

Molekulare Grundlagen der nephropathischen Wirkung von Ochratoxin A

Dissertation

zur Erlangung des

Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität

Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Isabell Hennemeier

geb. am 29.12.1984 in Ebersdorf (Thüringen)

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Reinhard Neubert
2. Gutachter: PD Dr. Gerald Schwerdt
3. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Burckhardt

Tag der Verteidigung: 17.01.2014

Inhaltsverzeichnis

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	2
2.1 Ochratoxin A	2
2.1.1 <i>Vorkommen und Belastung des Menschen</i>	2
2.1.2 <i>Toxikokinetik</i>	3
2.1.3 <i>Mechanismen der Toxizität</i>	4
2.1.3.1 Nephrotoxizität von Ochratoxin A	5
2.2 Nicht-kodierende RNAs (ncRNA)	6
2.2.1 <i>Lange nicht-kodierende RNAs</i>	7
2.2.2 <i>MicroRNAs</i>	9
2.2.2.1 MiR-29 Familie	10
2.3 WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP1).....	11
2.4 Zielsetzung der Arbeit	13
3. MATERIAL & METHODEN	14
3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	14
3.2 Zellbiologische Methoden.....	14
3.2.1 <i>Verwendete Zellen und deren Kultivierung</i>	14
3.2.2 <i>Transiente Transfektion</i>	15
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	15
3.3.1 <i>Isolierung genomischer DNA</i>	15
3.3.2 <i>Isolierung der Gesamt-RNA</i>	16
3.3.3 <i>Isolierung von Poly-A⁺ mRNA</i>	16
3.3.4 <i>Isolierung nukleärer und cytoplasmatischer RNA</i>	16

3.3.5	<i>Plasmid-Minipräparation</i>	16
3.3.6	<i>Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration</i>	16
3.3.7	<i>DNA-Gelelektrophorese</i>	17
3.3.8	<i>Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen</i>	17
3.3.9	<i>DNA-Sequenzierung</i>	17
3.3.10	<i>Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren</i>	17
3.3.10.1	Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten.....	17
3.3.10.2	TA Cloning	18
3.3.10.3	Transformation von <i>E.coli</i>	18
3.3.10.4	Übernachtskultur und Bakterienlagerung	18
3.3.10.5	Beschreibung selbst-konstruierter Plasmide	19
3.4	<i>Polymerase-Kettenreaktion – PCR</i>	21
3.4.1	<i>DNase-Verdau und reverse Transkription</i>	21
3.4.2	<i>Qualitative PCR</i>	22
3.4.3	<i>Quantitative Real-Time PCR - qPCR</i>	22
3.4.4	<i>RT-qPCR-Array</i>	24
3.4.5	<i>„Rapid Amplification of cDNA ends“-PCR (RACE-PCR)</i>	25
3.4.6	<i>TaqMan[®] qPCR zur Quantifizierung von microRNAs</i>	25
3.5	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	26
3.5.1	<i>Protein-Isolation</i>	26
3.5.2	<i>Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz</i>	26
3.5.3	<i>Western Blot</i>	26
3.5.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
3.5.3.2	Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen.....	27
3.5.3.3	Immunoblot	28
3.5.4	<i>ELISA</i>	29

