Behandlung mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei RT blockiert. Danach erfolgten zwei weitere Blockierungsschrirte mit 0,001% Avidin bzw. 0,001% Biotin für jeweils 15 Min. bei RT, um endogen vorhandenes Biotin mit Avidin zu binden und noch vorhandene Bindungsstellen für Biotin abzusättigen. Zwischen all diesen Schritten wurden die Schnitte stets mehrmals mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1% BSA in PBS bzw. 5% Serum in PBS) behandelt. Zusätzlich wurden zur Kontrolle der Antikörper-Spezifität Negativkontrollen (kein primärer Antikörper, Kontroll-Immunglobuline) mitgeführt. Nach mehreren Waschschrirten mit PBS erfolgte daraufhin die Behandlung mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper für 1 h bei RT. Danach wurden die Schnitte für 30 Min. mit dem Komplex aus Streptavidin und HRP behandelt (BD Biosciences). Nach

drei weiteren Waschschrritten mit PBS wurde die DAB-Lösung (BD Biosciences) auf die Schnitte gegeben und 0,5-5 Min. inkubiert, bis eine bräunliche Färbung auftrat.

Nach der DAB-Färbung wurden die Schnitte dreimal mit VE-Wasser gewaschen und zur Färbung von Zellkernen mit Hämatoxylin behandelt. Dazu wurden sie 5 Min. in Hämalaun gestellt und anschließend 5 Min. mit fließendem Wasser gespült. Im Anschluss daran wurden die Schnitte wieder entwässert (Tab 2.18) und in 1-2 Tropfen Eukitt (Fluka) eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop (Nikon Eclipse 55i).

Tab. 2.18: Entwässerung von Gewebeschnitten nach der Immunhistochemie

Lösung	Zeit
70% Ethanol	1 Min.
100% Ethanol	2 Min.
100% Ethanol	2 Min.
100% Ethanol	2 Min.
100% Ethanol	2 Min.
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	10 Sek.
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	3 Min.
Xylol / Roti <sup>®</sup> -Histol	3 Min.

Anmerkung zum Nachweis von KIM-1: Für den immunhistochemischen Nachweis von KIM-1 wurde in späteren Experimenten mit dem Antikörper von R&D Systems anstelle des Kits von BD Biosciences das Vectastain Elite ABC-Kit und DAB-Substrat von Vector Laboratories verwendet, da die Protokolle zu diesem Zeitpunkt auf dieses Kit umgestellt worden waren; Grund dafür war eine Verbesserung der Methode hinsichtlich der Reduktion einer unspezifischen Färbung des Hintergrundes. Die Methode beim Kit von Vector Laboratories basiert auf einem ähnlichen Prinzip wie beim Kit von BD Biosciences.

### **Bestimmung der Zellproliferation durch Färbung von BrdU-positiven Zellen in Nieren- und Leberschnitten**

Zur Detektion von BrdU in Nieren- und Leberschnitten wurde das BrdU In-Situ Detection Kit (BD Biosciences) verwendet. Enparaffinierte Schnitte (Tab. 2.17) wurden mehrmals kurz mit VE-Wasser gewaschen und die endogene Peroxidase anschließend durch 20 Min. Inkubation mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS blockiert. Nach mehreren Waschschrritten mit PBS wurden die Schnitte zur Epitop-Demaskierung in den Puffer „Retrievagen A“ gegeben und 10 Min. in der Mikrowelle auf 89°C erhitzt. Die auf RT

abgekühlten Schnitte wurden dann erneut dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem biotinylierten anti-BrdU-Antikörper behandelt (1:20-Verdünnung). Im Folgenden wurden die Schnitte 30 Min. bei RT mit Streptavidin-HRP inkubiert und 3-5 Min. mit DAB-Substrat behandelt, bis die gewünschte Farbintensität auftrat. Zwischen diesen Schritten wurden die Präparate jeweils gründlich mit PBS gewaschen. Nach der DAB-Färbung wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser gespült und mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Dazu wurden sie zunächst 2 Min. in Hämalaun gegeben und 5 Min. unter fließendem Wasser abgespült. Dann erfolgten noch eine kurze (30-40 Sek.) Behandlung mit 0,1% Eosin G in H<sub>2</sub>O und mehrere Waschschrte. Die Entwässerung fand auf die oben beschriebene Weise statt und die Schnitte wurden dann in 1 Tropfen KAISERS Glyceringelatine (Merck, Darmstadt) eingebettet.

Zur Auswertung wurden unter dem Lichtmikroskop (OLYMPUS CH-2) bei 200-facher Vergrößerung in den Nierenschnitten zufällig jeweils 10 Gesichtsfelder aus Kortex (unter Aussparung von Markstrahlen) und äußerer Medulla ausgewählt und die Anzahl braun gefärbter (BrdU-positiver) Zellkerne ermittelt. In Schnitten von Lebern wurden 20 Gesichtsfelder ausgewertet. Die mittlere Anzahl an BrdU-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in den verschiedenen Geweberegionen wurde dann zur statistischen Auswertung (ANOVA und Dunnett's Test) herangezogen.

#### **2.2.4.6 Immunfluoreszenzfärbung von Vimentin in NRK-52E-Zellen**

Da Vimentin im Western Blot nicht zu detektieren war, wurde die Expression des Proteins in den Zellen durch indirekte Immunfluoreszenz untersucht. Auch hier basiert das Prinzip auf der indirekten Färbung eines Antigens durch sekundäre Antikörper, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Für diese Experimente wurden NRK-Zellen in 12 well-Platten auf sterile Deckgläschen ( $\varnothing$  15 mm) ausgesät und im Brutschrank inkubiert. Konfluente Zellrasen wurden dann mit leicht zytotoxischen Konzentrationen nephrotoxischer Substanzen über 48 h behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und 10 Min. mit Methanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und 1 Min. mit Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) fixiert. Nach zwei Waschschrten mit PBS wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen für Antikörper für 1 h mit 10% Ziegen Serum in PBS behandelt. Die Inkubation fand bei RT und in einer feuchten Kammer statt. Im Anschluss daran wurden die Zellen für 1 h bei RT mit dem primären Antikörper (Maus anti-Vimentin; 1:50 in 1% BSA in PBS) inkubiert. Die Behandlung mit dem sekundären, FITC-gekoppelten Antikörper (Ziege anti-Maus; 1:50 in 1% BSA in

PBS) erfolgte nach gründlichem Waschen mit PBS für 1 h bei RT in der abgedunkelten feuchten Kammer. Nach weiteren Waschschrinen mit PBS und Wasser wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den wells herausgenommen und kurz an der Luft getrocknet, bevor sie in 3-5  $\mu$ l Vectashield mit DAPI (Vector Laboratories) eingebettet wurden. Bis zur Auswertung am Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben abgedunkelt bei +4°C gelagert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 90 Tage-Toxizitätstudie (oral, Schlundsonde) mit Ochratoxin A in männlichen F344/N-Ratten

In dieser Arbeit wurde eine 90-Tage-Toxizitätsstudie mit Ochratoxin A (OTA) in männlichen F344/N-Ratten durchgeführt, die als Grundlage für die Untersuchung von frühen Anzeichen für chronische Nephrotoxizität dienen sollte. Zum einen wurden in der Studie verschiedene klassische (traditionelle) Endpunkte für Toxizität untersucht, die in der Regel bei Routine-Studien im Tier bestimmt werden; die genaueren Untersuchungen der Organe beschränkten sich dabei allerdings auf die Niere als wichtigstes Zielorgan von OTA und auf die Leber (Abschnitt 3.1.2). Des Weiteren wurde untersucht, ob Veränderungen der Zellproliferation ein frühes Ereignis der OTA-bedingten Krebsentstehung in der Niere darstellen, wie es bereits für zahlreiche nicht-gentoxische Kanzerogene gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.1.3). Aus diesen Gründen wurden Ratten mit niedrigen Dosen OTA behandelt, die in dieser Spezies bekanntermaßen kanzerogen und nur schwach nephrotoxisch wirken. Schließlich wurden neue Biomarker für Nephrotoxizität im Gewebe sowie im Urin gemessen (Abschnitt 3.1.4), um einen Vergleich zwischen der Empfindlichkeit dieser Marker und den traditionellen Endpunkten für Toxizität aufzustellen.

Um einen besseren Einblick in den Zusammenhang zwischen der oralen Exposition mit verschiedenen Dosen OTA und der daraus resultierenden Konzentration im Plasma sowie in Niere (Zielorgan für Toxizität) und Leber (kein Zielorgan) zu erhalten, wurde OTA in Plasma- und Organproben der Tiere mit einer LC/MS-MS-Methode gemessen. Die Ergebnisse dieser Arbeiten werden nun im folgenden Abschnitt vorgestellt.

#### 3.1.1 Ochratoxin A-Konzentration in Plasma, Niere und Leber

Die Behandlung mit OTA resultierte in einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg des Blut- und Gewebespiegels des Toxins in allen drei Dosisgruppen (Abb. 3.1). In Übereinstimmung mit früheren Berichten wurde auch im Plasma von unbehandelten Tieren eine geringe Menge an OTA gemessen ( $0,036 \pm 0,026 \mu\text{M}$ ,  $0,026 \pm 0,013 \mu\text{M}$  und  $0,023 \pm 0,011 \mu\text{M}$  nach 14, 28 bzw. 90 Tagen), die mit einer geringfügigen Kontamination des Futters mit OTA zu begründen ist (Mally *et al.*, 2005b). Allerdings

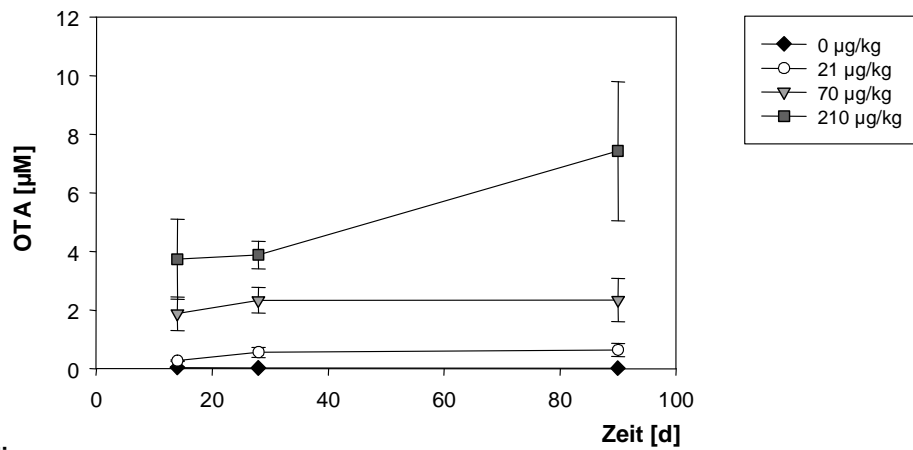


wurde das Toxin in diesen Tieren weder in Nieren- noch in Lebergewebe nachgewiesen, sodass es wohl bei Aufnahme solch geringer Mengen an OTA zu einem Gleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausscheidung kommt.

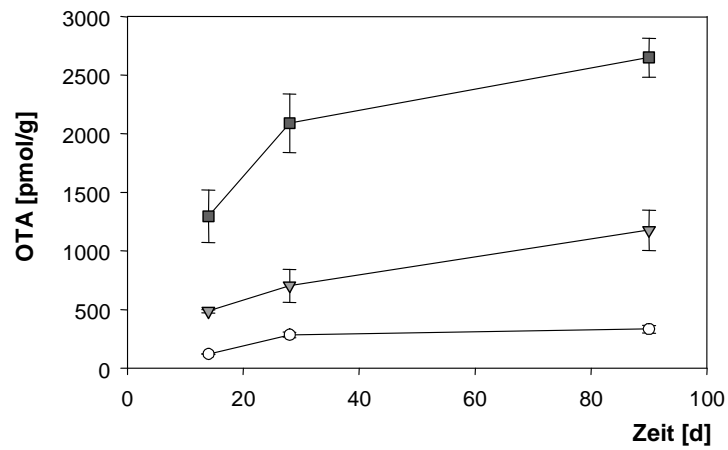
In den beiden unteren Dosisgruppen schien sich bei längerer Behandlung ein Fließgleichgewicht zwischen Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung gebildet zu haben, das bei ca. 0,64  $\mu\text{M}$  (21  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  OTA) bzw. 2,34  $\mu\text{M}$  (70  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  OTA) lag. Dagegen wurde in Hochdosistieren bis zum Ende der Behandlung ein stetiger Anstieg der Plasmakonzentration von Ochratoxin A gemessen, der nach 90 Tagen  $7,42 \pm 2,37 \mu\text{M}$  betrug.

Sowohl in Nieren- als auch in Lebergewebe von OTA-behandelten Ratten wurde eine Akkumulation von OTA über die Zeit festgestellt. Wie bereits in einer früheren Studie gezeigt wurde, lagen in beiden Organen 24 h nach der letzten Behandlung mit OTA ähnliche Gewebekonzentrationen vor (Mally *et al.*, 2005b). In Ratten, die mit 21  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  behandelt wurden, betrug die OTA-Konzentration nach 90 Tagen in der Niere  $332 \pm 33 \text{ pmol}/\text{g}$  und in der Leber  $255 \pm 18 \text{ pmol}/\text{g}$ . Da die Gewebekonzentration in diesen Tieren nach 28 Tagen bis zum Ende der Studie nur sehr leicht angestiegen war, schien sich auch hier ein Gleichgewichtszustand entwickelt zu haben und keine weitere Akkumulation mehr stattzufinden. Dagegen wurde in den Organen von Mittel- und Hochdosistieren bis zum Abschluss der Behandlung eine kontinuierliche Zunahme der OTA-Konzentration gemessen, die in der Niere nach 13 Wochen bei  $1176 \pm 174 \text{ pmol}/\text{g}$  bzw.  $2650 \pm 166 \text{ pmol}/\text{g}$  (70 bzw. 210  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  OTA) und in der Leber bei  $943 \pm 75 \text{ pmol}/\text{g}$  bzw.  $2147 \pm 185 \text{ pmol}/\text{g}$  lag.

## a) Plasma



## b) Niere



## c) Leber

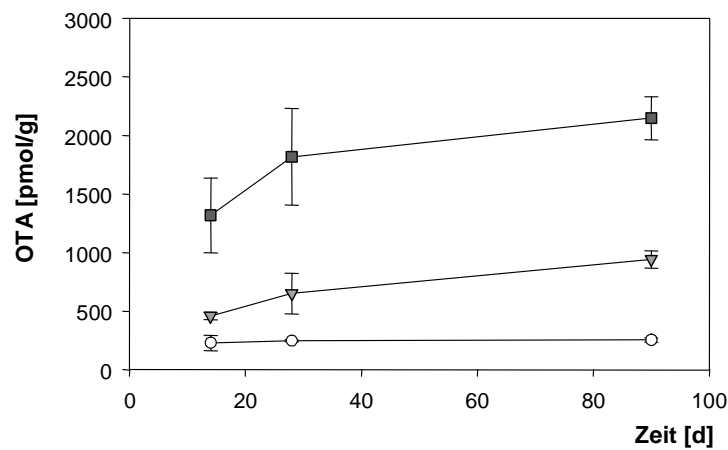


Abb. 3.1: OTA-Konzentration in Plasma (a), Nieren- (b) und Lebergewebe (c) von Ratten, die 14, 28 oder 90 Tage mit 0, 21, 70 und 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden.

### 3.1.2 Traditionelle Endpunkte für Toxizität

#### 3.1.2.1 Klinische Symptome

Bei den täglichen Untersuchungen der Tiere wurden äußerlich keine Krankheitszeichen oder Verhaltensauffälligkeiten festgestellt.

#### 3.1.2.2 Futter- und Wasseraufnahme

Ein Vergleich zwischen Kontroll- und Hochdosistieren zeigt, dass die Behandlung mit bis zu 210 µg/kg KG OTA keinen Einfluss auf Futter- oder Wasserkonsum der Tiere hatte (s. Abb. 3.2). Bei Tieren der niedrigen Dosisgruppe (21 µg/kg KG) wurde von Woche 7 bis Woche 11 (Tage 45-73) im Vergleich zu den übrigen Gruppen ein leicht erhöhter Wasserkonsum gemessen, was als Zufallsbefund gewertet wird und wahrscheinlich mit dem leicht erhöhten Körpergewicht dieser Tiere in Zusammenhang steht (s. 3.1.2.3).

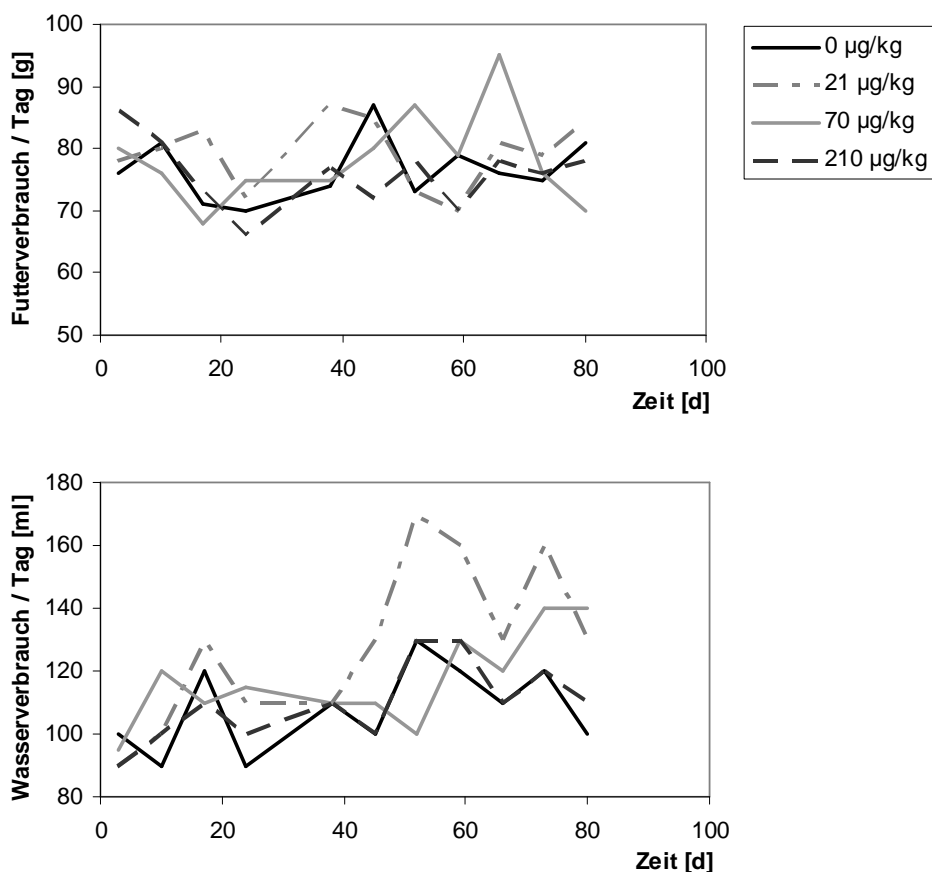


Abb. 3.2: Futter- und Wasserverbrauch von OTA-behandelten Ratten (wöchentliche Messung des Verbrauchs pro Tag und Käfig (5 Tiere)).

### 3.1.2.3 Körpergewicht

Die Exposition mit Ochratoxin A hatte keine Auswirkungen auf die Gewichtszunahme der Tiere (Abb. 3.3 und Tab. 3.1). Lediglich in der Woche vor der Tötung kam es nach dem chirurgischen Eingriff (Implantation der osmotischen Minipumpen) zu einer geringen Abnahme des Körpergewichts in allen Versuchsgruppen. Tiere, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, wiesen ab der dritten Woche ein etwas höheres Körpergewicht auf als die übrigen Tiere. Da es sich um die niedrigste Dosisgruppe handelt, ist dieser Befund nicht als Folge der Behandlung mit OTA zu bewerten.

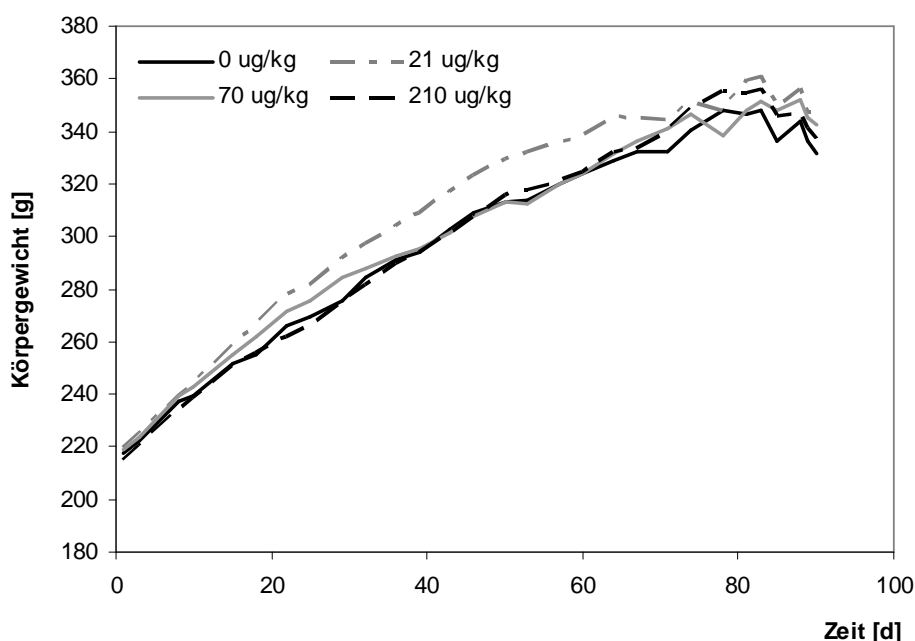


Abb. 3.3: Zunahme des Körpergewichts von männlichen F344/N-Ratten, die über 90 Tage wiederholt mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG Ochratoxin A behandelt wurden.

### 3.1.2.4 Organgewichte

OTA hatte keinen Einfluss auf das relative Gewicht von Leber und Milz (bezogen auf das Körpergewicht), jedoch wurde nach Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA eine dosis- und zeitabhängige Reduktion des relativen Nierengewichtes beobachtet (Tab. 3.1).

### 3.1.2.5 Makroskopische Befunde

Bei der Organentnahme nach 90 Tagen Behandlung wurde bei den Tieren der Hochdosisgruppe (210 µg/kg KG) eine leichte Hellfärbung der Leber festgestellt. Abgesehen davon wurden keine makroskopischen Auffälligkeiten beobachtet.

Tab. 3.1: Körper- und relatives Organgewicht von F344/N-Ratten nach Behandlung mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA für 14, 28 oder 90 Tage (Mittelwert ± Standardabweichung (n = 5)). Die statistische Analyse erfolgt mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01).

		OTA [µg/kg KG]			
Zeit [d]		0	21	70	210
<b>Körpergewicht (KG) [g]</b>					
initial	0	217.4 ± 10.6	219.6 ± 9.8	219.0 ± 10.1	215.0 ± 8.9
final	90	331.4 ± 25.7	347.0 ± 11.4	342.4 ± 24.2	336.8 ± 12.8
Zunahme [g]		114.0 ± 19.1	127.4 ± 9.2	123.4 ± 16.2	121.8 ± 6.1
Endgewicht [%]		100.0 ± 7.8	104.7 ± 3.4	103.3 ± 7.3	101.6 ± 3.9
Relative Zunahme des		152.4 ± 7.9	158.2 ± 5.6	156.3 ± 6.1	156.7 ± 2.8
<b>Relatives Organgewicht [% des KG]</b>					
Linke Niere	14	0.35 ± 0.00	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01	0.35 ± 0.02
	28	0.34 ± 0.00	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.01 **
	90	0.30 ± 0.00	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01 **	0.23 ± 0.01 **
Rechte Niere	14	0.33 ± 0.00	0.31 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.33 ± 0.02
	28	0.32 ± 0.00	0.32 ± 0.01	0.31 ± 0.03	0.29 ± 0.01 *
	90	0.29 ± 0.00	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.01 **
Leber	14	4.72 ± 0.20	4.12 ± 0.65	4.49 ± 0.16	4.50 ± 0.24
	28	4.06 ± 0.20	4.03 ± 0.23	3.86 ± 0.18	3.80 ± 0.19
	90	2.94 ± 0.20	3.05 ± 0.08	3.04 ± 0.15	2.74 ± 0.09
Milz	14	0.23 ± 0.00	0.23 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.23 ± 0.01
	28	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01
	90	0.19 ± 0.00	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.18 ± 0.01

### 3.1.2.6 Histopathologie

Die Behandlung mit 70 und 210 µg/kg KG Ochratoxin A führte zu pathologischen Veränderungen in der Niere (Abb. 3.4). Die Zielzellen des Toxins waren Epithelzellen im Bereich der proximalen Tubuli des äußeren Marks und der Markstrahlen (S<sub>3</sub>-Segment, *Pars recta*). Dort verursachte OTA die Degeneration einzelner Zellen, die sich in das Tubuluslumen ablösten. Als Folge davon war in betroffenen Tubuli eine verstärkte Basophilie und der Verlust des Bürstensaums zu beobachten, die auf eine Dedifferenzierung der Zellen und Regeneration des Epithels hindeuten. Tubuläre Hyperplasie, wie sie häufig als Reaktion auf die Induktion von Nekrose durch zytotoxische Substanzen auftritt, wurde nicht festgestellt. Diese Form der regenerativen Hyperplasie ist eine kompensatorische Reaktion; betroffene Epithelien besitzen leicht vergrößerte Zellen mit einem basophilen Zytoplasma, reduziertem Bürstensaum und einem hohen Zellkern/Zytoplasma-Verhältnis (Dietrich und Swenberg 1991). Neben der Gewebeschädigung wurde infolge der Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA in den Zielzellen des Toxins zudem eine prominente Vergrößerung der Zellkerne (Karyomegalie) beobachtet.

Diese histopathologischen Effekte traten dosis- und zeitabhängig auf. Während sich die Nieren von Ratten, die zwei Wochen mit 70 µg/kg KG OTA behandelt worden waren, nicht von Nieren aus Kontrolltieren unterschieden, konnte nach 28 und 90 Tagen eine schwache Basophilie in proximalen Tubuli am äußeren Rand des äußeren Markes beobachtet werden. Betroffene Tubuli wiesen minimale (28 Tage) bis schwache (90 Tage) Anzeichen von Zelldegeneration auf. Degenerierte Zellen waren kondensiert, besaßen ein stark eosinophiles Zytoplasma mit einem kontrahierten Zellkern und lösten sich in das Tubuluslumen ab (Abb. 3.4). Zusätzlich wurde in S<sub>3</sub>-Tubuli dieser Tiere nach 28 Tagen Behandlung eine leichte Zunahme der Zellkerngröße sowie eine Zunahme an mitotischen Zellen festgestellt.

Die gleichen histopathologischen Veränderungen traten in Hochdosistieren bereits nach 14 Tagen auf. Nach 28 und 90 Tagen begann sich die tubuläre Basophilie vom Außenrand des äußeren Mark tiefer in das äußere Mark und in die Markstrahlen auszuweiten. Daneben wurde in zahlreichen proximalen Tubuluszellen des S<sub>3</sub>-Segmentes eine starke Vergrößerung der Zellkerne bis zur Kategorie „Karyomegalie“, d.h. Zellen mit einem achtfachen oder noch größeren Chromosomensatz, notiert. Die Degeneration einzelner Zellen wurde bei diesen Tieren ebenfalls bis zum Ende der

Studie beobachtet, allerdings nahm das Ausmaß an Zelldegeneration mit der Zeit deutlich ab.

Im Gegensatz zu den pathologischen Effekten in Nieren von Mittel- und Hochdosistieren wurden in Nieren von Ratten, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, bis zum Ende der Studie keine Unterschiede zu Kontrollnieren festgestellt.

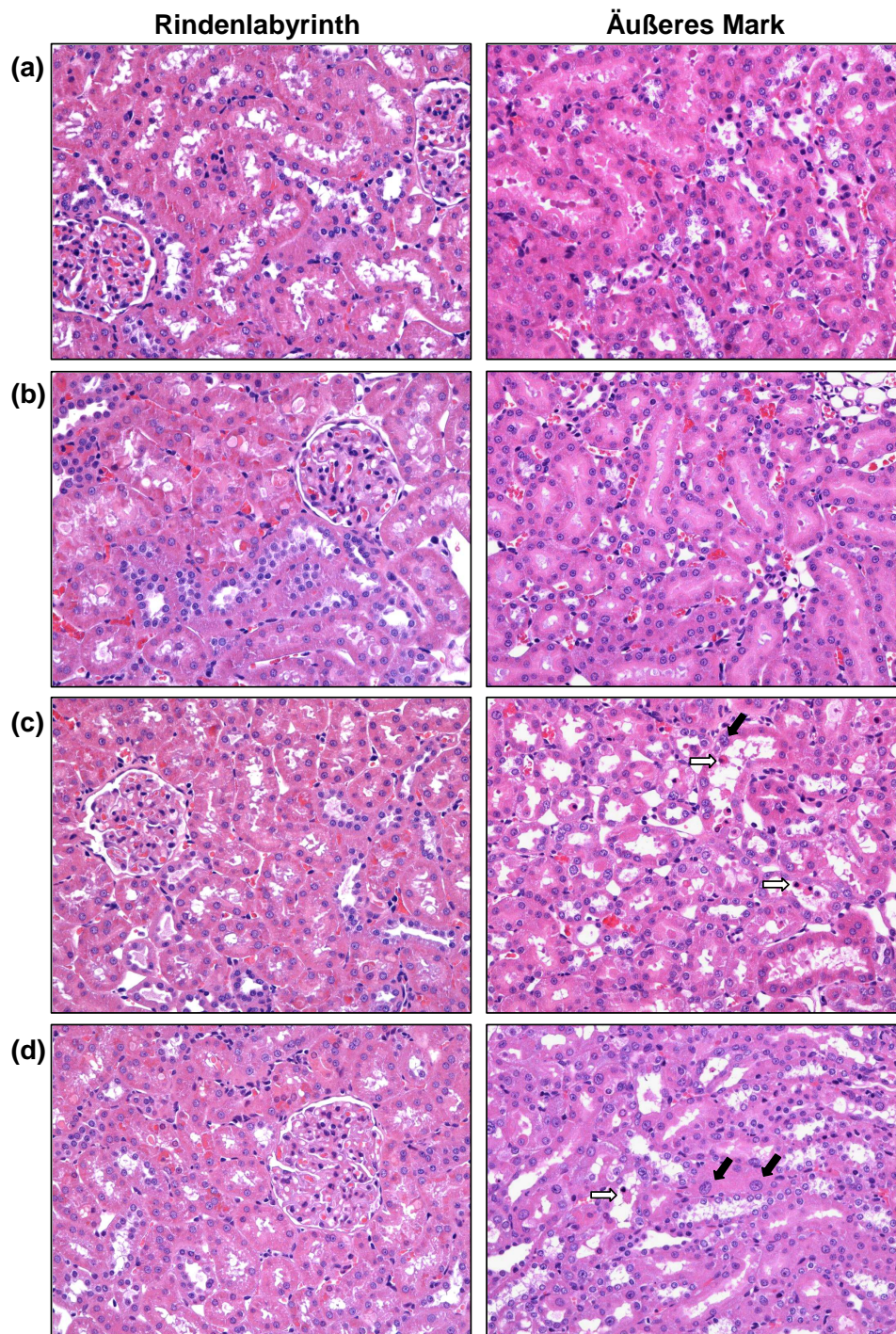


Abb. 3.4: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Nierenschnitte von Ratten, die 90 Tage mit 0 (a), 21 (b), 70 (c) oder 210 (d)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt wurden. OTA hatte keine histopathologischen Effekte auf Nierenkörperchen und kortikale Tubuli (ohne Markstrahlen). Dagegen führte die Exposition mit OTA in Nieren von Mittel- und Hochdosistieren zur Schädigung von proximalen Tubulusepithelzellen in Markstrahlen und im Außenstreifen des äußeren Marks. Dort induzierte das Toxin zum einen die Degeneration einzelner Zellen (weißer Pfeil,  $\Rightarrow$ ) sowie eine Vergrößerung der Zellkerne (schwarzer Pfeil,  $\Rightarrow$ ). 200-fache Vergrößerung.

OTA hatte bis auf kleine morphologische Veränderungen, die auf Unterschiede im Glycogen-Metabolismus hindeuten, keine pathologischen Effekte auf die Leber der behandelten Tiere (Abb. 3.5).

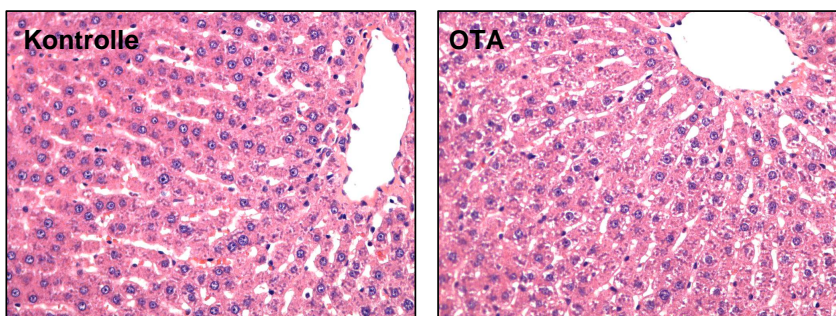


Abb. 3.5: Hämatoxylin-Eosin-gefärbte Leberschnitte aus einer Kontrollratte und einem Tier, das 90 Tage mit 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  OTA behandelt wurde. OTA führte zu keinen pathologischen Veränderungen in der Leber. 200-fache Vergrößerung.

Da sich Niere und Leber von Tieren, die mit 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt wurden, nicht von den Organen der Kontrolltiere unterschieden, wurde diese Dosis als *no-observed-effect-level* (NOEL) festgelegt.

### 3.1.2.7 Ultrastrukturelle Veränderungen in Nierenzellen

Da die Zielzellen von OTA Epithelzellen des proximalen Tubulus sind, konzentrierte sich die Analyse der Ultrastruktur auf diesen Zelltyp, der anhand der charakteristischen Merkmale (große Zellen, Bürstensaum, endozytotische Vesikel) gut von den anderen Zellen der Nierenrinde und des Marks unterschieden werden konnte.

Die histopathologische Untersuchung hatte gezeigt, dass die toxischen Effekte von OTA ausschließlich im geraden Abschnitt des proximalen Tubulus (*Pars recta*) auftraten, der sich hauptsächlich aus  $S_3$ -Zellen zusammensetzt. Diese Zellen zeichnen sich im Gegensatz zu Zellen des gewundenen Abschnitts (*Pars convoluta*;  $S_1$ - und die meisten  $S_2$ -Zellen) durch einen sehr langen Bürstensaum und geringe Einfaltungen der



Basalmembran aus. Des weiteren besitzen  $S_3$ -Zellen kleinere Mitochondrien und verfügen über einen schwächer ausgebildeten Endozytoseapparat als die anderen Zelltypen des proximalen Tubulusepithel (Sands und Verlander 2005). Zum Vergleich zeigt Abb. 3.6 eine typische  $S_2$ - bzw.  $S_3$ -Zelle aus dem proximalen Tubulusepithel.

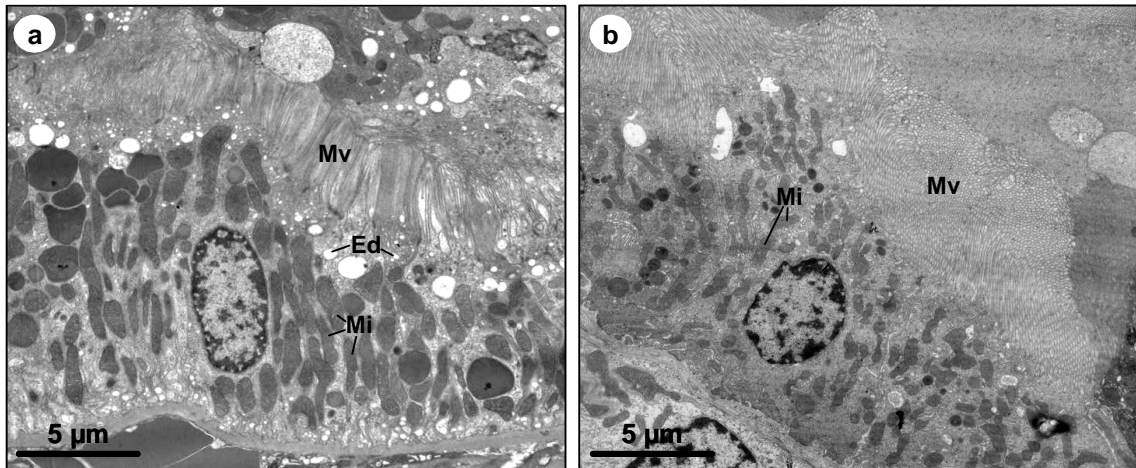


Abb. 3.6: Proximale Tubulusepithelzellen vom  $S_2$ - (a) bzw.  $S_3$ -Typ (b) aus der Niere einer unbehandelten F344/N-Ratte.  $S_2$ -Zellen besitzen eine stark eingefaltete Basalmembran und dazwischen liegende, große Mitochondrien (Mi; „basale Streifung“). An der apikalen Zellseite befinden sich zahlreiche Endosomen (Ed).  $S_3$ -Zellen haben im Vergleich zu  $S_2$ -Zellen einen längeren Bürstensaum (Mv, Mikrovilli), jedoch kaum Einfaltungen der Basalmembran, kleinere Mitochondrien und einen schwach ausgebildeten Endozytoseapparat.

Der Vergleich von Nierenzellen aus Ratten, die 90 Tage mit 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden, mit Zellen aus Kontrolltieren zeigte, das OTA in Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Histopathologie spezifisch in proximalen Tubulusepithelzellen des  $S_3$ -Typs morphologische Veränderungen induzierte, während  $S_1$ - und  $S_2$ -Zellen behandelter Tiere keine eindeutigen mikroskopischen Auffälligkeiten im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen. Auch in anderen Zelltypen der Nierenrinde und des äußeren Marks, z. B. Zellen der Nierenkörperchen und distalen Tubuli, waren keine OTA-abhängigen strukturelle Abnormalitäten erkennbar.

Der markanteste Effekt in den Zielzellen von OTA war die enorme Vergrößerung der Zellkerne, die mit einer Zunahme des Zellvolumens einherging (Abb. 3.7). Während die Größe von Zellkernen aus normalen proximalen Tubulusepithelzellen bei 6-7 µm lag, wurden bei OTA-behandelten Tieren Nuklei mit einem Durchmesser von bis zu 17 µm beobachtet. In einigen dieser Zellen traten mehrere Kernanschnitte auf, was auf einen

stark gelappten Nukleus oder auf das Vorhandensein multipler Kerne hindeutet. Zellen mit solch vergrößerten Kernen unterschieden sich ansonsten nicht wesentlich von normalen Zellen. Die einzigen Auffälligkeiten waren eine intrazelluläre Ansammlung von Lipidtropfen und, verglichen mit Kontrollzellen, ein deutlich kürzerer Bürstensaum. Des weiteren schien die Anzahl der Mitochondrien in einigen betroffenen Zellen stark erhöht zu sein; die Organellen waren in diesem Fall deutlich kleiner als in normalen S<sub>3</sub>-Zellen. Andere Zellen enthielten Mitochondrien, die einen geschwollenen Phänotyp aufwiesen, wie es auch in einigen früheren Studien bei verschiedenen Tierarten nach OTA-Exposition gezeigt worden war (Dwivedi *et al.*, 1984; Kumar *et al.*, 2007; Stoev *et al.*, 2001). Aufgrund einer geringen Anzahl an qualitativ vergleichbaren Kontrollzellen konnte jedoch keine quantitative Analyse dieser Effekte gemacht werden.

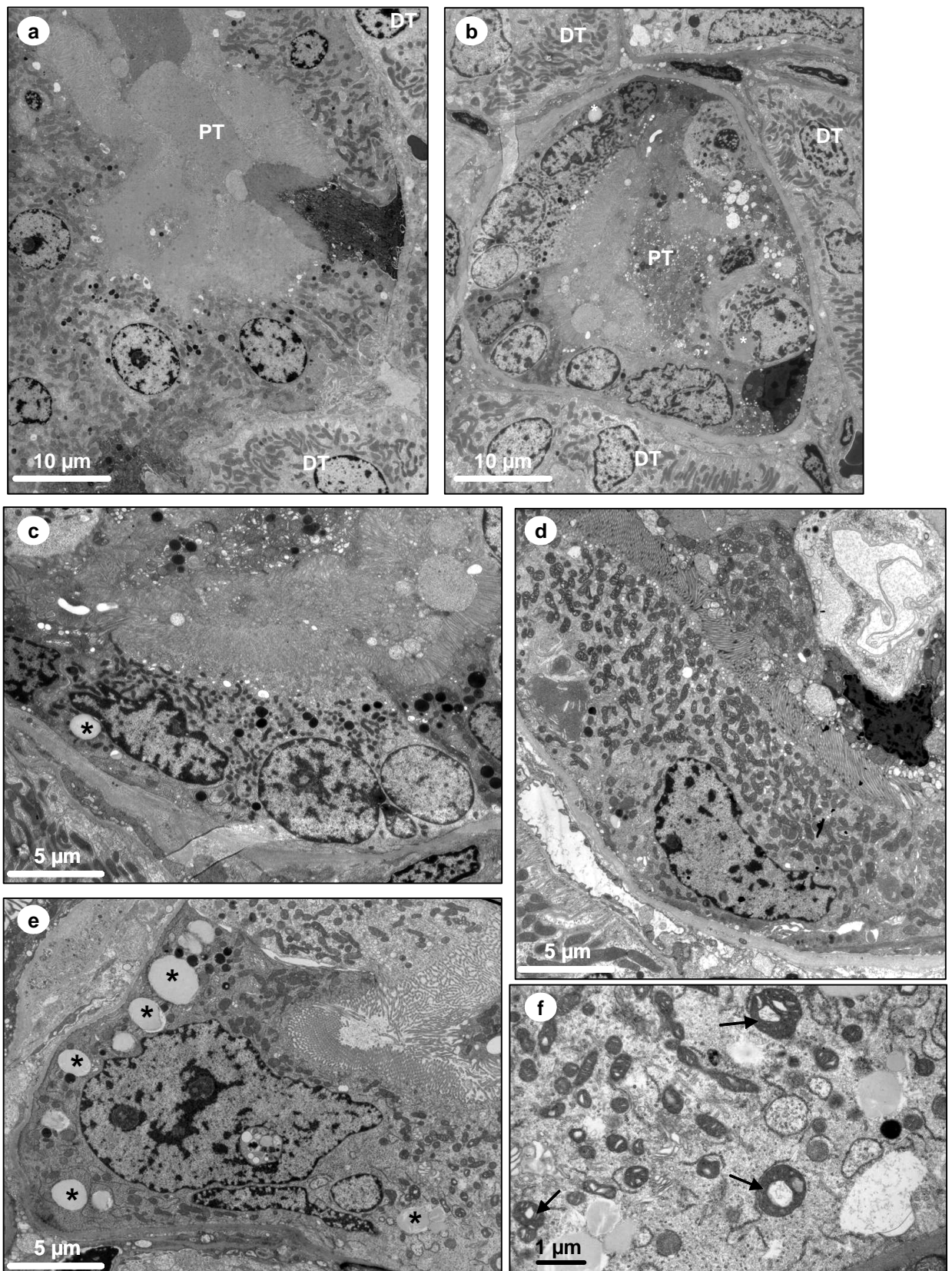


Abb. 3.7: Proximale Tubulusepithelzellen ( $S_3$ -Typ) aus der Niere von OTA-behandelten Ratten (210  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ , 90 Tage). Die Abbildungen (a) und (b) zeigen jeweils einen repräsentativen Querschnitt durch einen proximalen Tubulus (PT) aus der Niere

eines Kontrolltiers (a) und eines behandelten Tieres (b). Zum Vergleich wurden distale Tubuli (DT) gekennzeichnet. Die Abbildungen (c) bis (e) zeigen drei abnormale proximale Tubulusepithelzellen aus OTA-behandelten Tieren. Markante strukturelle Veränderungen sind vor allem vergrößerte, gelappte Zellkerne, ein kurzer Bürstensaum und das Vorkommen von Lipidvesikeln (\*). Zum Teil war die Anzahl der Mitochondrien in solchen Zellen erhöht (d), andere Zellen (e) enthielten geschwollene Mitochondrien (vergrößerter Bildausschnitt in (f)).