3.5.4.1	Kollagen-ELISA.....	29
3.5.4.2	WISP1-ELISA.....	30
3.5.5	<i>Reportergen-Assay</i>	30
3.5.5.1	Plasmide für Reportergen-Analysen.....	31
3.5.5.2	Sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP)-Assay	31
3.5.5.3	Luziferase Reporter Assay.....	32
3.5.5.4	Dual-Luciferase® Reporter Assay.....	32
3.5.6	<i>Puffer für proteinbiochemische Methoden</i>	33
3.6	Bioinformatik	34
3.7	Statistik.....	35
4.	ERGEBNISSE & DISKUSSION	36
4.1	Durch Ochratoxin A verursachte Genexpressionsveränderungen	36
4.1.1	<i>Durch Ochratoxin A verursachte Genexpressionsveränderungen in humanen proximalen Tubuluszellen (RPTEC)</i>	36
4.1.2	<i>Validierung der PCR-Array Ergebnisse</i>	37
4.1.3	<i>Diskussion</i>	39
4.2	Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Expression.....	42
4.2.1	<i>Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Genexpression</i>	42
4.2.2	<i>Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Proteinexpression</i>	44
4.2.3	<i>Ochratoxin A induziert ein alternatives WISP1-Transkript (lncWISP1)</i>	45
4.2.4	<i>lncWISP1 ist eine nukleär angereicherte lange nicht-kodierende RNA</i>	46
4.2.5	<i>Diskussion</i>	47
4.3	Ochratoxin A induziert lncWISP1 über den MEK/ERK-Signalweg.....	50
4.3.1	<i>Untersuchung potentieller Signalwege zur lncWISP1-Induktion</i>	50
4.3.2	<i>Die Rolle des MEK/ERK-Signalweges</i>	51
4.3.3	<i>Ochratoxin A interagiert mit intrazellulären Signalproteinen</i>	53

4.3.4	<i>Diskussion</i>	54
4.4	Identifizierung des lncWISP1-Promotors	56
4.4.1	<i>Ochratoxin A induziert einen alternativen lncWISP1-Promotor</i>	56
4.4.2	<i>Diskussion</i>	57
4.5	Ochratoxin A vermindert die Wirkung der miR-29b.....	59
4.5.1	<i>Ochratoxin A und miR-29b regulieren die WISP1 3'UTR</i>	60
4.5.2	<i>Posttranskriptionelle Regulation der miR-29b durch Ochratoxin A</i>	61
4.5.3	<i>Diskussion</i>	62
4.6	Einfluss der miR-29b auf die Kollagen-Expression.....	64
4.6.1	<i>MiR-29b reduziert die Kollagen I, III und IV-Expression</i>	64
4.6.2	<i>Diskussion</i>	66
4.7	Die profibrotische Wirkung von Ochratoxin A ist miR-29b-abhängig	68
4.7.1	<i>Ochratoxin A erhöht die Kollagenexpression post-transkriptionell</i>	68
4.7.1.1	Einfluss von Ochratoxin A auf die Kollagen Proteinexpression	68
4.7.1.2	Einfluss von Ochratoxin A auf die Kollagen I, III und IV mRNA-Expression.....	69
4.7.1.3	Einfluss von Ochratoxin A auf die Funktion der Kollagen I 3'UTR.....	69
4.7.2	<i>Einfluss der miR-29b auf die Ochratoxin A-induzierte Erhöhung des Kollagen-Proteingehalts im Medium</i>	70
4.7.3	<i>Diskussion</i>	71
5.	ZUSAMMENFASSENDER DISKUSSION	74
6.	SCHLUSSFOLGERUNG	78
	LITERATURVERZEICHNIS	V
	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XV
	RT² PROFILER PCR-ARRAY ROHDATEN	XVIII
	PRIMER WALKING	XXVI

1. Zusammenfassung

Ochratoxin A (OTA) ist ein Mykotoxin, das mit der Entstehung chronischer Nephropathien in Tier und Mensch in Verbindung gebracht wird. Es wird von verschiedenen Schimmelpilzarten synthetisiert und ist ubiquitär in Lebens- und Futtermittel verbreitet. Die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen, die nach einer verlängerten Exposition mit geringen und damit relevanten OTA-Konzentrationen zu fibrotischen Nephropathien führen können, sind jedoch weitgehend unbekannt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit, die Genexpressionsänderungen im Rahmen der nephropathischen Wirkung von OTA zu untersuchen.

Unter Verwendung von RT-qPCR-Arrays konnte gezeigt werden, dass eine 14-tägige Exposition von primären humanen proximalen Tubuluszellen (RPTEC) mit 10 nM OTA zu einer veränderten Expression von Genen führt, die an inflammatorischen, fibrotischen und/oder malignen Prozessen beteiligt sind. Besonders stark wurde durch OTA ein Transkript des *Wnt1 inducible signaling pathway protein 1* (WISP1) in RPTEC Zellen als auch in den humanen Nierenzellen HEK293 und HK-2 exprimiert. Bei dieser RNA handelt es sich um ein bisher nicht beschriebenes, nukleär angereichertes, alternatives Transkript von WISP1, das lncWISP1 (= long noncoding WISP1) genannt wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Expression von lncWISP1 über den MEK/ERK-Signalweg und unter Verwendung eines alternativen Promotors erfolgt. lncWISP1 besteht aus einem Teil des vierten Introns und des fünften und damit letzten Exons von WISP1, das die 3'untranslatierte Region (3'UTR) beinhaltet und u.a. eine microRNA-29b (miR-29b) Bindestelle enthält. OTA Exposition und damit vermehrte lncWISP1 Expression führt zur verminderten Wirkung der anti-fibrotisch agierenden miR-29b, wahrscheinlich durch das Bereitstellen alternativer Bindestellen für miR-29b in Form von lncWISP1. Die verminderte Wirkung der miR-29b spiegelt sich in gesteigerter Expression verschiedener Kollagene, die die klassischen miR-29b Zieltranskripte darstellen, wider.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse lassen auf einen neuartigen molekularen Mechanismus schließen, bei dem der nephropathische Zellstressor OTA zur verstärkten Expression der langen nicht-Protein-kodierenden RNA lncWISP1 führt. lncWISP1 wiederum unterdrückt die Wirkung der anti-fibrotischen miR-29b und trägt dadurch indirekt zu einer gesteigerten Formation extrazellulärer Matrix, gefolgt von fibrotischen Gewebsveränderungen, bei.

2. Einleitung

2.1 Ochratoxin A

Ochratoxin A (OTA) ist ein Mykotoxin, das von Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus* und *Penicillium* synthetisiert wird. Weiterhin zählen Ochratoxin B (dechloriertes OTA) und C (ethyliertes OTA) zu der Gruppe der natürlich vorkommenden Ochratoxine. OTA ist jedoch auf Grund seines Vorkommens und seiner Toxizität für die Gesundheit von Tier und Mensch am bedeutendsten. Es wurde erstmals 1965 aus *Aspergillus ochraceus* isoliert und nach diesem Stamm benannt (Van der Merwe et al., 1965). Strukturell handelt es sich um ein Isocoumarin-Derivat, das über eine Peptidbindung an L-β-Phenylalanin gebunden ist (Abb. 1).

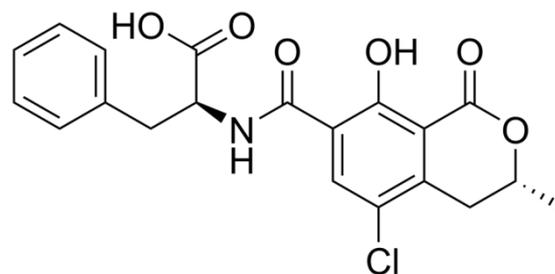


Abb. 1: Strukturformel von Ochratoxin A. N-[[[(3R)-5-Chloro-8-Hydroxy-3-Methyl-1-Oxo-7-Isochromanyl]carbonyl]-3-Phenyl-L-Alanin

2.1.1 Vorkommen und Belastung des Menschen

OTA ist ein ubiquitär verbreitetes Mykotoxin, das je nach Lager- und Verarbeitungsbedingungen in diversen Nahrungsmitteln nachweisbar ist. In Europa findet man 50 % des detektierten OTA in Getreideprodukten, gefolgt von Wein (13 %), Kaffee (10%), Gewürzen (8 %), Bier (5 %), Kakao (4 %) und getrockneten Früchten (3 %) (Fernández-Cruz et al., 2010; Miraglia M, 2002). Über die Verfütterung von kontaminiertem Futtermittel kann OTA in das Fleisch von Nutztieren gelangen (Miraglia M, 2002). Als Folge der ubiquitären Verbreitung von OTA-belasteten Nahrungsmitteln und dadurch, dass es relativ stabil gegenüber den gängigen Verarbeitungsverfahren von Lebensmitteln ist, ist eine tägliche Aufnahme über die Nahrung schwer zu vermeiden (Bullerman and Bianchini, 2007). Die im Auftrag des Wissenschaftlichen Lebensmittelausschusses der EU (SCF) durchgeführten Berechnungen ergaben, dass ein europäischer Erwachsener bei normaler Ernährung täglich