### 3.1.2.8 Klinische Chemie und Urinanalyse

Im Allgemeinen führte die Behandlung mit OTA zu nur geringen Veränderungen von klinisch-chemischen Parametern in Blut und Urin (Tab. 3.2 und Tab. 9.1, Anhang). Die schwach nephrotoxischen Effekte von OTA (s. 3.1.2.6) hatten keinen Effekt auf Standardparameter der Urinanalyse, wie z.B. Urinvolumen oder Kreatinin-, Protein- oder Glukosegehalt. Des Weiteren führte die Behandlung des Toxins nicht zu veränderten Harnstoff-Spiegeln im Blut. In Hochdosistieren konnte nach 90 Tagen ein leichter Anstieg des Kreatinin-Spiegels im Blut nachgewiesen werden (1,2-fache Erhöhung gegenüber Kontrolltieren). Die Messung der Aktivität verschiedener Enzyme aus Tubulusepithelzellen im Urin zeigte eine leicht erhöhte Freisetzung von  $\beta$ -N-Acetyl-D-glucosaminidase ( $\beta$ -NAG) nach 28 und 90 Tagen bei Tieren, die mit 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt worden waren (1,7- bzw. 1,3-fache Erhöhung). Des Weiteren wurden nach 90 Tagen im Urin von Mittel- und Hochdosistieren erniedrigte Werte für  $\gamma$ -Glutamyltransferase ( $\gamma$ -GT) gemessen (60%-ige bzw. 20%-ige Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe). Da  $\gamma$ -GT ein Bürstensaum-Enzym von proximalen Tubulusepithelzellen ist, hängt die verringerte Enzymaktivität vermutlich mit dem Verlust des Bürstensaums durch Toxizität und Dedifferenzierung der Zellen während der Regeneration des geschädigten Gewebes zusammen (s. Abschnitt 1.2.3). Daneben wurde bei Tieren, die mit 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt worden waren, ein Anstieg der Erythrozyten- und Leukozytenzahl im Urin festgestellt, der möglicherweise mit der Gewebeschädigung in der Niere oder in den ableitenden Harnorganen zusammenhängt.

Interessanterweise führte die wiederholte Exposition mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG Ochratoxin A nach 90 Tagen zu einem signifikanten Anstieg der Kalziumkonzentration im Plasma, die mit einer leichten Abnahme der Kalziumkonzentration im Urin einherging (nur Hochdosistiere).

In Übereinstimmung mit den histopathologischen Daten und Ergebnissen aus früheren Studien (Mally *et al.*, 2005b; NTP 1989) wurde im Plasma nach Behandlung mit

Ochratoxin A keine erhöhte Aktivität von Enzymmarkern für Lebertoxizität gemessen. Dagegen wurde nach 28 und 90 Tagen wiederholter Exposition mit OTA eine erniedrigte Aktivität der Alkalischen Phosphatase gemessen. Auch bei anderen Parametern in Blut und Urin kam es bei OTA-behandelten Tieren vereinzelt zu signifikanten Änderungen, z.B. bei der Kalium- oder Triglyceridkonzentration im Plasma (s. Tab. 9.1, Anhang). Da diese Effekte jedoch keine Zeit- und Dosisabhängigkeit aufwiesen, wurden sie nicht als eindeutig substanzabhängig angesehen.

Tab. 3.2: Klinische Chemie und Urinanalyse nach Behandlung von F344/N-Ratten mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA für 14, 28 bzw. 90 Tage. (Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 5)). Statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe sind mit \*p < 0,05 und \*\*p < 0,01 (ANOVA + Dunnett's Test) bzw. <sup>†</sup>p < 0,05 (Kruskal Wallis + Steel Test) gekennzeichnet. Abkürzungen: β-NAG, N-Acetyl-β-D-glucosaminidase, γ-GT, γ-Glutamyltransferase, n.d., nicht detektiert, RBC, *red blood cells* (rote Blutzellen); WBC, *white blood cells* (weiße Blutzellen).

	Zeit [d]	OTA [µg/kg KG]			
		0	21	70	210
<b>Urinanalyse</b>					
<b>Volumen</b>	14	13,5 ± 6,0	16,0 ± 10,8	15,4 ± 6,4	13,6 ± 3,3
	28	9,1 ± 4,0	11,1 ± 5,3	6,2 ± 1,4	5,8 ± 1,5
	90	8,8 ± 4,0	5,2 ± 3,5	8,2 ± 4,4	9,9 ± 1,7
<b>Relative Dichte [rel. 1]</b>	14	1,03 ± 0,02	1,02 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,02 ± 0,01
	28	1,03 ± 0,01	1,02 ± 0,01	1,03 ± 0,00	1,03 ± 0,01
	90	1,03 ± 0,01	1,04 ± 0,01	1,03 ± 0,01	1,02 ± 0,00
<b>Osmolalität [mosmol/kg]</b>	14	430 ± 168	403 ± 356	377 ± 109	479 ± 192
	28	746 ± 284	609 ± 276	951 ± 97	906 ± 135
	90	655 ± 248	1014 ± 370	744 ± 157	564 ± 74
<b>pH-Wert</b>	14	7.2 ± 0.8	7.7 ± 0.7	7.3 ± 0.7	7.4 ± 0.9
	28	6.6 ± 0.4	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.4	7.2 ± 1.0
	90	6.8 ± 0.3	6.6 ± 0.4	6.9 ± 0.2	6.7 ± 0.3
<b>Kreatinin [mg/20h]</b>	14	5,83 ± 1,03	6,00 ± 1,37	6,08 ± 0,79	5,84 ± 0,52
	28	6,19 ± 0,70	5,78 ± 1,67	5,63 ± 1,13	3,93 ± 1,27
	90	7,94 ± 0,86	6,83 ± 1,90	8,27 ± 1,48	8,57 ± 0,65
<b>Proteingehalt [g/l]</b>	14	0.10 ± 0.14	0.05 ± 0.11	0.15 ± 0.14	0.20 ± 0.11
	28	0.20 ± 0.11	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00
	90	0.20 ± 0.11	0.35 ± 0.22	0.25 ± 0.00	0.25 ± 0.00
<b>β-NAG [mU/mg Kreatinin]</b>	14	11,4 ± 2,2	10,2 ± 3,0	11,6 ± 3,3	15,3 ± 1,6
	28	12,2 ± 1,4	10,9 ± 1,5	11,5 ± 0,7	20,8 ± 2,0 **
	90	8,2 ± 1,2	6,5 ± 1,0	8,1 ± 0,7	10,6 ± 1,3 **
<b>γ-GT [U/mg Kreatinin]</b>	14	2,22 ± 0,59	1,64 ± 0,28	2,15 ± 0,86	2,56 ± 0,69
	28	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	90	1,98 ± 0,36	1,76 ± 0,13	1,16 ± 0,09 **	0,48 ± 0,04 **

	Zeit [d]	OTA [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ]			
		0	21	70	210
<b>Ketone [mmol/l]</b>	14	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2	0.1 $\pm$ 0.2
	28	0.6 $\pm$ 0.6	0.5 $\pm$ 0.6	1.0 $\pm$ 0.6	0.9 $\pm$ 0.6
	90	0.3 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.6	0.3 $\pm$ 0.3	0.0 $\pm$ 0.0
<b>Erythrozyten [pro <math>\mu\text{l}</math>]</b>	14	4 $\pm$ 6	2 $\pm$ 5	2 $\pm$ 5	25 $\pm$ 0 <sup>+</sup>
	28	13 $\pm$ 7	8 $\pm$ 5	21 $\pm$ 8	50 $\pm$ 0 <sup>+</sup>
	90	11 $\pm$ 9	21 $\pm$ 18	40 $\pm$ 14	45 $\pm$ 11 <sup>+</sup>
<b>Leukozyten [pro <math>\mu\text{l}</math>]</b>	14	10 $\pm$ 14	5 $\pm$ 11	5 $\pm$ 11	20 $\pm$ 11
	28	20 $\pm$ 11	10 $\pm$ 14	38 $\pm$ 43	85 $\pm$ 34
	90	20 $\pm$ 11	25 $\pm$ 0	85 $\pm$ 34	70 $\pm$ 41
<b>RBC score 0/3</b>	90	0	1	0	0
<b>WBC score 0/3</b>	90	0	0	1	1 <sup>+</sup>
<b>Natrium (Na<sup>+</sup>) [mM]</b>	14	17,3 $\pm$ 4,8	19,8 $\pm$ 17,5	17,2 $\pm$ 4,3	18,8 $\pm$ 3,4
	28	40,8 $\pm$ 13,7	35,6 $\pm$ 13,8	58,7 $\pm$ 22,9	70,3 $\pm$ 17,2
	90	28,5 $\pm$ 14,1	47,1 $\pm$ 25,5	35,1 $\pm$ 13,7	25,7 $\pm$ 7,11
<b>Kalium (K<sup>+</sup>) [mM]</b>	14	65,5 $\pm$ 33,2	56,5 $\pm$ 68,5	53,0 $\pm$ 13,4	59,5 $\pm$ 15,9
	28	75,7 $\pm$ 19,4	77,1 $\pm$ 31,7	84,3 $\pm$ 38,8	78,7 $\pm$ 46,5
	90	69,9 $\pm$ 30,8	123,4 $\pm$ 47,0	83,6 $\pm$ 20,6	57,9 $\pm$ 10,9
<b>Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) [mM]</b>	14	1,12 $\pm$ 1,06	1,61 $\pm$ 1,19	2,62 $\pm$ 2,28	2,56 $\pm$ 1,87
	28	1,31 $\pm$ 0,53	0,81 $\pm$ 0,74	0,86 $\pm$ 0,23	0,85 $\pm$ 0,22
	90	1,23 $\pm$ 0,51	2,64 $\pm$ 1,88	1,43 $\pm$ 0,38	0,63 $\pm$ 0,17
<b>Phosphat (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) [mM]</b>	14	10,63 $\pm$ 11,12	6,71 $\pm$ 14,13	238,68 $\pm$ 520,77	7,72 $\pm$ 12,74
	28	15,15 $\pm$ 10,55	11,01 $\pm$ 9,22	28,27 $\pm$ 4,71	16,32 $\pm$ 9,88
	90	13,72 $\pm$ 2,89	22,00 $\pm$ 21,79	13,49 $\pm$ 6,27	19,69 $\pm$ 6,22
<b>Klinische Chemie im Blut</b>					
<b>Harnstoff [mM]</b>	14	4,84 $\pm$ 0,29	4,68 $\pm$ 0,67	5,11 $\pm$ 0,24	5,12 $\pm$ 0,24
	28	7,32 $\pm$ 0,49	5,83 $\pm$ 0,90 **	7,69 $\pm$ 0,88	6,67 $\pm$ 0,24
	90	6,25 $\pm$ 1,10	5,79 $\pm$ 0,97	6,06 $\pm$ 0,49	5,38 $\pm$ 1,01
<b>Kreatinin [mg/l]</b>	14	2,43 $\pm$ 0,13	2,56 $\pm$ 0,11	4,63 $\pm$ 5,03	5,52 $\pm$ 4,92
	28	2,83 $\pm$ 0,20	2,95 $\pm$ 0,15	2,59 $\pm$ 0,14	2,69 $\pm$ 0,23
	90	3,29 $\pm$ 0,30	3,35 $\pm$ 0,34	3,61 $\pm$ 0,09	4,00 $\pm$ 0,19 **
<b>Kalzium (Ca<sup>2+</sup>) [mM]</b>	14	2,43 $\pm$ 0,06	2,40 $\pm$ 0,07	2,48 $\pm$ 0,08	2,54 $\pm$ 0,03 *
	28	2,44 $\pm$ 0,06	2,42 $\pm$ 0,05	2,37 $\pm$ 0,02	2,41 $\pm$ 0,04
	90	2,58 $\pm$ 0,06	2,52 $\pm$ 0,08	2,70 $\pm$ 0,05 *	2,71 $\pm$ 0,06 *

### 3.1.2.9 Hämatologie

Auch die Analyse der Blutzellen ergab nur geringe Veränderungen in OTA-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren (s. Tab. 9.2, Anhang). Nach vier Wochen wurde in Ratten, die mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  behandelt wurden, eine verminderte Anzahl an Retikulozyten und ein dosisabhängiger Anstieg der Leukozytenzahl verzeichnet. Dieser

Effekt wurde auch nach 13 Wochen beobachtet, allerdings in geringerem Maße als zu dem früheren Zeitpunkt. Die differentielle Analyse der Leukozytenzahl ergab eine dosisabhängige Abnahme der Neutrophilen und Eosinophilen bei gleichzeitigem Anstieg der Zahl an Lymphozyten und weiteren großen Zellen, die nicht mit Standardmethoden der Hämatologie identifiziert werden können.

#### **3.1.2.10 Zusammenfassung**

Die wiederholte Exposition von F344/N-Ratten mit 70 und 210 µg/kg KG Ochratoxin A führte zu toxischen Effekten in der Niere, nicht aber in der Leber, obgleich es in beiden Organen zu einer vergleichbaren Akkumulation des Toxins kam (Abschnitt 3.1.1). Dagegen wurde bei einer Behandlung mit 21 µg/kg KG OTA bis zum Ende der Studie keine toxische Wirkung festgestellt (histopathologischer NOEL).

Die Zielzellen von OTA waren S<sub>3</sub>-Zellen aus dem geraden Abschnitt des proximalen Tubulus, in denen OTA die Degeneration einzelner Zellen induzierte. Zugleich konnte in den Zellen eine Zunahme der Zellkerngröße und die Ansammlung von Lipidvesikeln beobachtet werden. Diese Effekte traten frühzeitig im Laufe der Behandlung ein und verstärkten sich mit der Zeit.

Die nephrotoxische Wirkung von Ochratoxin A konnten mit Routinemethoden (klinische Chemie und Urinanalyse) erst zu einem späten Zeitpunkt detektiert werden. Des Weiteren waren selbst nach 90 Tagen Exposition mit der Hochdosis (210 µg/kg KG) nur schwache Effekte auf die traditionellen Marker für Nephrotoxizität zu verzeichnen.

### 3.1.3 Ochratoxin A-abhängige Effekte auf die Proliferation von Zellen in Niere und Leber

Neben seinen nephrotoxischen Eigenschaften in verschiedenen Tierarten stellt OTA in Ratten ein bedeutendes Nierenkanzerogen dar. Mit der Untersuchung der Proliferation sollte in dieser Arbeit eine alternative Strategie zur Prüfung auf kanzerogene Eigenschaften von Substanzen getestet werden, wonach krebsauslösende Substanzen bereits in subchronischen Studien anhand von Effekten auf die Zellteilungsrate identifiziert werden sollen.

Die Messung der Zellproliferation durch die Markierung neusynthetisierter DNA mit 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) zeigte, dass die wiederholte Exposition mit 70 und 210 µg/kg KG Ochratoxin A in männlichen F344/N-Ratten zu einem deutlichen, zeit- und dosis-abhängigen Anstieg der Zellproliferation am spezifischen Zielort des Toxins führte, den proximalen Tubulusepithelzellen in den Markstrahlen und im äußeren Mark (*Pars recta*) (Abb. 3.8). In Nieren von Kontrolltieren und Ratten, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, war das Zellteilungsmuster in den Tubuli zufällig und die Proliferation nahm mit dem zunehmenden Alter der Tiere als Folge der Organreifung ab. Dagegen führte die Behandlung mit 70 und 210 µg/kg KG OTA zu einer klaren Veränderung des Zellteilungsmusters, die zuerst Epithelzellen von S<sub>3</sub>-Tubuli an der kortiko-medullären Grenze im äußeren Streifen des äußeren Marks betraf. Bei Tieren der Hochdosisgruppe konnte man dort bereits nach 14 Tagen vereinzelt Tubuli oder Cluster von Tubuli erkennen, in denen zahlreiche Zellen BrdU-positiv gefärbt waren (Abb. 3.9). In den betroffenen Tubuli wurde zudem die Degeneration einzelner Zellen und in anderen Zellen eine Zunahme der Zellkerngröße beobachtet, was spezifische Effekte der Exposition mit OTA sind (s. 3.1.2.6).

Diese Cluster weiteten sich mit der Zeit auf die tieferen Bereiche des äußeren Streifen des äußeren Marks und die Markstrahlen aus, sodass nach 90-tägiger Behandlung mit 210 µg/kg KG OTA nahezu alle S<sub>3</sub>-Tubuli BrdU-positiv Zellen aufwiesen (Abb. 3.8). Parallel zum Anstieg der Zellteilungsrate im geraden Segment der proximalen Tubuli wurde im Vergleich zu Kontrollnieren eine Abnahme der Proliferation im Kortex (ohne Markstrahlen) festgestellt.



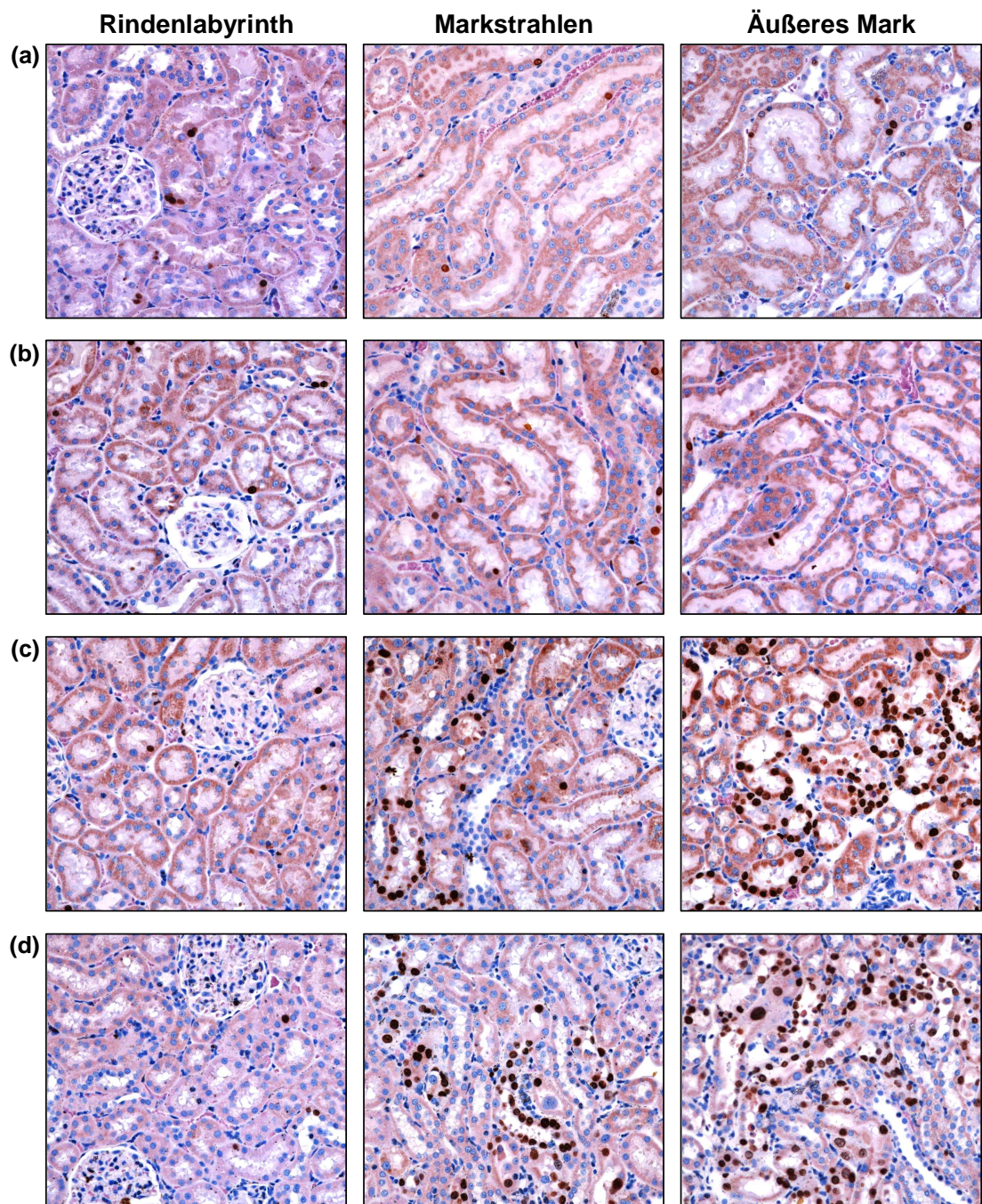


Abb. 3.8: BrdU-Färbung in Nieren aus männlichen F344/N-Ratten nach 90-tägiger Behandlung mit 0 (a), 21 (b), 70 (c) oder 210 (d)  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA. OTA führte in proximalen Tubuli in Markstrahlen und im äußeren Mark zu einem dramatischen Anstieg der Zellproliferation. Keine Veränderungen der Zellteilungsrate traten dagegen in Zellen des Rindenlabyrinths auf. 200-fache Vergrößerung.

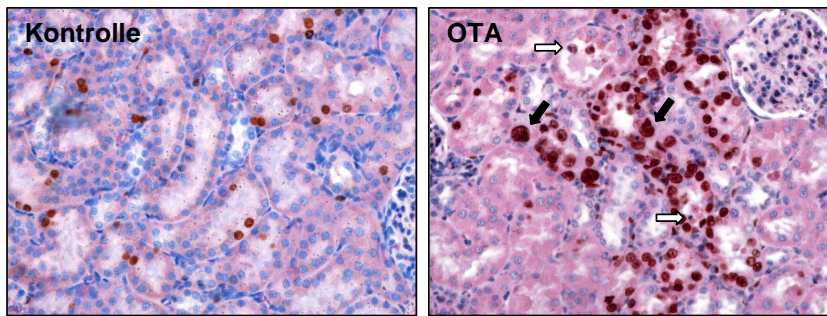


Abb. 3.9: BrdU-positives Zellcluster im äußeren Mark (Markstrahl) nach 14-tägiger Behandlung mit 210 µg/kg KG OTA. Deutlich zu erkennen sind auch die charakteristischen histopathologischen Veränderungen, die OTA in der Niere verursacht (Zelldegeneration, weißer Pfeil, ⇨; Zellkernvergrößerung, schwarzer Pfeil, ⇨). 200-fache Vergrößerung.

Die Quantifizierung der BrdU-positiven Zellen im Außenstreifen des äußeren Marks und im Kortex (nur Rindenlabyrinth, keine Markstrahlen) zeigte bei Hoch- und Mitteldosistieren einen signifikanten Anstieg der Zellproliferation nach 4 bzw. 13 Wochen; die Zahl an BrdU-positiven Zellen nahm im Vergleich zur Kontrolle im äußeren Mark um das 10-fache zu. Dagegen wurde im Kortex nach Behandlung mit OTA eine zeit- und dosisabhängige Abnahme der Proliferation beobachtet (Abb. 3.10).

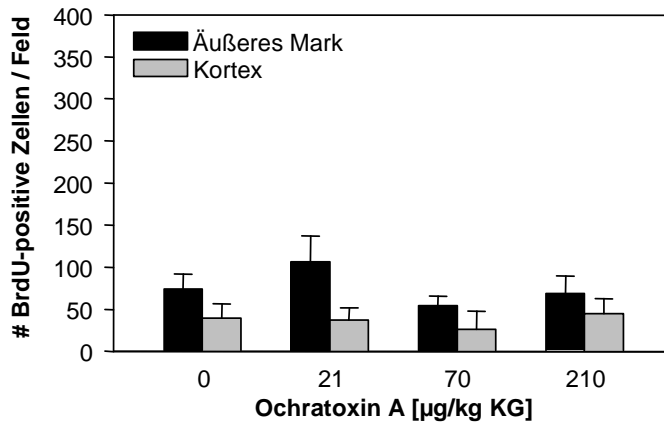
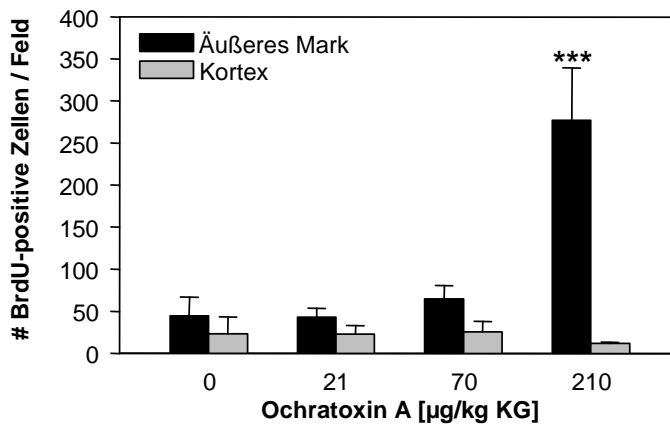
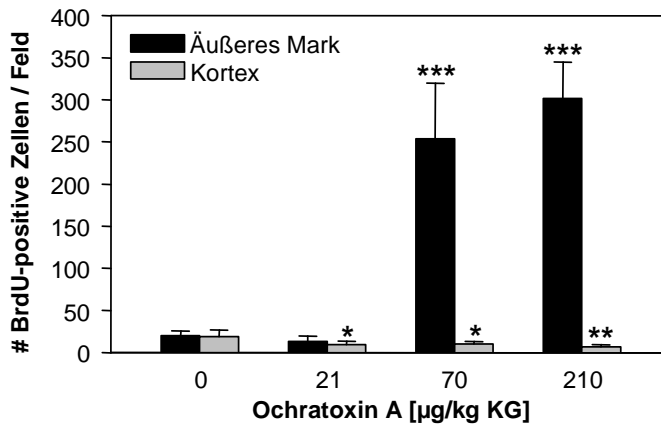
**(a) 14 Tage****(b) 28 Tage****(c) 90 Tage**

Abb. 3.10: Quantifizierung von BrdU-positiven Zellen im äußeren Mark bzw. im Kortex (ohne Markstrahlen) von Nieren aus männlichen F344/N-Ratten, die 14 (a), 28 (b) oder 90 Tage (c) mit 0, 21, 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$  OTA behandelt worden waren (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung pro Feld bei 200-facher Vergrößerung). Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA und Dunnett's Post Hoc-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

In Nieren von Tieren, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, sowie in der Leber traten dagegen keine Veränderungen der Zellteilung auf (Abb. 3.8 und Abb. 3.11), was gut mit dem histopathologischen NOEL dieser Studie übereinstimmt. Zudem war diese Dosis auch der *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) in der 2 Jahres-Kanzerogenitätsstudie mit OTA (NTP, 1989).

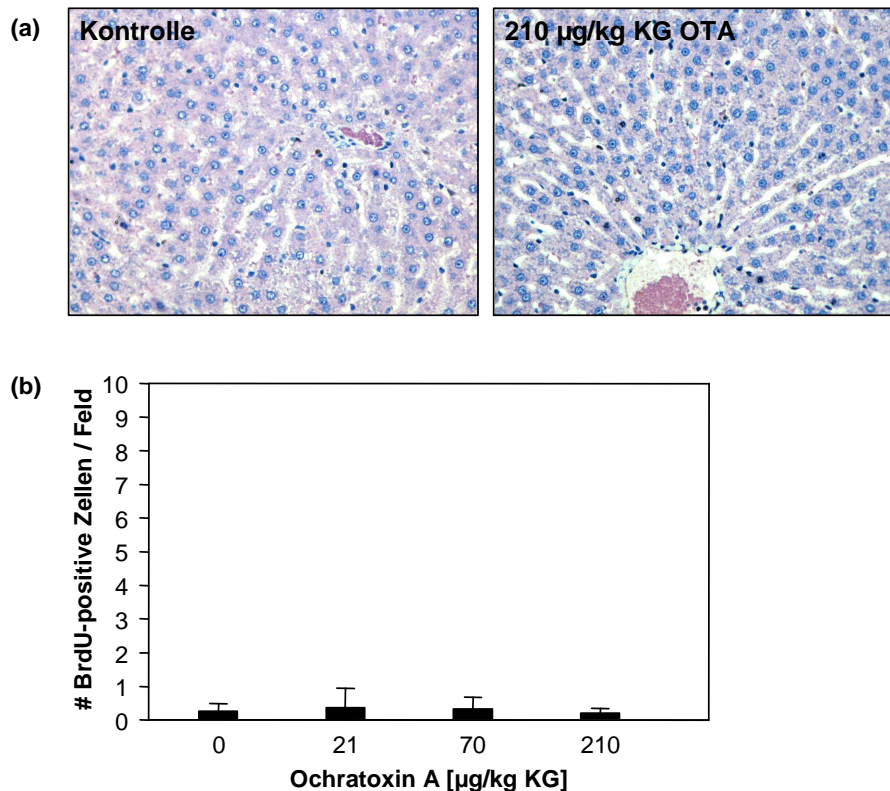


Abb. 3.11: BrdU-Färbung (a) und Quantifizierung positiv-gefärbter Zellen (b) in der Leber nach 90 Tagen Behandlung von männlichen F344/N-Ratten mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA. OTA führte in diesem Organ zu keinen Veränderungen der Zellproliferation.

Die wiederholte Behandlung mit krebserregenden Dosen Ochratoxin A (ab 70 µg/kg KG) führte somit bereits nach kurzer Zeit spezifisch in der Niere als Zielorgan für Kanzerogenität zu deutlichen Veränderungen der Zellteilungsrate.

### 3.1.4 Expression von neuen Biomarkern für Nephrotoxizität

In Abschnitt 3.1.2 wurde gezeigt, dass die wiederholte Behandlung mit 70 und 210 µg/kg KG Ochratoxin A in F344/N-Ratten zu einer fortschreitenden Schädigung des Nierengewebes im Bereich der proximalen Tubuli führte. Die Studie ist somit ein geeignetes Modell, um die Empfindlichkeit früher Marker für chronische Nephrotoxizität zu testen. Die Routinebestimmung klinisch-chemischer Parameter in Blut und Urin, die einen Hinweis auf nephrotoxische Wirkungen geben, zeigte die geringe Sensitivität dieser Marker. Im folgenden Abschnitt wird nun erläutert, welche Effekte die Behandlung mit OTA auf die Gen- und Proteinexpression von neuen Biomarkern hatte, die bis jetzt nur in Modellen für akute Nephrotoxizität getestet wurden. Zu den untersuchten Markern gehören *kidney injury molecule-1*, *LCN2*, *tissue inhibitor of metalloproteinases-1*, Osteopontin (*secreted phosphoprotein 1*), Clusterin, Vimentin und Hämoxxygenase-1. Obgleich alle diese Marker frühzeitige Indikatoren einer akuten Nierenschädigung sind, wurde ihre Sensitivität im Vergleich zu traditionellen Markern für Nephrotoxizität bei einem progressiven, chronischen Verlauf einer Nierenschädigung noch nicht untersucht.

#### 3.1.4.1 Expression von Markergenen im Nierengewebe Ochratoxin A-behandelter Ratten

Die wiederholte Exposition von männlichen F344/N-Ratten mit 70 und 210 µg/kg KG Ochratoxin A führte in der Niere zu einem dosis- und zeitabhängigen Anstieg der mRNA-Expression von Genen, die bisher als neue Marker für akute Nephrotoxizität gelten (Abb. 3.12). Die Induktion von *Kim-1* (*kidney injury molecule-1*), *Lcn-2* (Lipocalin-2), *Timp-1* (*tissue inhibitor of metalloproteinases-1*), *Spp1* (Osteopontin) und *Clu* (Clusterin) korrelierte gut mit den fortschreitenden pathologischen Veränderungen in der Niere und ging Änderungen von klinisch-chemischen Parametern zum Nachweis einer gestörten Nierenfunktion voraus. Im Gegensatz zur Mittel- und Hochdosisgruppe wurden in Nieren von Ratten, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, zu keinem Zeitpunkt signifikante Änderungen in der Genexpression im Vergleich zu Kontrolltieren festgestellt. Dieses Ergebnis bestätigt somit NOEL für histopathologische Veränderungen dieser Studie.

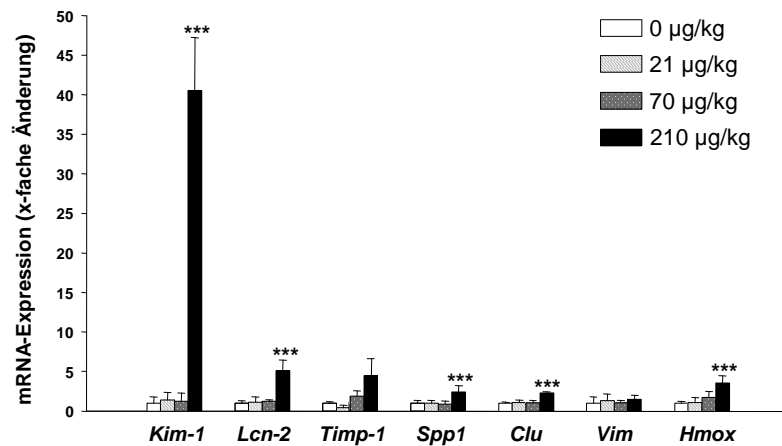
*Kim-1*, *Lcn-2* und *Timp-1* waren die Markergene, die nach Behandlung mit OTA am stärksten dereguliert wurden ( $\geq 10$ -facher Anstieg bei Mittel- und Hochdosistieren). Der Anstieg der *Kim-1* mRNA-Expression war zudem eine der frühesten Reaktionen der Niere auf die toxische Wirkung von OTA. Während in Kontroll- und Niedrigdosis-Tieren

die Expression dieses Gens konstant niedrig blieb, wurde *Kim-1* bereits nach 14 Tagen in allen Hochdosistieren und auch schon nach 28 Tagen in vier von fünf Tieren der mittleren Dosisgruppe induziert. Zu diesen Zeitpunkt waren in den Niere nur geringe histopathologische Effekte in Form von Zelldegeneration und Regeneration im Bereich der proximalen Tubuli zu beobachten. Der Grad dieser pathologischen Veränderungen in den einzelnen Tieren korrelierte mit der jeweiligen Expression von *Kim-1* in der Niere.

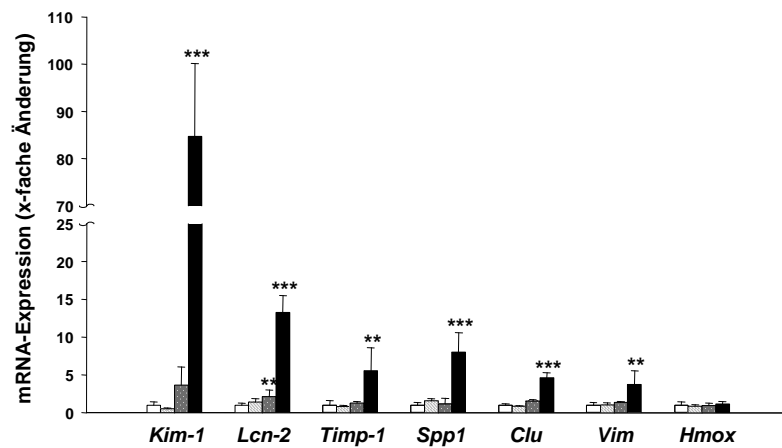
Auch die Expression von *Spp1* und *Clu* war nach 28-tägiger Behandlung mit 210 µg/kg KG OTA deutlich erhöht ( $\geq$  5-facher Anstieg). Im Gegensatz zu *Kim-1* war eine eindeutige Zunahme der mRNA-Expression von *Lcn-2*, *Spp1*, *Timp-1* und *Clu* in der Niere nach Behandlung mit 70 µg/kg KG OTA allerdings erst nach 90 Tagen zu messen.

Im Gegensatz zu *Kim-1*, *Lcn-2*, *Spp1*, *Timp-1* und *Clu* traten nur geringe Änderungen der Expression von *Hmox* (Hämoxygenase-1) und *Vim* (Vimentin) auf (2-3-facher Anstieg). Zudem war die Induktion von *Hmox* nicht zu allen Zeitpunkten konsistent. *Vim* wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe in Tieren der mittleren Dosisgruppe zu keinem Zeitpunkt der Studie verstärkt exprimiert.

## (a) 14 Tage



## (b) 28 Tage



## (c) 90 Tage

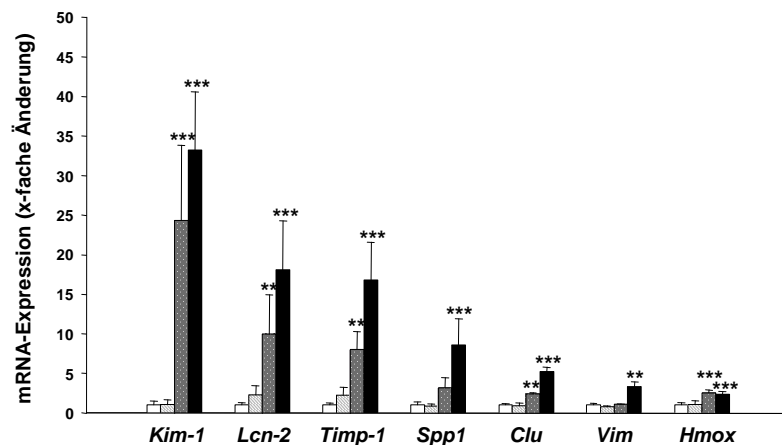


Abb. 3.12: Änderungen der mRNA-Expression von Markergenen für akute Nephrotoxizität in der Niere von männlichen F344/N-Ratten nach Behandlung mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA für 14 (a), 28 (b) oder 90 (c) Tage. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung relativ zur Kontrollgruppe angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA + Dunnett's Post Hoc-Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### **3.1.4.2 Immunhistochemische Lokalisation von Markerproteinen im Nierengewebe**

Um die Effekte auf mRNA-Ebene auch auf Ebene der Proteinexpression zu bestätigen und zusätzliche Informationen zur Lokalisation zu erhalten, wurden die Produkte der Markergene immunhistochemisch im Nierengewebe nachgewiesen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden für die Marker (Gen bzw. Protein) eine einheitliche Bezeichnung verwendet, die eine Abkürzung des Gen- und/oder Proteinnamens in Großbuchstaben darstellt.

#### **Kidney injury molecule-1 (KIM-1)**

KIM-1 wurde in der Niere von unbehandelten Tieren in einigen wenigen proximalen Tubuluszellen nachgewiesen, was vermutlich auf eine leichte Gewebeschädigung während der normalen Filtrierleistung zurückzuführen ist. Die 90-tägige Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA führte zu einem dramatischen Anstieg der KIM-1-Expression in proximalen Tubulusepithelzellen des äußeren Marks (Abb. 3.13b). Betroffene Nierentubuli wiesen Anzeichen von Zelldegeneration und Regeneration auf. Am stärksten war die Expression von KIM-1 an der apikalen (luminalen) Seite von Epithelzellen, die einen dedifferenzierten Phänotyp besaßen, d.h. abgeflachte Zellen ohne ausgeprägten Bürstensaum; zum Teil wurde das Protein dort auch diffus im Zytoplasma verteilt lokalisiert. In einigen Tubuli waren auch abgelöste Zellen und Zelltrümmer positiv für KIM-1 gefärbt. Interessanterweise wurde KIM-1 auch in Zellen nachgewiesen, die keinen veränderten Phänotyp aufwiesen, was auf eine äußerst frühzeitige Induktion des Markers hindeutet.

In guter Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Genexpressionsanalyse wurde KIM-1 bereits nach 14 Tagen in Nieren der Hochdosisgruppe nachgewiesen, und zwar spezifisch an Stellen mit OTA-bedingten histopathologischen Veränderungen wie Zelldegeneration und Zellkernvergrößerung (Abb. 3.13a). Dagegen wurde auch nach 90 Tagen keine verstärkte Expression von KIM-1 im Nierengewebe von Tieren nachgewiesen, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden. Somit korreliert die Induktion der mRNA-Expression von KIM-1 in Nierenzellen direkt mit einem Anstieg der Proteinsynthese.



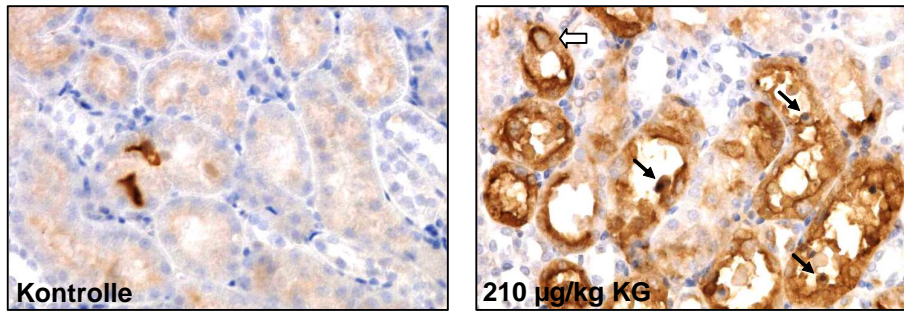
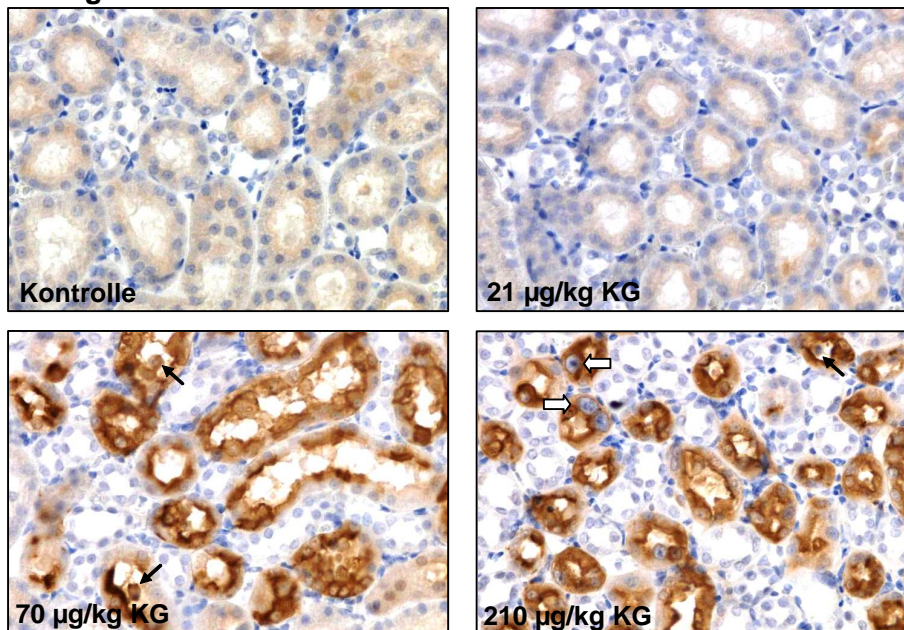
**(a) 14 Tage****(b) 90 Tage**

Abb. 3.13: Expression von KIM-1 im äußeren Streifen des äußeren Marks nach 14 (a) bzw. 90 (b) Tagen Behandlung von F344/N-Ratten mit bis zu 210 µg/kg KG OTA. Die wiederholte Exposition gegenüber 70 bzw. 210 µg/kg KG OTA führte zeit- und dosisabhängig zur Induktion von KIM-1 in proximalen Tubuli. Betroffene Tubuli wiesen meist für OTA charakteristische histopathologische Veränderungen wie Zelldegeneration (schwarze Pfeile, →) und Zellkernvergrößerung (weiße Pfeile, ⇨) auf (Antikörper von R&D Systems, Wiesbaden).

**Lipocalin-2 (LCN2)**

Obgleich die Genexpression von Lipocalin-2 (LCN2) infolge einer wiederholten Exposition mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA in annähernd gleichem Ausmaß zugenommen hatte wie die mRNA-Expression von KIM-1, waren Effekte auf die Proteinexpression von LCN2 nicht ersichtlich. Im Nierengewebe der F344/N-Ratten konnte das Protein nur am Bürstensaum einiger proximaler Tubuli, insbesondere im

inneren Bereich des äußeren Streifen des äußeren Marks detektiert werden. Die Behandlung mit bis zu 210 µg/kg KG OTA über 90 Tage führte selbst in stark geschädigten Nierentubuli nicht zu einer Steigerung der Proteinsynthese, noch zu einer veränderten Lokalisation von LCN2 (Abb. 3.14).

Da LCN2 im Rahmen dieses Versuchs nur schwach detektiert werden konnte, wurden weitere Experimente zur immunhistochemischen Lokalisation des Proteins in Wistar-Ratten nach Behandlung mit Gentamicin durchgeführt. Überraschenderweise wurden zwischen den beiden Rattenstämmen deutliche Unterschiede hinsichtlich der endogenen Produktion von LCN2 in der Niere festgestellt, die für eine Verwendung dieses Proteins als Biomarker eine Rolle spielen könnten. Während LCN2 bei männlichen F344/N-Ratten im Kortex nur am Bürstensaum weniger proximaler Tubuli detektiert wurde, konnte das Protein selbst bei unbehandelten Wistar-Ratten in zahlreichen apikalen Vesikeln nachgewiesen werden, wie es für sezernierte Proteine charakteristisch ist (s. Abschnitt 3.1.4.3, Urinproteine). Zudem konnte in Nierengewebe Gentamicin-behandelter Wistar-Ratten mit der beschriebenen immunhistochemischen Technik (Abschnitt 2.2.4.5) eine deutliche Zunahme LCN2-positiver Vesikel nachgewiesen werden, die mit einem Anstieg der Genexpression im Gewebe und der Proteinkonzentration im Urin korrelierte (Hoffmann *et al.*, 2008). Somit ist der in dieser Arbeit verwendete Antikörper für die Detektion von LCN2 im Gewebe prinzipiell geeignet, auch wenn die OTA-Behandlung in F344/N-Ratten keine ersichtliche Zunahme der Proteinexpression von LCN2 in der Niere zur Folge hatte.

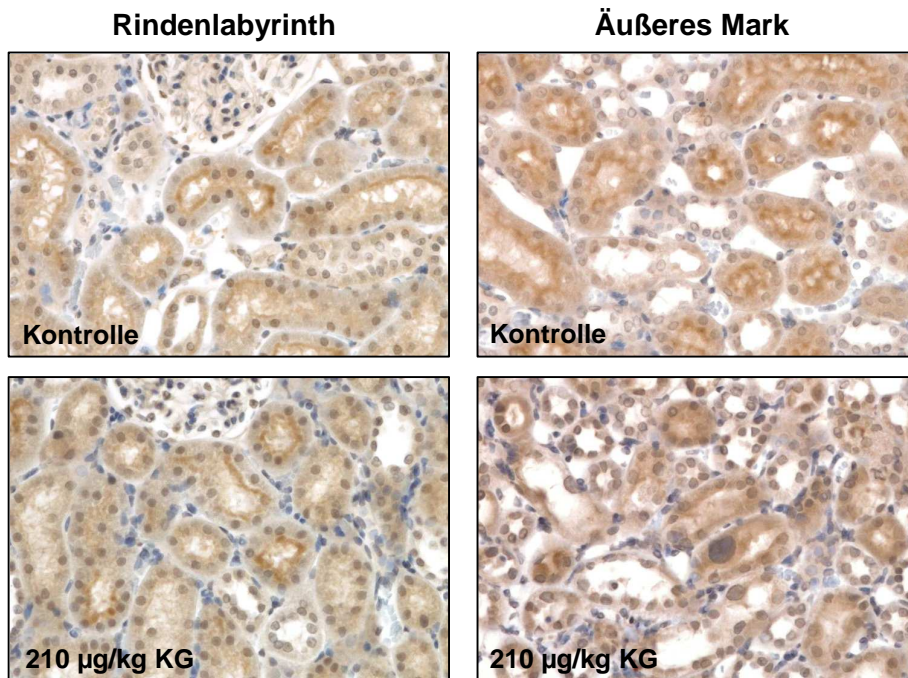
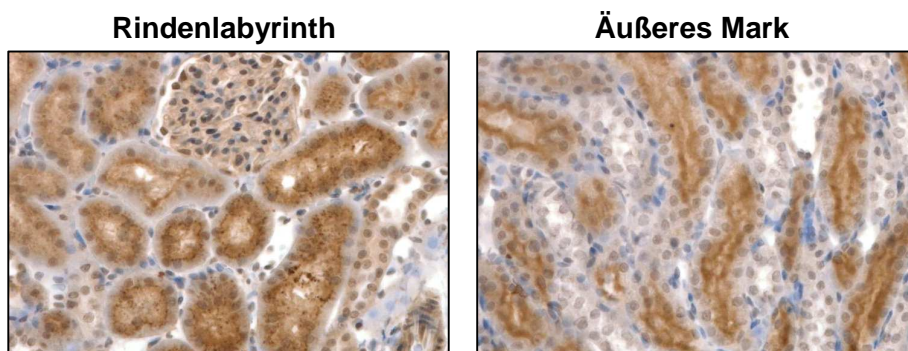
**(a) F344/N-Stamm****(b) Wistar-Stamm**

Abb. 3.14: Expression von LCN2 in renalen Tubulusepithelzellen im Rindenlabyrinth bzw. im Außenstreifen des äußeren Marks von Nieren aus F344/N-Ratten, die 90 Tage mit 0 bzw. 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden (a). LCN2 ist am Bürstensaum von einigen proximalen Tubulusepithelzellen lokalisiert, allerdings sind keine OTA-abhängigen Veränderungen zu erkennen. Im Unterschied zu F344/N-Ratten ist LCN2 bei Wistar-Ratten auch in intrazellulären Vesikeln von kortikalen Tubuli zu finden (b; s. Text).

### **Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)**

TIMP-1 wurde bei allen Tieren sowohl in proximalen Tubulusepithelzellen der Nierenrinde als auch des äußeren Marks detektiert, wobei sich die Lokalisation des Proteins in kortikalen Tubuli deutlich von der in Zellen im Nierenmark unterschied. In proximalen Tubulusepithelzellen der Nierenrinde befand sich TIMP-1 in vesikulären Strukturen, des weiteren wurden Aggregate im Tubuluslumen stark positiv gefärbt, was auf eine Sekretion von TIMP-1 hindeutet (Abb. 3.15a).

Interessanterweise wurde TIMP-1 bei gesunden Tieren in proximalen Tubulusepithelzellen des S<sub>3</sub>-Segmentes überwiegend an Zell-Zellkontakten und an der apikalen Seite, jedoch nicht in Vesikeln detektiert, sodass das Protein im Mark wohl eine andere Funktion als in der Nierenrinde besitzt (Abb. 3.15b).

Die wiederholte Exposition mit bis zu 210 µg/kg KG OTA über drei Monate hatte keinen Anstieg der Proteinexpression von TIMP-1 zur Folge, obgleich die mRNA-Expression in der Niere dosisabhängig deutlich zugenommen hatte. Im Gegenteil schien es in Tubuli des äußeren Marks sogar zu einer Abnahme der TIMP-1-Expression an den Zellgrenzen zu kommen. Allerdings wurden in diesem Bereich der Niere bei Tieren, die mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden, in einigen proximalen Tubulusepithelzellen TIMP-1-positive Vesikel detektiert, was sich deutlich von den Beobachtungen in Kontrollnieren unterschied. Die vesikulären Strukturen in den S<sub>3</sub>-Zellen waren im basalen Bereich deutlich stärker konzentriert als an der apikalen (luminalen) Seite. Somit führte die Behandlung mit OTA nicht – wie anhand der Genexpressionsanalyse erwartet – zu einer erhöhten Proteinkonzentration von TIMP-1, jedoch zu einer veränderten Lokalisation des Proteins in den Zielzellen der toxischen Wirkung von OTA (Abb. 3.15b).

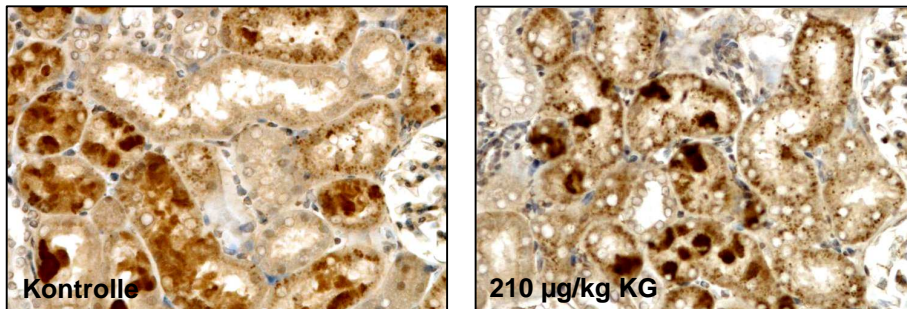
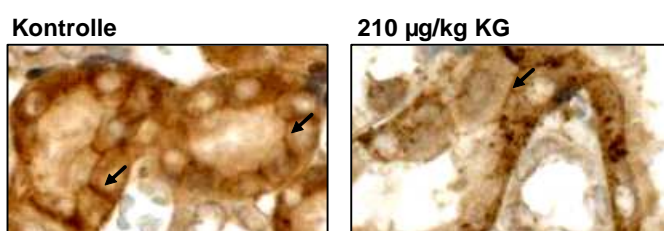
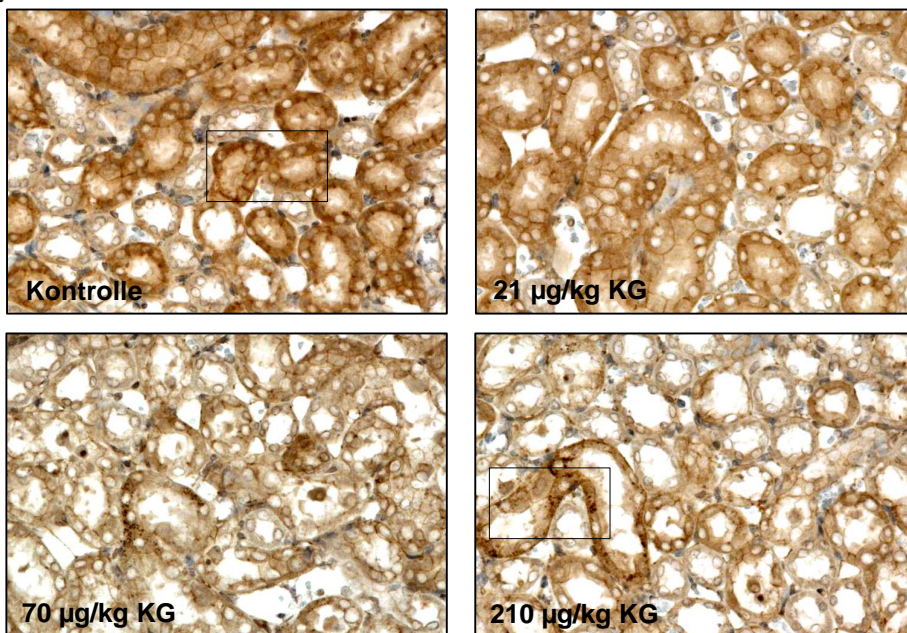
**(a) Rindenlabyrinth****(b) Äußeres Mark**

Abb. 3.15: Expression von TIMP-1 im Rindenlabyrinth (a) und im Außenstreifen des äußeren Marks (b) von Ratten, die 90 Tage mit bis zu 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt wurden. TIMP-1 wurde sowohl in kortikalen als auch medullären Tubuli konstitutiv exprimiert. Während TIMP-1 in proximalen Tubuli im Kortex in intrazellulären Vesikeln und in Aggregaten im Tubuluslumen zu finden war, war das Protein bei Tubuli im äußeren Mark überwiegend an der apikalen Seite und an Zell-Zell-Kontakten lokalisiert (s. vergrößerter Bildausschnitt der Kontrollniere). Die Behandlung mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA führte im äußeren Mark zu einer geringeren Expression von TIMP-1 an den Zellgrenzen, allerdings konnten in einigen Zellen positiv gefärbte Vesikel nachgewiesen werden (vergrößerte Bildausschnitte).

### Osteopontin (OPN)

OPN wurde bei allen Tieren in intrazellulären Vesikeln und am Bürstensaum von proximalen Tubuli lokalisiert (Abb. 3.16). Die wiederholte Behandlung mit 70 und 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA über drei Monate führte dosisabhängig in einigen Tubuli im äußeren Mark zu einer Zunahme von OPN-positiven Vesikeln. Auch konnte in Zellen mit einem dedifferenzierten Phänotyp eine apikale Expression des Proteins beobachtet werden. Zum Teil fand sich OPN auch auf der Oberfläche von degenerierten Zellen bzw. in Assoziation mit Zelltrümmern im Tubuluslumen. Somit korreliert die OTA-induzierte Zunahme der mRNA-Expression mit einer erhöhten Expression des OPN-Proteins in den Zielzellen von OTA.

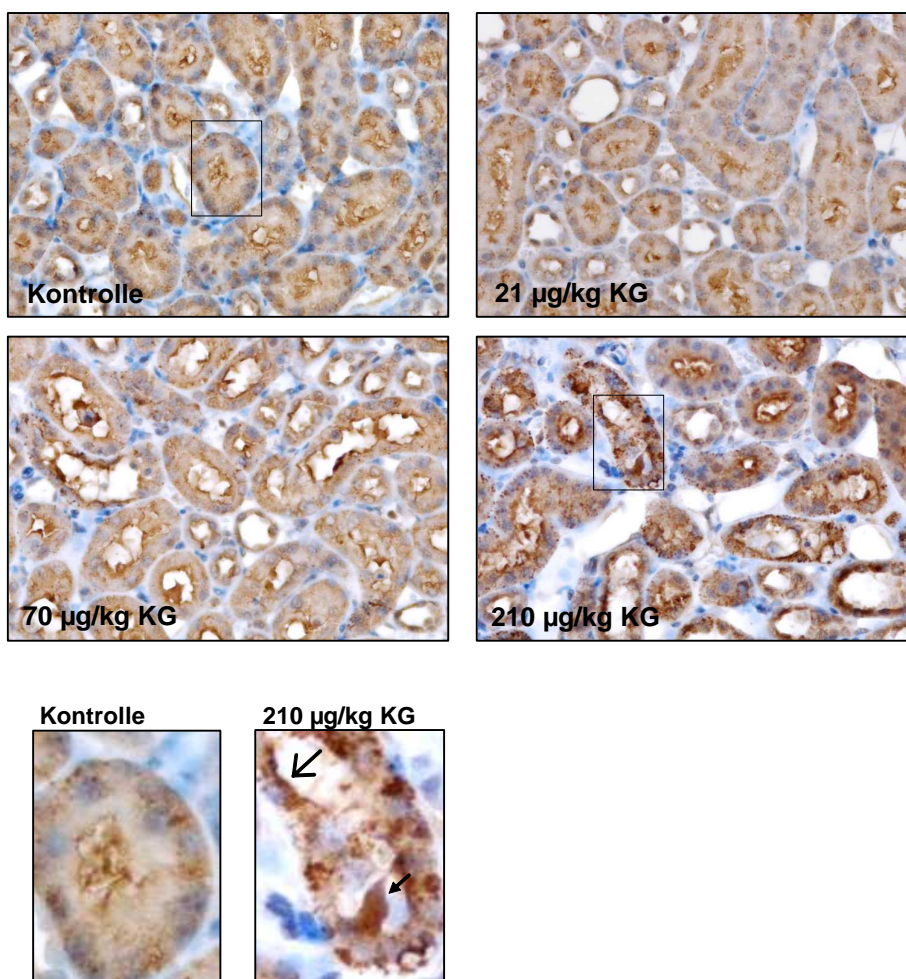


Abb. 3.16: OPN-Expression im äußeren Streifen des äußeren Marks von Nieren aus F344/N-Ratten nach Behandlung mit bis zu 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA über 90 Tage. OPN wurde bei allen Tieren in intrazellulären Vesikeln von proximalen Tubulusepithelzellen detektiert. Die Behandlung mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA führte zu einer Zunahme der Anzahl OPN-positiver Vesikel in Tubuli des äußeren Marks (s. vergrößerte Bildausschnitte). Des weiteren wiesen Zellen mit einem dedifferenzierten Phänotyp eine apikale Expression des Proteins auf ( $\rightarrow$ ). Zum Teil wurden auch tote Zellen und Zelltrümmer im Lumen der Tubuli angefärbt ( $\rightarrow$ ).

### **Clusterin (CLU)**

Wie TIMP-1 und OPN wurde auch Clusterin (CLU) bei allen Tieren konstitutiv in Nierentubulusepithelzellen gebildet. Des Weiteren fand sich das Protein in Zellen des Nierenkörperchens sowie des Interstitiums. Im Gegensatz zu den beiden anderen Proteinen wurde CLU jedoch nur in kortikalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen, wo es in Vesikeln an der apikalen Seite lokalisiert war, was auf eine Sekretion in den Urin hinweist (Abb. 3.17a).

Dagegen trat in Nierentubuli des äußeren Marks in Kontrolltieren und Ratten, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, keine positive Färbung für CLU auf. Allerdings führte die wiederholte Exposition gegenüber 70 oder 210 µg/kg KG OTA dosisabhängig zu einer Expression des Proteins in proximalen Tubuli, die deutliche Anzeichen für Degeneration und Regeneration aufwies. CLU konnte sowohl in Zellen mit einem dedifferenzierten Phänotyp als auch in toten Zellen bzw. in Assoziation mit Zelltrümmern im Tubuluslumen nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Lokalisation von CLU in kortikalen Tubulusepithelzellen befand sich das Protein in positiv gefärbten S<sub>3</sub>-Tubuli diffus im Zytoplasma verteilt (Abb. 3.17b).

Die Resultate auf Proteinebene entsprechen dem Ergebnis der mRNA-Expression nach 90 Tagen, sodass die Induktion der Genexpression offensichtlich direkt mit einem spezifischen Anstieg der CLU-Proteinsynthese in den Zielzellen von OTA korreliert.

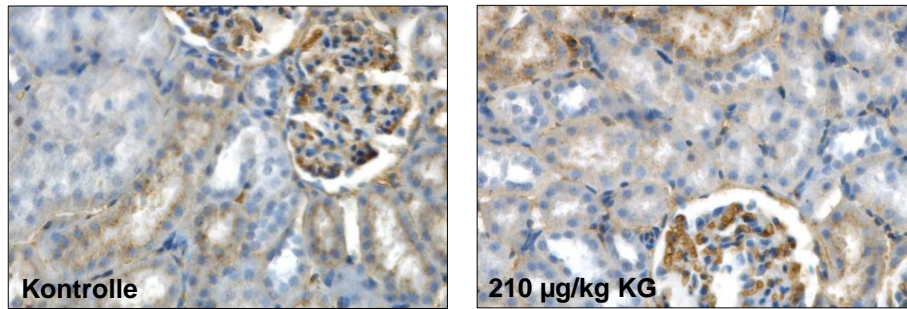
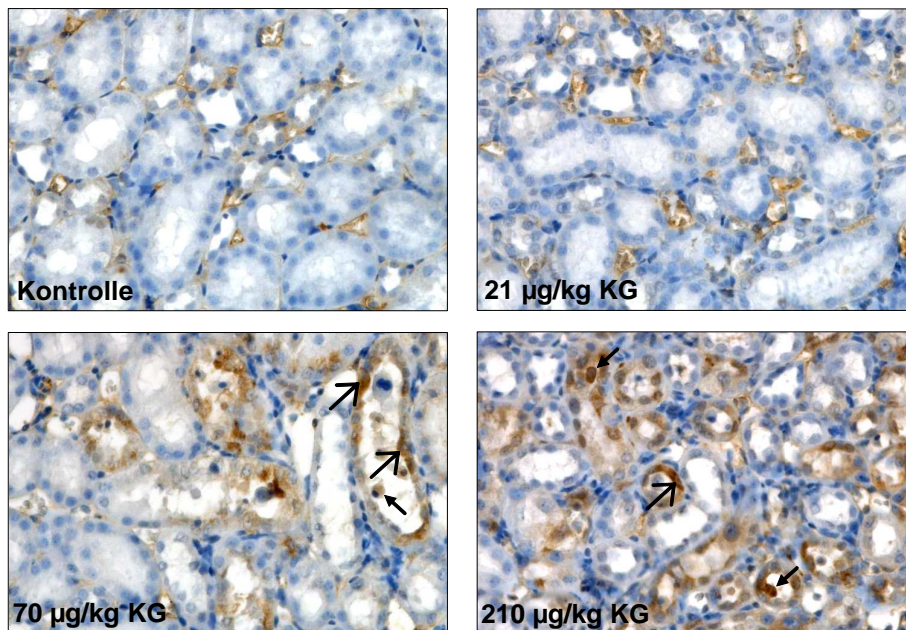
**(a) Rindenlabyrinth****(b) Äußeres Mark**

Abb. 3.17: Expression von CLU im Rindenlabyrinth (a) und im Außenstreifen des äußeren Marks (b) von Nieren aus F344/N-Ratten, die 90 Tage mit bis zu 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden. CLU wurde konstitutiv in einigen Tubuli der Nierenschale, in den Nierenkörperchen und in Zellen im Interstitium exprimiert. Die Exposition mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA führte zur Produktion von CLU in proximalen Tubuli des äußeren Marks. Dort wurde das Protein sowohl in dedifferenzierten Zellen in erweiterten Tubuli detektiert (→), als auch in toten Zellen und Zelltrümmern im Tubuluslumen (→).



**Vimentin (VIM)**

VIM wurde in der Niere konstitutiv nur von Zellen im Glomerulus und im Interstitium gebildet, während normale, differenzierte Tubulusepithelzellen das Protein nicht produzierten (Abb. 3.18). Obgleich selbst in der Hochdosisgruppe nach 90 Tagen nur geringe Veränderungen der Genexpression von VIM gemessen worden waren, konnte eine Induktion der Proteinsynthese zu diesem Zeitpunkt sowohl bei Tieren der mittleren als auch der hohen Dosisgruppe nachgewiesen werden. VIM wurde erwartungsgemäß in dedifferenzierten Epithelzellen von proximalen Tubuli im äußeren Mark detektiert, wobei eine klare Dosisabhängigkeit zu erkennen war. Während in Nieren von Tieren, die mit 70 µg/kg KG OTA behandelt wurden, nur wenige Tubuli positiv gefärbt wurden, wiesen nach 90-tägiger Behandlung mit 210 µg/kg KG OTA nahezu alle proximalen Tubulusepithelzellen im äußeren Mark eine schwache bis sehr starke Färbung für VIM auf (Abb. 3.18b).

Somit war der Nachweis von VIM auf Proteinebene weitaus empfindlicher als die Messung der mRNA-Expression des Markers im geschädigten Gewebe.

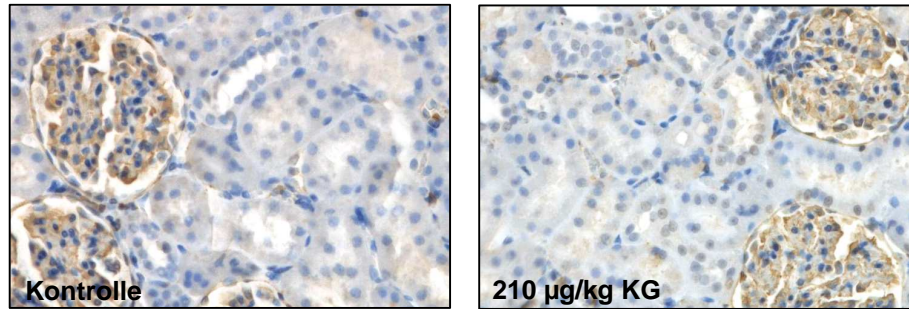
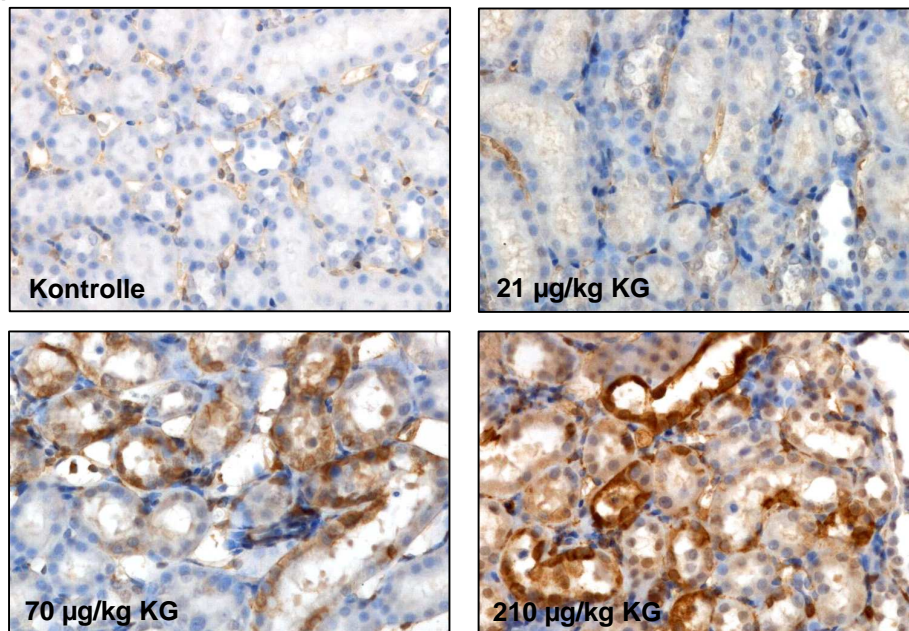
**(a) Rindenlabyrinth****(b) Äußeres Mark**

Abb. 3.18: Expression von VIM im Rindenlabyrinth (a) und im Außenstreifen des äußeren Marks (b) von Nieren aus F344/N-Ratten, die 90 Tage mit bis zu 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden. In der Niere wurde VIM konstitutiv nur von Zellen des Glomerulus und Interstitiums gebildet, während differenzierte Tubulusepithelzellen das Protein nicht produzierten. Die Exposition mit 70 und 210 µg/kg KG OTA führte zu einer dosisabhängigen Induktion von VIM in dedifferenzierten proximalen Tubulusepithelzellen im äußeren Mark.

### 3.1.4.3 Exkretion von Markerproteinen in den Urin

#### Ochratoxin A führt zu Mikroalbuminurie und einer erhöhten Ausscheidung von kleinen Proteinen

Bei Bestimmung von Routine-Parametern im Urin konnte nach 14 Tagen in der Hochdosisgruppe lediglich eine leichte Erhöhung der Erythrozytenzahl, aber kein Effekt auf sensitive Enzymmarker wie  $\gamma$ -GT oder NAG nachgewiesen werden (Abschnitt 3.1.2.7). Obgleich zu keinem Zeitpunkt ein Anstieg des Gesamt-Protein-Gehalts im Urin gemessen worden war, zeigte die Analyse von Urinproteinen über SDS-PAGE (Abb. 3.19) bereits nach zwei Wochen Behandlung mit 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA die deutliche Zunahme eines Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa im Urin. Durch Verwendung eines albumin-spezifischen Antikörpers konnte bestätigt werden, dass diese Tiere eine leicht erhöhte Ausscheidung von Albumin besaßen (Mikroalbuminurie; Abb. 3.20).

Da Albuminurie verschiedene Ursachen haben kann, unter anderem auch eine Schädigung des glomerulären Filters, wurde daraufhin auch die Ausscheidung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin (12 kDa) im Urin über Western Blot bestimmt.  $\beta$ 2-Mikroglobulin wird in der Niere aus dem Blut filtriert und dort von Epithelzellen des proximalen Tubulus rückresorbiert, weshalb es normalerweise nur in sehr geringen Mengen im Urin vorkommt. Dagegen führt eine Störung der endozytotischen Wiederaufnahme des Proteins durch proximale Tubulusepithelzellen zu einer erhöhten Ausscheidung von  $\beta$ 2-Mikroglobulin. Die Analyse von Urinproteinen im Western Blot zeigt, dass es infolge der Behandlung mit OTA parallel zur Mikroalbuminurie zu einer Zunahme der  $\beta$ 2-Mikroglobulin-Exkretion im Urin kam (Abb. 3.20), was auf eine OTA-induzierte Schädigung der Proteinaufnahme im proximalen Tubulusepithel hindeutet. Dieser Effekt wurde bereits in einer *in vitro*-Studie mit COS-Zellen gezeigt (Gekle *et al.*, 1994) und stimmt mit dem histopathologischen Befunden überein. Somit konnte durch die Verwendung von Albumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin als Proteinmarker im Urin bereits nach 14 Tagen ein nierenschädigender Effekt durch Behandlung mit 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA nachgewiesen werden.

Allerdings waren die Mengen an Albumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin im Urin OTA-behandelter F344/N Ratten sehr variabel, und auch unbehandelte Tiere wiesen zum Teil sehr große Mengen an diesen Proteinen im Urin auf. Zudem konnten im Urin von Tieren der mittleren Dosisgruppe keine signifikanten Veränderungen dieser Marker

festgestellt werden, obgleich die Nieren dieser Tiere bereits nach vier Wochen histopathologische Veränderungen aufwiesen.

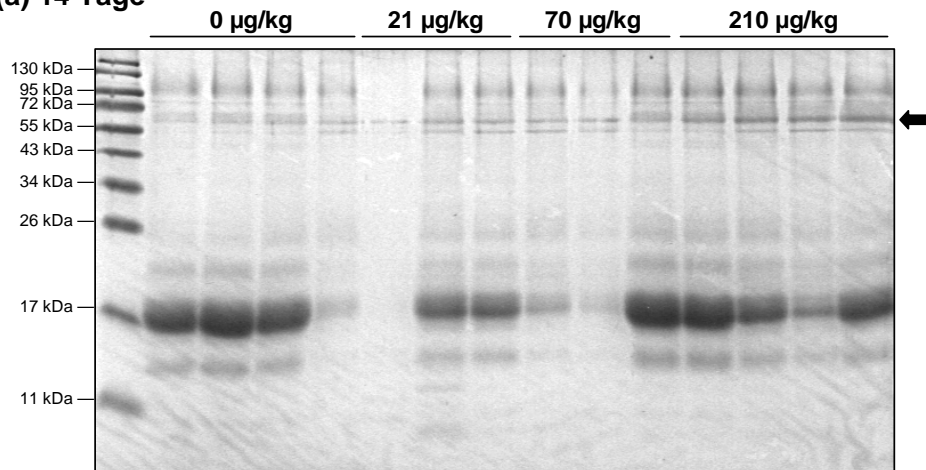
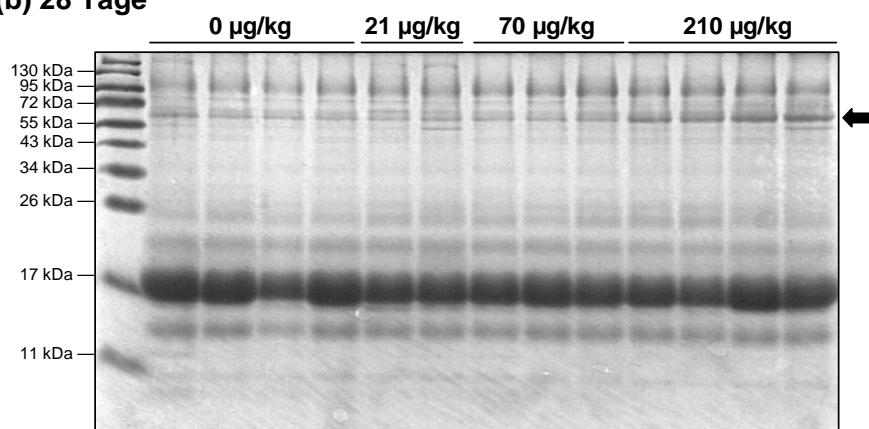
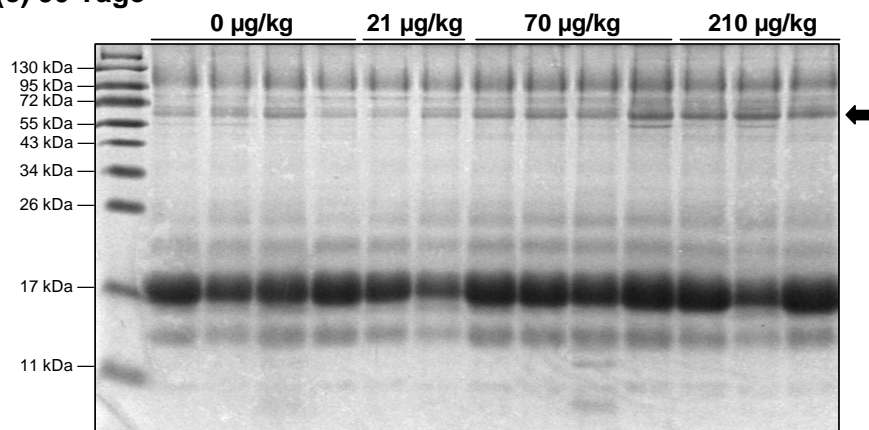
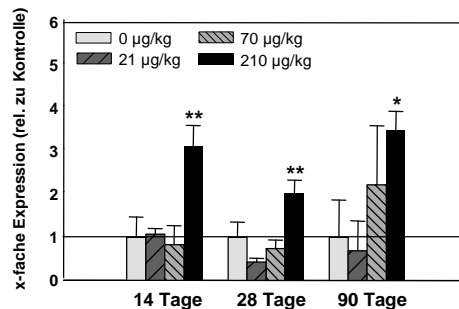
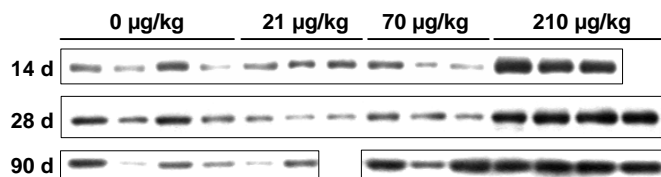
**(a) 14 Tage****(b) 28 Tage****(c) 90 Tage**

Abb. 3.19: Trennung von Proteinen aus Urin von Ratten, die 14 (a), 28 (b) oder 90 (c) Tage mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA behandelt worden waren, über SDS-PAGE (16%-Trenngel). Im Urin aus Hochdosistieren kam es zu einer deutlich Zunahme eines Proteins mit einer Masse von ca. 70 kDa (schwarzer Pfeil, →).

### (a) Albumin



### (b) β2-Mikroglobulin

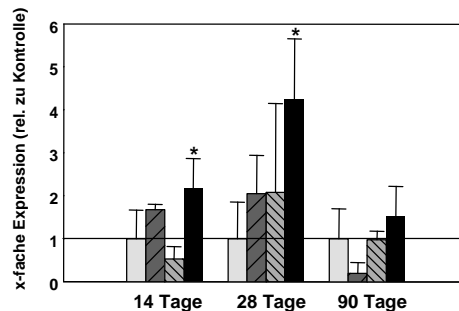
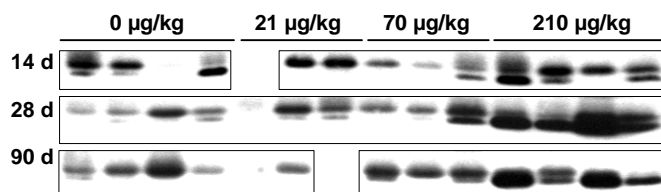


Abb. 3.20: Albumin (a; 69 kDa) und β2-Mikroglobulin (b; 12 kDa) im Urin von Ratten, die 14, 28 oder 90 Tage mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA behandelt worden waren.

## Detektion von Biomarker-Proteinen im Urin OTA-behandelter Ratten

### KIM-1

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass die Bestimmung von soluble-(s-)KIM-1 im Urin einen wertvollen Biomarker zur frühen Diagnose akuter Nierenerkrankungen darstellen kann (Han *et al.*, 2002; Han *et al.*, 2008; Vaidya *et al.*, 2006). Allerdings wurde die Exkretion von s-KIM-1 noch nicht ausreichend in Tiermodellen für chronische, progressive Nierenschädigung untersucht.

Zur Detektion von s-KIM-1 im Urin der F344/N-Ratten wurde ein neuer Antikörper verwendet, über den noch keine Literaturdaten bezüglich Spezifität im Western Blot existierten. Über Immunoblotting wurden zwei Banden für s-KIM-1 detektiert, die bei ca. 60 kDa und 72 kDa lagen, was mit den Ergebnissen aus anderen Studien

konsistent ist (Herzog *et al.*, 2007; Ichimura *et al.*, 2004). Zudem wurde Urin von Wistar-Ratten, die kurzzeitig mit nephrotoxischen Dosen an Gentamicin behandelt worden waren, als Positivkontrolle verwendet, da eine Behandlung mit dieser Substanz nachweislich zur Synthese und Sekretion von s-KIM-1 führt (Hoffmann *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008). Auch in dieser Probe wurde eine Proteinbande bei ca. 60 kDa detektiert.

s-KIM-1 wurde im aufkonzentrierten Urin von unbehandelten und OTA-behandelten F344/N-Ratten detektiert. Allerdings war die Konzentration von s-KIM-1 im Urin aus Kontrolltieren sehr gering, während infolge der Behandlung mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  OTA zeit- und dosisabhängig eine signifikante Zunahme von s-KIM-1 im Urin zu beobachten war (Abb. 3.21). Der Zeitverlauf der erhöhten Exkretion von s-KIM-1 korrelierte somit sehr gut mit der Induktion der Gen- und Proteinexpression von KIM-1 im Nierengewebe, wie es auch in anderen tierexperimentellen Studien berichtet wurde (Prozialeck *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2008).

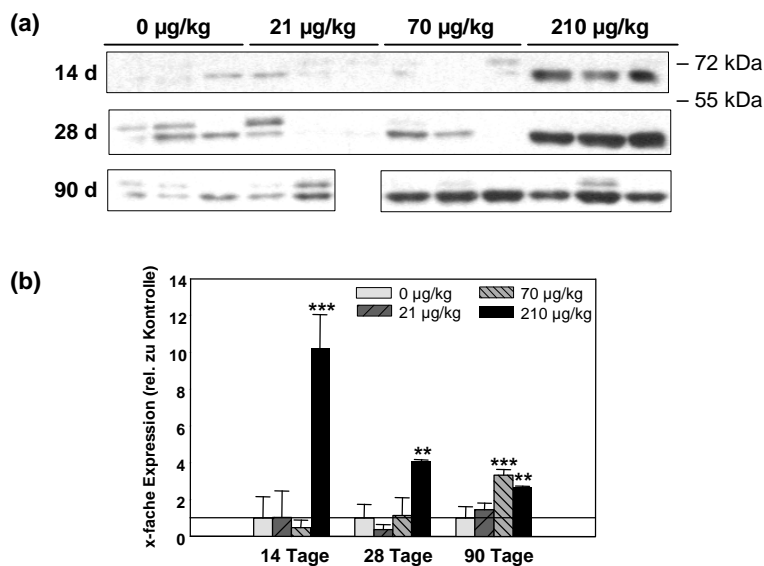


Abb. 3.21: KIM-1 im Urin von OTA-behandelten Ratten. (a) Western Blot von aufkonzentrierten Urinproben, (b) Densitometrische Auswertung der Bande bei ca. 60 kDa.