durchschnittlich zwischen 0,7 und 4,6 ng/kg Körpergewicht aufnimmt (Miraglia M, 2002). In dem im Jahr 2006 veröffentlichten Gutachten der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) wurde die wöchentliche Aufnahme auf 15 bis 60 ng geschätzt. Die tolerierbare wöchentliche Aufnahmemenge (TWI) beträgt 120 ng pro kg Körpergewicht (EFSA, 2006).

Die aus der OTA-Aufnahme resultierenden OTA Konzentrationen im Blutplasma im gesunden menschlichen Körper liegen in Europa zwischen 0,11 µg/l (0,27 nmol/l) und 5,58 µg/l (13,8 nmol/l). Im Durchschnitt liegt die Plasmakonzentration bei etwa 0,35 µg/l (0,87 nmol/l) (Miraglia M, 2002). Die Bestimmung der OTA-Plasmagehalte in Menschen aus verschiedenen Regionen der Welt ergab eine mittlere Plasmakonzentration von 0,45 µg OTA/l Plasma (1,11 nmol/l). Dabei wurden die niedrigsten Konzentrationen in der japanischen Bevölkerung und die höchsten in Argentinien gefunden (Coronel et al., 2010). Der Vergleich der OTA-Plasmakonzentrationen zwischen gesunden Personen und Personen mit chronischen Nierenerkrankungen in der tunesischen Bevölkerung ergab, dass die durchschnittliche Konzentration in der Kontrollgruppe 0,82 nmol/l betrug. Personen mit chronischen Nierenerkrankungen wiesen hingegen eine Plasmakonzentration von bis zu 16,1 nmol/l (Ø 4,46 nmol/l) (Zaied et al., 2011). Dies lässt darauf schließen, dass die renale Exkretion und Akkumulierung von OTA und damit auch dessen Toxizität durch Nierenerkrankungen beeinflusst wird.

2.1.2 Toxikokinetik

Nach oraler Aufnahme wird OTA mit einer Bioverfügbarkeit von bis zu 97 % im Magen oder Dünndarm absorbiert (Coronel et al., 2010; Hagelberg et al., 1989; Ringot et al., 2006). Im Blutkreislauf angekommen, bindet es zu 99 % an Plasmaproteine (hauptsächlich Albumin). Über die Pfortader wird OTA zur Leber transportiert und anschließend in verschiedene Organe oder Gewebe, wie Niere, Leber, Muskel- und Fettgewebe, verteilt (Ringot et al., 2006).

Die Biotransformation und damit Detoxifizierung von OTA erfolgt in der Leber, der Niere und im Dünndarm. Dabei wird OTA vor allem über Hydrolyse, Hydroxylierung, Laktoringöffnung und Konjugation metabolisiert (Wu et al., 2011).

Die Halbwertszeit von OTA variiert sehr stark zwischen unterschiedlichen Spezies. Sie beträgt nach intravenöser Gabe 35,5 Tage im Menschen, 48 h in der Maus und 8,3 h im Fisch (Hagelberg et al., 1989; Studer-Rohr et al., 2000). Es wird vermutet, dass die relativ lange

Eliminationszeit unter anderem durch die starke Bindung von OTA an Plasmaproteine bedingt ist (Kumagai, 1985). Die Exkretion von OTA erfolgt renal, fäkal oder über die Milch (Coronel et al., 2010; Ringot et al., 2006). Nach Sekretion im proximalen Tubulus kann OTA entlang des Nephrons reabsorbiert werden (Zingerle et al., 1997). Dies ist ein weiterer Grund für die lange Eliminationszeit und für die Akkumulierung des Toxins in der Niere.