## CLU

CLU wurde sowohl im Urin von unbehandelten als auch im Urin von OTA-behandelten F344/N-Ratten detektiert. Vergleichende Untersuchungen mit Ganzzelllysaten von NRK-Zellen zeigten, dass der Antikörper spezifisch an die  $\alpha$ -Kette (45 kDa) des sezernierten Dimers (s-CLU) bindet.

Obgleich in verschiedenen Studien von einer erhöhten Exkretion von s-CLU bei Nierentoxizität berichtet wurde, ergab die densitometrische Auswertung keinen OTA-abhängigen Anstieg der s-CLU-Menge im Rattenurin (Abb. 3.22).

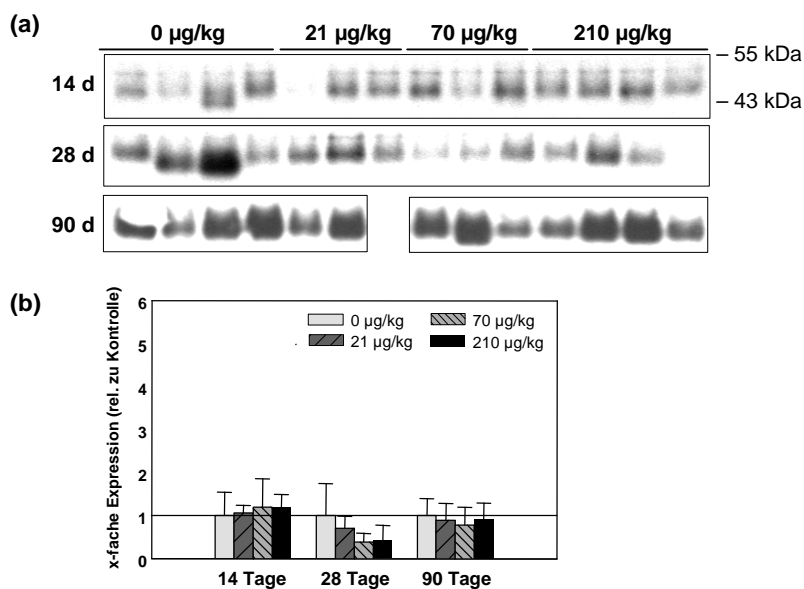


Abb. 3.22: CLU im Urin von OTA-behandelten Ratten. (a) Western Blot-Analyse von aufkonzentrierten Urinproben, (b) densitometrische Auswertung.

## LCN2

Auch LCN2 wurde in verschiedenen Studien als sensitiver Urinmarker für eine akute Nierenschädigung identifiziert. Um zu untersuchen, ob eine erhöhte Ausscheidung dieses Proteins auch zur frühen Indikation einer fortschreitenden Nierenschädigung geeignet sei, sollte LCN2 analog zu früheren Studien über Immunoblotting im Urin der OTA-behandelten F344/N-Ratten nachgewiesen werden (Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004). Allerdings konnte mit dieser Methode LCN2 weder bei Kontrolltieren noch nach Behandlung mit bis zu 210 µg/kg KG OTA über 90 Tage im Urin detektiert werden. Für den Western Blot wurden sowohl unkonzentrierter Rattenurin als auch mit

Trichloressigsäure aufkonzentrierte Urinproteine verwendet, um Fehlerquellen aufgrund der Probenvorbereitung möglichst auszuschließen.

Aufgrund des unerwartet negativen Ergebnisses wurde auch hier die Spezifität des Antikörpers überprüft (s. KIM-1), indem Urin von männlichen Wistar-Ratten aus einer 14-Tage-Studie mit dem Nephrotoxin Aristolochiasäure verwendet wurde. Überraschenderweise wurde LCN2 (25 kDa) in diesen Proben mit der oben beschriebenen Methode sehr gut detektiert (Abb. 3.25). Selbst im Urin unbehandelter Wistar-Ratten wurde das Protein deutlich nachgewiesen. Infolge der Behandlung mit dem Nephrotoxin Aristolochiasäure kam es zur Zunahme der LCN2-Exkretion.

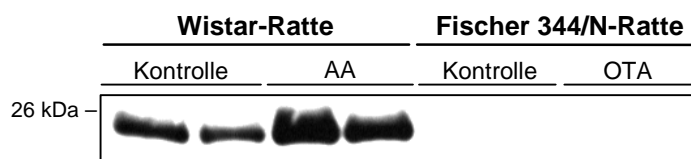


Abb. 3.23: LCN2 (25 kDa) im Urin von männlichen Wistar- und Fischer 344/N-Ratten. Wistar-Ratten wurden für 2 Wochen mit dem Nephrotoxin Aristolochiasäure (AA; 10 mg/kg KG) behandelt. Die Fischer 344/N-Ratten wurden für 3 Monate mit 210 µg/kg KG OTA behandelt.

Dieses Ergebnis korreliert sehr gut mit den Resultaten der immunhistochemischen Studien, in denen LCN2 bei Wistar-Ratten, nicht jedoch bei F344/N-Ratten, in sekretorischen Vesikeln in kortikalen Tubuli detektiert werden konnte (Abschnitt 3.1.4.2). Somit scheint sich die Proteinsynthese und/oder Proteinverarbeitung von LCN2 in Fischer 344/N-Ratten deutlich von den Vorgängen in Wistar-Ratten zu unterscheiden und nicht direkt mit der Genexpression dieses Markers zu korrelieren, wie es in einigen Studien berichtet wurde (Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005).

## OPN

Es ist bekannt, das OPN konstitutiv in den Urin sezerniert wird (Khan *et al.*, 2002; Kleinman *et al.*, 1995; Xie *et al.*, 2001). Allerdings wurde die Ausscheidung des Proteins als Marker für Nephrotoxizität bislang noch nicht untersucht. Da OTA im Nierengewebe zu einer dosisabhängigen Zunahme der OPN-Proteinexpression geführt hatte (s. Abschnitt 3.1.4.2), sollte überprüft werden, ob sich Veränderungen in der Proteinkonzentration in Tubulusepithelzellen auch in einer erhöhten Exkretion von OPN zeigten. Allerdings konnte das Protein über Western Blot zu keinem Zeitpunkt der Studie im Urin von Kontrolltieren oder von OTA-behandelten F344/N-Ratten detektiert



werden. Zum Nachweis von OPN wurden sowohl der für die Immunhistochemie verwendete monoklonale Antikörper als auch ein polyklonaler Antikörper verwendet. In beiden Fällen konnte nur eine unspezifische Bindung bzw. keine Bindung des Antikörpers verzeichnet werden.

Da OPN aus der Maus bekanntermaßen nicht gut an Nitrozellulose-Membranen bindet (Rittling und Feng 1998), wurde der Western Blot zusätzlich mit einer PVDF-Membran durchgeführt. Auch hier konnte OPN nicht im Urin der F344/N-Ratten detektiert werden, allerdings wurde mit dem polyklonalen Antikörper ein 56 kDa-Protein im Urin einer weiblichen Sprague Dawley-Ratte detektiert, die mit dem Nephrotoxin Aristolochiasäure behandelt worden war und als Positivkontrolle diente (Abb. 3.24).

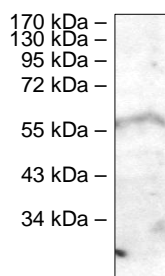


Abb. 3.24: OPN im Urin einer weiblichen Sprague Dawley-Ratte, die einmalig mit einer nephrotoxischen Dosis Aristolochiasäure (10 mg/kg KG) behandelt worden war

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse darauf hin, dass der Nachweis von OPN in Urin über Immunoblotting schwierig und die Methode nicht sehr empfindlich ist.

#### 3.1.4.4 Zusammenfassung

Die Analyse der Gen- und Proteinexpression neuer Biomarker für akute Nephrotoxizität in Nieren von F344/N-Ratten nach subchronischer Exposition mit bis zu 210 µg/kg KG OTA zeigte eine frühzeitige Induktion der Marker im Verlauf der fortschreitenden Gewebeschädigung. Eine erhöhte Genexpression von KIM-1, LCN2, TIMP-1, OPN und CLU ließ sich in der Hochdosisgruppe bereits nach 14 Tagen nachweisen. Somit ging die Induktion der neuen Marker deutlich den Effekten auf traditionelle Marker zur Diagnose einer Nierenschädigung voraus. Der Anstieg der mRNA-Expression der neuen Biomarker korrelierte mit dem Auftauchen und dem Schweregrad von histopathologischen Veränderungen, ging diesen aber nicht voraus. KIM-1 war in dieser Studie der empfindlichste Biomarker, da bereits bei einer leichten Gewebeschädigung eine starke Induktion dieses Gens festgestellt werden konnte. In

Übereinstimmung mit den Ergebnissen der histopathologischen Untersuchungen wurde in Tieren, die mit 21 µg/kg KG OTA behandelt wurden, keine erhöhte Expression der Markergene gemessen. Die Ergebnisse der Genexpressionsanalysen ließen sich in den meisten Fällen auch auf Proteinebene bestätigen, wo es im Falle von KIM-1, OPN, CLU und VIM zu einer spezifischen Induktion der Proteinsynthese in proximalen Tubuli kam, die Anzeichen von Degeneration und Regeneration aufwies. Obgleich die erhöhte Expression der Marker im Gewebe somit in dieser Studie ein frühzeitiger Indikator einer Schädigung im Bereich der proximalen Tubuli war, konnte nur für KIM-1 auch eine erhöhte Ausscheidung über den Urin nachgewiesen werden, während keine Effekte auf die Exkretion anderer potentieller Urinmarker, d. h. CLU, LCN2 und OPN, infolge der Behandlung mit OTA festgestellt wurden.

### **3.2 *In vitro*-Studien in NRK-52E-Zellen**

Die Ergebnisse aus dem Tierversuch mit OTA zeigen, dass die neuen Biomarker für Nephrotoxizität sensitive Indikatoren für eine Nierenschädigung darstellen, was mit den Resultaten verschiedener akuter Toxizitätsstudien übereinstimmt. Aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität der neuen Marker *in vivo* sollten diese auch in einem *in vitro*-Modell für das proximale Tubulusepithel als empfindliche Endpunkte für Toxizität getestet werden. Für diese Experimente wurden *Normal Rat Kidney*-Zellen (NRK-52E) verwendet, da diese Zelllinie aus der Ratte stammt und somit einen Vergleich mit den Ergebnissen des Tierversuchs ermöglichte. Die Zellen wurden mit einer Reihe unterschiedlicher Substanzen behandelt (OTA, Cadmium, Cisplatin und Kaliumbromat), die alle toxisch auf das proximale Tubulusepithel wirken, jedoch unterschiedliche Wirkmechanismen besitzen. Um die Sensitivität der Marker *in vitro* zu überprüfen, wurden – analog zu den Routineuntersuchungen beim Tierexperiment – Zytotoxizitätsstudien durchgeführt und die Expression der neuen Marker nach Behandlung mit nicht-zytotoxischen und zytotoxischen Konzentrationen gemessen.

#### **3.2.1 Zytotoxizität nach Behandlung mit verschiedenen Nephrotoxinen**

Zur Bestimmung der zytotoxischen Effekte der Modellsubstanzen für die *in vitro*-Experimente wurde ein MTT-Test durchgeführt, mit dem die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen gemessen wird, welche in direktem Zusammenhang mit der Lebensfähigkeit der Zellen steht. Da die Testreaktion in Zellen mit intakten

Zellmembranen durchgeführt wird, ist der MTT-Test sehr viel sensitiver als der häufig angewandte Laktatdehydrogenase (LDH)-Test, der die Freisetzung dieses Enzyms aus toten Zellen mit beschädigter Zellmembran misst.

In NRK-Zellen führte die 24- oder 48-stündige Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen OTA, Kaliumbromat ( $\text{KBrO}_3$ ), Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ ) oder Cisplatin zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Abnahme der Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen (Abb. 3.25). Eine signifikante Reduktion der Lebensfähigkeit der Zellen trat nach Behandlung mit 1000  $\mu\text{M}$   $\text{KBrO}_3$ , 30  $\mu\text{M}$  OTA, 15  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bzw. 15  $\mu\text{M}$  Cisplatin auf. Während selbst relativ hohe  $\text{KBrO}_3$ - (bis 3 mM) und OTA-Konzentrationen (bis 100  $\mu\text{M}$ ) nur zu einer langsamen Reduktion der Zellvitalität führten, waren NRK-Zellen sehr sensitiv gegenüber einer Exposition mit  $\text{CdCl}_2$  oder Cisplatin, wobei bereits Konzentrationen ab 75  $\mu\text{M}$  zum Absterben nahezu aller Zellen führten.

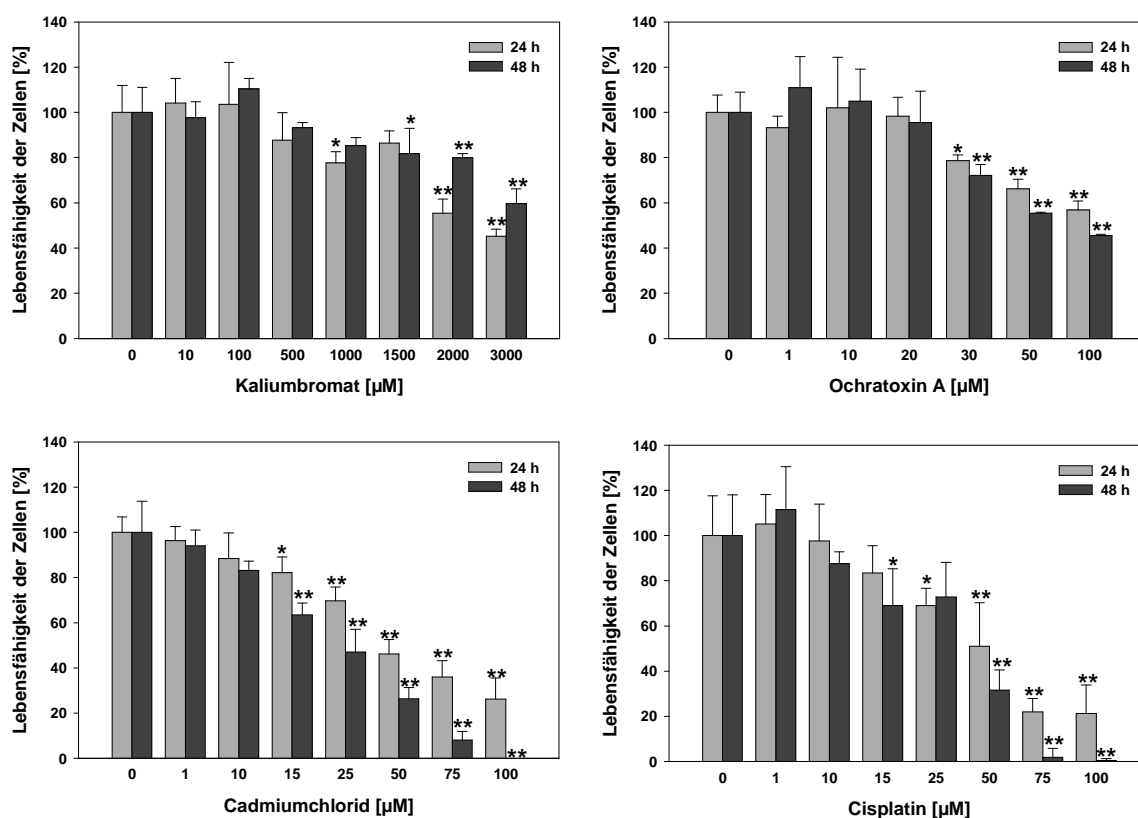


Abb. 3.25: MTT-Test zur Bestimmung der zytotoxischen Konzentrationen von Kaliumbromat, Ochratoxin A, Cadmiumchlorid und Cisplatin in NRK-52E-Zellen nach Behandlung über 24 oder 48 h. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA und Dunnett's Post Hoc Test (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.2.2 Veränderungen der Gen- und Proteinexpression neuer Biomarker für Nephrotoxizität in NRK-Zellen nach Behandlung mit Nephrotoxinen

24-48 h Behandlung der NRK-Zellen mit nephrotoxischen Modellsubstanzen führte bei keinem der getesteten neuen Biomarker zu einer konsistenten Induktion als Reaktion auf Toxizität. Die Ergebnisse der Messungen der mRNA-Expression von LCN2, OPN, CLU, VIM, TIMP-1 und HO-1 (Genbezeichnungen: *Lcn-2*, *Spp1*, *Clu*, *Vim*, *Timp-1* und *Hmox*) aus drei unabhängigen Real-time PCR-Experimenten sind in Tab. 3.3 dargestellt.

Da KIM-1 im Tierversuch ein äußerst sensibler Biomarker für Nierenschädigung ist, war es von besonderem Interesse, die Expression dieses Markers in NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Nephrotoxinen zu untersuchen. Allerdings konnte das KIM-1-Transkript bei den Real-time-PCR-Experimenten weder in unbehandelten NRK-Zellen noch nach Exposition gegenüber OTA, KBrO<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub> oder Cisplatin detektiert werden. Allerdings kam es in den PCR-Ansätzen zu einer Dimerisierung der spezifischen Primer, was zu einer Hemmung der Reaktion führen kann. Um ein falsch negatives Ergebnis bei der Real-time PCR auszuschließen, wurde zusätzlich eine klassische RT-PCR mit optimierten Primern durchgeführt. Auch hier konnte jedoch selbst nach 35 PCR-Zyklen weder in Kontrollzellen noch nach Behandlung mit bis zu 30 µM OTA, 2000 µM KBrO<sub>3</sub>, 25 µM CdCl<sub>2</sub> und 25 µM Cisplatin über 48 h ein Produkt nachgewiesen werden. Als Beispiel ist in Abb.3.26a das Ergebnis der RT-PCR für OTA-behandelte Zellen gezeigt. Im Gegensatz zu den NRK-Zellen konnten mit derselben Methode selbst in Nieren von unbehandelten F344/N-Ratten bereits nach 28 PCR-Zyklen geringe Mengen an *Kim-1*-Transkripten nachgewiesen werden (Abb.3.26b). Als Positivkontrolle diente cDNA aus Nieren von Ratten, die 28 Tage mit 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden (s. Abschnitt 3.1.4.1). Hier konnte erwartungsgemäß eine Zunahme an KIM-1-Transkript detektiert werden (Abb.3.26b). Somit wird KIM-1 in NRK-52E-Zellen unter den beschriebenen Versuchsbedingungen offensichtlich nicht exprimiert und auch nach Behandlung mit (nicht-)zytotoxischen Konzentrationen verschiedener Nephrotoxine nicht induziert.

Tab. 3.3: mRNA-Expression von Markergenen für Nephrotoxizität in NRK-52E-Zellen nach 24- oder 48-stündiger Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen Ochratoxin A, Cisplatin, Cadmiumchlorid oder Kaliumbromat (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung relativ zur Kontrolle; drei unabhängige Experimente).

Gen	Intervall [h]	Änderung der mRNA-Expression (x-fach, bezogen auf Kontrollzellen)											
		Ochratoxin A [ $\mu$ M]			Cisplatin [ $\mu$ M]			Cadmiumchlorid [ $\mu$ M]			Kaliumbromat [ $\mu$ M]		
		10	20	30	5	15	25	10	15	25	100	500	1000
<i>Lcn-2</i>	24	0,8 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	2,6 $\pm$ 1,6	1,0 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,4
	48	0,8 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,7	1,6 $\pm$ 0,6	1,1 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1
<i>Spp1</i>	24	0,8 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 1,6	0,9 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,2
	48	0,8 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,8	2,7 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,2	0,9 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2	1,7 $\pm$ 0,4
<i>Clu</i>	24	1,5 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 0,9	2,2 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 2,7	1,4 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,4	2,2 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 1,2	2,6 $\pm$ 1,5	1,6 $\pm$ 0,9
	48	1,7 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,5	0,8 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 1,0	2,9 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 1,0	2,5 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,4	1,9 $\pm$ 1,1	2,4 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,8
<i>Vim</i>	24	1,1 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,0	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,0
	48	1,2 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1	0,3 $\pm$ 0,0
<i>Timp-1</i>	24	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,5	0,5 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,4	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,3	0,9 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,4
	48	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,1
<i>Hmox</i>	24	1,1 $\pm$ 0,1	1,7 $\pm$ 0,2	3,9 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	30 $\pm$ 14	85 $\pm$ 47	376 $\pm$ 289	1,6 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 1,3	10,3 $\pm$ 3,2
	48	1,4 $\pm$ 0,1	2,3 $\pm$ 0,5	5,0 $\pm$ 2,6	1,2 $\pm$ 0,0	1,6 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2	97 $\pm$ 66	388 $\pm$ 195	552 $\pm$ 359	1,6 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 4	96 $\pm$ 40

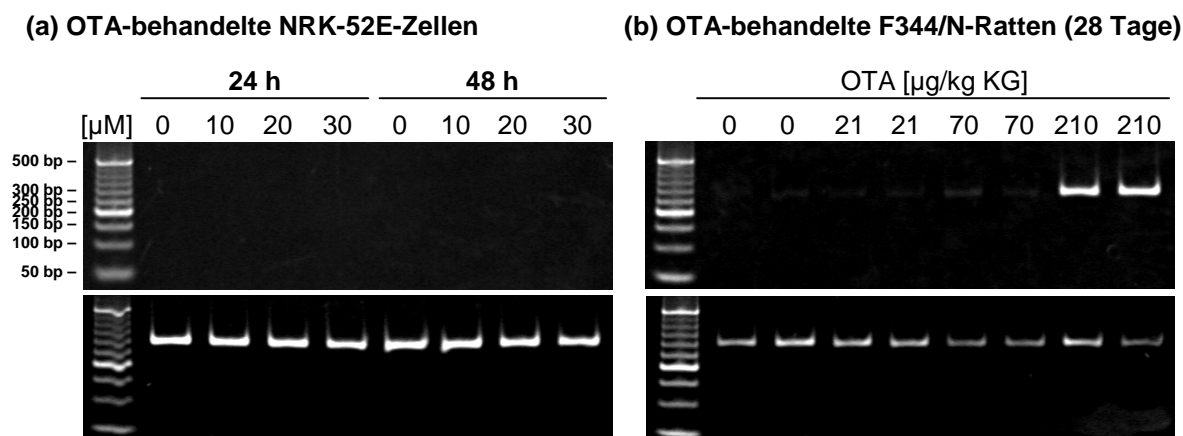
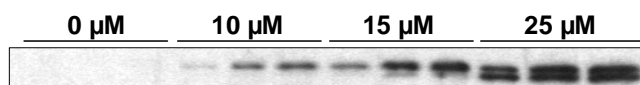


Abb.3.26: Genexpression von *Kim-1* in NRK-52E-Zellen (a) und F344/N-Ratten (b) nach Behandlung mit Ochratoxin A (OTA). In NRK-Zellen konnte das *Kim-1*-Transkript nach Exposition mit bis zu 30  $\mu\text{M}$  OTA für 48 h nicht detektiert werden, während die Behandlung mit 210  $\mu\text{g/kg KG}$  OTA für 28 Tage in der Niere von F344/N-Ratten zu einem deutlichen Anstieg der *Kim-1*-Genexpression führte (obere Felder; a: 35 Zyklen, b: 28 Zyklen). Die unteren Felder zeigen die Expression von  $\beta$ -Aktin (25 Zyklen).

Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit  $\text{CdCl}_2$  und  $\text{KBrO}_3$  in NRK-Zellen konzentrationsabhängig zu einer deutlichen Induktion der Gen- und Proteinexpression von HO-1 (Tab. 3.3 und Abb. 3.27). Während HO-1 in unbehandelten Zellen nicht detektierbar war, kam es in NRK-Zellen bereits nach Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  bzw. 500  $\mu\text{M}$   $\text{KBrO}_3$  zu einem sichtbaren Anstieg der HO-1-Konzentration.

#### Cadmiumchlorid



#### Kaliumbromat

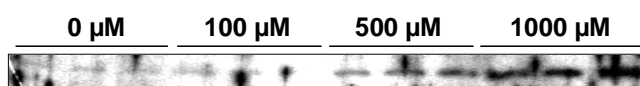


Abb. 3.27: HO-1-Expression in NRK-Zellen nach 48 h Behandlung mit Cadmiumchlorid oder Kaliumbromat.

Die Behandlung mit OTA führte in Analogie zu den Ergebnissen aus dem Tierversuch (s. Abschnitt 3.1.4.1) auch zu einer schwachen Induktion von HO-1 (Tab. 3.3),

allerdings konnte das HO-1-Protein nur bei zytotoxischen Konzentrationen (30  $\mu\text{M}$ ) nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Überraschenderweise kam es jedoch nach Behandlung mit Cisplatin nicht zu einer gesteigerten Expression von HO-1 (Tab. 3.3).

Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene wurde CLU in NRK-52E-Zellen stark exprimiert (Abb. 3.28). Zudem wurde bei allen Experimenten beobachtet, dass konfluente Zellen nach 48h im Vergleich zu den 24h-Proben eine um 1,5- bis 2-fach erhöhte CLU-Expression besaßen und das Protein somit auch unabhängig von einer Behandlung durch Zellkulturbedingungen dereguliert wurde.

Auf Ebene der Genexpression wurde nach Behandlung mit allen Nephrotoxinen eine schwache Induktion von CLU gemessen, die meist nicht dosisabhängig war, sondern zu den gemessenen Zeitpunkten bei der mittleren, leicht zytotoxischen Konzentration am stärksten war. In jedem Fall war die Genexpression von CLU jedoch maximal um das 2- bis 4-fache erhöht.

Auf Proteinebene wurden zwei Formen von CLU in den Zellen detektiert, die  $\alpha$ -Kette des dimeren Holoproteins (45 kDa) und eine intermediäre Form mit einer Masse von ca. 60 kDa, bei der es sich wahrscheinlich um eine Mannose-haltige Zwischenstufe im Golgi-Apparat handelt (Lakins *et al.*, 1998). Als Folge der Behandlung mit den Nephrotoxinen wurden unterschiedliche Effekte auf den intrazellulären CLU-Umsatz festgestellt. Während die Exposition mit OTA,  $\text{KBrO}_3$  und  $\text{CdCl}_2$  zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme von CLU (Holoprotein) in den Zellen führte, hatte die Behandlung der Zellen mit Cisplatin eine leichte Zunahme der intrazellulären Konzentration dieser Form des Proteins zur Folge. Des Weiteren wurde in  $\text{CdCl}_2$ - und Cisplatin-behandelten NRK-Zellen ein erhöhter Spiegel des 60-kDa-Intermediats gemessen, während in OTA- und  $\text{KBrO}_3$ -behandelten Zellen eine Abnahme bzw. kein Effekt auf diese Form von CLU beobachtet wurde. Die Exposition mit 25  $\mu\text{M}$   $\text{CdCl}_2$  führte zudem zu der Bildung einer zusätzlichen CLU-Spezies mit einer Masse von ca. 42 kDa, die bei keinem anderen Toxin detektiert wurde.

Im Zellüberstand wurde ebenfalls eine sehr hohe Konzentration an  $\alpha$ -CLU festgestellt, die sich möglicherweise aus der Zugabe von Serum zum Zellmedium und der Sekretion des Proteins zusammensetzte (nicht gezeigt).

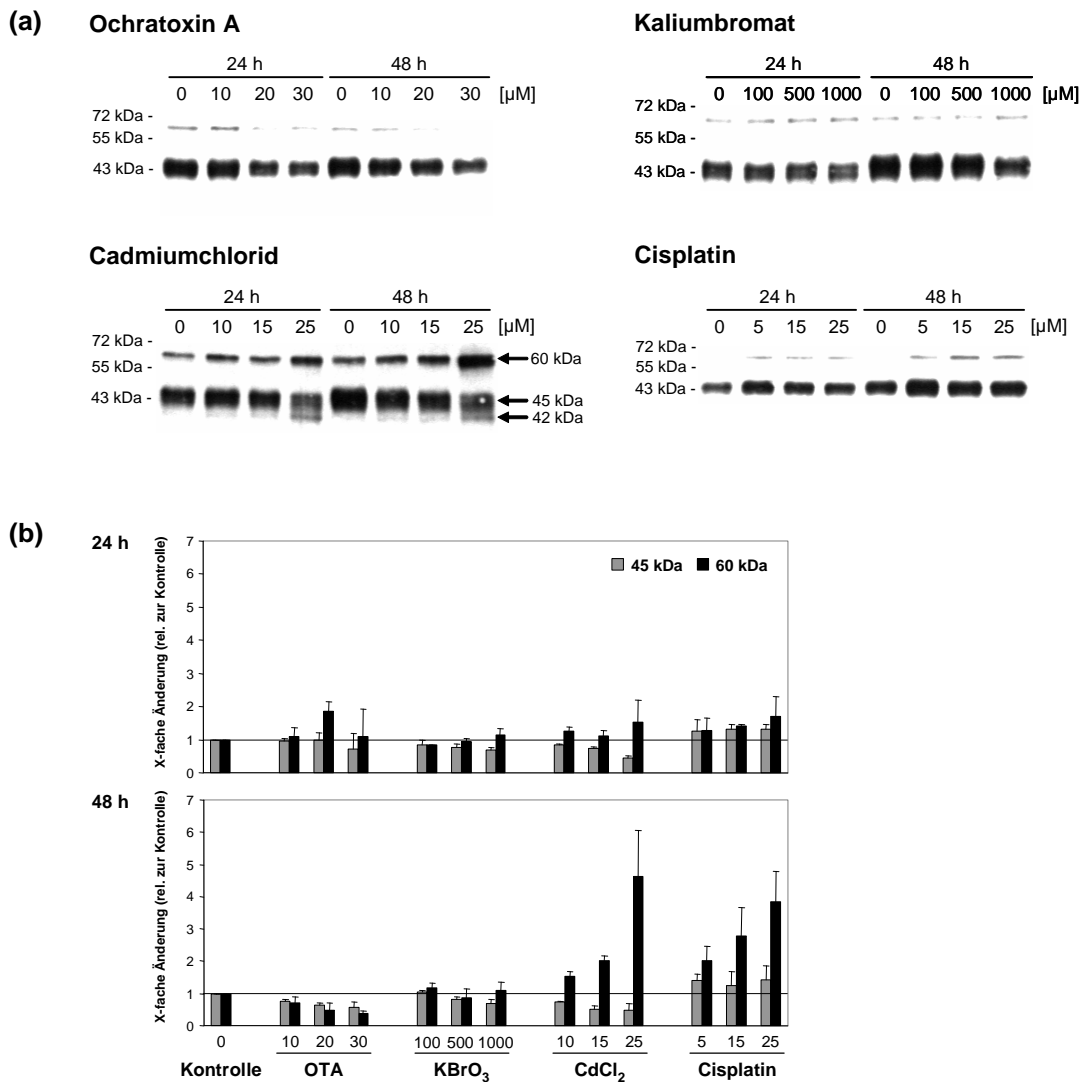


Abb. 3.28: Intrazelluläre Expression von CLU in NRK-Zellen nach Behandlung mit Ochratoxin A (OTA), Kaliumbromat (KBrO<sub>3</sub>), Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) und Cisplatin über 24 oder 48 h. (a) Western-Blot-Analysen zeigten in Ganzzelllysaten das Vorhandensein von drei unterschiedlichen Formen des Proteins mit einem Molekulargewicht von 60, 45 und 42 kDa (s. Markierung bei Cadmiumchlorid). Das 45 kDa-Protein stellt die  $\alpha$ -Kette des dimeren Proteins dar, während es sich bei dem Protein mit einem Molekulargewicht von 60 kDa um eine Zwischenform handelt. Das 42 kDa-Protein wurde nur bei Zellen beobachtet, die mit zytotoxischen Konzentrationen CdCl<sub>2</sub> behandelt worden waren. (b) Densitometrische Analyse der CLU-Banden bei 45 und 60 kDa (Konzentrationsangaben in [ $\mu$ M], Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Experimenten).

In deutlichem Kontrast zu akuten Toxizitätsstudien *in vivo* konnte in behandelten Zellen im Fall von LCN2, OPN, VIM und TIMP-1 keine Veränderung der mRNA-Expression beobachtet werden. Verglichen mit den mRNA-Spiegeln in der Niere von unbehandelten F344/N-Ratten war die Expression dieser Gene in den NRK-52E-Zellen



deutlich höher (niedrige  $C_T$ -Werte in der Real-time PCR), was auf eine hohe konstitutive Expression hindeutet, die nicht zusätzlich durch toxische Einflüsse stimuliert werden kann. Auf Proteinebene konnte dies exemplarisch für VIM gezeigt werden. VIM gilt als Marker für dedifferenzierte Zellen, in denen das Protein als Intermediärfilament einen Teil des Zytoskeletts darstellt (Franke *et al.*, 1979). Obgleich die NRK-52E-Zellen bei Konfluenz einen gewissen Differenzierungsgrad besaßen und einen festen Zellverband bildeten, zeigte die Immunfluoreszenzfärbung von VIM eine konstitutiv hohe Expression des Proteins (Abb. 3.29). In Übereinstimmung mit dem Ergebnis der Genexpressionsstudien hatte selbst die Behandlung mit zytotoxischen Konzentrationen verschiedener Nephrotoxine keinen erkennbaren Einfluss auf die VIM-Expression, wie es in Abb. 3.29 exemplarisch für OTA-behandelte Zellen gezeigt ist. VIM befand sich unabhängig von der Behandlung als Bestandteil des Zytoskeletts im Zytoplasma aller Zellen.

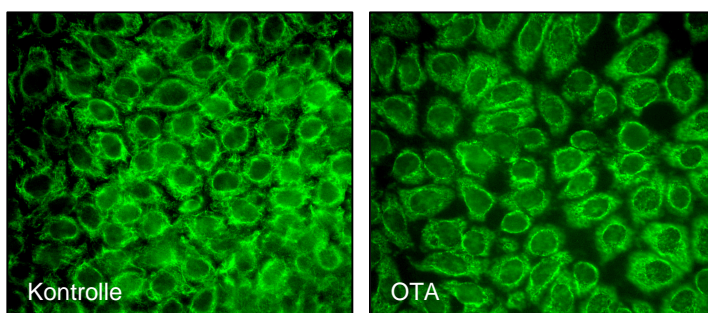


Abb. 3.29: Vimentin-Expression in unbehandelten NRK-52E-Zellen und nach 48-stündiger Behandlung mit 30  $\mu$ M OTA.

Aufgrund der hohen endogenen mRNA-Expression war davon auszugehen, dass die Markerproteine OPN, LCN2 und TIMP-1 ebenfalls konstitutiv hoch in NRK-52E-Zellen exprimiert wurden. Da somit keine deutliche Veränderung in behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle zu erwarten war, wurde die Proteinexpression dieser Marker nicht weiter untersucht.

### 3.2.3 Zusammenfassung

In Kurzzeitstudien wurden neue *in vivo*-Biomarker für akute Nephrotoxizität in NRK-52E-Zellen als *in vitro*-Modell für proximale Tubulusepithelzellen hinsichtlich ihrer Eignung als sensitiver Endpunkt für Toxizität untersucht. Die Exposition von NRK-Zellen mit vier verschiedenen Modellsubstanzen führte jedoch nicht zu konsistenten Effekten auf die Expression der untersuchten Biomarker. Die mRNA-Expression von

KIM-1, einem der empfindlichsten Marker für Nierentoxizität *in vivo*, war in der Zelllinie auch nach Behandlung mit toxischen Substanzen nicht nachzuweisen, während andere Marker (VIM, OPN, TIMP-1 und LCN2) eine hohe endogene Expression aufwiesen, die durch die verwendeten Modellssubstanzen kaum moduliert wurde. CLU wurde zwar in allen Fällen schwach induziert, allerdings war dieser Effekt nicht konzentrationsabhängig und Veränderungen auf Proteinebene waren nicht bei allen Verbindungen konsistent. Die Expression von HO-1 wurde durch CdCl<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub> und OTA induziert, allerdings führte die Behandlung mit Cisplatin, einem potenten HO-1-Induktor *in vivo*, in den NRK-Zellen nicht zu einer verstärkten Synthese dieses Stressmarkers.

## 4 Diskussion

Zahlreiche Chemikalien sind dafür bekannt, nach akuter bzw. wiederholter Exposition toxische Wirkungen auf die Niere zu besitzen. Aufgrund der hohen funktionalen Reservekapazität der Niere wird die langsam fortschreitende Entwicklung einer Nierenschädigung infolge einer längerfristigen Aufnahme kleiner Dosen nephrotoxischer Substanzen meist erst in einem sehr späten Stadium der Schädigung erkannt. Im Rahmen von toxikologischen Prüfverfahren zur Untersuchung von Effekten nach wiederholter Exposition werden nephrotoxische Eigenschaften der Testsubstanzen somit oft erst in Langzeitstudien im Tier nachgewiesen. Der enorme Aufwand an Planung, Zeit und Kosten sowie die große Anzahl an Versuchstieren, die für die Durchführung solcher Langzeitstudien benötigt wird, hat jedoch dazu geführt, dass von Politik und Industrie verstärkt die Entwicklung von verbesserten Testmethoden bzw. empfindlicheren Markern zum Nachweis chronischer Toxizität gefordert wird. Es war aus diesem Grund Thema dieser Arbeit, neue Ansätze für Teststrategien zur Prüfung auf chronische Toxizität zu erforschen und zur beurteilen, wobei der Schwerpunkt auf der Niere als einem der Hauptzielorgane für toxische Wirkungen von Substanzen lag. Zum einen sollten dazu frühe Ereignisse während der Entwicklung von chronischer Nierentoxizität nach wiederholter Exposition von Ratten gegenüber Ochratoxin A (OTA) untersucht und mögliche neue Marker für Nierenschädigung bzw. kanzerogenes Potential untersucht werden (Abschnitt 4.1). Neben den Untersuchungen *in vivo* war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neue Ansätze für die Prüfung nephrotoxischer Wirkungen *in vitro* als mögliche Ersatzmethode zum Tierversuch zu erforschen (Abschnitt 4.2).

### 4.1 Frühe Endpunkte für Nierentoxizität nach wiederholter Exposition von Ratten gegenüber Ochratoxin A (OTA)

Für die Untersuchungen *in vivo* wurde OTA als Modellsubstanz ausgewählt, da die wiederholte Exposition nachgewiesenermaßen in zahlreichen Tierarten eine langsam fortschreitende Nephropathie induziert (EFSA 2006). Zudem handelt es sich bei OTA um eines der potentesten Nierenkanzerogene, die bis jetzt im Tierexperiment untersucht wurden (Lock und Hard 2004).

Um einen Aufschluss über die frühen Ereignisse der chronischen Nierenschädigung und die Entwicklung von Nierenkrebs nach Gabe von OTA zu erhalten, wurden F344/N-Ratten bis zu 90 Tage mit denselben Dosen behandelt wie in der 2 Jahres-Kanzerogenitätsstudie von NTP (NTP 1989). Zur Erfassung toxikologischer Effekte wurden zum einen traditionelle Ansatzpunkte (Körper- und Organgewicht, Histopathologie, Elektronenmikroskopie, klinische Chemie und Urinanalyse), zum anderen potentielle neue Marker (Zellproliferation und neue Biomarker für Nephrotoxizität) untersucht. Die Ergebnisse sollten dann zum einen Hinweise auf die Empfindlichkeit der neuen Marker im Vergleich zu klassischen Messmethoden liefern, zum anderen war es von Interesse, neue Hinweise auf die mechanistischen Grundlagen der OTA-induzierten Nierentoxizität zu erhalten.

#### **4.1.1 Veränderungen von Histopathologie und Zellproliferation in der Niere sind frühe Marker für die nierenschädigenden und kanzerogenen Eigenschaften von OTA**

Viele Substanzen führen – abhängig von Dosis und Zeitdauer der Exposition – zu Gewebeschädigungen in der Niere. Eine kontinuierliche Schädigung infolge der chronischen Exposition gegenüber solchen Substanzen kann zu Nierenversagen führen und wird in einigen Fällen auch in Zusammenhang mit der Entstehung von Nierenkrebs gebracht (Lock und Hard 2004). Der Nachweis von schwach nephrotoxischen Substanzeigenschaften ist jedoch mithilfe der traditionellen Endpunkte sehr schwierig, da sich Funktionsstörungen der Niere und/oder die Entstehung von Nierenkrebs häufig erst nach einem sehr langen Zeitraum und bei Gabe hoher Dosen nachweisen lassen. Während neue Biomarker für Zytotoxizität/Regeneration möglicherweise die Schädigung des Gewebes zu einem früheren Zeitpunkt erkennen lassen (s. Abschnitt 4.1.2), gibt es nur wenige neue Ansätze zur Früherkennung von sog. „nicht-gentoxischen“ (d.h. nicht-DNA-reaktiven) Kanzerogenen, weil die Substanzen oft sehr unterschiedliche primäre Wirkmechanismen besitzen. So hängt die kanzerogene Wirkung nicht selten von der Bindung an spezielle Rezeptoren oder von bestimmten physiologischen, metabolischen oder anatomischen Bedingungen ab. Bei den meisten dieser Substanzen ist jedoch eine Stimulation der Zellteilung der entscheidende Schritt für die Tumorgenese (Alden 2000; Klaunig *et al.*, 2000). Um das kanzerogene Potential von Substanzen zu überprüfen, die in Kurzzeitstudien keine oder nur eine schwach gentoxische Wirkung zeigten, müssen äußerst zeit- und kostenaufwendige Studien im Tier durchgeführt werden, die über den größten Teil der Lebenszeit laufen, d.h. bei der

Ratte über zwei Jahre (Kramer und von Landenberg 2004). Eine Alternative zu diesen Langzeitexperimenten im Tier könnte allerdings der Nachweis von substanzbedingten Veränderungen der Zellproliferation in Zielgeweben als frühes Ereignis der Kanzerogenese darstellen. Dies sollte in dieser Arbeit mit OTA als bedeutendem Nierenkanzerogen in der Ratte untersucht werden. Neben Messungen der Zellproliferation in der Niere (Zielorgan) sowie in der Leber (kein Zielorgan von OTA) nach wiederholter Behandlung mit kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Dosen des Nephrotoxins wurden auch histopathologische Untersuchungen im Hinblick auf die frühen Ereignisse der OTA-abhängigen Nierenschädigung und Nierenkanzerogenese durchgeführt.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die wiederholte Behandlung mit 70 und 210 µg/kg KG OTA in der Niere bereits nach kurzer Zeit den Tod einzelner Zellen im S<sub>3</sub>-Segment des proximalen Tubulus verursachte. An der gleichen Stelle wurde ein Anstieg der Proliferation sowie eine prominente Vergrößerung von Zellkernen und Zytoplasma beobachtet. Die ultrastrukturelle Analyse zeigte, dass diese Zellkerne unregelmäßig geformt waren und es in den Zellen möglicherweise auch zur Bildung mehrerer Zellkerne gekommen war. Während die Zelldegeneration nach einiger Zeit nachzulassen schien, nahmen die OTA-induzierten Effekte auf die Zellkerngröße und die Zellteilung im Verlauf der Studie stetig zu. Im Gegensatz dazu wurden in der Leber bis zum Ende der Studie keine pathologischen Veränderungen festgestellt.

Die deutliche Zunahme auf die renale Zellproliferation stimmt mit früheren Studien überein, in denen eine verstärkte Expression des Proliferationsmarkers *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) in der Niere, jedoch nicht in der Leber, von Ratten gemessen wurde, die mit bis zu 2 mg/kg KG OTA behandelt wurden (Mally *et al.*, 2005b). Rasonyi *et al.* (1999) stellten dagegen keine Veränderungen der renalen Zellproliferation nach Behandlung mit 1 mg/kg KG OTA fest. Allerdings wurde OTA in dieser Studie nur über eine Woche verabreicht, was möglicherweise zu kurz war, um eine proliferative Reaktion auszulösen.

Zellproliferation stellt einen kritischen Schritt in dem komplexen Prozess der Kanzerogenese dar. Einerseits werden durch die Replikation der DNA Schäden in der DNA in feststehende Mutationen umgewandelt; des weiteren führt eine Stimulation der Zellteilung zu klonalen Expansion initiiertes Zellen (Dietrich und Swenberg 1991; Lutz 1990). Drittens werden DNA-Reparaturmechanismen bei einer sehr hohen Zellteilungsrate inhibiert, was wiederum zur Entstehung von Mutationen beitragen kann

(Butterworth und Bogdanffy 1999). Substanzen, die eine Stimulation der Zellteilung bewirken, verursachen somit indirekt die Bildung von Mutationen und eine klonale Expansion präneoplastischer Zellen. Solche epigenetischen Kanzerogene können in zwei Klassen unterteilt werden: Mitogene und zytotoxische Substanzen (Jones *et al.*, 1996; Klaunig *et al.*, 2000). Während in der Leber zahlreiche mitogen wirkende Substanzen beschrieben wurden (Jones *et al.*, 1996), wirken epigenetische Kanzerogene in der Niere hauptsächlich über die kontinuierliche Stimulation einer regenerativen Zellproliferation infolge von Zytotoxizität (Lock und Hard 2004). In vielen Fällen spielt dabei die Akkumulation von  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin in  $S_2$ -Zellen des proximalen Tubulus eine Rolle. Allerdings ist es bekannt, dass die Behandlung mit OTA Effekte auf das  $S_3$ -Segment hat und nicht zu einer Anreicherung von  $\alpha_{2\mu}$ -Globulin in proximalen Tubulusepithelzellen führt (Rasonyi *et al.*, 1999). Des weiteren hatte die wiederholte Exposition mit 70 und 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA in dieser Studie bei F344/N-Ratten zwar den Tod vereinzelter Zellen im  $S_3$ -Segment des proximalen Tubulus zur Folge, indessen wurden nur schwache Effekte auf klinisch-chemische Parameter in Urin und Serum gemessen, was nicht für eine prominente zytotoxische Wirkung von OTA spricht. Des weiteren scheint eine einfache tubuläre Hyperplasie, die bei zytotoxischen Nierenkanzerogenen häufig beobachtet wird (Dietrich und Swenberg 1991), nicht zu den pathologischen Veränderungen zu gehören, die nach Behandlung mit kanzerogenen Dosen OTA auftreten. Dagegen stellt die häufige und sehr frühe Entwicklung von Karyomegalie ein einzigartiges Charakteristikum der OTA-induzierten Nierenpathologie dar. Eine Zellkernvergrößerung wurde sonst nur bei chronischer Behandlung mit epigenetischen, zytotoxischen Kanzerogenen wie Chloroform oder Trichlorethen in vereinzelter Zellen nachgewiesen (Lock und Reed 2006; Mally *et al.*, 2006b; Templin *et al.*, 1998).

Auch wenn der primäre Wirkmechanismus, der zu der erhöhten Zellproliferation in der Niere nach Behandlung mit Ochratoxin A führt, noch nicht bekannt ist, weisen die bereits sehr frühzeitig eintretenden Veränderungen im Zellteilungsmuster sowie die schnelle Zunahme der Zellteilungsrate darauf hin, dass dieser Prozess einen kritischen Schritt der OTA-abhängigen Tumorgenese darstellt. Dies wird auch dadurch gestützt, dass diese Veränderungen ausschließlich in der Niere stattfanden, dem Zielorgan der kanzerogenen Wirkung von OTA, und dort auch nur in den spezifischen Zielzellen des Toxins, den Epithelzellen des geraden Segments des proximalen Tubulus, aus denen sich auch die Tumore entwickeln (JECFA 2001). Zudem besteht eine sehr gute Korrelation zwischen der Zellproliferation im äußeren Mark nach drei Monaten und der

Tumorinzidenz nach zwei Jahren (Abb. 4.1). So führte die wiederholte Behandlung mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA über 90 Tage zu einer dosisabhängigen Zunahme der Zellteilung. Bei den gleichen Dosen war in der Langzeitstudie Nierenkrebs aufgetreten, während in Ratten, die mit 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA exponiert worden waren, selbst nach zwei Jahren keine erhöhte Bildung von Tumoren festgestellt wurde. Analog dazu wurden im Rahmen der 90 Tage-Studie nach Behandlung mit dieser Dosis auch keine Veränderungen der Zellproliferation nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass die kanzerogene Wirkung von OTA mit einer Stimulation der Zellteilung assoziiert ist.

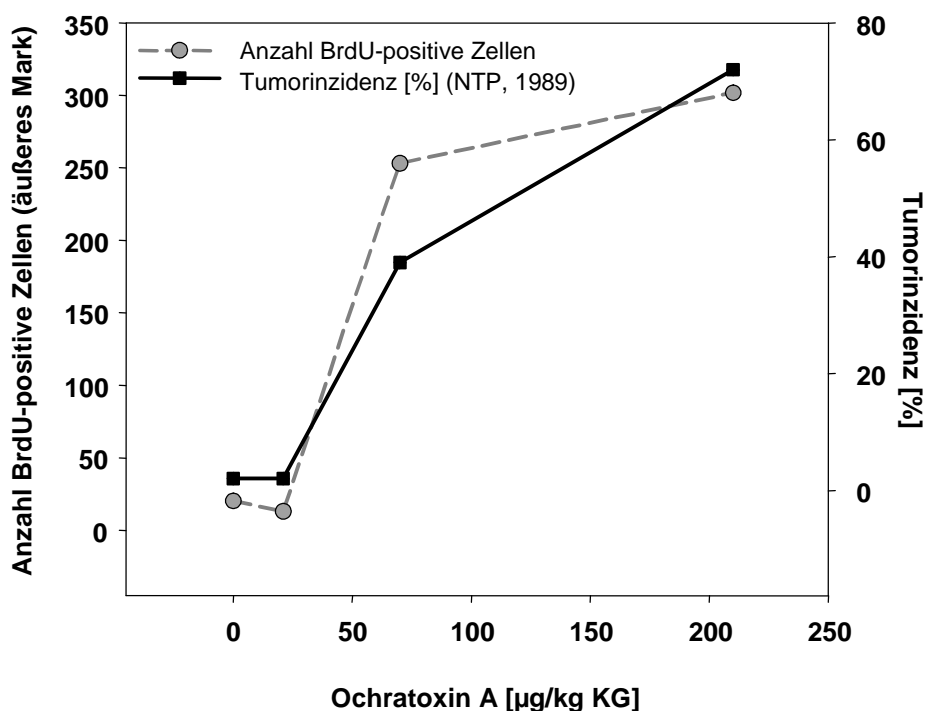


Abb. 4.1: Korrelation zwischen der Anzahl an BrdU-positiv gefärbten Zellen im Außenstreifen des äußeren Marks von Nieren aus Ratten, die 90 Tage mit 0, 21, 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt wurden, und der Tumorinzidenz in der Niere nach Behandlung von Ratten mit den gleichen Dosen OTA über 2 Jahre.

#### 4.1.2 Bewertung der Sensitivität neuer Biomarker zum Nachweis chronischer Nephrotoxizität

In den letzten Jahren wurden durch Genexpressionsanalysen verschiedene spezifische Biomarker für Nephrotoxizität identifiziert. Zu diesen Markern gehören *kidney injury molecule-1* (KIM-1), Lipocalin-2 (LCN2), *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1), Osteopontin (OPN), Clusterin (CLU), Vimentin (VIM) und Hämoxxygenase-1 (HO-1) (Amin *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 2004; Kharasch *et al.*, 2006; Mishra *et al.*, 2003;

Thukral *et al.*, 2005). Obgleich die Eignung dieser Marker zur frühzeitigen Diagnose einer akuten Gewebeschädigung die Vermutung nahe legt, dass es sich auch um sensitive Indikatoren für chronische Nierentoxizität handelt, wurde dies noch nicht ausreichend untersucht. Eine kontinuierliche Schädigung von Nierengewebe durch toxische Substanzen führt zu einem fortschreitenden Verlust der Nierenfunktion, der jedoch mithilfe klassischer klinisch-chemischer Parameter (z.B. Serum-Kreatinin) in der Regel erst sehr spät nachgewiesen werden kann (Hart und Kinter 2005). Aus diesem Grund ist es notwendig, frühe, empfindliche und zuverlässige Endpunkte für Nierentoxizität zu identifizieren.

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die viel versprechenden neuen Biomarker für akute Nierentoxizität in einem Modell für eine langsam fortschreitende Nierenschädigung zu prüfen. OTA wurde als Modellsubstanz verwendet, da es dafür bekannt ist, in verschiedenen Tierarten eine Schädigung der Niere hervorzurufen (EFSA 2006). Zudem ist die spezifische Zielregion von OTA das proximale Tubulusepithel, einer der häufigsten Zielorte für Toxizität in der Niere (JECFA 2001; Khan und Alden 2002). Zum einen sollte mit dem Versuch festgestellt werden, ob die Marker im Verlauf einer chronischen Nierenschädigung induziert werden und ob die gesteigerte Expression dabei mit dem Ausmaß der Schädigung korreliert. Des Weiteren sollten Effekte auf potentielle neue und traditionelle Endpunkte wie klinische Chemie und Histopathologie hinsichtlich des Zeitpunktes ihres Eintretens, ihrer Intensität und ihrer Zuverlässigkeit verglichen werden.

In guter Übereinstimmung mit Studien zur akuten Nephrotoxizität verschiedener Substanzen zeigte die Analyse der mRNA-Expression einen Anstieg der Markergenexpression im Nierengewebe von F344/N-Ratten nach Behandlung mit bis zu 210 µg/kg KG OTA über 90 Tage. Bei der Mehrzahl der getesteten Marker konnte die Induktion bereits zu einem Zeitpunkt gemessen werden, an dem noch keine Effekte auf klassische klinisch-chemische Parameter zur Indikation einer Nierenschädigung auftraten, sodass die Ergebnisse dieser Studie im Einklang mit der Hypothese stehen, dass es sich bei den untersuchten Markern um sensitive Indikatoren für Nephrotoxizität handelt. Gerade im Hinblick auf die Prüfung auf Nierentoxizität nach wiederholter Gabe ist neben der hohen Empfindlichkeit sicherlich auch entscheidend, dass sowohl der Zeitverlauf als auch das Ausmaß der Veränderungen der mRNA-Expression der neuen Marker sehr gut mit dem jeweiligen Grad der Gewebeschädigung korrelierten und somit den fortschreitenden Verlauf der Nierenschädigung widerspiegeln. Somit



unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Verwendung dieser Marker auch zur Untersuchung von chronischer Nephrotoxizität.

Obgleich Messungen auf Ebene der Genexpression einfache und sensitive Analysemethoden darstellen, ist es aus verschiedenen Gründen sinnvoll, auch Untersuchungen auf Proteinebene durchzuführen. Zum einen ermöglicht die Lokalisation von Markerproteinen im Gewebe, Hinweise auf den Ort und die Art der toxischen Effekte zu erhalten. Über die meisten der neuen Biomarker für Nephrotoxizität, die auf Basis der Genexpression identifiziert worden waren, ist hinsichtlich ihrer Lokalisation in der gesunden und der kranken Niere noch wenig bekannt oder es gibt widersprüchliche Berichte. Um mehr über den Zusammenhang zwischen Gen- und Proteinexpression der neuen Biomarker zu erfahren, wurden daher die Produkte der Markergene immunhistochemisch im Nierengewebe lokalisiert. Die Messung von Markerproteinen in Serum oder Urin lässt es zum anderen zu, den Verlauf einer Erkrankung direkt mitzuverfolgen, ohne Gewebe entnehmen zu müssen (nicht-invasive Diagnostik). Daher sollten KIM-1, CLU, LCN2 und OPN im Urin OTA-behandelter Tiere untersucht werden, um das Potential dieser Proteine zur Verwendung in nicht-invasiven Diagnoseverfahren zu beurteilen. Die Ergebnisse der Messungen auf Gen- und Proteinebene werden nun im Folgenden für die einzelnen Marker diskutiert.

#### **Kidney injury molecule-1 (KIM-1)**

Veränderungen der Expression von KIM-1 waren die frühesten und stärksten Effekte, die nach Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA auftraten. Eine Induktion von KIM-1 mRNA und Protein konnte bereits zu Zeitpunkten nachgewiesen werden, an denen nur geringfügige histopathologische Veränderungen in Form von Einzelzell-Degeneration und einer damit verbundenen Regeneration in proximalen Tubuli auftraten.

KIM-1 ist ein Transmembranprotein, das bei akuter Nierenschädigung an der apikalen (luminalen) Zellmembran von proximalen Tubulusepithelzellen exprimiert wird (Ichimura *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2004). Die extrazelluläre Domäne des Proteins (s-KIM-1) wird kontinuierlich durch Metalloproteinasen abgeschnitten und gelangt so in den Urin (Bailly *et al.*, 2002; Vaidya *et al.*, 2006).

Auch nach Behandlung mit OTA wurde KIM-1 hauptsächlich an der apikalen Seite von Tubulusepithelzellen mit einem abgeflachten (dedifferenzierten) Phänotyp lokalisiert, was mit den Ergebnissen aus anderen Studien (Ichimura *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*,

2006) gut übereinstimmt und auf eine Rolle von KIM-1 während der Regeneration hinweist. Interessanterweise wurde KIM-1 auch in einigen Zellen detektiert, die einen normalen, differenzierten Phänotyp aufwiesen, was darauf hindeutet, dass KIM-1 tatsächlich ein äußerst empfindlicher Marker für Stress/Zytotoxizität ist. Zudem wurde KIM-1 ausschließlich im Bereich der toxischen Wirkungen von OTA (äußerer Streifen des äußeren Marks) in den Zielzellen des Toxins nachgewiesen, was auf eine hohe Spezifität des Markers schließen lässt.

Neben der starken Expression von KIM-1 im Nierengewebe konnte auch die Exkretion von s-KIM-1 im Urin nachgewiesen werden, wobei die Menge des Proteins im Urin mit der mRNA- und Proteinexpression im Gewebe gut korrelierte. Auch dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien (Ichimura *et al.*, 2004; Vaidya *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2008) und unterstützt somit die Verwendung von s-KIM-1 als nicht-invasiven Biomarker für Nephrotoxizität. Die Funktion von s-KIM-1 ist noch nicht vollständig aufgeklärt; es wurde jedoch die Hypothese aufgestellt, dass s-KIM-1 eine schützende Funktion während der akuten Phase der Toxizität besitzt. So soll s-KIM-1 einer Verstopfung der Nierentubuli entgegenwirken, indem es über seine Ig-Domäne an Integrine von abgelösten Zellen im Lumen bindet und dadurch die Aggregation und Wiederanheftung dieser Zellen verhindert (Bailly *et al.*, 2002; Hirt 2006). Für eine solche Funktion sprechen auch die Ergebnisse dieser Studie, in der KIM-1 auch in Zellen und Zelltrümmern im Tubuluslumen lokalisiert wurde.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Studie darauf schließen, dass KIM-1 ein früher Marker für Schädigung / Regeneration im Bereich der proximalen Tubuli ist. KIM-1 wird in der gesunden Niere nicht exprimiert, aber selbst bei geringsten histopathologischen Veränderungen stark induziert, wobei der Anstieg der Gen- und Proteinexpression im Gewebe mit einer erhöhten Exkretion von s-KIM-1 im Urin korreliert. Somit stellt KIM-1 einen sehr sensitiven und zuverlässigen Biomarker dar, der zudem nicht-invasiv im Urin bestimmt werden kann. Obgleich KIM-1 bis jetzt hauptsächlich zur frühen Diagnose von akutem Nierenversagen angewandt wurde, weisen die Resultate dieser Studie darauf hin, dass auch chronische Nephrotoxizität mithilfe dieses Markers deutlich früher und besser erkannt werden kann als mit den klassischen Biomarkern. Dies ist auch in Einklang mit den Ergebnissen von zwei neueren Studien, in denen die Induktion von KIM-1 nach längerfristiger Exposition mit OTA und Cadmium beschrieben wurde (Marin-Kuan *et al.*, 2006; Prozialeck *et al.*, 2007), obgleich in diesen Studien keine genaue Dokumentation dosis-abhängiger Effekte auf die Expression von KIM-1 (inklusive nicht-toxischer Dosen) durchgeführt wurde.

### Lipocalin-2 (LCN2)

LCN2 ist ein Akute-Phase-Protein, dessen Gen- und Proteinexpression infolge einer akuten Schädigung der proximalen Tubuli dort schnell und ähnlich dramatisch wie KIM-1 induziert wird (Mishra *et al.*, 2003; Mori *et al.*, 2005). Es wird daher vermutet, dass LCN2 ebenfalls einen sensitiven und universellen Marker für nephrotoxische Effekte im Bereich der proximalen Tubuli darstellt (Mori und Nakao 2007), allerdings wurden bislang keine Studien zur Messung der LCN2-Expression bei chronisch verlaufenden Nierenschädigungen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen nach wiederholter Gabe von niedrigen Dosen OTA einen deutlichen Anstieg der mRNA-Expression von LCN2 in der Niere, der mit histopathologischen Veränderungen korrelierte. Allerdings waren Effekte auf Proteinebene im Gewebe nicht nachweisbar. Auch im Urin konnte LCN2 nicht nachgewiesen werden, obgleich dies in verschiedenen Studien als sensitive Methode zum Nachweis von Nierenschäden postuliert wurde (Ding *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004). Somit scheint ein Anstieg der Genexpression von LCN2 nicht zwingend auch zu einer deutlich erhöhten Proteinsynthese zu führen. Möglicherweise ist LCN2 in diagnostischen Verfahren auf Proteinebene, z.B. Immunhistochemie in Nierenbiopsien oder Messung des sezernierten Proteins im Urin, zur Detektion einer geringfügigen Schädigung von Nierentubuli weniger gut geeignet als KIM-1, auch wenn der Anstieg der Genexpression der beiden Marker im Verlauf der Nierenerkrankung ähnlich ist. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Resultaten einer kürzlich veröffentlichten Studie, in der die Proteinexpression in Patienten untersucht wurde, deren Nieren eine tubulointerstitielle Schädigung aufwiesen (Ding *et al.*, 2007). In Nierengewebe von Patienten mit einer leichteren Form der Schädigung wurde LCN2 nicht nachgewiesen, obgleich im Urin mit einem sensitiven ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) eine schwache Erhöhung der Lipocalin-2-Konzentration gemessen wurde. Dagegen konnte LCN2 bei Patienten mit einer stärkeren Form dieser Nierenerkrankung sowohl in proximalen Tubuli als auch im Urin gut nachgewiesen werden, was mit den Beobachtungen in anderen Studien übereinstimmt (Mishra *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2004; Mori *et al.*, 2005). Es ist daher möglich, dass OTA in dieser Studie zwar zu einer leicht erhöhten Proteinsynthese und Sekretion von LCN2 führte, diese Veränderung jedoch nur mit äußerst sensitiven Methoden, wie z.B. einem ELISA, zu detektieren wäre. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass LCN2 mit der verwendeten Western Blot-Methode selbst im Urin von gesunden Tieren aus anderen Rattenstämmen (Wistar-Ratten) leicht nachzuweisen war. Dieser stamm-spezifische Unterschied war auch bei

der Expression von LCN2 in der Niere zu beobachten; so konnte LCN2 bei Wistar-Ratten, die das Protein in den Urin sezernierten, auch in intrazellulären Vesikeln von kortikalen Tubulusepithelzellen nachgewiesen werden, während bei F344/N-Ratten keine Färbung auftrat. Da LCN2 insgesamt aber einen viel versprechenden Marker für Nephrotoxizität darstellt, sind sicherlich weitere Untersuchungen in anderen Modellen für chronische Nierenschäden notwendig. Es sollte dabei jedoch bedacht werden, dass erhöhte Werte für LCN2 in Serum oder Urin auch bei Entzündungen oder Infektionen auftreten können (Björkqvist *et al.*, 2004; Fjaertoft *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 1995) und eine Induktion dieses Markers allein somit nicht spezifisch für eine Nierenschädigung ist.

### **Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)**

Neben der Modulation der Genexpression von KIM-1 und LCN2 war der Anstieg der TIMP-1-mRNA-Expression nach Behandlung mit OTA eine der frühesten Veränderungen in der Niere. Im Gegensatz zu diesen beiden Markern wurde TIMP-1-Protein jedoch auch in der gesunden Niere in zahlreichen Tubulusepithelzellen lokalisiert, sodass es aufgrund des hohen Hintergrunds schwierig war, OTA-bedingte Veränderungen in der Proteinexpression zu detektieren. In kortikalen Tubulusepithelzellen wurde TIMP-1 in vesikulären Strukturen lokalisiert. Des Weiteren waren Bestandteile im Lumen von Tubuli der Nierenrinde teilweise stark positiv gefärbt. Diese Beobachtungen sprechen für eine konstitutive Synthese in S<sub>1</sub>- und S<sub>2</sub>-proximalen Tubulusepithelzellen und die Sekretion von TIMP-1 in den Urin, wo das Protein offensichtlich mit bestimmten Makromolekülen (Proteinen, Zelltrümmer) assoziiert. Ähnliche Beobachtungen wurden von Eddy *et al.* (1995) bei Ratten gemacht (Eddy und Giachelli 1995), die große Mengen an Protein ausscheiden, wie es auch in dieser Studie bei F344/N-Ratten festgestellt wurde. Es ist daher möglich, dass TIMP-1, ähnlich wie KIM-1, bei einer Gewebeschädigung in Tubulusepithelzellen verstärkt produziert und ausgeschieden wird, wie es zumindest in einer Studie berichtet wurde (Chromek *et al.*, 2003). Dies wurde jedoch nicht weiter untersucht, da selbst Kontrolltiere eine starke Expression von vesikulärem TIMP-1-Protein in diesem Bereich der Niere aufwiesen.

Die Lokalisation von TIMP-1 in proximalen Tubulusepithelzellen des S<sub>3</sub>-Segments unterschied sich deutlich von der Verteilung des Proteins in kortikalen Tubuli. Hier wurde das Protein bei Kontrolltieren an der apikalen Seite der Zellen detektiert. Möglicherweise besitzt TIMP-1 daher an dieser Stelle eher intrazelluläre oder

Oberflächerezeptor-gekoppelte Funktion, was mit Beobachtungen für Timp-Proteine *in vitro* und *in vivo* übereinstimmt (Ahmed *et al.*, 2007; Chirco *et al.*, 2006). Interessanterweise schien die TIMP-1-Expression in S<sub>3</sub>-Tubuli nach Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA abzunehmen. Dafür konnten in einigen Zellen positiv gefärbte intrazellulären Vesikel nachgewiesen werden, was bei Kontrolltieren nicht beobachtet wurde. Es ist bekannt, dass TIMP-1 mit der Entwicklung von Fibrose (Gewebevernarbung) assoziiert ist, einer Akkumulation der extrazellulären Matrix, die auf die reduzierte Aktivität von Matrix-Metallproteinase (MMPs) zurückzuführen ist (Johnson *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 1994). Es existieren widersprüchliche Berichte über die Lokalisation von TIMP-1 in fibrotischem Nierengewebe: einerseits wurde das Protein dabei ausschließlich im Interstitium detektiert (Duymelinck *et al.*, 1998; Eddy 1996), andere Studien weisen dagegen auf eine intrazelluläre Funktion von TIMP-1 in Tubulusepithelzellen hin (Ahmed *et al.*, 2007). In dieser Studie kam es infolge der Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA im basalen Bereich einiger proximaler Tubulusepithelzellen im äußeren Mark zur Bildung von Vesikeln, was auf eine Sekretion von TIMP-1 in die tubuläre Basallamina und somit eine Hemmung der MMPs hindeuten könnte. Es ist daher möglich, dass die veränderte Expression von TIMP-1 infolge der wiederholten Exposition mit OTA auf die Entwicklung fibrotischer Prozesse zurückzuführen ist. Einige Studien *in vitro* weisen auf die Induktion fibrotischer Prozesse durch OTA hin (Sauvant *et al.*, 2005a; Sauvant *et al.*, 2005b), in dieser Studie wurden jedoch keine pathologischen Anzeichen für Fibrose festgestellt. Daher besitzt TIMP-1 möglicherweise eine andere Funktion im geschädigten Nierengewebe. Die Ergebnisse verschiedener Genexpressionsstudien weisen auf eine Assoziation zwischen der Induktion von TIMP-1 und regenerativen Vorgängen in der Niere hin (Huang *et al.*, 2001; Kharasch *et al.*, 2006; Thukral *et al.*, 2005), wobei die Expression des Proteins jedoch nicht im Gewebe untersucht wurde. *In vitro* wurde gezeigt, dass TIMP-1 durch Wachstumsfaktoren induziert wird (Chirco *et al.*, 2006). Des Weiteren wurde eine Überexpression von TIMP-1 in bösartigen Tumoren mit erhöhter Proliferationsrate (Kallakury *et al.*, 2001; Miyata *et al.*, 2004) sowie in hypertrophen Regionen nach Nierenschädigung nachgewiesen (Ahmed *et al.*, 2007). Somit könnte die OTA-abhängige Induktion der Genexpression von TIMP-1 auch in Zusammenhang mit der prominenten Stimulation der Proliferation von proximalen Tubulusepithelzellen stehen. Welche Funktion TIMP-1 bei diesem Prozess hat, ist zwar nicht klar, es ist jedoch bekannt, dass das Protein das Zellwachstum regulieren kann und anti-apoptotische Eigenschaften besitzt (Chirco *et al.*, 2006).

Insgesamt stellten Effekte auf die Genexpression von TIMP-1 nach Behandlung mit OTA in der Niere einen frühen Marker für Toxizität dar. Obgleich es möglich ist, dass TIMP-1 in diesem Zusammenhang einen frühen Marker für die Entwicklung einer Fibrose ist, sprechen die pathologischen Veränderungen zum Zeitpunkt der Induktion von TIMP-1 eher dafür, dass das Protein an den Prozessen der Regeneration und Proliferation von Nierenzellen beteiligt ist.

### **Osteopontin (OPN)**

Effekte auf die Genexpression von OPN waren ebenfalls ein frühes Ereignis der OTA-induzierten Nephrotoxizität, wenn auch die Intensität dieser Reaktion nicht so groß war wie bei KIM-1, LCN2 und TIMP-1. Ähnlich wie bei TIMP-1 wurde auch OPN konstitutiv in proximalen Tubuli gebildet, was den Nachweis geringer Veränderungen der Proteinexpression schwierig gestaltete. Dennoch konnte nach 90-tägiger Behandlung mit 70 und 210 µg/kg KG OTA eine Zunahme der intrazellulären OPN-Proteinkonzentration in proximalen Tubulusepithelzellen im äußeren Mark beobachtet werden, was für eine spezifische Induktion von OPN am Ort der OTA-induzierten Schädigung spricht. Zellen mit einer erhöhten OPN-Expression besaßen einen dedifferenzierten Phänotyp und wiesen entweder eine erhöhte Anzahl positiv-gefärbter Vesikel und/oder eine apikale Expression des Proteins auf, wie es auch in anderen Studien berichtet wurde; dort wurde eine verstärkte Expression von OPN in proximalen Tubulusepithelzellen zum Zeitpunkt der Regeneration nach Schädigung durch Ischämie bzw. Behandlung mit Gentamicin oder Quecksilberchlorid gemessen (Persy *et al.*, 1999; Verstrepen *et al.*, 2001; Xie *et al.*, 2001a). Die Lokalisation von OPN in dedifferenzierten Epithelzellen und der Zeitverlauf der mRNA-Expression nach Behandlung mit OTA sprechen somit für die Hypothese, dass OPN mit Regeneration assoziiert ist (Iguchi *et al.*, 2004; Magil *et al.*, 1997; Persy *et al.*, 1999; Verstrepen *et al.*, 2001). Die Tatsache, dass OPN hauptsächlich in Vesikeln detektiert wurde, lässt auf eine erhöhte Sekretion und/oder eine verstärkte endozytische Wiederaufnahme des Proteins in proximale Tubulusepithelzellen schließen (Verstrepen *et al.*, 2001). Sezerniertes OPN vermittelt vermutlich durch die Bindung an Integrinrezeptoren die Adhäsion und Migration von Zellen zur Neubildung eines geschlossenen Epithels (Brown *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 2001b). Dies könnte auch Ursache für die apikale Expression von OPN an dedifferenzierten Tubulusepithelzellen sein, da Integrine sich bei diesen Zellen aufgrund des Verlusts an Polarität nicht nur auf der basalen Seite, sondern auf der gesamten Oberfläche befinden (El Nahas 2003; Vaidya *et al.*, 2008).

Des weiteren könnte die Bindung von OPN an diese Rezeptoren auch die Färbung der Oberfläche von abgerundeten, degenerierten Zellen im Lumen erklären.

Ein besonderes Interesse bei dieser Studie war es, neben der Expression von OPN im Gewebe auch eine mögliche Exkretion des Proteins in den Urin zu untersuchen. Obgleich OPN einen viel versprechenden Marker für Nephrotoxizität darstellt, wurde eine verstärkte Bildung und Sekretion des Proteins bis jetzt nur in einer Studie nachgewiesen, in der die Bildung von Nierensteinen durch die wiederholte Gabe von Ethylenglykol untersucht wurde; OPN im Urin wurde dabei über Western Blot nachgewiesen (Khan *et al.*, 2002). In dieser Arbeit konnte jedoch OPN weder im Urin von Kontrolltieren noch im Urin OTA-behandelter F344/N-Ratten nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte im Urin einer Ratte, die mit einer stark nephrotoxischen Dosis Aristolochiasäure behandelt worden war, eine Bande detektiert werden. Möglicherweise ist der Nachweis von OPN über Western Blot daher keine sehr empfindliche Methode, um geringfügige Erhöhungen der Ausscheidung zu messen. Zudem weisen neuere Erkenntnisse daraufhin, dass OPN im Urin proteolytisch gespalten wird (Christensen *et al.*, 2008); daher könnte der schwierige Nachweis von OPN auch auf der geringen Stabilität des Proteins beruhen. Andererseits ist es bekannt, dass sezerniertes OPN mit Kalziumoxalatkristallen assoziiert, um deren Ausscheidung zu fördern (Kohri *et al.*, 1993). OPN in dieser Form wäre mit der Western Blot-Methode dieser Studie nicht nachzuweisen (Kohri *et al.*, 1993). Auch könnte eine endozytotische Wiederaufnahme von OPN in proximale Tubulusepithelzellen (s. oben) die tatsächliche Sekretion des Proteins deutlich herabsetzen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass OPN in Nierengewebe einen Marker für tubuläre Regeneration darstellt, dessen Gen- und Proteinexpression gut mit dem Grad der Schädigung korreliert. Allerdings macht der starke Hintergrund der Proteinexpression in der gesunden Niere den Nachweis einer leicht erhöhten Expression von OPN schwierig, was eine Verwendung dieses Markers auf Proteinebene nicht unterstützt. Zudem konnte über Immunoblotting keine erhöhte Ausscheidung dieses Markers bei schwach nephrotoxischen Effekten festgestellt werden, was vorerst gegen die Anwendung von OPN als nicht-invasiven Marker für Nierenschädigung spricht. Dennoch sollte dieses Ergebnis mithilfe sensitiverer Nachweismethoden (z.B. ELISA) überprüft werden. Zudem sollte in weiteren Versuchen bedacht werden, Urinproben zum Nachweis von OPN mit einem

Stabilisierungspuffer zu versehen, um dem raschen Abbau des Proteins entgegenzuwirken.

### **Clusterin (CLU)**

Auch die mRNA-Expression von CLU wurde frühzeitig und in einem ähnlichen Ausmaß wie bei OPN induziert. Auf Proteinebene wurde CLU in normalen proximalen Tubuli des äußeren Marks nicht detektiert. Dagegen führte die Exposition mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA in Übereinstimmung mit der erhöhten Genexpression zu einer dosisabhängigen Induktion der Proteinsynthese von CLU in Tubuli, die Anzeichen von Zelldegeneration und Regeneration aufwiesen. Dort wurde CLU sowohl in dedifferenzierten Zellen als auch in abgelösten, degenerierten Zellen nachgewiesen, was sich mit den Berichten von zwei anderen Studien deckt, wo eine verstärkte Expression von CLU in Tubulusepithelzellen während der akuten Stressphase infolge eines regenerativen Stimulus in einer atrophen Niere bzw. infolge der Behandlung mit der nephrotoxischen Verbindung Para-Aminophenol beobachtet wurde (Gobe *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 2007). Die genaue Funktion von CLU unter solch pathologischen Bedingungen ist jedoch bislang ungeklärt. *In vivo* wurde in einigen Fällen eine deutliche Assoziation zwischen CLU und Apoptose nachgewiesen (Buttyan *et al.*, 1989; Hidaka *et al.*, 2002; Lakins *et al.*, 1998; Witzgall *et al.*, 1994) und auch Ergebnisse aus verschiedenen *in vitro*-Experimenten zeigen die erhöhte Gen- und Proteinexpression von CLU durch apoptose-induzierende Stressfaktoren (French *et al.*, 1994; Leskov *et al.*, 2003; Michel *et al.*, 1997; Trougakos *et al.*, 2005). Einige Studien deuten darauf hin, dass OTA in Nierenzellen oxidativen Stress und Apoptose induziert (Kamp *et al.*, 2005a; Petrik *et al.*, 2003). Es ist daher möglich, dass CLU von Zellen vermehrt exprimiert wurde, die infolge der Behandlung mit dem Toxin besonders gestresst waren. Über die Funktion von CLU in den betroffenen Zellen existieren widersprüchliche Berichte, und eine erhöhte intrazelluläre Konzentration des Proteins wurde sowohl mit einer Hemmung als auch mit der Induktion des programmierten Zelltodes assoziiert (Buttyan *et al.*, 1989; French *et al.*, 1994; Hara *et al.*, 2001; Sensibar *et al.*, 1995; Trougakos *et al.*, 2005). Anhand von neueren Erkenntnissen geht man jedoch davon aus, dass die Induktion der normalen, sezernierten Form des Proteins (s-CLU) in der Zelle normalerweise mit dem Schutz vor Stress und Apoptose verbunden ist (Shannan *et al.*, 2006; Trougakos *et al.*, 2005). Dies würde auch mit den Ergebnissen dieser Studie übereinstimmen, in der CLU-positiv gefärbte Zellen nach Behandlung mit OTA hauptsächlich lebensfähig erschienen. Zudem ist eine schützende Funktion dieses Markers in Einklang mit der Tatsache, dass CLU in



zahlreichen Tumoren überexprimiert wird (Miyake *et al.*, 2002; Rosenberg und Silkensen 1995; Shannan *et al.*, 2006).

Zusätzlich zu möglichen intrazellulären Aufgaben könnte s-CLU auch eine Rolle bei der Entfernung von Zelltrümmern aus den Tubuli und der Vermittlung fester Zellkontakte spielen (Leskov *et al.*, 2003; Rosenberg und Silkensen 1995). So wurden im Nierengewebe der OTA-behandelten Tiere positiv gefärbte Zellen und Zelltrümmer im Tubuluslumen beobachtet, wie es auch in anderen Studien berichtet worden war (Hidaka *et al.*, 2002; Witzgall *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 2007). Allerdings wurde im Urin OTA-behandelter Ratten trotz der erhöhten Proteinsynthese im Nierengewebe keine verstärkte Sekretion von s-CLU gemessen. Im Gegensatz dazu wurde bei verschiedenen akuten und chronischen Modellen für Nierenschädigung, einschließlich der Behandlung von Ratten mit nephrotoxischen Verbindungen wie Gentamicin, Cisplatin und N-Phenylanthranilsäure, ein Anstieg der s-CLU-Menge im Urin festgestellt (Aulitzky *et al.*, 1992; Betton *et al.*, 2007; Bounous *et al.*, 2007; Eti *et al.*, 1993; Gautier *et al.*, 2007; Hidaka *et al.*, 2002; Hoffmann *et al.*, 2008). Auch wurde s-CLU neben s-KIM-1 vor kurzem von Behörden in den USA sowie in Europa als Urin-Biomarker für akute Nephrotoxizität anerkannt ([www.c-path.org/pstc.cfm](http://www.c-path.org/pstc.cfm)). Interessanterweise wurden bei den oben genannten Studien Sprague-Dawley- und Wistar-Ratten verwendet, die s-CLU unter normalen Umständen (keine Schädigung) nur in sehr geringen Mengen ausscheiden. Im Gegensatz dazu wiesen die F344/N-Ratten dieser Studie eine hohe konstitutive Sekretion des Markers auf. Es ist daher möglich, dass kleine Unterschiede in der Ausscheidung von s-CLU infolge der Behandlung mit OTA wegen des deutlich erhöhten Grundspiegels von s-CLU im Urin nicht nachgewiesen werden konnten. Des Weiteren könnten auch hier wieder Stamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Reaktion auf nephrotoxische Verbindungen eine Rolle spielen (s. LCN2) oder die Sekretion von s-CLU an bestimmte toxische Wirkmechanismen gekoppelt sein, die durch die OTA-Behandlung nicht induziert wurden. Dies sollte eventuell in anderen Rattenstämmen und mit sensitiven Nachweismethoden (ELISA) überprüft werden.

Insgesamt lässt das Ergebnis dieser Studie darauf schließen, dass CLU in der Niere infolge von Zellstress und Gewebeschädigung induziert wird und damit einen frühen Marker für toxische Effekte darstellt. Es sollte jedoch bedacht werden, dass eine Induktion der CLU-mRNA-Expression in proximalen Tubulusepithelzellen nach wiederholter Behandlung mit 70 µg/kg KG OTA weniger ausgeprägt war als bei anderen Markern (z.B. KIM-1, TIMP-1 und LCN2).

### **Vimentin (VIM)**

VIM wird normalerweise nur von mesenchymalen Zellen gebildet, während differenzierte Epithelzellen dieses Protein nicht enthalten. Die Induktion von VIM in renalen Tubulusepithelzellen gilt daher als klassisches Merkmal für die Dedifferenzierung dieser Zellen zu einem embryonalen (mesenchymalen) Phänotyp während der Regeneration von geschädigtem Gewebe (Bonventre 2003; Ichimura *et al.*, 1998; Wallin *et al.*, 1992; Witzgall *et al.*, 1994). Erwartungsgemäß kam es daher auch in dieser Studie nach Behandlung mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA zur Proteinsynthese von VIM in Tubuli, die Anzeichen von Regeneration aufwiesen. Interessanterweise waren die Effekte auf Ebene der Transkription sehr viel geringer als auf Proteinebene. Bei Tieren, die 90 Tage mit der mittleren Dosis OTA behandelt wurden (70 µg/kg KG), konnte das Protein in Zellen in einigen geschädigten Tubuli nachgewiesen werden, obgleich keine erhöhte Genexpression zu beobachten war. Selbst bei Hochdosistieren, bei denen die überwiegende Mehrzahl der Tubulusepithelzellen zumindest eine schwach positive Färbung für Vimentin zeigten, wurde nur eine leichte Zunahme der mRNA-Expression verzeichnet. Ähnlich geringe Veränderungen der Genexpression von VIM trotz einer starken Regeneration von Nierengewebe wurden auch in einer anderen Studie gemessen (Kharasch *et al.*, 2006). Somit scheint im Fall von VIM der Nachweis des Proteins im Gewebe und nicht die verstärkte Transkription des Gens die bessere Methode zu sein, frühzeitig regenerative Veränderungen in der Niere zu detektieren.