2.1.3 Mechanismen der Toxizität

OTA, das als humanes Karzinogen der Klasse 2B (= möglicherweise krebserregend für den Menschen) eingestuft ist, hat grundsätzlich diverse toxische Effekte. Es wirkt immunotoxisch, neurotoxisch, hepatotoxisch und teratogen (Al-Anati and Petzinger, 2006; Gagliano et al., 2006; el Khoury and Atoui, 2010; Mally, 2012; O'Brien et al., 2005; Sava et al., 2006; Wangikar et al., 2004). Im Vordergrund der toxischen Wirkung von OTA steht jedoch seine Nephrotoxizität, welche in 2.1.3.1 detaillierter beschrieben wird.

Die molekularen Grundlagen der toxischen Wirkung von OTA sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Unter anderem wurde beschrieben, dass OTA auf Grund seines Phenylalaninrestes kompetitiv die Phenylalanyl-tRNA-Synthase und damit die Proteinbiosynthese hemmt (Creppy et al., 1983). Auch andere Enzyme können durch den Phenylalaninrest von OTA in ihrer Wirkung beeinflusst werden (Ringot et al., 2006). Weitere molekulare Mechanismen, die für die Toxizität von OTA verantwortlich sein können, sind die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies bzw. Lipidperoxidation (Rahimtula and Bereziat, 1988), die Störung der zellulären Ca^{2+} -Homöostase (Benescic et al., 2000), die Inhibierung der mitochondrialen Atmungskette (Aleo et al., 1991), die Bildung von DNA-Addukten (Grosse et al., 1995) und die Induktion der Apoptose (Chopra et al., 2010; Schwerdt et al., 1999a). Es ist wichtig festzuhalten, dass die beobachteten toxischen Effekte abhängig von der OTA-Konzentration sind (Ringot et al., 2006). Viele der oben beschriebenen Effekte finden sich nur bei OTA-Konzentrationen, die teilweise weit oberhalb der Konzentrationen liegen, die man im Organismus erwarten kann. Dagegen wirkt OTA in nanomolaren Konzentrationen, also Konzentrationen, die tatsächlich im Organismus bei üblicher Kost gefunden werden können, nicht als klassisches Toxin, sondern eher als Modulator von Signalwegen (Gekle et al., 2005).

2.1.3.1 Nephrotoxizität von Ochratoxin A

Die Niere stellt das wichtigste Zielorgan der OTA-Toxizität dar. OTA wirkt in allen bisher getesteten Säugetieren nephrotoxisch (EFSA, 2006). Dabei handelt es sich nicht ausschließlich um experimentelle Befunde. So wird OTA als auslösender Faktor der sogenannten Schweine-Nephropathie angesehen (Elling and Moller, 1973; Milićević et al., 2008; Pohland et al., 1992a). Diese Erkrankung ist durch eine Degeneration der proximalen Tubuli, einer Atrophie des tubulären Epithels, einer interstitiellen Fibrose im Nierenkortex und hyalinisierten Glomeruli charakterisiert. Im Geflügel wurden ebenfalls Nephropathien durch OTA-kontaminiertes Futtermittel ausgelöst (Pohland et al., 1992b).

In Bezug auf den Menschen gibt es Hinweise darauf, dass OTA mit der Entstehung bestimmter Nierenerkrankungen und auch von Tumoren im Urogenitaltrakt in Zusammenhang gebracht werden kann (Ozçelik et al., 2001; Peraica et al., 2008; Pfohl-Leszkowicz and Manderville, 2007; Zaied et al., 2011). Erhöhte OTA-Konzentrationen konnten im Blut und im Urin von Patienten mit endemischer Balkan-Nephropathie, einer chronisch verlaufenden interstitiellen Nephritis in Balkanländern, und auch im Blut von tunesischen Patienten mit chronischer interstitieller Nephropathie unbekannter Ätiologie gemessen werden (Castegnaro et al., 2006; Peraica et al., 2008; Zaied et al., 2011). Interessanterweise zeigen diese Nierenerkrankungen große Ähnlichkeiten hinsichtlich der morphologischen und funktionellen Schädigungen des Nierengewebes, die auch bei der Schweine-Nephropathie beobachtet werden können. Die erhöhte Aufnahme von OTA-kontaminierten Lebensmitteln wird daher als mögliche Ursache für das Auftreten der oben genannten Nephropathien diskutiert, jedoch sind bisher noch keine eindeutigen Beweise erbracht und andere ökologische Einflussfaktoren können nicht ausgeschlossen werden (Tatu et al., 1998).