### **Mikroalbuminurie und $\beta$ 2-Mikroglobulin**

Neben der Untersuchung von KIM-1, LCN2, CLU und OPN im Urin OTA-behandelter Ratten wurden zwei weitere Marker für eine gestörte Nierenfunktion gemessen. So konnte anhand der Analyse von Urinproteinen über Western Blot bei Hochdosistieren bereits nach 14 Tagen ein kleiner, jedoch signifikanter, Anstieg von Albumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin nachgewiesen werden, während die Routine-Analyse des Urins nach wiederholter Exposition von F344/N-Ratten mit bis zu 210 µg/kg KG OTA keinen Anstieg des Proteingehalts angezeigt hatte. Mikroalbuminurie in Zusammenhang mit einer erhöhten Ausscheidung von Proteinen mit einem geringen Molekulargewicht ist ein charakteristisches Anzeichen für eine gestörte Wiederaufnahme von Proteinen aus dem Ultrafiltrat in proximale Tubulusepithelzellen (Birn und Christensen 2006; Hart und Kinter 2005), was auch *in vitro* in OK-Zellen nach Behandlung mit Ochratoxin A gezeigt worden war (Gekle und Silbernagl 1996). In Hochdosistieren ging dieser Effekt

Veränderungen von Parametern der klassischen Urin- und Serumanalyse, wie z.B. der Freisetzung von NAG und einem erhöhten Kreatinin-Spiegel im Blut, voraus. Dies unterstützt die Verwendung dieser Marker (Mikroalbumin und  $\beta$ 2-Mikroglobulin) als Urin-Biomarker für akute Nephrotoxizität; als solche wurden sie mittlerweile auch von den Behörden anerkannt ([www.c-path.org/pstc.cfm](http://www.c-path.org/pstc.cfm)). Allerdings war die Induktion der Gen- und Proteinexpression der neuen Biomarker (insbesondere KIM-1) in Tieren, die mit der mittleren Dosis OTA behandelt wurden, sensitiver und eindeutiger als die erhöhte Ausscheidung von Proteinen über den Urin, zumal auch Kontrolltiere mit der Zeit eine leichte Proteinurie aufwiesen.

#### 4.1.3 Aspekte zur Risikobewertung von OTA

Da es infolge der Einnahme kontaminierter Lebensmittel zu einer chronischen Exposition des Menschen mit OTA kommt, muss ein Grenzwert in Nahrungsmitteln festgesetzt werden, der die tägliche bzw. wöchentlich duldbare Aufnahmemenge festlegt, bei der keine toxischen Wirkungen zu erwarten sind. Je besser der Stand der Forschung hinsichtlich Wirkmechanismus, Relevanz für den Menschen, Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Toxikokinetik der Substanz ist, desto besser lässt sich ein Grenzwert ableiten. Toxikokinetische Aspekte spielen für die Bewertung des Gesundheitsrisikos für den Menschen eine entscheidende Rolle. Da beim Tierversuch nur auf die Situation im Menschen extrapoliert werden kann, ist es notwendig, Daten über Plasmakonzentrationen, Anreicherung der Substanz im Gewebe und Ausscheidung zu besitzen.

In dieser Studie wurden die toxischen Wirkungen der Behandlung von Ratten mit bis zu 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA über 14, 28 oder 90 Tage untersucht und parallel dazu Plasma- und Gewebekonzentrationen der Substanz gemessen. Interessanterweise konnte in den behandelten Tieren anhand verschiedenster toxikologischer Endpunkte (klassische und neue Marker) gezeigt werden, dass adverse Effekte nur in Tieren auftraten, die mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA behandelt wurden. So traten in der Niere von Tieren dieser Gruppen dosis- und zeitabhängig histopathologische Veränderungen sowie eine Induktion der Expression von Biomarkern für Nephrotoxizität wie KIM-1, LCN2 oder CLU auf; zudem wurden Veränderungen der Konzentration bestimmter Markerproteine für Nierenschädigung im Urin gemessen. Außerdem weisen markante Veränderungen der Zellteilung in der Niere auf ein kanzerogenes Potential dieser Dosen hin. Dagegen wurden in Ratten, die bis zu 90 Tage mit der niedrigen Dosis (21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG) OTA behandelt wurden, keine Unterschiede zur Kontrollgruppe

beobachtet, sodass diese Dosis in der Studie den *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) für alle gemessenen Endpunkte für Toxizität darstellt. Der NOAEL dieser Studie entspricht somit dem NOAEL der 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie (NTP 1989).

Somit scheint ein Schwellenwert für die nephrotoxische Wirkung von OTA zu existieren. Anhand der Messergebnisse für die Plasma- und Gewebekonzentration der einzelnen Dosisgruppen kann man darauf schließen, dass die wiederholte Aufnahme von bis zu 21 µg/kg KG OTA in Ratten nicht zum Erreichen toxischer Spiegel führt. So kam es infolge der Exposition mit 70 oder 210 µg/kg KG OTA in den Ratten zu hohen Plasmaspiegeln sowie einem kontinuierlichen Anstieg der Gewebekonzentration in Niere und Leber. Dagegen schien die wiederholte Exposition mit 21 µg/kg KG OTA zu einem Fließgleichgewicht zwischen Aufnahme und Ausscheidung zu führen. Obgleich bekannt ist, dass OTA sich aufgrund seiner Lipophilie in fettreichen Geweben anreichert und eine lange Eliminationshalbwertszeit aus dem Plasma besitzt (Ringot *et al.*, 2006), lässt das Fehlen jeglicher adverser Effekte nach bis zu 90 Tagen wiederholter Behandlung mit 21 µg/kg KG den Rückschluss zu, dass es bei dieser Dosis in Ratten selbst bei langfristiger Exposition nicht zum Erreichen der kritischen toxischen Konzentration von OTA kommt.

Für die Abschätzung des Risikos für den Menschen ist es des weiteren wichtig zu betonen, dass die Plasmakonzentration von OTA bei Behandlung mit 21 µg/kg KG nicht höher als 0,64 µM lag, was immer noch um den Faktor 200-1400 höher ist als die durchschnittliche Konzentration des Toxins im Plasma von Menschen, die über die Nahrung mit OTA exponiert werden (0,18-1,19 ng/ml, entspricht 0,45-2,95 nM) (SCOOP 2002). Auch die Bestimmung der OTA-Konzentration im Plasma von Personen, die über ihre Nahrung relativ hohe OTA-Konzentrationen aufnehmen, ergab Werte, die immer noch mehrere Größenordnungen unterhalb von denen liegen, die im Tierversuch zu adversen Effekten geführt hatten (EFSA 2006).

#### **4.1.4 Neue Aspekte zum molekularen Wirkungsmechanismus von OTA**

OTA stellt eines der potentesten Nierenkanzerogene, die bis jetzt in Tierexperimenten untersucht wurden, dar (Lock und Hard 2004), allerdings ist der Wirkmechanismus, über den OTA in Ratten Nierentumoren induziert, noch weitgehend ungeklärt. Die 90-Tage-Studie mit OTA sollte daher auch dazu dienen, einige neue Erkenntnisse zum kanzerogenen Wirkmechanismus der Substanz zu liefern.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Induktion der Zellproliferation einen entscheidenden Schritt in der OTA-abhängigen Nierenkanzerogenese darstellt. Zudem scheint ein Schwellenwert für diesen Effekt zu existieren, da die Behandlung mit einer nicht-kanzerogenen Dosis (21 µg/kg KG OTA) auch nicht zu einer Steigerung der Zellteilungsrate führte. Ähnliche nicht-lineare Zusammenhänge zwischen Proliferation und Tumorentstehung wurden bei verschiedenen nicht-gentoxischen Kanzerogenen festgestellt (Butterworth und Bogdanffy 1999; Dietrich und Swenberg 1991; Lutz *et al.*, 1997), was die Hypothese stützt, dass OTA Nierenkrebs nicht durch eine direkte Interaktion mit DNA, sondern über einen epigenetischen Wirkmechanismus auslöst (Mally und Dekant 2005; Schilter *et al.*, 2005).

Neben der deutlichen Steigerung der Zellteilungsrate waren Zelldegeneration und die Entstehung von großen Zellen mit deutlich vergrößerten Zellkernen die markantesten Effekte von OTA in der Niere. Eine Zunahme der Zellkerngröße ist ein Hinweis auf eine gestörte Trennung der Chromatiden während der Mitose und einen darauf folgenden Abbruch der Zytokinese. Eine Störung der Zellteilung und infolgedessen die Bildung polyploider Zellkerne anstelle der bei anderen Nephrotoxinen beobachteten tubulären Hyperplasie könnte somit die auffällige Pathologie nach Exposition mit OTA erklären. Zudem könnte eine Behinderung der Mitose durch OTA auch die Ursache für die Induktion des Todes einzelner Zellen und der damit verbundenen regenerativen Proliferation sein. Die Auslösung von Apoptose wäre dabei als Schutzmechanismus zur Elimination genetisch veränderter Zellen anzusehen (Klaunig *et al.*, 2000). Abnorme mitotische Figuren und die Bildung von stark vergrößerten Zellkernen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nach Exposition mit OTA nachgewiesen (Boorman *et al.*, 1992; Maaroufi *et al.*, 1999; Mally *et al.*, 2005b; Rached *et al.*, 2006; Steyn *et al.*, 1975). Der Beitrag solcher Zellen zur OTA-vermittelten Nierenkanzerogenese muss zwar noch bewiesen werden, allerdings ist es gut bekannt, dass polyploide Zellen genetisch instabil sind und somit potentielle Vorläuferzellen von Tumoren darstellen (Storchova und Pellman 2004). Normalerweise werden solche Zellen zwar in einem Ruhezustand gehalten und gehen nicht noch einmal in die Mitosephase (Storchova und Pellman 2004). In Gegenwart von stark mitogen wirkenden Substanzen könnte es jedoch zum Überwinden der Kontrollpunkte und zur Zellteilung kommen, wie es nach Behandlung mit OTA beobachtet wurde. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache gestützt, dass stark vergrößerte Zellkerne eine BrdU-positive Färbung zeigten, was auf mehrere Runden DNA-Replikation ohne nachfolgende Zytokinese hindeutet. Des Weiteren wurde bereits nach kurzer Exposition mit kanzerogenen Dosen OTA die

Induktion verschiedener Regulatoren des Zellzyklus, die an der Kontrolle der Mitose beteiligt sind, nachgewiesen (Adler *et al.*, 2009). Obgleich daher die spezifischen molekularen Ereignisse, die in Nierentubulusepithelzellen eine Störung der Mitose verursachen, noch nicht identifiziert wurden, weisen die deutlich gesteigerte Zellproliferation nach Behandlung mit OTA und die gleichzeitige Präsenz mitotischer Anomalien darauf hin, dass der molekulare Mechanismus der OTA-abhängigen Kanzerogenese auf einer Störung der Zellzykluskontrolle beruht.

In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass einige toxische Effekte von OTA auf eine Störung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase zurückzuführen sein könnten (Berndt *et al.*, 1984; Dopp *et al.*, 1999; Hoehler *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 1989; Mally *et al.*, 2006a). OTA führt in Nierenzellen sehr frühzeitig zu einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (Berndt *et al.*, 1984; Dopp *et al.*, 1999). In einer humanen Nierenepithelzelllinie wurde eine OTA-abhängige Stimulation der Zellteilung infolge einer Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nachgewiesen (Benesic *et al.*, 2000). Interessanterweise führte die Behandlung mit 70 und 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA über 90 Tage zu einem signifikanten Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Plasma. Zudem konnte im Nierengewebe der OTA-behandelten Ratten eine klare Abnahme der Expression von Regucalcin nachgewiesen werden (Adler *et al.*, 2009). Dies wurde auch bei anderen Nephrotoxinen beobachtet und ist mit einem Anstieg der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Niere assoziiert (Yamaguchi 2005). Es ist bekannt, dass dieser wichtige Botenstoff an der Regulation der Zellteilung beteiligt ist (Roderick und Cook 2008).  $\text{Ca}^{2+}$  beeinflusst beispielsweise die Aktivität der Phosphokinase C, welche unter anderem Signalwege für die Proliferation steuert. Eine Stimulation dieser Kinase wurde bei einigen nicht-gentoxischen Kanzerogenen festgestellt und könnte somit im Zusammenhang mit den Effekten auf die Zellteilung stehen (Klaunig *et al.*, 2000). Somit ist es möglich, dass die Störung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase die Basis für die Störung der Zellzyklus-Kontrolle ist und/oder die Zellproliferation in der Niere auslöst. Dies wird auch durch die Ergebnisse aus zwei Microarray-Studien gestützt, in denen infolge der Behandlung mit OTA Veränderungen von Genen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion, unter anderem von Regucalcin, gemessen wurden (Arbillaga *et al.*, 2008; Marin-Kuan *et al.*, 2006).

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass OTA zu oxidativem Stress und dadurch indirekt zu DNA-Schäden führt (Cavin *et al.*, 2007; Marin-Kuan *et al.*, 2006). Oxidative DNA-Schäden treten bereits bei sehr niedrigen, nicht-kanzerogenen Dosen Ochratoxin A auf und können sowohl in der Niere als auch der Leber nachgewiesen werden (Kamp *et*

*al.*, 2005a; Mally *et al.*, 2005a). In dieser Studie wurde interessanterweise in den beiden Organen eine ähnlich hohe Gewebekonzentration von OTA gemessen, allerdings konnten keine pathologischen Veränderungen in der Leber beobachtet werden. Obgleich es nicht ausgeschlossen werden kann, dass das Toxin in der Niere in den spezifischen Zielzellen im S<sub>3</sub>-Segment des proximalen Tubulus akkumuliert und daher dort sehr viel höher konzentriert vorliegt, stimmen die Daten dieser Studie mit Ergebnissen aus anderen Studien überein, in denen relativ hohe Dosen OTA (500 µg/kg KG oder mehr) verabreicht worden waren (Arbillaga *et al.*, 2008; Mally *et al.*, 2005b). Auch hier waren in Niere und Leber ähnlich hohe Konzentrationen gemessen worden. Selbst wenn OTA bereits in niedrigen Konzentrationen in Zellen oxidativen Stress auslöst, scheint somit kein ultimativer Zusammenhang zur Krebsentstehung in der Niere zu bestehen. Der Kurvenverlauf für die Dosis-Wirkungsbeziehung für renale Zellproliferation bzw. Tumorzinzidenz (Abb. 4.1) deutet vielmehr darauf hin, dass die Induktion der Zellproliferation in der Niere hauptverantwortlich für die Tumorgenese ist. Möglicherweise sorgen oxidative DNA-Schädigungen durch OTA jedoch in Zusammenhang mit der erhöhten Zellteilungsrate für eine erhöhte Mutationsrate und die rasche Entwicklung der Tumoren.

#### **4.1.5 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen**

Die Behandlung von männlichen F344/N-Ratten mit 70 und 210 µg/kg KG OTA über bis zu 90 Tagen führte zeit- und dosisabhängig zur Degeneration und Regeneration von Epithelzellen im Bereich des S<sub>3</sub>-Segment des proximalen Tubulus und ist daher ein geeignetes Modell für die Entwicklung einer Nierenschädigung infolge der kontinuierlichen Exposition gegenüber einer nephrotoxischen Verbindung.

Während nur schwache Effekte auf traditionelle klinisch-chemische Parameter in Blut und Urin gemessen wurden, konnte im Nierengewebe eine frühzeitige Induktion der Gen- und/oder Proteinexpression verschiedener neuer Marker für Nephrotoxizität (KIM-1, LCN2, CLU, TIMP-1, OPN, VIM, HO-1) nachgewiesen werden, die gut mit den histopathologischen Veränderungen übereinstimmte, diesen aber nicht vorausging. Somit unterstützen die Ergebnisse dieser Studie die Verwendung dieser Marker als empfindliche Indikatoren im Rahmen der Prüfung auf Nephrotoxizität. KIM-1 war in dieser Studie der empfindlichste Biomarker, da bereits bei einer geringfügigen Schädigung des Gewebes eine dramatisch erhöhte Expression von KIM-1 mRNA und Protein verzeichnet wurde; zudem konnte auch eine erhöhte Ausscheidung von

s-KIM-1 über den Urin nachgewiesen werden, sodass sich der Marker auch für nicht-invasive Untersuchungen auf Nephrotoxizität eignet.

Neben der Bestimmung von Biomarkern für Nephrotoxizität konnten aus der Studie im Tier auch neue Erkenntnisse über die frühen Ereignisse und den Mechanismus der OTA-abhängigen Nierenkanzerogenese gewonnen werden. So spielen frühe Veränderungen der Zellproliferation in der Niere infolge einer Exposition mit OTA offensichtlich einen entscheidenden Schritt bei der Tumorgenese in der Ratte. Eine Steigerung der Zellteilung konnte nach Gabe von kanzerogenen Dosen im Zielgewebe bereits nach 28 bzw. 90 Tagen nachgewiesen werden. Dagegen traten bei der nicht-kanzerogenen Dosis (21 µg/kg KG) auch nach drei Monaten keine Veränderungen der Zellteilungsrate auf. Somit konnten in einer 90-Tages-Studie anhand von Veränderungen der Zellteilung kanzerogene und nicht-kanzerogene Dosen OTA differenziert werden. Das Ergebnis dieser Studie unterstützt damit den Ansatz, Effekte auf die Zellteilung als Marker zur Früherkennung von Substanzen mit kanzerogenen Potential einzusetzen.

Schließlich erbrachte die Untersuchung verschiedener Endpunkte für Toxizität, dass die Exposition der Tiere gegenüber 21 µg/kg KG OTA keine adversen Effekte hatte und diese Dosis somit der NOAEL dieser Studie ist. Die entspricht auch dem Ergebnis der 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie mit OTA. Somit wurden bereits in dieser relativ kurzen Studie anhand empfindlicher Endpunkte wesentliche Informationen über Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei längerer, kontinuierlicher Exposition gegenüber OTA gewonnen. Messungen der OTA-Konzentration in Plasma und Niere zeigten zudem, dass es bei der kontinuierlichen Aufnahme dieser Dosis in den Tieren nicht zu einer Akkumulation von OTA im Zielgewebe kam. Daher kann man darauf schließen, dass auch eine chronische Exposition gegenüber dieser niedrigen Dosis in der Ratte keine toxischen Effekte zur Folge hat.



## 4.2 Bewertung neuer *in vivo*-Biomarker für Nephrotoxizität in NRK-52E-Zellen als *in vitro*-Testsystem

Neben der Reduktion von Langzeittierversuchen ist es ein Hauptanliegen verschiedener Interessenverbände aus Industrie und Politik, Tierversuche für Toxizitätstests durch Verfahren *in vitro* zu ersetzen, um Kosten, Zeit und Tierzahl zu sparen. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, mögliche sensitive Endpunkte für Nephrotoxizität in einem *in vitro*-Modellsystem zu untersuchen. Da das proximale Tubulusepithel aufgrund der besonderen Empfindlichkeit der Zellen einen der häufigsten Zielorte von nephrotoxischen Chemikalien darstellt, würde ein geeignetes *in vitro*-Testsystem den Vorteil bieten, solche Substanzen über *Screening*-Verfahren rasch zu identifizieren und von weiteren Testungen am Tier auszuschließen. Um nephrotoxische Wirkungen *in vitro* möglichst empfindlich nachzuweisen, ist es daher notwendig, Endpunkte zu messen, die bereits bei nicht-zytotoxischen Stoffkonzentrationen (und möglichst ausschließlich in Nierenzellen) eintreten. Für Hochdurchsatz-Testreihen ist es zudem sinnvoll, *in vitro*-Systeme zu verwenden, die leicht zu handhaben sind und gut replizierbare Ergebnisse bieten können. Primärzellen sind aus diesem Grund für große *screenings* weniger gut geeignet wie Zelllinien, obgleich sie natürlich die physiologischen Eigenschaften sehr viel besser repräsentieren als permanente Zelllinien. Daher wurde in dieser Arbeit eine Nierenzelllinie (NRK-52E) verwendet, die Eigenschaften von proximalen Tubulusepithelzellen besitzt (Lash *et al.*, 2002a; Prozialeck *et al.*, 2006) und bereits in zahlreichen Studien als Modell für Nierenzellen verwendet wurde (Giuliani *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 2001; Lash *et al.*, 2002b; Leussink *et al.*, 2002; Madden *et al.*, 2002; Sauvant *et al.*, 2005a; Yasui *et al.*, 2002).

Ansatzpunkt waren – wie beim Tierversuch – auch hier Veränderungen der Genexpression, da man davon ausgeht, dass diese einen frühzeitigen Hinweis auf Toxizität geben können. Da die Biomarker KIM-1, LCN2, OPN, CLU, TIMP-1, VIM und HO-1 im oben beschriebenen und in anderen Tierversuchen frühzeitig infolge einer Schädigung des Tubulusepithels verstärkt exprimiert wurden, sollte die Expression dieser Marker in NRK-52E-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen, *in vivo* sehr gut charakterisierten Nephrotoxinen bestimmt werden. Eine Induktion einiger der genannten Marker auf Gen- oder Proteinniveau war bereits in einzelnen Zellkulturstudien beschrieben worden (Bailly *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2001; Mishra *et*

*al.*, 2003; Sikorski *et al.*, 2004). Allerdings wurden bislang noch keine vergleichenden Studien in einem einheitlichen System und unter Verwendung mehrerer toxischer Substanzen mit unterschiedlichen Wirkungsmechanismen durchgeführt.

Messungen auf mRNA-Ebene in NRK-Zellen zeigten indes keine konsistente Induktion der ausgewählten Marker nach Behandlung mit nicht- bzw. geringfügig zytotoxischen Konzentrationen OTA, Kaliumbromat (KBrO<sub>3</sub>), Cadmiumchlorid (CdCl<sub>2</sub>) oder Cisplatin über 24 oder 48 Stunden. Gerade die Genexpression von KIM-1, LCN2 und TIMP-1, welche im Tierversuch mit OTA bereits bei geringen pathologischen Veränderungen in der Niere am stärksten dereguliert worden war, zeigte *in vitro* keinen Effekt.

In Übereinstimmung mit Studien *in vivo* und *in vitro* wurde zwar nach Exposition der Zellen mit OTA, CdCl<sub>2</sub> oder KBrO<sub>3</sub> eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Expression von HO-1 gemessen (Delker *et al.*, 2006; Gautier *et al.*, 2001; Marin-Kuan *et al.*, 2006; Sikorski *et al.*, 2004). Allerdings stand die Abwesenheit von HO-1 mRNA und Protein in Cisplatin-behandelten NRK-Zellen in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen aus einer *in vivo*-Studie an Ratten, in der die Behandlung mit Cisplatin einen massiven Anstieg der HO-1-Expression im Nierengewebe zur Folge hatte (Amin *et al.*, 2004). Somit ist die Induktion von HO-1 in der Zelllinie möglicherweise abhängig von der gegebenen toxischen Substanz bzw. dem jeweiligen toxischen Mechanismus. Andererseits könnten im Fall von Cisplatin auch kinetische Aspekte eine Rolle spielen und HO-1 als früher Marker für Zellstress zu einem früheren Zeitpunkt als nach 24 Stunden induziert worden sein.

Allein die Genexpression von CLU wurde nach Behandlung mit allen Nephrotoxinen schwach induziert. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in einer früheren Studie mit NRK-52E-Zellen erzielt, die 24 Stunden mit nicht-zytotoxischen Konzentrationen Cisplatin behandelt wurden (Huang *et al.*, 2001). Vermutlich beruht dieser Effekt auf dem Auftreten eines Stressfaktors, z.B. oxidativer oder gentoxischer Stress (Michel *et al.*, 1997; Trougakos *et al.*, 2005). Interessanterweise waren die Wirkungen von OTA, KBrO<sub>3</sub>, CdCl<sub>2</sub> und Cisplatin auch bei hohen, zytotoxischen Konzentrationen relativ gering und wiesen im Gegensatz zur Wirkung auf HO-1 keine klare Konzentrationsabhängigkeit auf. Dieses Ergebnis ist jedoch konsistent mit dem Bericht von Trougakos *et al.* (2005); hier wurde festgestellt, dass es in humanen OS-Zellen mit einem hohen endogenen Gehalt an CLU (Protein) infolge der Exposition mit einem gentoxischen Agens nur zu einer schwachen Induktion der CLU-Genexpression kam, wohingegen die Induktion in Zellen mit einem niedrigen Hintergrundniveau an CLU

deutlich stärker war. Auch in NRK-52E-Zellen wurde CLU auf Gen- und Proteinebene stark exprimiert, sodass dies möglicherweise die Ursache für die schwachen Effekte auf die mRNA-Expression nach Behandlung mit nephrotoxischen Verbindungen ist. CLU spielt in Zellen offensichtlich eine wichtige Rolle bei der Entscheidung zwischen Zelltod und Überleben, wobei die Konzentration und subzelluläre Lokalisation des Proteins ausschlaggebend sind (French *et al.*, 1994; Girton *et al.*, 2002; Lakins *et al.*, 1998; Leskov *et al.*, 2003; Sensibar *et al.*, 1995; Trougakos *et al.*, 2005). Ein moderater Level an CLU im Zytoplasma besitzt eine zytoprotektive Funktion, während die Akkumulation des Proteins dagegen Apoptose-fördernd wirkt (Trougakos *et al.*, 2005). Des Weiteren kommt es unter dem Einfluss eines starken Stressfaktors zur Bildung bzw. Aktivierung einer besonderen CLU-Form (n-CLU), die in den Zellkern wandert und Apoptose induziert (Leskov *et al.*, 2003). In NRK-Zellen wurde nach Behandlung mit OTA, KBrO<sub>3</sub> und CdCl<sub>2</sub> trotz einer leichten Steigerung der Genexpression eine konzentrationsabhängige Abnahme von intrazellulärem  $\alpha$ -CLU festgestellt. Dieses Ergebnis ist mit den Befunden aus Prostatagewebe konsistent, in dem eine deutliche Veränderung der Biosynthese von CLU infolge der Induktion von Apoptose festgestellt wurde (Lakins *et al.*, 1998): die Bildung des normalen, sezernierten CLU-Protein nahm stark ab, während die Konzentration von Zwischenstufen der CLU-Synthese anstieg und eine neue CLU-Form mit einer Masse von 42 kDa gebildet wurde. Diese Beobachtungen wurden in NRK-Zellen nach Behandlung mit Cadmiumchlorid gemacht und korrelieren mit den zytotoxischen Effekten der Substanz. In ähnlicher, wenn auch abgeschwächter Form scheint dieser Prozess auch nach Exposition gegenüber OTA und KBrO<sub>3</sub> abzulaufen, wohingegen Cisplatin auch in zytotoxischen Konzentrationen zu einer Steigerung der normalen CLU-Synthese und nicht des apoptose-assoziierten Weges führt. Somit scheint die Wirkung toxischer Stoffe auf die intrazelluläre CLU-Konzentration stark vom spezifischen Wirkmechanismus abzuhängen und sich kein allgemein gültiger Trend ableiten zu lassen. Alles in allem besitzt somit auch CLU aufgrund seiner schwachen Induzierbarkeit auf Genexpressionsebene und seiner komplexen, substanz-spezifischen Biosynthese in NRK-52E-Zellen kein Potential als zuverlässiger und sensitiver Indikator für toxische Effekte *in vitro*.

Mögliche Ursache für die schwachen Effekte der Markerexpression *in vitro* im Vergleich zu Studien *in vivo* ist zum einen, dass einige der Gene bereits in unbehandelten NRK-52E-Zellen zu einem sehr hohen Grad exprimiert wurden. Dies hängt vermutlich mit dem dedifferenzierten Phänotyp von kultivierten Zellen zusammen; so konnte in einer Studie bereits bei der Kultivierung von Primärzellen aus

dem proximalen Tubulus ein deutlicher Anstieg der Genexpression von LCN2, VIM und CLU gemessen werden (Weiland *et al.*, 2007). Dies stimmt auch mit der Tatsache überein, dass für VIM in den NRK-Zellen eine hohe endogene Expression nachgewiesen wurde. Es ist daher wahrscheinlich, dass eine Behandlung mit toxischen Substanzen keinen zusätzlich stimulierenden Effekt auf die ohnehin bereits sehr starke Expression dieser Marker hat.

In deutlichem Gegensatz zu tierexperimentellen Studien konnte die mRNA-Expression von KIM-1 weder in Kontrollzellen noch nach Behandlung mit einem der Nephrotoxine in den Zellen nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass KIM-1 in NRK-52E-Zellen nicht exprimiert wird, stimmt mit Studien an einer weiteren Nierenzelllinie überein, welche Eigenschaften des proximalen Tubulusepithels besitzt, den LLC-PK<sub>1</sub>-Zellen (Zhang *et al.*, 2007). Die Expression von KIM-1 wird mit Dedifferenzierung und Proliferation assoziiert. Immortalisierte Nierenzellen (HK-2) bzw. Nierenkrebszellen (769-P) produzieren endogen große Mengen des Proteins (Bailly *et al.*, 2002). Somit könnte eine Ursache für die fehlende Expression von KIM-1 in NRK-52E-Zellen darin bestehen, dass es in den Zellen während der Konfluenz zur Ausbildung eines gewissen Differenzierungsgrades kommt, bei dem KIM-1 nicht exprimiert wird. KIM-1 ist *in vivo* mit der Regeneration von Nierengewebe assoziiert (Ichimura *et al.*, 1998; van Timmeren *et al.*, 2007). Nun wurde in verschiedenen Studien gezeigt, dass, im Gegensatz zur *in vivo*-Situation, in Monolayern von kultivierten Nierenzellen bei kontinuierlicher Exposition gegenüber nephrotoxischen Verbindungen keine Regeneration stattfindet, sondern ausschließlich im Falle einer Entfernung der toxischen Substanz (Huang *et al.*, 2001; Kamp *et al.*, 2005b; Kays *et al.*, 1993; Kays und Schnellmann 1995; Wiegele *et al.*, 1998; Witzgall *et al.*, 1994). Daher ist es möglich, dass KIM-1 (und andere Marker für Regeneration) unter den experimentellen Bedingungen dieser Studie, welche zur Imitation progressiver toxischer Effekte ausgewählt wurden, nicht induziert wurden.

Andererseits stimmen die Ergebnisse mit anderen Studien überein, in denen Veränderungen der Genexpression infolge der Behandlung mit Toxinen *in vivo* und *in vitro* gemessen wurden (Huang *et al.*, 2001; Jessen *et al.*, 2003; Tamura *et al.*, 2006). So wurden in primären Hepatozyten wie auch in der Leber nach Behandlung mit verschiedenen Peroxisomen-Proliferatoren Gene, die mit der pharmakologischen Wirkung der Substanzen assoziiert sind, in ähnlicher Weise moduliert. Im Gegensatz dazu wurden Gene, die mit den toxischen Wirkungen der Substanzen (Proliferation und Apoptose) assoziiert sind, nur *in vivo* dereguliert. Dies ist vermutlich auf das Fehlen

von weiteren Zelltypen (z.B. Kupffer-Zellen) *in vitro* zurückzuführen, die *in vivo* eine bedeutende Rolle im toxischen Wirkmechanismus spielen (Tamura *et al.*, 2006). Somit können toxische Wirkungen, die auf der Interaktion der Zielzellen mit anderen Zellen, Bestandteilen der Matrix und anderen extrazellulären Faktoren beruhen, durch einfache Zellkulturmodelle nicht ausreichend nachgeahmt werden. Daher scheint es zum derzeitigen Zeitpunkt nicht sinnvoll, für solche komplexen Zielorgane wie die Niere einen vollständigen Ersatz der Tierexperimente (*Replacement*) zu fordern. Dennoch ist es wichtig, die Entwicklung von *in vitro*-Testsystemen als Vorstufe von Tierexperimenten weiterhin zu fördern. Auch wenn mit einem solchen Testsystem sicherlich nicht alle nephrotoxischen Substanzen erfasst würden, könnte ein *Screening* von Prüfsubstanzen potente Nephrotoxine schon vor der ersten Testung am Tier herausfiltern. Somit müssten nur Substanzen, die *in vitro* keinen toxischen Effekt hatten, auch *in vivo* getestet werden (Prieto *et al.*, 2006).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Biomarker KIM-1, LCN2, TIMP-1, OPN, CLU und VIM im Gegensatz zu ihrer hohen Sensitivität im Tierversuch in NRK-52E-Zellen als *in vitro*-Modell nicht geeignet waren, nephrotoxische Effekte anzuzeigen. Allein HO-1 könnte einen relativ sensitiven Marker in einem *Screening*-System darstellen, um zumindest einige Toxine bereits *in vitro* zu identifizieren. Immerhin wurde dieser Marker durch OTA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bei ähnlichen Konzentrationen im Medium bzw. Plasma ( $\mu\text{M}$ -Bereich) induziert. Die Anwendung der Biomarker als zuverlässige, universelle Endpunkte für Nephrotoxizität *in vitro* unterstützen die Ergebnisse dieser Studie jedoch nicht. Die Bestimmung der Zytotoxizität war in den Experimenten der zuverlässigste und empfindlichste Marker. Allerdings ist dieser Endpunkt für *in vitro*-Studien auf zielorgan-spezifische Toxizität ungeeignet; dafür müssen empfindliche, gewebespezifische Endpunkte identifiziert werden, die zur Bestimmung einer *no observed effect concentration* (NOEC) herangezogen werden können, um einen Ausgangspunkt für die Risikoabschätzung zu haben (Prieto *et al.*, 2006).

## 5 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass KIM-1, LCN2, CLU, TIMP-1, OPN und VIM im Nierengewebe empfindliche Biomarker für OTA-abhängige Toxizität sind. Zudem war eine erhöhte Konzentration von KIM-1 im Urin ein guter Marker für die nephrotoxischen Effekte. Dies stimmt gut mit der Entscheidung der regulatorischen Behörden in den USA (FDA) und Europa (EMA) überein, KIM-1 als neuen Urin-Biomarker für akute Nephrotoxizität anzuerkennen. Die erhöhte Genexpression aller oben genannter Marker korrelierte gut mit der langsam fortschreitenden Nierenschädigung infolge der wiederholten Exposition mit OTA, was die Verwendung der Marker als frühzeitige Indikatoren von chronischer Nephrotoxizität stützt. Allerdings müsste dies noch in weiteren Modellen für eine Nierenschädigung nach wiederholter Exposition gegenüber toxischen Verbindungen ausgetestet werden. Unabhängige internationale Organisationen wie das *Critical Path Institute (C-Path)*, das *ILSI Health and Environmental Sciences Institute (ILSI-HESI)* oder das InnoMed PredTox-Projekt fördern die Zusammenarbeit von regulatorischen Behörden und Wissenschaftlern aus Universitäten und Industrie zur Entwicklung und Validierung von neuen bzw. verbesserten Testmethoden im Bereich der präklinischen Forschung ([www.c-path.org](http://www.c-path.org); [www.hesiglobal.org](http://www.hesiglobal.org); [www.innomed-predtox.com](http://www.innomed-predtox.com)). Unter der Leitung von C-Path und ILSI-HESI wurden in den letzten Jahren verschiedene neue Biomarker für akute Nephrotoxizität (z.B. KIM-1, s. oben) durch die Verwendung geeigneter Modellsubstanzen in unterschiedlichen Labors geprüft und validiert. Ein ähnliches Vorgehen könnte evtl. nun auch für die Entwicklung und Validierung von Biomarkern für chronische Nephrotoxizität (einschließlich Marker für Nierenkrebs) angewandt werden.

In der Arbeit konnte des weiteren gezeigt werden, dass OTA-induzierte, frühe Veränderungen der Zellteilung mit der Entwicklung von Nierenkrebs in Zusammenhang stehen. Auch für andere Substanzen wurde eine Korrelation zwischen Effekten auf die Zellteilung und der Entstehung von Nierenkrebs gezeigt. Somit könnte es durchaus sinnvoll sein, Messungen der Zellproliferation in subakute oder subchronische Toxizitätsstudien einzuführen. Dafür müsste nun – ausgehend von der Methodik und den Ergebnissen dieser und anderer Studien – ein gemeinsames Testverfahren entwickelt und validiert werden, ähnlich wie auch für die Biomarker für Nephrotoxizität.

Sicherlich bieten auch vergleichende Genexpressionsanalysen noch Möglichkeiten, neue „Krebsmarker“ zu identifizieren. So wurde bereits auf Basis der Genexpression ein Erkennungsmuster für viele nicht-gentoxische Leberkanzerogene entwickelt (Fielden *et al.*, 2007). Auch in dieser Studie führte die Behandlung von Ratten mit OTA bereits nach kurzer Zeit zu einer veränderten Expression bestimmter Gene des Zellzyklus (Adler *et al.*, 2009), was einen Ansatzpunkt für die Entwicklung eines ähnlichen Erkennungsmusters für Nierenkanzerogene bieten könnte.

Auch wenn die Ergebnisse Studien in den NRK-Zellen den Einsatz der neuen *in vivo*-Biomarker als Indikatoren für Nephrotoxizität *in vitro* nicht unterstützen, sollte der Ansatz, nierenspezifische Endpunkte zur Prüfung auf Toxizität *in vitro* zu identifizieren, nicht verworfen werden. Wichtig ist es sicherlich, auch weitere Zellkultursysteme zu testen und durch die Weiterentwicklung und Optimierung der Kulturbedingungen eine größere Ähnlichkeit zu der Situation *in vivo* zu schaffen. Dies würde die Wahrscheinlichkeit erhöhen, Biomarker zu finden (z.B. mittels vergleichenden Genexpressionsanalysen), die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unter dem Einfluss toxischer Substanzen induziert werden. Des Weiteren sollte die Funktion von KIM-1, LCN2 etc. weiter erforscht werden, um einen Einblick zu bekommen, unter welchen Umständen und warum eine Induktion der Expression erfolgt (oder nicht). Erkenntnisse darüber könnten dann wiederum verwendet werden, um ein geeignetes Testsystem *in vitro* zu entwickeln.

## 6 Zusammenfassung

Die Niere ist eines der wichtigsten Zielorgane für Toxizität, allerdings stellt die frühzeitige Erkennung einer Nierenschädigung und/oder kanzerogenen Wirkung infolge einer wiederholten Exposition gegenüber toxischen Verbindungen ein großes Problem dar, da traditionelle Marker für Nierenfunktionsstörungen wenig empfindlich sind. Häufig werden toxische Effekte auf die Niere daher erst in Langzeitexperimenten im Tier erkannt. Die ethischen Bedenken sowie der hohe Aufwand an Zeit und Kosten bei Durchführung solcher Tierversuche haben in der letzten Zeit zu Bestrebungen geführt, nach Alternativmethoden zu suchen, die es ermöglichen, Tierzahl oder Versuchsdauer zu verringern oder sogar einige Versuche am Tier vollständig durch Studien *in vitro* zu ersetzen.

Ziel dieser Arbeit war es daher, mögliche Alternativmethoden zur Prüfung auf Nephrotoxizität nach wiederholter Exposition zu untersuchen. Zum einen wurden dazu in einem *in vivo*-Modell für chronische Nierentoxizität neue Biomarker für Stress und Gewebeschädigung untersucht, deren erhöhte Genexpression in mehreren Modellen für akute Schädigung des Nierengewebes gezeigt wurde, einschließlich *kidney injury molecule-1* (KIM-1), Lipocalin-2 (LCN2), Clusterin (CLU), Osteopontin (OPN), *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1), Vimentin (VIM) und Hämoxxygenase-1 (HO-1). Diese Marker wurden nachfolgend auch in einem zellkulturbasierten *in vitro*-Modell untersucht. Ein weiterer Teil der Arbeit befasste sich mit Veränderungen der Zellteilung als möglicher Marker für die Früherkennung kanzerogener Effekte.

Das *in vivo*-Modell bestand in einer Studie in männlichen F344/N-Ratten, die 14, 28 oder 90 Tage oral mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg Körpergewicht (KG) Ochratoxin A (OTA) behandelt wurden. OTA ist ein Mykotoxin, das in Ratten bei wiederholter Gabe eine Nierenschädigung und Nierenkrebs verursacht. Die Analyse der mRNA-Expression der neuen Biomarker in Nierengewebe zeigte bei Tieren, die mit 70 oder 210 µg/kg KG behandelt wurden, eine frühzeitige, zeit- und dosisabhängige Induktion von KIM-1, LCN2, TIMP-1, OPN und CLU, die mit histopathologischen Veränderungen in Form von Zelldegeneration und Regeneration einherging und das Fortschreiten der Schädigung gut widerspiegelte. Auch die mRNA-Expression von HO-1 und VIM wurde durch OTA moduliert, allerdings war eine Erhöhung nicht zu allen Zeitpunkten zu messen bzw. trat nicht so früh auf wie bei den anderen Markern. Effekte auf



traditionelle Marker für Nephrotoxizität (Serum-Kreatinin, N-Acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase und  $\gamma$ -Glutamyltransferase im Urin) wurden im Vergleich zu den neuen Markern zu einem späteren Zeitpunkt und zumeist nur in der Hochdosisgruppe festgestellt. Zusätzlich zu den Effekten auf die Genexpression konnte in den Zielzellen von OTA im proximalen Tubulusepithel eine erhöhte Proteinexpression von KIM-1, CLU, OPN und VIM gezeigt werden; nur für KIM-1 wurde allerdings auch im Urin eine erhöhte Konzentration nachgewiesen, die mit den Effekten auf die mRNA- und Proteinkonzentration im Gewebe korrelierte. Damit stellt KIM-1 in dieser Studie hinsichtlich Empfindlichkeit und Messbarkeit den empfindlichsten Biomarker für Nephrotoxizität dar.

Die Untersuchung der Zellteilung nach wiederholter Gabe von OTA zeigte einen dramatischen, zeit- und dosisabhängigen Anstieg der Proliferation von proximalen Tubulusepithelzellen in Nieren von Tieren, die mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG behandelt wurden. Dagegen wurden nach wiederholter Exposition gegenüber 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG über 90 Tage keine OTA-abhängigen Effekte auf die renale Zellproliferation festgestellt. Somit korrelieren die Veränderungen der Zellteilung in der Niere in der 90-Tages-Studie sehr gut mit dem Ergebnis der 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie mit OTA, in der Nierentumoren nur nach Behandlung mit 70 oder 210  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG auftraten.