Die hohe Empfindlichkeit der Niere gegenüber OTA ist zum Teil auf die toxikokinetischen Eigenschaften von OTA zurückzuführen. OTA reichert sich vor allem in proximalen Tubuluszellen durch sekretorischen Transport und im Sammelrohr durch Reabsorption an. Dadurch stellen diese beiden Bereiche der Niere die Zielstrukturen der OTA-Toxizität dar. Aus bisher nicht bekannten Gründen sind die morphologischen Veränderungen jedoch fast ausschließlich im proximalen Tubulus zu finden (Gekle et al., 2005), wobei Genexpressionsveränderungen eine Rolle spielen könnten. Die Ermittlung von OTA-induzierten Genexpressionsänderungen in proximalen Tubuluszellen, insbesondere unter Verwendung nanomolarer und damit relevanter Konzentrationen, stellt daher eine bisher nicht wahrgenommene Möglichkeit dar, die nephropathische Wirkung von OTA im Menschen zu charakterisieren.

2.2 Nicht-kodierende RNAs (ncRNA)

Das zentrale Dogma der Molekularbiologie wurde 1958 von Francis Crick publiziert und beschreibt den Fluss genetischer Information innerhalb eines biologischen Systems (Crick, 1970), d.h., aus DNA entsteht RNA und daraus entsteht ein funktionelles Protein. Die letzten Jahrzehnte molekularbiologischer Forschung haben jedoch gezeigt, dass die Hypothese von Crick die Komplexität höherer Organismen nicht vollständig erklären kann. Tatsächlich steigt das Verhältnis nicht-kodierender zu Protein-kodierenden DNA-Sequenzen mit zunehmender Komplexität des Organismus stetig an (Mattick, 2004; Taft et al., 2007) (Abb. 2).

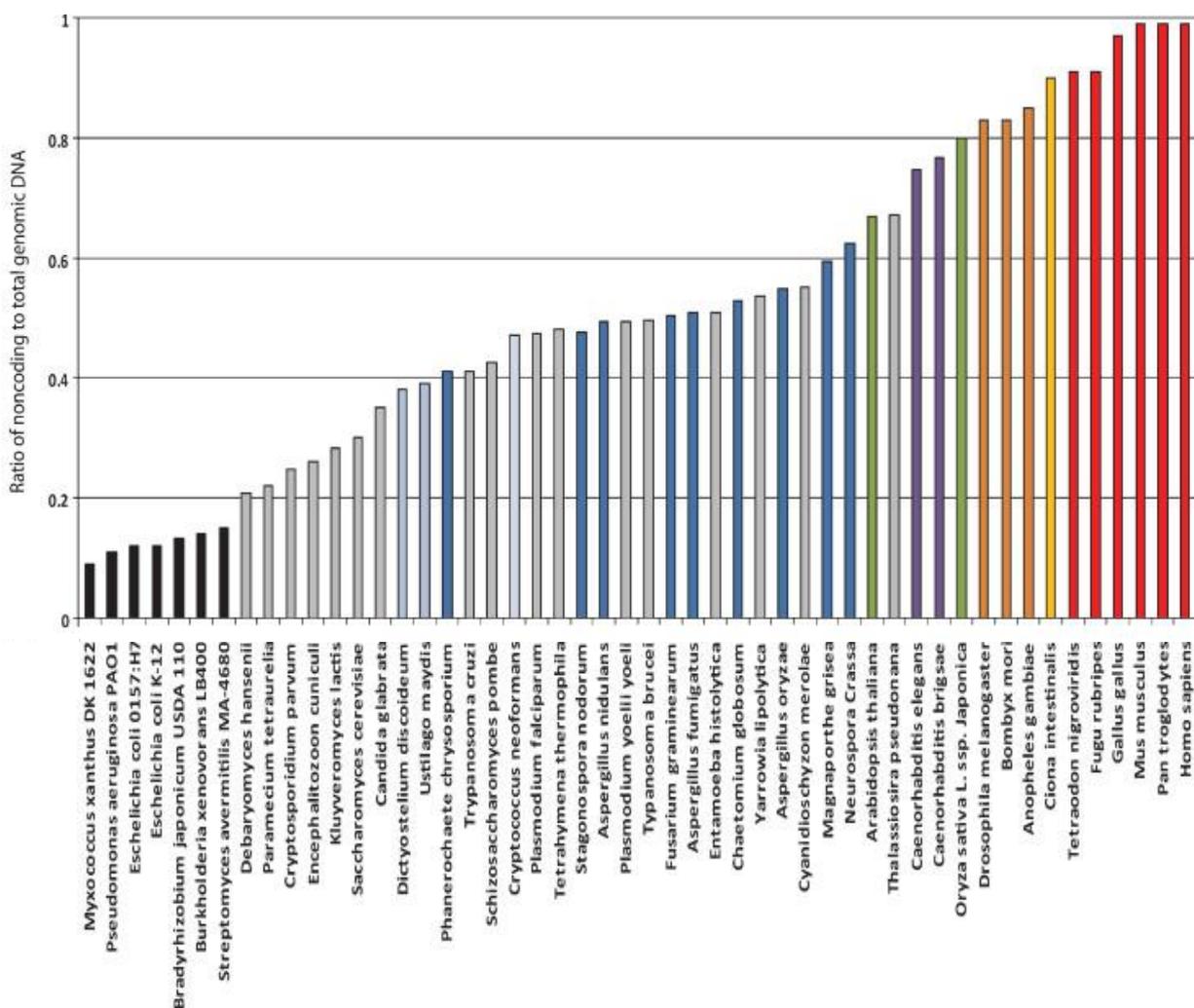


Abb. 2: Das Verhältnis nicht-Protein-kodierender zu Protein-kodierender DNA steigt mit zunehmender Komplexität. In Prokaryoten findet sich weniger als 25 % nicht-kodierende DNA, in einfachen Eukaryoten zwischen 25 und 50 % und in komplexeren Pilzen, Pflanzen und Tieren mehr als 50 % nicht-kodierende DNA und bis zu schätzungsweise 98 % nicht-Protein-kodierende Sequenzen beim Menschen. Die verschiedenen Farben repräsentieren Prokaryoten (schwarz), Einzeller (grau), Organismen, die je nach Lebenszyklus ein- oder mehrzellig sind (hellblau), einfache Mehrzeller (blau), Pflanzen (grün), Nematoden (lila), Arthropoden (orange), Chordatiere (gelb) und Vertebraten (rot) (aus Taft et al., 2007).

So haben niedrigere Organismen wie *C. elegans* eine vergleichbare Anzahl an Proteinkodierenden Genen wie der Mensch, während das humane Genom aber 30 mal größer ist (Taft et al., 2007). Weiterhin konnte im Rahmen des ENCODE-Projektes (*ENCyclopedia Of DNA Elements*), einem Forschungsprojekt mit dem Ziel, alle funktionellen Elemente des menschlichen Genoms sowie das Transkriptom zu identifizieren und zu charakterisieren, gezeigt werden, dass 76 % des humanen Genoms transkribiert werden, aber maximal nur 3 % des Genoms für Proteine kodieren (Djebali et al., 2012; Pennisi, 2012).