Ausgehend von den verschiedenen Endpunkten für Toxizität, die in der Studie untersucht wurden, liegt der *no-observed-adverse-effect-level* (NOAEL) bei 21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  KG OTA. Dies entspricht dem NOAEL der 2-Jahres-Kanzerogenitätsstudie.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurden die neuen *in vivo*-Biomarker für Nephrotoxizität in NRK 52E-Zellen als *in vitro*-Modell ausgetestet. Allerdings konnte eine erhöhte mRNA-Expression von KIM-1, einem sensitiven Marker *in vivo*, nach 24 oder 48 Stunden Behandlung mit verschiedenen nephrotoxischen Modellverbindungen (OTA, Kaliumbromat ( $\text{KBrO}_3$ ), Cisplatin oder Cadmiumchlorid ( $\text{CdCl}_2$ )) in den Zellen nicht nachgewiesen werden. Die mRNA-Expression anderer Marker (VIM, CLU, TIMP-1, LCN2, OPN) war dagegen in unbehandelten Zellen bereits so hoch, dass die Behandlung mit Nephrotoxinen zu keiner weiteren Induktion führte. Allein die Gen- und Proteinexpression von HO-1 wurde durch  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{KBrO}_3$  und OTA induziert und könnte daher einen potentiellen Marker für *screening*-Studien *in vitro* darstellen. Insgesamt war der Nachweis zytotoxischer Wirkungen jedoch der empfindlichste Endpunkt in der Zellkultur. Die Ergebnisse stützen somit die Verwendung der neuen *in vivo*-Biomarker als gewebespezifische Marker für Nephrotoxizität *in vitro* nicht.

## 7 Summary

The kidney is a main target organ of toxicity, but early detection of kidney damage and/or carcinogenic effects following the repeated exposure to toxic substances presents a major problem, since traditional markers of renal malfunction suffer from lack of sensitivity. Therefore, nephrotoxic effects are often detected only in long-term experiments in animals. Ethical reasons as well as the immense time and costs required for these animal studies have prompted the search for alternative methods by which animal numbers and duration of studies can be reduced. A further, albeit challenging, attempt is to replace experiments in animals by studies *in vitro*.

The aim of this work was to test possible alternative methods for the detection of nephrotoxicity after repeated exposure. On the one hand, the expression of new biomarkers of stress and tissue damage was studied in an *in vivo*-model of chronic nephrotoxicity; enhanced gene expression of these biomarkers, including kidney injury molecule-1 (KIM-1), lipocalin-2 (LCN2), clusterin (CLU), osteopontin (OPN), tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1), vimentin (VIM), and heme oxygenase-1 (HO-1), had been demonstrated before in several models of acute kidney damage. In addition to the experiments *in vivo*, the markers were also studied in a cell culture-based *in vitro*-model to assess their use as sensitive endpoints of toxicity *in vitro*. A further part of this work included the determination of cell proliferation as potential early marker of toxin-induced carcinogenic effects.

As an *in vivo*-model, a toxicity study in male F344/N rats was performed. Rats were treated 14, 28 or 90 days with 0, 21, 70 or 210 µg/kg body weight (bw) ochratoxin A (OTA) by oral administration. OTA is a mycotoxin that is known to cause kidney damage and renal tumors in rats after repeated exposure. Analysis of mRNA expression of the new biomarkers showed early, time- and dose-dependent induction of KIM-1, LCN2, TIMP-1, OPN and CLU in kidney tissue of animals treated with 70 or 210 µg/kg bw. The induction of these biomarkers accompanied histopathological changes like cell degeneration and regeneration and mirrored well the progression of tissue damage. mRNA expression of HO-1 and VIM was also modulated by OTA, but overexpression was not evident at all time points or occurred later than for the other markers. Compared with the new biomarkers, effects on traditional markers of nephrotoxicity (serum creatinine, urinary N-acetyl-β-D-glucosaminidase and γ-

glutamyltransferase) were restricted to later time points and the high dose group. In addition to the effects on gene expression, enhanced protein expression of KIM-1, CLU, OPN and VIM was observed in target cells of OTA in the proximal tubule epithelium; however, only for KIM-1, increased protein levels were also measured in urine, which correlated with the effects on the gene and protein expression in kidney tissue. Therefore, KIM-1 appeared to be the most sensitive biomarker of nephrotoxicity in this study.

The study of the renal cell division after repeated administration of OTA demonstrated a dramatic, time- and dose-dependent increase in the proliferation of proximal tubule epithelial cells in kidneys of rats exposed to 70 or 210 µg/kg bw. In contrast, no OTA-dependent effects on renal cell proliferation were observed after repeated administration of 21 µg/kg bw. Thus, changes of renal cell proliferation in this 90-day-study correlate well with the results of the 2-year-carcinogenicity study with OTA, where renal tumors were only detected at 70 or 210 µg/kg bw.

Based upon the different endpoints of toxicity determined in this study, the no-observed-adverse-effect-level (NOAEL) is 21 µg/kg KG OTA. This is consistent with the result of the 2-year-carcinogenicity study.

In another part of this work, the new *in vivo* biomarkers of nephrotoxicity were studied in NRK-52E cells as *in vitro*-model. However, mRNA expression of KIM-1, one of the best biomarkers *in vivo*, was not detected in the cells after treatment for 24 or 48 hours with several nephrotoxic model substances (OTA, potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>), cisplatin or cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>)). In contrast, high basal mRNA expression of other markers (VIM, CLU, TIMP-1, LCN2, OPN) was evident even in untreated cells and treatment with nephrotoxins did not further enhance marker gene expression. Only in the case of HO-1, both gene and protein expression were induced by CdCl<sub>2</sub>, KBrO<sub>3</sub> and OTA, and could therefore represent potential markers in screening studies *in vitro*. In summary, measurement of cytotoxicity was still the most sensitive endpoint of toxicity *in vitro*. Thus, results from this study do not support the use of the new *in vivo*-biomarkers as tissue-specific markers of nephrotoxicity *in vitro*.

## 8 Literaturverzeichnis

- Adler, M., Mueller, K., Rached, E., Dekant, W. und Mally, A. (2009). Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity. *Carcinogenesis* **30**, 711-19.
- Ahmed, A. K., Haylor, J. L., El Nahas, A. M. und Johnson, T. S. (2007). Localization of matrix metalloproteinases and their inhibitors in experimental progressive kidney scarring. *Kidney Int* **71**, 755-63.
- Aktories, K. und Unger, C. (2001). Mittel zur Behandlung von Tumoren. In Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie (W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann und K. Starke, Hrsg.), S. 949-83. Urban und Fischer Verlag, München.
- Alden, C. L. (2000). Safety assessment for non-genotoxic rodent carcinogens: curves, low-dose extrapolations, and mechanisms in carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* **19**, 557-60.
- Amin, R. P., Vickers, A. E., Sistare, F., Thompson, K. L., Roman, R. J., Lawton, M., Kramer, J., Hamadeh, H. K., Collins, J., Grissom, S., Bennett, L., Tucker, C. J., Wild, S., Kind, C., Oreffo, V., Davis, J. W., 2nd, Curtiss, S., Naciff, J. M., Cunningham, M., Tennant, R., Stevens, J., Car, B., Bertram, T. A. und Afshari, C. A. (2004). Identification of putative gene based markers of renal toxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 465-79.
- Ando, M., Hiratsuka, H., Nakagawa, J., Sato, S., Hayashi, Y. und Mitsumori, K. (1998). Cadmium accumulation in rats treated orally with cadmium chloride for 8 months. *J Toxicol Sci* **23**, 243-48.
- Arbillaga, L., Vettorazzi, A., Gil, A. G., van Delft, J. H., García-Jalón, J. A. und López de Cerain, A. (2008). Gene expression changes induced by ochratoxin A in renal and hepatic tissues of male F344 rat after oral repeated administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **230**, 197-207.
- Aronow, B. J., Lund, S. D., Brown, T. L., Harmony, J. A. und Witte, D. P. (1993). Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 725-29.
- Aulitzky, W. K., Schlegel, P. N., Wu, D. F., Cheng, C. Y., Chen, C. L., Li, P. S., Goldstein, M., Reidenberg, M. und Bardin, C. W. (1992). Measurement of urinary clusterin as an index of nephrotoxicity. *Proc Soc Exp Biol Med* **199**, 93-96.
- Baek, S. M., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S. und Kim, Y. K. (2003). Differential roles of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in cisplatin-induced cell death in renal proximal tubular epithelial cells. *J Lab Clin Med* **142**, 178-86.
- Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M. und Bonventre, J. V. (2002). Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* **277**, 39739-48.
- Balls, M., Bogni, A., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Eskes, C., Prieto, P., Sabbioni, E., Worth, A., Zuang, V., Barrat, M., Blaauboer, B. J., Botham, P., Combes, R., Doehmer, J., Fentem, J., Liebsch, M., Spielmann, H., Basketter, D., Clothier, R., Cronin, M., Garberg, P., Gilmour, N., Hanway, R., Kimber, I., Pease, C., Pfaller,

- W., Phillips, B., Rogiers, V., Tritthart, H. und Walum, E. (2002a). Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. Chapter 8: Target organ and target system toxicity. *Altern Lab Anim* **30**, **Suppl 1**, 1-125.
- Balls, M., Bogni, A., Bremer, S., Casati, S., Coecke, S., Eskes, C., Prieto, P., Sabbioni, E., Worth, A., Zuang, V., Barrat, M., Blaauboer, B. J., Botham, P., Combes, R., Doehmer, J., Fentem, J., Liebsch, M., Spielmann, H., Basketter, D., Clothier, R., Cronin, M., Garberg, P., Gilmour, N., Hanway, R., Kimber, I., Pease, C., Pfaller, W., Phillips, B., Rogiers, V., Tritthart, H. und Walum, E. (2002b). Alternative (non-animal) methods for chemical testing: current status and future prospects. Chapter 9: Genotoxicity and carcinogenicity. *Altern Lab Anim* **30**, **Suppl 1**, 83-93.
- Benesic, A., Mildenerger, S. und Gekle, M. (2000). Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *Pflugers Arch* **439**, 278-87.
- Berndt, W. O., Hayes, A. W. und Baggett, J. M. (1984). Effects of fungal toxins on renal slice calcium balance. *Toxicol Appl Pharmacol* **74**, 78-85.
- Betton, G. R., Davies, D. T., Lambert, T., Ennulat, D., Gould, S. und Biomarkers, C. H. (2007). Evaluation of novel markers of nephrotoxicity in rats treated with NPAA. Society of Toxicology 46th Annual Meeting, Charlotte, USA. *The Toxicologist (Supplement to Tox Sci)*, 380.
- Birn, H. und Christensen, E. I. (2006). Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney Int* **69**, 440-49.
- Björkqvist, M., Källman, J., Fjaertoft, G., Xu, S., Venge, P. und Schollin, J. (2004). Human neutrophil lipocalin: normal levels and use as a marker for invasive infection in the newborn. *Acta Paediatr* **93**, 534-39.
- Björkqvist, M., Källman, J., Fjaertoft, G., Xu, S., Venge, P. und Schollin, J. (2004). Human neutrophil lipocalin: normal levels and use as a marker for invasive infection in the newborn. *Acta Paediatr* **93**, 534-39.
- Blaschuk, O., Burdzy, K. und Fritz, I. B. (1983). Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *J Biol Chem* **258**, 7714-20.
- Bolbrinker, J., Markovic, S., Wehland, M., Melenhorst, W. B., van Goor, H. und Kreutz, R. (2006). Expression and response to angiotensin-converting enzyme inhibition of matrix metalloproteinases 2 and 9 in renal glomerular damage in young transgenic rats with renin-dependent hypertension. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 8-16.
- Bonacquisti, T. P. (2006). A drinking water utility's perspective on bromide, bromate, and ozonation. *Toxicology* **221**, 145-8.
- Bonventre, J. V. (2003). Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **14 Suppl 1**, S55-61.
- Boorman, G. A., McDonald, M. R., Imoto, S. und Persing, R. (1992). Renal lesions induced by ochratoxin A exposure in the F344 rat. *Toxicol Pathol* **20**, 236-45.
- Borregaard, N. und Cowland, J. B. (2006). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein. *Biometals* **19**, 211-15.
- Bounous, D. I., Westcott, D. M., Dambach, D. M. und Group, H. N. W. (2007). Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in rats treated with gentamicin.

- Society of Toxicology 46th Annual Meeting, Charlotte, USA. *The Toxicologist (Supplement to Tox Sci)*, 380.
- Brown, A. L., Odell, E. W. und Mantle, P. (2007). DNA ploidy distribution in renal tumours induced in male rats by dietary ochratoxin A. *Exp Toxic Pathol* **59**, 85-95.
- Brown, L. F., Berse, B., Van de Water, L., Papadopoulos-Sergiou, A., Perruzzi, C. A., Manseau, E. J., Dvorak, H. F. und Senger, D. R. (1992). Expression and distribution of osteopontin in human tissues: widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* **3**, 1169-80.
- Brzoska, M. M., Kaminski, M., Supernak-Bobko, D., Zwierz, K. und Moniuszko-Jakoniuk, J. (2003). Changes in the structure and function of the kidney of rats chronically exposed to cadmium. I. Biochemical and histopathological studies. *Arch Toxicol* **77**, 344-52.
- Butterworth, B. E. und Bogdanffy, M. S. (1999). A comprehensive approach for integration of toxicity and cancer risk assessments. *Regul Toxicol Pharmacol* **29**, 23-36.
- Buttayan, R., Olsson, C. A., Pintar, J., Chang, C., Bandyk, M., Ng, P.-Y. und Sawczuk, I. S. (1989). Induction of the TRPM-2 gene in cells undergoing programmed death. *Mol Cell Biol* **9**, 3473-81.
- Cavin, C., Delatour, T., Marin-Kuan, M., Holzhauser, D., Higgins, L., Bezencon, C., Guignard, G., Junod, S., Piguët, D., Richoz-Payot, J., Gremaux, E., Hayes, J. D., Nestler, S., Mantle, P. und Schilter, B. (2007). Reduction in antioxidant defences may contribute to ochratoxin A toxicity and carcinogenicity. *Toxicol Sci* **96**, 30-39.
- Cetin, R., Devrim, E., Kilicoglu, B., Avci, A., Candir, O. und Durak, I. (2006). Cisplatin impairs antioxidant system and causes oxidation in rat kidney tissues: possible protective roles of natural antioxidant foods. *J Appl Toxicol* **26**, 42-6.
- Chen, Z., Chen, J., Weng, T., Jin, N. und Liu, L. (2006). Identification of rat lung-prominent genes by a parallel DNA microarray hybridization. *BMC Genomics* **7**, 47.
- Chirco, R., Liu, X. W., Jung, K. K. und Kim, H. R. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev* **25**, 99-113.
- Christensen, B., Petersen, T. E. und Sorensen, E.S. (2008) Post-translational modification and proteolytic processing of urinary osteopontin. *Biochem J* **411**, 53-61.
- Chromek, M., Tullus, K., Hertting, O., Jaremko, G., Khalil, A., Li, Y.-H. und Brauner, A. (2003). Matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in acute pyelonephritis and renal scarring. *Pediatr Res* **53**, 698-705.
- Cohen, S. M. (2004). Human carcinogenic risk evaluation: an alternative approach to the two-year rodent bioassay. *Toxicol Sci* **80**, 225-29.
- Correa-Rotter, R., Ibarra-Rubio, M. E., Schwochau, G., Cruz, C., Silkensen, J. R., Pedraza-Chaverri, J., Chmielewski, D. und Rosenberg, M. E. (1998). Induction of clusterin in tubules of nephrotic rats. *J Am Soc Nephrol* **9**, 33-37.
- Cowland, J. B. und Borregaard, N. (1997). Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. *Genomics* **45**, 17-23.

- Davis, J. W., 2nd, Goodsaid, F. M., Bral, C. M., Obert, L. A., Mandakas, G., Garner, C. E., 2nd, Collins, N. D., Smith, R. J. und Rosenblum, I. Y. (2004). Quantitative gene expression analysis in a nonhuman primate model of antibiotic-induced nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **200**, 16-26.
- de Borst, M. H., van Timmeren, M. M., Vaidya, V. S., de Boer, R. A., van Dalen, M. B., Kramer, A. B., Schuurs, T. A., Bonventre, J. V., Navis, G. und van Goor, H. (2007). Induction of kidney injury molecule-1 in homozygous Ren2 rats is attenuated by blockade of the renin-angiotensin system or p38 MAP kinase. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F313-20.
- de Larco, J. E. und Todaro, G. J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* **94**, 335-42.
- Delker, D., Hatch, G., Allen, J., Crissman, B., George, M., Geter, D., Kilburn, S., Moore, T., Nelson, G., Roop, B., Slade, R., Swank, A., Ward, W. und DeAngelo, A. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress associated with bromate carcinogenicity. *Toxicology* **221**, 158-65.
- Depreter, M., Vandesompele, J., Espeel, M., Speleman, F. und Roels, F. (2002). Modulation of the peroxisomal gene expression pattern by dehydroepiandrosterone and vitamin D: therapeutic implications. *J Endocrinol* **175**, 779-92.
- Dietrich, D. R. und Swenberg, J. A. (1991). Preneoplastic lesions in rodent kidney induced spontaneously or by non-genotoxic agents: predictive nature and comparison to lesions induced by genotoxic carcinogens. *Mutat Res* **248**, 239-60.
- Ding, H., He, Y., Li, K., Yang, J., Li, X., Lu, R. und Gao, W. (2007). Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is an early biomarker for renal tubulointerstitial injury in IgA nephropathy. *Clin Immunol* **123**, 227-34.
- Dopp, E., Muller, J., Hahnel, C. und Schiffmann, D. (1999). Induction of genotoxic effects and modulation of the intracellular calcium level in syrian hamster embryo (SHE) fibroblasts caused by ochratoxin A. *Food Chem Toxicol* **37**, 713-21.
- Duymelinck, C., Deng, J. T., Dauwe, S. E., De Broe, M. E. und Verpooten, G. A. (1998). Inhibition of the matrix metalloproteinase system in a rat model of chronic cyclosporine nephropathy. *Kidney Int* **54**, 804-18.
- Dwivedi, P., Burns, R. B. und Maxwell, M. H. (1984). Ultrastructural study of the liver and kidney in ochratoxicosis A in young broiler chicks. *Res Vet Sci* **36**, 104-16.
- Eddy, A. A. (1996). Interstitial inflammation and fibrosis in rats with diet-induced hypercholesterolemia. *Kidney Int* **50**, 1139-49.
- Eddy, A. A. und Giachelli, C. M. (1995). Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. *Kidney Int* **47**, 1546-57.
- EFSA (2006). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the Commission related to ochratoxin A in food, EFSA-Q-2005-154. *The EFSA Journal* **365**, 1-56.
- El Nahas, A. M. (2003). Plasticity of kidney cells: role in kidney remodeling and scarring. *Kidney Int* **64**, 1553-63.
- El Nahas, A. M. und Bello, A. K. (2005). Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* **365**, 331-40.

- El Nahas, M. (2005). The global challenge of chronic kidney disease. *Kidney Int* **68**, 2918-29.
- Elcombe, C. R., Odum, J., Foster, J. R., Stone, S., Haslam, S., Soames, A. R., Kimber, I. und Ashby, J. (2002). Prediction of rodent nongenotoxic carcinogenesis: evaluation of biochemical and tissue changes in rodents following exposure to nine nongenotoxic NTP carcinogens. *Environ Health Perspect* **110**, 363-75.
- Engelmyer, E., van Goor, H., Edwards, D. R. und Diamond, J. R. (1995). Differential mRNA expression of renal cortical tissue inhibitor of metalloproteinase-1, -2, and -3 in experimental hydronephrosis. *J Am Soc Nephrol* **5**, 1675-83.
- Eti, S., Cheng, C. Y., Marshall, A. und Reidenberg, M. M. (1993). Urinary clusterin in chronic nephrotoxicity in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* **202**, 487-90.
- Fielden, M. R., Brennan, R. und Gollub, J. (2007). A gene expression biomarker provides early prediction and mechanistic assessment of hepatic tumor induction by nongenotoxic chemicals. *Toxicol Sci* **99**, 90-100.
- Fjaertoft, G., Foucard, T., Xu, S. und Venge, P. (2005). Human neutrophil lipocalin (HNL) as a diagnostic tool in children with acute infections: a study of the kinetics. *Acta Paediatr* **94**, 661-66.
- Flo, T. H., Smith, K. D., Sato, S., Rodriguez, D. J., Holmes, M. A., Strong, R. K., Akira, S. und Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* **432**, 917-21.
- Franchini, I., Alinovi, R., Bergamaschi, E. und Mutti, A. (2005). Contribution of studies on renal effects of heavy metals and selected organic compounds to our understanding of the progression of chronic nephropathies towards renal failure. *Acta Biomed Suppl* **2**, 58-67.
- Franke, W. W., Schmid, E., Winter, S., Osborn, M. und Weber, K. (1979). Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates. *Exp Cell Res* **123**, 25-46.
- Frei, U. und Schober-Halstenberg, H.-J. (2006). Bericht über Dialysebehandlung und Nierentransplantation in Deutschland 2005/2006. In Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere gGmbH, Berlin.
- French, L. E., Wohlwend, A., Sappino, A. P., Tschopp, J. und Schifferli, J. A. (1994). Human clusterin gene expression is confined to surviving cells during in vitro programmed cell death. *J Clin Invest* **93**, 877-84.
- Friedl, A., Stoesz, S. P., Buckley, P. und Gould, M. N. (1999). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. *Histochem J* **31**, 433-41.
- Fuchs, R. und Peraica, M. (2005). Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food Addit Contam* **22 Suppl 1**, 53-57.
- Gautier, J., Mylecraine, L., Riefke, B., Guilpin, V., Barlow, N., Walter, J., Gury, T., Baker, V., Hoffman, D., Steger-Hartmann, T., Harpur, E. und Pettit, S. (2007). Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in rats treated with cisplatin. Society of Toxicology 46th Annual Meeting, Charlotte, USA. *The Toxicologist (Supplement to Tox Sci)*, 379-80.



- Gautier, J. C., Holzhaeuser, D., Markovic, J., Gremaud, E., Schilter, B. und Turesky, R. J. (2001). Oxidative damage and stress response from ochratoxin a exposure in rats. *Free Radic Biol Med* **30**, 1089-98.
- Gekle, M., Mildenerger, S., Freudinger, R. und Silbernagl, S. (1994). The mycotoxin ochratoxin-A impairs protein uptake in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells). *J Pharmacol Exp Ther* **271**, 1-6.
- Gekle, M. und Silbernagl, S. (1996). Renal toxicodynamics of ochratoxin A: a pathophysiological approach. *Kidney Blood Press Res* **19**, 225-35.
- Girton, R. A., Sundin, D. P. und Rosenberg, M. E. (2002). Clusterin protects renal tubular epithelial cells from gentamicin-mediated cytotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* **282**, F703-09.
- Giuliani, R., Bettoni, F., Leali, D., Morandini, F., Apostoli, P., Grigolato, P., Cesana, B. M. und Aleo, M. F. (2005). Focal adhesion molecules as potential target of lead toxicity in NRK-52E cell line. *FEBS Lett* **579**, 6251-58.
- Gobe, G. C., Buttyan, R., Wyburn, K. R., Etheridge, M. R. und Smith, P. J. (1995). Clusterin expression and apoptosis in tissue remodeling associated with renal regeneration. *Kidney Int* **47**, 411-20.
- González-Buitrago, J. M., Ferreira, L. und Lorenzo, I. (2007). Urinary proteomics. *Clinica Chimica Acta* **375**, 49-56.
- Hagelberg, S., Hult, K. und Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *J Appl Toxicol* **9**, 91-96.
- Han, W. K., Alinani, A., Wu, C. L., Michaelson, D., Loda, M., McGovern, F. J., Thadhani, R. und Bonventre, J. V. (2005). Human kidney injury molecule-1 is a tissue and urinary tumor marker of renal cell carcinoma. *J Am Soc Nephrol* **16**, 1126-34.
- Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. und Bonventre, J. V. (2002). Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int* **62**, 237-44.
- Han, W. K., Waikar, S. S., Johnson, A., Betensky, R. A., Dent, C. L., Devarajan, P. und Bonventre, J. V. (2008). Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury. *Kidney Int* **73**, 863-69.
- Hara, I., Miyake, H., Gleave, M. E. und Kamidono, S. (2001). Introduction of clusterin gene into human renal cell carcinoma cells enhances their resistance to cytotoxic chemotherapy through inhibition of apoptosis both in vitro and in vivo. *Jpn J Cancer Res* **92**, 1220-24.
- Hart, S. E. und Kinter, L. B. (2005). Assessing renal effects of toxicants in vivo. In *Toxicology of the kidney* (J. B. Tarloff und L. H. Lash, Hrsg.), S. 81-147. CRC Press, Boca Raton.
- Hatzinger, P. B., Chen, Q., Dong, L. Q. und Stevens, J. L. (1988). Alterations in intermediate filament proteins in rat kidney proximal tubule epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **157**, 1316-22.
- Hawksworth, G. M., Bach, P. H., Nagelkerke, J. F., Dekant, W., Diezi, J. E., Harpur, E., Lock, E. A., MacDonald, C., Morin, J.-P., Pfaller, W., Rutten, F. A. J. J. L., Ryan, M. P., Toutain, H. J. und Trevisan, A. (1995). Nephrotoxicity testing in vitro. *Altern Lab Anim* **23**, 713-27.

- Herzog, C., Seth, R., Shah, S. V. und Kaushal, G. P. (2007). Role of meprin A in renal tubular epithelial cell injury. *Kidney Int* **71**, 1009-18.
- Hewitt, S. M., Dear, J. und Star, R. A. (2004). Discovery of protein biomarkers for renal diseases. *J Am Soc Nephrol* **15**, 1677-89.
- Hidaka, S., Kranzlin, B., Gretz, N. und Witzgall, R. (2002). Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res* **310**, 289-96.
- Hirt, M. N. (2006). Untersuchungen zur Signaltransduktion und Funktion von Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) (Dissertation). Universität Freiburg, Medizinische Fakultät, Freiburg.
- Hoehler, D., Marquardt, R. R., McIntosh, A. R. und Xiao, H. (1996). Free radical generation as induced by ochratoxin A and its analogs in bacteria (*Bacillus brevis*). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 27388-94.
- Hoffmann, D., Zidek, N., Sieber, M., Dekant, W. und Mally, A. (2008). Lipocalin 2, clusterin and Kim 1 as potential early, noninvasive biomarkers of nephrotoxicity (Poster) DGPT, Mainz, 2008. *Archives of Pharmacology* **377 (Suppl 1)**.
- Huang, Q., Dunn, R. T., 2nd, Jayadev, S., DiSorbo, O., Pack, F. D., Farr, S. B., Stoll, R. E. und Blanchard, K. T. (2001). Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci* **63**, 196-207.
- IARC (1993a). Cadmium and cadmium compounds. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Beryllium, cadmium, mercury, and exposures in the glass manufacturing industry, Bd. 58, S. 119-237, Lyon.
- IARC (1993b). Ochratoxin A. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins., Bd. 56, S. 489-521, Lyon.
- IARC (1999). Potassium bromate. In IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances, Bd. 73, S. 481-96, Lyon.
- Ichimura, T., Bonventre, J. V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C. A., Cate, R. L. und Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* **273**, 4135-42.
- Ichimura, T., Hung, C. C., Yang, S. A., Stevens, J. L. und Bonventre, J. V. (2004). Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F552-63.
- Iguchi, S., Nishi, S., Ikegame, M., Hoshi, K., Yoshizawa, T., Kawashima, H., Arakawa, M., Ozawa, H. und Gejyo, F. (2004). Expression of osteopontin in cisplatin-induced tubular injury. *Nephron Exp Nephrol* **97**, 96-105.
- Il'yasova, D. und Schwartz, G. G. (2005). Cadmium and renal cancer. *Toxicol Appl Pharmacol* **207**, 179-86.
- Imamdi, R., de Grauw, M. und van de Water, B. (2004). Protein kinase C mediates cisplatin-induced loss of adherens junctions followed by apoptosis of renal proximal tubular epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* **311**, 892-903.

- JECFA (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *WHO Food Additives Series 47*.
- Jessen, B. A., Mullins, J. S., De Peyster, A. und Stevens, G. J. (2003). Assessment of hepatocytes and liver slices as in vitro test systems to predict in vivo gene expression. *Toxicol Sci* **75**, 208-22.
- Johnson, T. S., Haylor, J. L., Thomas, G. L., Fisher, M. und El Nahas, A. M. (2002). Matrix metalloproteinases and their inhibitions in experimental renal scarring. *Exp Nephrol* **10**, 182-95.
- Jones, H. B., Eldridge, S. R., Butterworth, B. E. und Foster, J. R. (1996). Measures of cell replication in risk/safety assessment of xenobiotic-induced, nongenotoxic carcinogenesis. *Regul Toxicol Pharmacol* **23**, 117-27.
- Kallakury, B. V., Karikhalli, S., Haholu, A., Sheehan, C. E., Azumi, N. und Ross, J. S. (2001). Increased expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 correlate with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**, 3113-19.
- Kamp, H. G., Eisenbrand, G., Janzowski, C., Kiossev, J., Latendresse, J. R., Schlatter, J. und Turesky, R. J. (2005a). Ochratoxin A induces oxidative DNA damage in liver and kidney after oral dosing to rats. *Mol Nutr Food Res* **49**, 1160-67.
- Kamp, H. G., Eisenbrand, G., Schlatter, J., Wurth, K. und Janzowski, C. (2005b). Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells. *Toxicology* **206**, 413-25.
- Kanwar, Y. S. (2001). Heme oxygenase-1 in renal injury: Conclusions of studies in humans and animal models. *Kidney Int* **59**, 378-79.
- Kays, S. E., Berdanier, C. D., Swagler, A. R., Lock, E. A. und Schnellmann, R. G. (1993). An in vitro model of renal proximal tubule cell regeneration. *J Pharmacol Toxicol Methods* **29**, 211-15.
- Kays, S. E. und Schnellmann, R. G. (1995). Regeneration of renal proximal tubule cells in primary culture following toxicant injury: response to growth factors. *Toxicol Appl Pharmacol* **132**, 273-80.
- Khademi, M., Illes, Z., Gielen, A. W., Marta, M., Takazawa, N., Baecher-Allan, C., Brundin, L., Hannerz, J., Martin, C., Harris, R. A., Hafler, D. A., Kuchroo, V. K., Olsson, T., Piehl, F. und Wallstrom, E. (2004). T Cell Ig- and mucin-domaining-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* **172**, 7169-76.
- Khan, K. N. M. und Alden, C. L. (2002). Kidney. In *Handbook of Toxicologic Pathology* (W. M. Haschek, C. G. Rousseaux und M. A. Wallig, Hrsg.), Bd. 2, S. 255-336. Elsevier Science, San Diego.
- Khan, S., Martin, M., Bartsch, H. und Rahimtula, A. D. (1989). Perturbation of liver microsomal calcium homeostasis by ochratoxin A. *Biochem Pharmacol* **38**, 67-72.
- Khan, S. R., Johnson, J. M., Peck, A. B., Cornelius, J. G. und Glenton, P. A. (2002). Expression of osteopontin in rat kidneys: induction during ethylene glycol induced calcium oxalate nephrolithiasis. *J Urol* **168**, 1173-81.
- Kharasch, E. D., Schroeder, J. L., Bammler, T., Beyer, R. und Srinouanprachanh, S. (2006). Gene expression profiling of nephrotoxicity from the sevoflurane

- degradation product fluoromethyl-2,2-difluoro-1-(trifluoromethyl)vinyl ether ("compound A") in rats. *Toxicol Sci* **90**, 419-31.
- Kim, Y. K., Kim, H. J., Kwon, C. H., Kim, J. H., Woo, J. S., Jung, J. S. und Kim, J. M. (2005). Role of ERK activation in cisplatin-induced apoptosis in OK renal epithelial cells. *J Appl Toxicol* **25**, 374-82.
- King-Herbert, A. und Thayer, K. (2006). NTP workshop: animal models for the NTP rodent cancer bioassay: stocks and strains - should we switch? *Toxicol Pathol* **34**, 802-05.
- Kjeldsen, L., Cowland, J. B. und Borregaard, N. (2000). Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochim Biophys Acta* **1482**, 272-83.
- Kjeldsen, L., Johnsen, A. H., Sengelov, H. und Borregaard, N. (1993). Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem* **268**, 10425-32.
- Klaunig, J. E., Kamendulis, L. M. und Xu, Y. (2000). Epigenetic mechanisms of chemical carcinogenesis. *Hum Exp Toxicol* **19**, 543-55.
- Kleinman, J. G., Beshensky, A., Worcester, E. M. und Brown, D. (1995). Expression of osteopontin, a urinary inhibitor of stone mineral crystal growth, in rat kidney. *Kidney Int* **47**, 1585-96.
- Kohri, K., Nomura, S., Kitamura, Y., Nagata, T., Yoshioka, K., Iguchi, M., Yamate, T., Umekawa, T., Suzuki, Y., Sinojima, H. und Kurita, T. (1993). Structure and Expression of the mRNA Encoding Urinary Stone Protein (Osteopontin). *J Biol Chem* **268**, 15180-84.
- Kuchroo, V. K., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H. und Freeman, G. J. (2003). The TIM gene family: emerging roles in immunity and disease. *Nat Rev Immunol* **3**, 454-62.
- Kumar, M., Dwivedi, P., Sharma, A. K., Dev Singh, N. und Patil, R. D. (2007). Ochratoxin A and citrinin nephrotoxicity in New Zealand White rabbits: an ultrastructural assessment. *Mycopathologia* **163**, 21-30.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. und Hayashi, Y. (1990). Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate - a new renal carcinogen *Environ Health Perspect* **87**, 309-35.
- Kramer, P.-J. und von Landenberg, F. (2004). Prüfmethode für Anmeldungen und Zulassungen - Regulatorische Toxikologie. In Lehrbuch der Toxikologie (H. Marquardt und S. Schäfer, Hrsg.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Lakins, J., Bennett, S. A., Chen, J. H., Arnold, J. M., Morrissey, C., Wong, P., O'Sullivan, J. und Tenniswood, M. (1998). Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* **273**, 27887-95.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. und Petitfrere, E. (2004). TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**, 187-98.
- Lash, L. H., Putt, D. A., Hueni, S. E., Cao, W., Xu, F., Kulidjian, S. J. und Horwitz, J. P. (2002a). Cellular energetics and glutathione status in NRK-52E cells: toxicological implications. *Biochem Pharmacol* **64**, 1533-46.

- Lash, L. H., Putt, D. A. und Matherly, L. H. (2002b). Protection of NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, from chemical-induced apoptosis by overexpression of a mitochondrial glutathione transporter. *J Pharmacol Exp Ther* **303**, 476-86.
- Leskov, K. S., Klovov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J. und Boothman, D. A. (2003). Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* **278**, 11590-600.
- Leussink, B. T., Nagelkerke, J. F., van de Water, B., Slikkerveer, A., van der Voet, G. B., Srinivasan, A., Bruijn, J. A., de Wolff, F. A. und de Heer, E. (2002). Pathways of proximal tubular cell death in bismuth nephrotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **180**, 100-09.
- Levey, A. S., Atkins, R., Coresh, J., Cohen, E. P., Collins, A. J., Eckardt, K.-U., Nahas, M. E., Jaber, B. L., Jadoul, M., Levin, A., Powe, N. R., Rossert, J., Wheeler, D. C., Lameire, N. und Eknoyan, G. (2007). Chronic kidney disease as a global public health problem: approaches and initiatives - a position statement from Kidney Disease Improving Global Outcomes. *Kidney Int* **72**, 247-59.
- Lin, F., Zhang, P. L., Yang, X. J., Shi, J., Blasick, T., Han, W. K., Wang, H. L., Shen, S. S., Teh, B. T. und Bonventre, J. V. (2007). Human kidney injury molecule-1 (hKIM-1): a useful immunohistochemical marker for diagnosing renal cell carcinoma and ovarian clear cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* **31**, 371-81.
- Lock, E. A. und Hard, G. C. (2004). Chemically induced renal tubule tumors in the laboratory rat and mouse: review of the NCI/NTP database and categorization of renal carcinogens based on mechanistic information. *Crit Rev Toxicol* **34**, 211-99.
- Lock, E. A. und Reed, C. J. (2006). Trichloroethylene: Mechanisms of renal toxicity and renal cancer and relevance to risk assessment. *Toxicol Sci* **91**, 313-31.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Luhe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T. und Ahr, H. J. (2003). A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol Sci* **73**, 315-28.
- Lüllmann-Rauch, R. (2006). Niere. In Taschenlehrbuch Histologie, S. 438-57. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. und Myrtek, D. (2004). *Der Experimentator: Immunologie*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Lutz, U., Lugli, S., Bitsch, A., Schlatter, J. und Lutz, W. K. (1997). Dose response for the stimulation of cell division by caffeic acid in forestomach and kidney of the male F344 rat. *Fundam Appl Toxicol* **39**, 131-37.
- Lutz, W. K. (1990). Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**, 1243-47.
- Maaroufi, K., Zakhama, A., Baudrimont, I., Achour, A., Abid, S., Ellouz, F., Dhouib, S., Creppy, E. E. und Bacha, H. (1999). Karyomegaly of tubular cells as early stage marker of the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats. *Hum Exp Toxicol* **18**, 410-15.
- Madden, E. F., Akkerman, M. und Fowler, B. A. (2002). A comparison of 60, 70, and 90 kDa stress protein expression in normal rat NRK-52E and human HK-2 kidney

- cell lines following in vitro exposure to arsenite and cadmium alone or in combination. *J Biochem Mol Toxicol* **16**, 24-32.
- Magil, A. B., Pichler, R. H. und Johnson, R. J. (1997). Osteopontin in chronic puromycin aminonucleoside nephrosis. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1383-90.
- Mally, A. und Chipman, J. K. (2002). Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions, cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* **180**, 233-48.
- Mally, A., Decker, M., Bekteshi, M. und Dekant, W. (2006a). Ochratoxin A alters cell adhesion and gap junction intercellular communication in MDCK cells. *Toxicology* **223**, 15-25.
- Mally, A. und Dekant, W. (2005). DNA adduct formation by ochratoxin A: review of the available evidence. *Food Addit Contam* **22 Suppl 1**, 65-74.
- Mally, A., Pepe, G., Ravoori, S., Fiore, M., Gupta, R. C., Dekant, W. und Mosesso, P. (2005a). Ochratoxin A causes DNA damage and cytogenetic effects but no DNA adducts in rats. *Chem Res Toxicol* **18**, 1253-61.
- Mally, A., Volkel, W., Amberg, A., Kurz, M., Wanek, P., Eder, E., Hard, G. und Dekant, W. (2005b). Functional, biochemical, and pathological effects of repeated oral administration of ochratoxin A to rats. *Chem Res Toxicol* **18**, 1242-52.
- Mally, A., Walker, C. L., Everitt, J. I., Dekant, W. und Vamvakas, S. (2006b). Analysis of renal cell transformation following exposure to trichloroethene in vivo and its metabolite S-(dichlorovinyl)-L-cysteine in vitro. *Toxicology* **224**, 108-18.
- Mally, A., Zepnik, H., Wanek, P., Eder, E., Dingley, K., Ihmels, H., Völkel, W. und Dekant, W. (2004). Ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem Res Toxicol* **17**, 234-42.
- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., Bezencon, C., Piguet, D., Mansourian, R., Holzwarth, J., Grigorov, M., Delatour, T., Mantle, P., Cavin, C. und Schilter, B. (2006). A toxicogenomics approach to identify new plausible epigenetic mechanisms of ochratoxin a carcinogenicity in rat. *Toxicol Sci* **89**, 120-34.
- Mazzali, M., Kipari, T., Ophascharoensuk, V., Wesson, J. A., Johnson, R. und Hughes, J. (2002). Osteopontin--a molecule for all seasons. *Qjm* **95**, 3-13.
- Michel, D., Chatelain, G., North, S. und Brun, G. (1997). Stress-induced transcription of the clusterin/apoJ gene. *Biochem J* **328 ( Pt 1)**, 45-50.
- Mishra, J., Dent, C., Tarabishi, R., Mitsnefes, M. M., Ma, Q., Kelly, C., Ruff, S. M., Zahedi, K., Shao, M., Bean, J., Mori, K., Barasch, J. und Devarajan, P. (2005). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* **365**, 1231-38.
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J. und Devarajan, P. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* **14**, 2534-43.
- Mishra, J., Mori, K., Ma, Q., Kelly, C., Barasch, J. und Devarajan, P. (2004). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: a novel early urinary biomarker for cisplatin nephrotoxicity. *Am J Nephrol* **24**, 307-15.
- Miyake, H., Hara, S., Arakawa, S., Kamidono, S. und Hara, I. (2002). Over expression of clusterin is an independent prognostic factor for nonpapillary renal cell carcinoma. *J Urol* **167**, 703-06.

- Miyata, Y., Kanda, S., Nomata, K., Hayashida, Y. und Kanetake, H. (2004). Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* **63**, 602-08.
- Moll, S., Menoud, P. A., French, L., Sappino, A. P., Pastore, Y., Schifferli, J. A. und Izui, S. (1998). Tubular up-regulation of clusterin mRNA in murine lupus-like nephritis. *Am J Pathol* **152**, 953-62.
- Moore, M. M. und Chen, T. (2006). Mutagenicity of bromate: implications for cancer risk assessment. *Toxicology* **221**, 190-6.
- Mori, K., Lee, H. T., Rapoport, D., Drexler, I. R., Foster, K., Yang, J., Schmidt-Ott, K. M., Chen, X., Li, J. Y., Weiss, S., Mishra, J., Cheema, F. H., Markowitz, G., Suganami, T., Sawai, K., Mukoyama, M., Kunis, C., D'Agati, V., Devarajan, P. und Barasch, J. (2005). Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. *J Clin Invest* **115**, 610-21.
- Mori, K. und Nakao, K. (2007). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. *Kidney Int* **71**, 967-70.
- Morin, J.-P., De Broe, M. E., Pfaller, W. und Schmuck, G. (1997). Nephrotoxicity testing in vitro: the current situation. *Altern Lab Anim* **25**, 497-503.
- Mülhardt, C. (2006). *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag, München.
- Nath, K. A., Dvergsten, J., Correa-Rotter, R., Hostetter, T. H., Manivel, J. C. und Rosenberg, M. E. (1994). Induction of clusterin in acute and chronic oxidative renal disease in the rat and its dissociation from cell injury. *Lab Invest* **71**, 209-18.
- Nicholson, J. K., Connelly, J., Lindon, J. C. und Holmes, E. (2002). Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat Rev Drug Discovery* **11**, 153-62.
- NTP (1989). Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A (CAS No. 303-47-9) in F344/N rats (gavage studies). *Natl Toxicol Program Tech Rep Ser* **358**, 1-142.
- Parczyk, K., Pilarsky, C., Rachel, U. und Koch-Brandt, C. (1994). Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* **120**, 186-88.
- Perazella, M. A. (2005). Drug-induced nephropathy: an update. *Expert Opin Drug Saf* **4**, 689-706.
- Persy, V. P., Verstrepen, W. A., Ysebaert, D. K., De Greef, K. E. und De Broe, M. E. (1999). Differences in osteopontin up-regulation between proximal and distal tubules after renal ischemia/reperfusion. *Kidney Int* **56**, 601-11.
- Petrik, J., Zanic-Grubisic, T., Barisic, K., Pepeljnjak, S., Radic, B., Ferencic, Z. und Cepelak, I. (2003). Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney. *Arch Toxicol* **77**, 685-93.
- Pfaller, W. und Gstraunthaler, G. (1998). Nephrotoxicity testing in vitro--what we know and what we need to know. *Environ Health Perspect* **106 Suppl 2**, 559-69.
- Poirier, M. C. (2004). Chemical-induced DNA damage and human cancer risk. *Nat Rev Cancer* **4**, 630-37.

- Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A. und Wilson, M. R. (2000). Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* **39**, 15953-60.
- Prieto, P., Baird, A. W., Blaauboer, B. J., Castell Ripoll, J. V., Corvi, R., Dekant, W., Dietl, P., Gennari, A., Gribaldo, L., Griffin, J. L., Hartung, T., Heindel, J. J., Hoet, P., Jennings, P., Marocchio, L., Noraberg, J., Pazos, P., Westmoreland, C., Wolf, A., Wright, J. und Pfaller, W. (2006). The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. *Altern Lab Anim* **34**, 315-41.
- Prozialeck, W. C., Edwards, J. R., Lamar, P. C. und Smith, C. S. (2006). Epithelial barrier characteristics and expression of cell adhesion molecules in proximal tubule-derived cell lines commonly used for in vitro toxicity studies. *Toxicol In Vitro* **20**, 942-53.
- Prozialeck, W. C., Lamar, P. C. und Lynch, S. M. (2003). Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and b-catenin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* **189**, 180-95.
- Prozialeck, W. C., Vaidya, V. S., Liu, J., Waalkes, M. P., Edwards, J. R., Lamar, P. C., Bernard, A. M., Dumont, X. und Bonventre, J. V. (2007). Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int* **72**, 985-93.
- Rached, E., Hoffmann, D., Blumbach, K., Weber, K., Dekant, W. und Mally, A. (2008). Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin A in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* **103**, 371-81.
- Rached, E., Pfeiffer, E., Dekant, W. und Mally, A. (2006). Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics? *Toxicol Sci* **92**, 78-86.
- Rasonyi, T., Schlatter, J. und Dietrich, D. R. (1999). The role of alpha2u-globulin in ochratoxin A induced renal toxicity and tumors in F344 rats. *Toxicol Lett* **104**, 83-92.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y. J. und Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact* **159**, 18-46.
- Rittling, S. R. und Chambers, A. F. (2004). Role of osteopontin in tumour progression. *Brit J Cancer* **90**, 1877-81.
- Rittling, S. R. und Feng, F. (1998). Detection of mouse osteopontin by western blotting. *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 287-92.
- Roderick, H. L. und Cook, S. J. (2008). Ca<sup>2+</sup> signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca<sup>2+</sup> for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* **8**, 361-75.
- Rosenberg, M. E. und Silkensen, J. (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 633-45.
- Sands, J. M. und Verlander, J. W. (2005). Anatomy and physiology of the kidneys. In *Toxicology of the kidney* (J. B. Tarloff und L. H. Lash, Hrsg.), S. 3-56. CRC Press, Boca Raton.
- Sauvant, C., Holzinger, H. und Gekle, M. (2005a). The nephrotoxin ochratoxin A induces key parameters of chronic interstitial nephropathy in renal proximal tubular cells. *Cell Physiol Biochem* **15**, 125-34.



- Sauvant, C., Holzinger, H., Mildenerger, S. und Gekle, M. (2005b). Exposure to nephrotoxic ochratoxin A enhances collagen secretion in human renal proximal tubular cells. *Mol Nutr Food Res* **49**, 31-7.
- Schilter, B., Marin-Kuan, M., Delatour, T., Nestler, S., Mantle, P. und Cavin, C. (2005). Ochratoxin A: potential epigenetic mechanisms of toxicity and carcinogenicity. *Food Addit Contam* **22 Suppl 1**, 88-93.
- Schlegel, P. N., Matthews, G. J., Cichon, Z., Aulitzky, W. K., Cheng, C. Y., Chen, C.-L. C., Saso, L., Goldstein, M., Janne, O. A., Bardin, C. W. und Vaughan, E. D. (1992). Clusterin production in the obstructed rabbit kidney: correlations with loss of renal function. *J Am Soc Nephrol* **3**, 1163-71.
- Schmidt-Ott, K. M., Mori, K., Kalandadze, A., Li, J. Y., Paragas, N., Nicholas, T., Devarajan, P. und Barasch, J. (2006). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **15**, 442-49.
- SCOOP (2002). Reports on tasks for scientific cooperation: assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States, S. [http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7\\_en.pdf](http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf). Directorate-General Health and Consumer Protection.
- Sensibar, J. A., Sutkowski, D. M., Raffo, A., Buttyan, R., Griswold, M. D., Sylvester, S. R., Kozlowski, J. M. und Lee, C. (1995). Prevention of cell death induced by tumor necrosis factor alpha in LNCaP cells by overexpression of sulfated glycoprotein-2 (clusterin). *Cancer Res* **55**, 2431-37.
- Shannan, B., Seifert, M., Leskov, K., Willis, J., Boothman, D., Tilgen, W. und Reichrath, J. (2006). Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* **13**, 12-19.
- Sheikh-Hamad, D., Cacini, W., Buckley, A. R., Isaac, J., Truong, L. D., Tsao, C. C. und Kishore, B. K. (2004). Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Arch Toxicol* **78**, 147-55.
- Shu, Y., Hoshi, S., Tomari, S., Watanabe, T. und Nagata, M. (2002). Phenotypic changes and cell cycle activation in early tubulointerstitial injury of rat adriamycin nephrosis. *Pathol Int* **52**, 214-23.
- Sikorski, E. M., Hock, T., Hill-Kapturczak, N. und Agarwal, A. (2004). The story so far: molecular regulation of the heme oxygenase-1 gene in renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **286**, F425-41.
- Silkensen, J. R., Agarwal, A., Nath, K. A., Manivel, J. C. und Rosenberg, M. E. (1997). Temporal induction of clusterin in cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* **8**, 302-05.
- Singh, K., Mukherjee, A. B., De Vouge, M. W. und Mukherjee, B. B. (1992). Differential processing of osteopontin transcripts in rat kidney- and osteoblast-derived cell lines. *J Biol Chem* **267**, 23847-51.
- Steyn, P. S., Vleggaar, R., Du Preez, N. P., Blyth, A. A. und Seegers, J. C. (1975). The in vitro toxicity of analogs of ochratoxin A in monkey kidney epithelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **32**, 198-203.
- Stoev, S. D., Vitanov, S., Anguelov, G., Petkova-Bocharova, T. und Creppy, E. E. (2001). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a diet containing ochratoxin A and penicillic acid. *Vet Res Commun* **25**, 205-23.

- Storchova, Z. und Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 45-54.
- Tamura, K., Ono, A., Miyagishima, T., Nagao, T. und Urushidani, T. (2006). Profiling of gene expression in rat liver and rat primary cultured hepatocytes treated with peroxisome proliferators. *J Toxicol Sci* **31**, 471-90.
- Tang, W. W., Feng, L., Xia, Y. und Wilson, C. B. (1994). Extracellular matrix accumulation in immune-mediated tubulointerstitial injury. *Kidney Int* **45**, 1077-84.
- Templin, M. V., Constan, A. A., Wolf, D. C., Wong, B. A. und Butterworth, B. E. (1998). Patterns of chloroform-induced regenerative cell proliferation in BDF1 mice correlate with organ specificity and dose-response of tumor formation. *Carcinogenesis* **19**, 187-93.
- Thevenod, F. (2003). Nephrotoxicity and the proximal tubule. Insights from cadmium. *Nephron Physiol* **93**, 87-93.
- Thompson, K. L., Afshari, C. A., Amin, R. P., Bertram, T. A., Car, B., Cunningham, M., Kind, C., Kramer, J. A., Lawton, M., Mirsky, M., Naciff, J. M., Oreffo, V., Pine, P. S. und Sistare, F. D. (2004). Identification of platform-independent gene expression markers of cisplatin nephrotoxicity. *Environ Health Perspect* **112**, 488-94.
- Thukral, S. K., Nordone, P. J., Hu, R., Sullivan, L., Galambos, E., Fitzpatrick, V. D., Healy, L., Bass, M. B., Cosenza, M. E. und Afshari, C. A. (2005). Prediction of nephrotoxicant action and identification of candidate toxicity-related biomarkers. *Toxicol Pathol* **33**, 343-55.
- Trof, R. J., Di Maggio, F., Leemreis, J. und Groeneveld, A. B. (2006). Biomarkers of acute renal injury and renal failure. *Shock* **26**, 245-53.
- Trougakos, I. P., Lourda, M., Agiostratidou, G., Kletsas, D. und Gonos, E. S. (2005). Differential effects of clusterin/apolipoprotein J on cellular growth and survival. *Free Radic Biol Med* **38**, 436-49.
- Umemura, T. und Kurokawa, Y. (2006). Etiology of bromate-induced cancer and possible modes of action-studies in Japan. *Toxicology* **221**, 154-7.
- Umemura, T., Takagi, A., Sai, K., Hasegawa, R. und Kurokawa, Y. (1998). 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* **72**, 264-9.
- Vaidya, V. S., Ferguson, M. A. und Bonventre, J. V. (2008). Biomarkers of acute kidney injury. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **48**, 463-93.
- Vaidya, V. S., Ramirez, V., Ichimura, T., Bobadilla, N. A. und Bonventre, J. V. (2006). Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal Physiol* **290**, F517-29.
- van Timmeren, M., van den Heuvel, M., Bailly, V., Bakker, S., van Goor, H. und Stegeman, C. (2007). Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease. *J Pathol* **212**, 209-17.
- van Timmeren, M. M., Bakker, S. J., Vaidya, V. S., Bailly, V., Schuur, T. A., Damman, J., Stegeman, C. A., Bonventre, J. V. und van Goor, H. (2006). Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* **291**, F456-64.

- Vassalotti, J. A., Stevens, L. A. und Levey, A. S. (2007). Testing for chronic kidney disease: a position statement from the national kidney foundation. *Am J Kidney Dis* **50**, 169-80.
- Verstrepen, W. A., Persy, V. P., Verhulst, A., Dauwe, S. und De Broe, M. E. (2001). Renal osteopontin protein and mRNA upregulation during acute nephrotoxicity in the rat. *Nephrol Dial Transplant* **16**, 712-24.
- Wallin, A., Zhang, G., Jones, T. W., Jaken, S. und Stevens, J. L. (1992). Mechanism of the nephrogenic repair response. Studies on proliferation and vimentin expression after 35S-1,2-dichlorovinyl-L-cysteine nephrotoxicity in vivo and in cultured proximal tubule epithelial cells. *Lab Invest* **66**, 474-84.
- Weiland, C., Ahr, H. J., Vohr, H. W. und Ellinger-Ziegelbauer, H. (2007). Characterization of primary rat proximal tubular cells by gene expression analysis. *Toxicol In Vitro* **21**, 466-91.
- Wiegele, G., Brandis, M. und Zimmerhackl, L. B. (1998). Apoptosis and necrosis during ischaemia in renal tubular cells (LLC-PK1 and MDCK). *Nephrol Dial Transplant* **13**, 1158-67.
- Williams, G. M. und Whysner, J. (1996). Epigenetic carcinogens: evaluation and risk assessment. *Exp Toxic Pathol* **48**, 189-95.
- Witzgall, R., Brown, D., Schwarz, C. und Bonventre, J. V. (1994). Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. Evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells. *J Clin Invest* **93**, 2175-88.
- Xie, J. und Shaikh, Z. A. (2006a). Cadmium-induced apoptosis in rat kidney epithelial cells involves decrease in nuclear factor-kappa B activity. *Toxicol Sci* **91**, 299-308.
- Xie, J. und Shaikh, Z. A. (2006b). Cadmium induces cell cycle arrest in rat kidney epithelial cells in G2/M phase. *Toxicology*.
- Xie, Y., Nishi, S., Iguchi, S., Imai, N., Sakatsume, M., Saito, A., Ikegame, M., Iino, N., Shimada, H., Ueno, M., Kawashima, H., Arakawa, M. und Gejyo, F. (2001a). Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int* **59**, 959-74.
- Xie, Y., Sakatsume, M., Nishi, S., Narita, I., Arakawa, M. und Gejyo, F. (2001b). Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* **60**, 1645-57.
- Xu, S. Y., Pauksen, K. und Venge, P. (1995). Serum measurements of human neutrophil lipocalin (HNL) discriminate between acute bacterial and viral infections. *Scand J Clin Lab Invest* **55**, 125-31.
- Yamaguchi, M. (2005). Role of regucalcin in maintaining cell homeostasis and function. *Int J Mol Med* **15**, 371-89.
- Yang, A., Trajkovic, D., Illanes, O. und Ramiro-Ibanez, F. (2007). Clinicopathological and tissue indicators of para-aminophenol nephrotoxicity in sprague-dawley rats. *Toxicol Pathol* **35**, 521-32.
- Yang, J., Mori, K., Li, J. Y. und Barasch, J. (2003). Iron, lipocalin, and kidney epithelia. *Am J Physiol Renal Physiol* **285**, F9-18.

- Yasui, T., Fujita, K., Asai, K. und Kohri, K. (2002). Osteopontin regulates adhesion of calcium oxalate crystals to renal epithelial cells. *Int J Urol* **9**, 100-08.
- Zepnik, H., Volkel, W. und Dekant, W. (2003). Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxin A in F 344 rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* **192**, 36-44.
- Zhang, Z., Humphreys, B. D. und Bonventre, J. V. (2007). Shedding of the urinary biomarker kidney injury molecule-1 (KIM-1) is regulated by MAP kinases and juxtamembrane region. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2704-14.
- Zhou, H., Pisitkun, T., Aponte, A., Yuen, P. S. T., Hoffert, J. D., Yasuda, H., Hu, X., Chawla, L., Shen, R.-F., Knepper, M. A. und Star, R. A. (2006). Exosomal Fetuin-A identified by proteomics: a novel urinary biomarker for detecting acute kidney injury. *Kidney Int*, 1-11.
- Zhou, Y., Vaidya, V. S., Brown, R. P., Zhang, J., Rosenzweig, B. A., Thompson, K. L., Miller, T. J., Bonventre, J. V. und Goering, P. L. (2008). Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* **101**, 159-70.

## 9 Anhang

### 9.1 Klinische Chemie und Hämatologie bei männlichen F344/N-Ratten nach subchronischer Exposition mit Ochratoxin A (Ergänzung)

In Tabellen 9.1 und 9.2 sind weitere Messwerte für klinisch-chemische Parameter im Plasma sowie Daten zur Hämatologie bei männlichen F344/N-Ratten nach Behandlung mit bis zu 210 µg/kg KG Ochratoxin A angegeben (s. Abschnitte 3.1.4 und 3.1.5).

Tab. 9.1: Klinisch-chemische Parameter im Plasma von F344/N-Ratten, die 14, 28 bzw. 90 Tage mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 5). Statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden mit \*p < 0,05 und \*\*p < 0,01 (ANOVA + Dunnett's Test) bzw. \*p < 0,05 (Kruskal Wallis + Steel Test) gekennzeichnet. Abkürzungen: ALAT, Alaninaminotransferase; ALP, Alkalische Phosphatase; ASAT, Aspartataminotransferase; GDH, Glutamatdehydrogenase; γ-GT, γ-Glutamyltransferase; LDH, Lactatdehydrogenase.

	Zeit [d]	OTA [µg/kg KG]			
		0	21	70	210
<b>Glukose [mM]</b>	14	4,57 ± 0,34	4,64 ± 0,42	5,28 ± 0,43 *	4,88 ± 0,45
	28	8,23 ± 0,50	7,84 ± 0,32	8,67 ± 0,14	8,89 ± 0,25 *
	90	7,43 ± 1,21	8,57 ± 0,65	7,36 ± 0,25	7,48 ± 0,29
<b>Bilirubin (gesamt) [µM]</b>	14	1,09 ± 0,17	1,11 ± 0,27	1,03 ± 0,11	0,94 ± 0,12
	28	0,66 ± 0,08	0,75 ± 0,13	0,63 ± 0,11	0,71 ± 0,08
	90	0,87 ± 0,10	0,99 ± 0,16	0,86 ± 0,15	0,90 ± 0,07
<b>Cholesterin [mM]</b>	14	1,78 ± 0,11	1,81 ± 0,16	1,73 ± 0,10	1,73 ± 0,12
	28	1,34 ± 0,12	1,43 ± 0,18	1,42 ± 0,13	1,47 ± 0,17
	90	1,36 ± 0,08	1,40 ± 0,16	1,38 ± 0,09	1,41 ± 0,13
<b>Triglyceride [mM]</b>	14	0,74 ± 0,15	0,58 ± 0,11	0,72 ± 0,12	0,99 ± 0,23
	28	0,47 ± 0,19	0,47 ± 0,16	1,50 ± 0,37 **	2,25 ± 0,35 **
	90	1,48 ± 0,33	0,79 ± 0,48	1,80 ± 0,32	1,67 ± 0,59
<b>Phospholipide [mM]</b>	14	1,50 ± 0,08	1,46 ± 0,14	1,46 ± 0,09	1,54 ± 0,06
	28	1,27 ± 0,08	1,26 ± 0,12	1,33 ± 0,14	1,59 ± 0,13 **
	90	1,40 ± 0,08	1,24 ± 0,13	1,48 ± 0,10	1,46 ± 0,14
<b>Proteingehalt [g/l]</b>	14	58,92 ± 1,37	57,67 ± 1,72	58,52 ± 2,33	58,73 ± 2,10
	28	61,58 ± 1,00	60,50 ± 1,17	59,58 ± 0,81	60,35 ± 2,41
	90	63,85 ± 3,56	59,58 ± 2,01	66,24 ± 0,61	64,99 ± 2,25

	Zeit [d]	OTA [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ]			
		0	21	70	210
<b>Albumin [g/l]</b>	14	35,05 $\pm$ 0,65	36,20 $\pm$ 1,01	35,42 $\pm$ 1,26	35,25 $\pm$ 0,81
	28	38,02 $\pm$ 1,12	37,40 $\pm$ 1,25	36,59 $\pm$ 0,61	35,73 $\pm$ 1,04
	90	39,29 $\pm$ 1,53	37,00 $\pm$ 1,65	40,06 $\pm$ 0,48	39,25 $\pm$ 0,95
<b>Globulin [g/l]</b>	14	23,87 $\pm$ 1,08	21,48 $\pm$ 1,49	23,10 $\pm$ 2,21	23,48 $\pm$ 1,62
	28	23,55 $\pm$ 0,46	23,10 $\pm$ 1,35	22,99 $\pm$ 0,60	24,62 $\pm$ 1,38
	90	24,56 $\pm$ 2,12	22,57 $\pm$ 1,12	26,18 $\pm$ 0,65	25,73 $\pm$ 1,71
<b>Albumin / Globulin</b>	14	1,47 $\pm$ 0,07	1,69 $\pm$ 0,13	1,54 $\pm$ 0,16	1,51 $\pm$ 0,10
	28	1,62 $\pm$ 0,07	1,63 $\pm$ 0,13	1,59 $\pm$ 0,05	1,45 $\pm$ 0,04 <sup>+</sup>
	90	1,61 $\pm$ 0,08	1,64 $\pm$ 0,11	1,53 $\pm$ 0,05	1,53 $\pm$ 0,10
<b>ASAT [U/l]</b>	14	102,5 $\pm$ 17,3	100,3 $\pm$ 15,5	89,0 $\pm$ 9,6	85,5 $\pm$ 14,4
	28	86,5 $\pm$ 10,1	85,9 $\pm$ 12,0	84,6 $\pm$ 5,7	79,1 $\pm$ 10,5
	90	94,8 $\pm$ 17,8	95,9 $\pm$ 12,0	80,3 $\pm$ 6,5	81,5 $\pm$ 13,2
<b>ALAT [U/l]</b>	14	45,7 $\pm$ 4,2	47,4 $\pm$ 5,9	42,1 $\pm$ 4,1	36,6 $\pm$ 3,3 <sup>*</sup>
	28	39,0 $\pm$ 1,4	40,5 $\pm$ 4,4	37,7 $\pm$ 3,8	35,4 $\pm$ 5,7
	90	43,3 $\pm$ 3,3	41,7 $\pm$ 4,5	41,1 $\pm$ 1,7	40,1 $\pm$ 5,7
<b>LDH [U/l]</b>	14	486,7 $\pm$ 135,3	471,4 $\pm$ 134,5	408,4 $\pm$ 94,9	306,9 $\pm$ 53,1
	28	400,5 $\pm$ 99,0	383,9 $\pm$ 101,9	384,4 $\pm$ 217,4	247,1 $\pm$ 59,7
	90	443,6 $\pm$ 154,6	607,2 $\pm$ 130,7	347,8 $\pm$ 126,1	360,5 $\pm$ 205,8
<b>GDH [U/l]</b>	14	6,5 $\pm$ 1,2	5,2 $\pm$ 0,9	5,7 $\pm$ 0,7	5,5 $\pm$ 0,6
	28	5,4 $\pm$ 0,8	5,3 $\pm$ 0,4	6,0 $\pm$ 1,8	6,3 $\pm$ 1,3
	90	5,3 $\pm$ 0,6	6,2 $\pm$ 0,3	5,2 $\pm$ 1,2	5,3 $\pm$ 0,2
<b>ALP [U/l]</b>	14	131,4 $\pm$ 7,9	133,0 $\pm$ 9,8	125,7 $\pm$ 8,4	128,3 $\pm$ 8,3
	28	149,0 $\pm$ 14,2	128,9 $\pm$ 8,6 <sup>*</sup>	126,6 $\pm$ 8,6 <sup>**</sup>	117,5 $\pm$ 7,6 <sup>**</sup>
	90	119,0 $\pm$ 14,3	96,6 $\pm$ 7,7 <sup>**</sup>	115,4 $\pm$ 5,0	96,0 $\pm$ 3,95 <sup>**</sup>
<b><math>\gamma</math>-GT [U/l]</b>	14	0	0	0	0
	28	0	0	0	0
	90	0	0	0	0
<b>Kreatinkinase [U/l]</b>	14	336,0 $\pm$ 144,9	258,1 $\pm$ 44,0	235,9 $\pm$ 55,1	300,6 $\pm$ 195,5
	28	242,1 $\pm$ 44,3	265,7 $\pm$ 35,8	230,9 $\pm$ 75,0	165,7 $\pm$ 32,5
	90	256,4 $\pm$ 79,8	320,0 $\pm$ 51,4	199,0 $\pm$ 45,1	198,3 $\pm$ 102,7
<b>Natrium (Na<sup>+</sup>) [mM]</b>	14	138,0 $\pm$ 0,7	139,2 $\pm$ 2,1	139,0 $\pm$ 1,4	141,2 $\pm$ 1,4 <sup>*</sup>
	28	138,4 $\pm$ 0,5	139,9 $\pm$ 0,9	138,8 $\pm$ 1,9	138,3 $\pm$ 0,6
	90	141,5 $\pm$ 1,7	139,9 $\pm$ 0,7	142,4 $\pm$ 1,3	142,3 $\pm$ 0,8
<b>Kalium (K<sup>+</sup>) [mM]</b>	14	7,72 $\pm$ 0,39	6,94 $\pm$ 0,43	6,87 $\pm$ 0,51 <sup>*</sup>	6,16 $\pm$ 0,60 <sup>**</sup>
	28	4,79 $\pm$ 0,35	4,43 $\pm$ 0,13	4,91 $\pm$ 0,76	4,92 $\pm$ 0,25
	90	5,31 $\pm$ 0,38	6,20 $\pm$ 0,28 <sup>**</sup>	5,54 $\pm$ 0,38	5,22 $\pm$ 0,34
<b>Chlorid (Cl<sup>-</sup>) [mM]</b>	14	102,0 $\pm$ 1,4	102,3 $\pm$ 1,9	102,6 $\pm$ 1,0	102,9 $\pm$ 0,8
	28	99,1 $\pm$ 0,8	99,9 $\pm$ 1,0	99,7 $\pm$ 1,2	99,5 $\pm$ 0,8
	90	100,7 $\pm$ 0,9	100,0 $\pm$ 0,8	100,2 $\pm$ 0,5	99,8 $\pm$ 0,8
<b>Phosphat (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) [mM]</b>	14	2,99 $\pm$ 0,17	2,65 $\pm$ 0,45	3,10 $\pm$ 0,18	3,15 $\pm$ 0,10
	28	2,05 $\pm$ 0,20	2,19 $\pm$ 0,15	1,83 $\pm$ 0,04 <sup>*</sup>	1,57 $\pm$ 0,06
	90	1,96 $\pm$ 0,17	1,81 $\pm$ 0,16	2,80 $\pm$ 1,52	1,93 $\pm$ 0,29

Tab. 9.2: Hämatologie von F344/N-Ratten, die 28 bzw. 90 Tage mit 0, 21, 70 oder 210 µg/kg KG OTA behandelt wurden. Die Daten sind als Mittelwerte ± Standardabweichung angegeben (n = 5). Statistisch signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe wurden mit \*p < 0,05 und \*\*p < 0,01 (ANOVA + Dunnett's Test) gekennzeichnet. Abkürzungen: HDW, *hemoglobin distribution width*; MCH, *mean corpuscular hemoglobin*; MCHC, *mean corpuscular hemoglobin concentration*; MCV, *mean corpuscular volume*; RBC, rote Blutzellen; RDW, *red cell distribution width*; WBC, weiße Blutzellen.

	Zeit [d]	OTA [µg/kg KG]			
		0	21	70	210
<b>RBC [10<sup>6</sup>/mm<sup>3</sup>]</b>	28	8,70 ± 0,23	8,58 ± 0,24	8,47 ± 0,16	8,33 ± 0,23
	90	9,58 ± 0,25	9,13 ± 0,29 *	9,50 ± 0,19	9,18 ± 0,16
<b>Hämoglobin [mM]</b>	28	9,3 ± 0,1	9,1 ± 0,3	9,2 ± 0,1	8,9 ± 0,3
	90	9,8 ± 0,4	9,6 ± 0,3	9,9 ± 0,2	9,7 ± 0,2
<b>Hämatokrit [%]</b>	28	42 ± 1	41 ± 1	40 ± 1	40 ± 1 *
	90	46 ± 2	44 ± 1	46 ± 1	44 ± 1
<b>MCV [fl]</b>	28	47,9 ± 0,5	47,2 ± 0,3 *	47,5 ± 0,3	47,4 ± 0,3
	90	47,7 ± 0,9	47,4 ± 0,3	48,7 ± 0,7	48,5 ± 0,6
<b>MCH [fmol]</b>	28	1,07 ± 0,04	1,06 ± 0,01	1,09 ± 0,01	1,07 ± 0,01
	90	1,02 ± 0,02	1,05 ± 0,01	1,04 ± 0,03	1,05 ± 0,01
<b>MCHC [mM]</b>	28	22,25 ± 0,53	22,41 ± 0,34	22,83 ± 0,16	22,54 ± 0,27
	90	21,41 ± 0,47	22,08 ± 0,11	21,44 ± 0,44	21,71 ± 0,35
<b>RDW [%]</b>	28	12,5 ± 0,3	12,6 ± 0,3	12,7 ± 0,2	12,1 ± 0,1
	90	13,6 ± 0,5	13,7 ± 0,2	13,0 ± 0,3	13,0 ± 0,3
<b>HDW [mM]</b>	28	2,11 ± 0,02	2,13 ± 0,03	2,12 ± 0,02	2,15 ± 0,03
	90	2,08 ± 0,04	2,15 ± 0,04	2,08 ± 0,03	2,04 ± 0,05
<b>Retikulozyten [10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>]</b>	28	183 ± 20	191 ± 12	158 ± 9	139 ± 12 **
	90	186 ± 31	194 ± 25	184 ± 21	158 ± 40
L-Retikulozyten [%]	28	68,2 ± 3,0	64,4 ± 0,9	64,1 ± 1,4	65,8 ± 2,3
	90	65,1 ± 9,1	64,1 ± 3,4	61,4 ± 5,0	59,9 ± 5,9
M-Retikulozyten [%]	28	28,8 ± 2,5	32,4 ± 0,6	33,0 ± 0,5	32,0 ± 1,6
	90	30,9 ± 7,2	31,3 ± 2,1	34,8 ± 3,9	35,7 ± 4,9
H-Retikulozyten [%]	28	3,1 ± 0,9	3,2 ± 0,7	2,9 ± 1,0	2,2 ± 0,7
	90	4,0 ± 2,1	4,7 ± 1,4	3,9 ± 1,0	4,5 ± 1,2
<b>WBC [10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>]</b>	28	5,87 ± 0,82	6,81 ± 1,10	6,76 ± 0,40	7,38 ± 0,64 *
	90	5,14 ± 1,01	4,53 ± 0,54	6,79 ± 0,91 *	6,11 ± 1,29
Neutrophile [%]	28	25,0 ± 1,8	25,4 ± 2,9	25,4 ± 2,4	23,6 ± 2,3
	90	30,2 ± 4,7	38,9 ± 10,5	24,1 ± 1,9	21,9 ± 3,2
Eosinophile [%]	28	1,4 ± 0,2	1,6 ± 0,3	1,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
	90	2,4 ± 0,7	2,3 ± 0,7	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,5
Basophile [%]	28	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1
	90	0,5 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Lymphozyten [%]	28	70,3 ± 2,2	70,1 ± 3,1	70,4 ± 2,1	71,8 ± 2,4
	90	64,3 ± 4,9	55,0 ± 11,3	70,7 ± 1,7	73,2 ± 3,7

	Zeit [d]	OTA [ $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ]			
		0	21	70	210
Monozyten [%]	28	$1,9 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,5$	$1,9 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,3$
	90	$2,0 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,5$
LUC [%]	28	$1,0 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,2$
	90	$0,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,4^*$	$1,0 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,2^{**}$
Plättchenzahl [ $10^3/\text{mm}^3$ ]	28	$896 \pm 121$	$897 \pm 80$	$960 \pm 56$	$995 \pm 120$
	90	$642 \pm 155$	$740 \pm 147$	$832 \pm 75$	$866 \pm 54^*$



## 9.2 Verzeichnis der Abkürzungen und Einheiten

AA	Aristolochiasäure
Ax	Absorption bei einer Wellenlänge von x Nanometern
Abb.	Abbildung
<i>Actb</i>	$\beta$ -Aktin ( <i>Gen</i> )
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ALAT	Alaninaminotransferase
ASAT	Aspartataminotransferase
BEN	<i>Balkan endemic nephropathy</i>
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CdCl <sub>2</sub>	Cadmiumchlorid
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLU ( <i>Clu</i> )	Clusterin ( <i>Gen</i> )
cm	Zentimeter
CO	Kohlenmonoxid
C <sub>T</sub> -Wert	<i>threshold cycle</i>
d	Tag(e)
DAB	3,3-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMP-30	Dimethylaminomethylphenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DT	distaler Tubulus
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECVAM	<i>European Centre for the Validation of Alternative Methods</i>
Ed	Endosom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT	epitheliale-mesenchymale Transition
Eta-1	<i>early T-lymphocyte activation-1</i>
<i>et al.</i>	<i>Et altera</i>
evtl.	eventuell
f	Femto ( $10^{-15}$ )
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fl	Femtoliter
FW	vorwärts ( <i>forward</i> )
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
GDH	Glutamatdehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
$\gamma$ -GT	$\gamma$ -Glutamyltransferase
GTC	Guanidinisothiocyanat
h	Stunde(n)
HAVcr-1	<i>hepatitis A virus cellular receptor-1</i>
HDW	<i>hemoglobin distribution width</i>
<i>Hmox</i>	Hämoxygenase-1 ( <i>Gen</i> )
HO-1	Hämoxygenase-1 (Protein, allgemeine Abkürzung)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
HSP	Hitzeschock-Protein ( <i>heat shock protein</i> )
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
inkl.	Inklusive
KBrO <sub>3</sub>	Kaliumbromat

kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KIM-1 ( <i>Kim-1</i> )	<i>kidney injury molecule-1 (Gen)</i>
l	Liter
LCN2 ( <i>Lcn2</i> )	Lipocalin-2 ( <i>Gen</i> )
LDH	Lactatdehydrogenase
LUC	<i>large unstained cells</i>
LSAB	<i>labeled streptavidin biotin</i>
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
m	milli (10 <sup>-3</sup> ), Meter oder monoklonal
μg	Mikrogramm
mM	millimolar
μm	Mikrometer
M	molar
MCH	<i>mean corpuscular hemoglobin</i>
MCHC	<i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
MCV	<i>mean corpuscular volume</i>
Mi	Mitochondrien
Min.	Minute(n)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MP	Millipore (Wasserart)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTT	3,[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
mU	milli-Units (milli-Einheiten)
Mv	Mikrovilli
n	nano (10 <sup>-9</sup> )
NAG	N-Acetyl-β-D-glucosaminidase
n-CLU	nukleäre Form von Clusterin (CLU)
n.d.	nicht detektiert
NGAL	<i>neutrophil gelatinase-associated lipocalin</i>
NZ	Nitrozellulose
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
NOEC	<i>no observed effect concentration</i>
NOEL	<i>no observed effect level</i>

---

nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NRK-Zellen	<i>Normal Rat Kidney-Zellen</i>
OPN	Osteopontin
OTA	Ochratoxin A
p	Polyklonal
p	piko ( $10^{-12}$ )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBST	PBS mit Tween-20
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PCT	<i>proximal convoluted tubule</i>
ppm	<i>parts per million</i> ( $10^{-6}$ )
PST	<i>proximal straight tubule</i>
PT	Proximaler Tubulus
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBC	<i>red blood cells</i> , rote Blutzellen
RDW	<i>red cell distribution width</i>
REACH	Registrierung, Evaluierung und Autorisierung alter und neuer Chemikalien
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
<i>Rplp1</i>	<i>ribosomal protein, large, P1 (Gen)</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptions-PCR
RTQ-PCR	Real-time quantitative PCR
RV	rückwärts ( <i>reverse</i> )
S.	Seite
S <sub>1</sub> / S <sub>2</sub> / S <sub>3</sub>	erstes, zweites, drittes Segment des proximalen Tubulus
s-CLU	sezernierte Form von Clusterin
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
Sek.	Sekunde(n)
SGP-2	<i>sulfated glycoprotein-2</i>
s-Kim-1	sezernierte Form von Kim-1

---

<i>Spp1</i>	<i>secreted phosphoprotein-1</i> (Bezeichnung des Gens für OPN)
Tab.	Tabelle
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS mit Tween-20
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIM-1	<i>T-cell immunoglobulin mucin-1</i>
TIMP-1 ( <i>Timp-1</i> )	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i> (Gen)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPM-2	<i>Testosterone-repressed prostate message-2</i>
U	<i>unit</i>
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
VE	vollentsalzt
VIM ( <i>Vim</i> )	Vimentin (Gen)
WB	Western Blot
WBC	<i>white blood cells</i> , weiße Blutzellen
z.B.	zum Beispiel

## 9.3 Lebenslauf

### Eva Rached

Steinackerstraße 16  
79576 Weil am Rhein

Email: eva.rached@web.de

Mobil: 0049-176-61031540

### Persönliche Daten

---

Geburtsdatum/-ort: 03. September 1980 in Würzburg

Familienstand: verheiratet, eine Tochter

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schule und Studium

---

09/1990 – 06/1999 **Wirsberg-Gymnasium Würzburg**  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

10/1999 – 02/2005 **Universität Würzburg**  
**Studium der Biologie**  
Studienschwerpunkte: Biochemie, Mikrobiologie, Pharmakologie und Toxikologie  
Thema der Diplomarbeit: „Molekulare Mechanismen der Toxizität von Ochratoxin A in humanen Nierentubulusepithelzellen“ (durchgeführt am Lehrstuhl für Toxikologie)  
Abschluss: Diplom-Biologin

### Promotion

---

03/2005 – 03/2008 **Universität Würzburg**  
**Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie (Lehrstuhl für Toxikologie)**  
Thema der Promotion: „Neue Ansätze zur Entwicklung von Alternativmethoden zur Prüfung auf chronische Nierentoxizität“

### Berufspraxis

---

04/2008 – 07/2008 **Universität Würzburg, Lehrstuhl für Toxikologie**  
**Wissenschaftliche Mitarbeiterin**  
Forschungsarbeit: Immunhistochemische Detektion von Biomarkern für Nephrotoxizität in Nierengewebe (*tissue microarrays*) behandelter Ratten

Seit 08/2008 **Harlan Laboratories Ltd., Itingen, Schweiz**  
**Studienleiterin im Bereich Nagertoxikologie**

---

**Weiterbildung / sonstige Kenntnisse**

---

**Fortbildungskurse zur Fachtoxikologin DGPT**

- Molekulare Zelltoxikologie
- Fremdstoffmetabolismus und Toxikokinetik
- Grundlagen der Organtoxikologie und –pathologie I + II
- Versuchstierkunde I und Biostatistik
- Lebensmitteltoxikologie

**Fremdsprachen**

- Sehr gute Englisch-Kenntnisse
- Gute Französisch-Kenntnisse

---

**Mitgliedschaften / Vereine**

---

- Mitglied der DGPT e.V. (Deutsche Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie)
- Mitglied des Vereins „Unizwerge e.V. Würzburg“

---

Eva Rached

## 9.4 Publikationen und Konferenzbeiträge

### Publikationen

---

- Rached, E.**, Pfeiffer, E., Dekant, W. und Mally, A. (2006). Ochratoxin A: apoptosis and aberrant exit from mitosis due to perturbation of microtubule dynamics? *Toxicol Sci* **92**, 78-86.
- Rached, E.**, Hard, G. C., Blumbach, K., Weber, K., Draheim, R., Lutz, W. K., Ozden, S., Steger, U., Dekant, W. und Mally, A. (2007). Ochratoxin A: 13-week oral toxicity and cell proliferation in male F344/n rats. *Toxicol Sci* **97**, 288-98.
- Rached, E.**, Hoffmann, D., Blumbach, K., Weber, K., Dekant, W. und Mally, A. (2008). Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin a in vivo and in vitro. *Toxicol Sci* **103**, 371-81.
- Adler, M., Mueller, K., **Rached, E.**, Dekant, W. und Mally, A. (2009). Modulation of key regulators of mitosis linked to chromosomal instability is an early event in ochratoxin A carcinogenicity. *Carcinogenesis* **30**, 711-19.
- Sieber, M., Hoffmann, D., Adler, M., Vaidya, V.S., Clement, M., Bonventre, J.V., Zidek, N., **Rached, E.**, Amberg, A., Dekant, W. und Mally, A. (2009). Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. *Toxicol Sci* **109**, 336-49.
- Sieber, M., Wagner, S., **Rached, E.**, Amberg, A., Mally, A. und Dekant, W. (2009). Metabonomic study of ochratoxin A toxicity after repeated administration: phenotypic anchoring enhances ability for biomarker discovery. *Chem Res Toxicol* **22**, 1221-31.
- Hoffmann, D., Adler, M., Clement, M., Vaidya, V., **Rached, E.**, Mulrane, L., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Gautier, J.C., Matheis, K., Staedtler, F., Dieterle, F., Walijew, A., Hewitt, P., Ellinger-Ziegelbauer, H., Bonventre, J.V., Dekant, W. und Mally, A. (2009) Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *In Vorbereitung*

### Konferenzbeiträge

---

- Rached, E.**, Hard, G.C., Blumbach, K., Weber, K., Draheim, R. Steger, U., Dekant, W. und Mally, A. (2007) Ochratoxin A carcinogenicity: time- and dose-dependent increase in renal cell proliferation in male F344/N rats. 48. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology 375 (Suppl. 1): Abstract 442, S. 89. (Poster)
- Rached, E.**, Dekant, W. und Mally, A. (2007) KIM-1, clusterin and HO-1 as potential biomarkers for nephrotoxicity testing in vitro. Society of Toxicology 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Charlotte, USA. *The Toxicologist* (Supplement to *Tox Sci*), Abstract #1835, S. 379. (Vortrag)
- Rached, E.**, Hard, G.C., Blumbach, K., Weber, K., Draheim, R. Steger, U., Dekant, W. und Mally, A. (2007) Ochratoxin A carcinogenicity: time- and dose-dependent increase in renal cell proliferation in male F344/N rats. Society of Toxicology 46<sup>th</sup> Annual Meeting, Charlotte, USA. *The Toxicologist* (Supplement to *Tox Sci*), Abstract #1954, S. 403. (Poster)



**Rached, E.**, Hoffmann, D., Dekant, W. und Mally, A. Evaluation of putative biomarkers of nephrotoxicity after exposure to ochratoxin A in vivo and in vitro. 49. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology 375 (Suppl. 1): Abstract, S. 73. (Poster)

Hoffmann, D., Adler M., **Rached, E.**, Mulrane, L., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Gautier, J.C., Matheis, K., Staedler, F., Dieterle, F., Walijew, A., Hewitt, P., Ellinger, H., Vaidya, V., Clement, M., Bonventre, J.V., Dekant, W. und Mally A. (2009) Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. Society of Toxicology 48<sup>th</sup> Annual Meeting, Baltimore, USA. The Toxicologist (Supplement to Tox Sci), Abstract #1603, S. 332. (Poster)