Heute weiß man, dass diesem großen Anteil nicht-Protein-kodierender Sequenzen – bis vor wenigen Jahren als „*junk*“ (= Abfall, unbrauchbares Material) bezeichnet – eine essentielle Rolle während physiologischer sowie pathophysiologischer Prozesse zukommt. Diese Ansicht wird gestützt dadurch, dass die Expression nicht-kodierender RNAs (ncRNAs) streng reguliert ist, d.h., Zelltyp-, Gewebe-spezifisch und abhängig vom ontogenetischen Entwicklungsstand stattfindet (Costa, 2007; Mattick, 2004; Mattick and Makunin, 2006; Taft et al., 2010, 2007).

Funktionell werden ncRNAs in zwei Klassen unterteilt: Zum Einen infrastrukturelle ncRNAs wie ribosomale RNA (rRNA), transfer-RNA (tRNA) oder *small nuclear* RNA (snRNA), zum Anderen regulatorische ncRNAs wie microRNA (miR) oder lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) (Costa, 2007; Mattick, 2004; Mattick and Makunin, 2006). In neuesten Forschungsergebnissen wurden weiterhin natürlich vorkommende zirkuläre RNAs identifiziert, die als regulatorische ncRNAs fungieren (Hansen et al., 2013).

2.2.1 Lange nicht-kodierende RNAs

Lange nicht-kodierende RNAs sind Transkripte, die eine Länge von über 200 Basen aufweisen und nicht in Proteine translatiert werden. Studien der letzten Jahre belegen eine große Anzahl von lncRNAs. So wurden im Rahmen des ENCODE Projektes bis zum Jahr 2012 9600 lange nicht-kodierende RNA-Moleküle identifiziert (Pennisi, 2012). Nach der Transkription werden die meisten lncRNAs ähnlich wie Protein-kodierende Gene prozessiert, einschließlich des Anheftens der 5'Cap-Struktur, der 3'Polyadenylierung, des Spleißens von Introns und des intrazellulären Transports (Yoon et al., 2012). Die Transkription von lncRNAs ist streng reguliert, d.h., abhängig vom Entwicklungsstadium und gewebespezifisch. Darüber hinaus weisen lncRNAs eine präzise subzelluläre Lokalisation auf (Mercer et al., 2009), wohingegen die Sequenz-Konservierung von lncRNAs gering ist. Genomanalysen haben gezeigt, dass das gesamte humane Genom mit lncRNA-kodierenden Abschnitten durchsetzt

ist und diese oft mit Protein-kodierenden und nicht-kodierenden Abschnitten überlappen (Chen and Carmichael, 2010).

Die Funktion der meisten bisher identifizierten lncRNAs ist nicht aufgeklärt. Die bislang gut charakterisierten lncRNAs deuten auf ein breites Spektrum an Funktionen hin und zeigen eine Vielzahl regulierter zellulärer Prozesse. So beeinflussen lncRNAs die Genexpression auf verschiedenen Ebenen, indem z.B. die Chromatinstruktur modifiziert wird und sowohl die transkriptionelle als auch posttranskriptionelle Prozessierung von mRNAs reguliert wird. Auch kann eine einzige lncRNA diverse Funktionen ausüben.

Chromatin-Modifizierung

lncRNAs können epigenetische Veränderungen hervorrufen, indem so genannte Chromatin Remodeling Komplexe an spezifische genomische Loci rekrutiert werden. lncRNAs können dabei als eine Art Stützgerüst dienen, um die räumliche Nähe von Proteinkomplexen herzustellen oder die nukleäre Struktur bzw. Histonmodifikationen zu beeinflussen. Weiterhin können DNA-bindende Proteine oder Transkriptionsfaktoren vom Chromatin weggefangen werden. Es ist ebenso beschrieben, dass lncRNAs Chromatinschleifen erzeugen können und dadurch regulatorisch wirken (Mercer et al., 2009; Nagano and Fraser, 2011; Rinn and Chang, 2012; Wang and Chang, 2011).

Transkriptionelle Regulation

lncRNAs können transkriptionelle Prozesse durch verschiedene Mechanismen steuern. Als Co-Faktoren modulieren sie die Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Ebenso kann die Aktivität der RNA Polymerase II reguliert werden, indem die lncRNAs entweder direkt mit der RNA Polymerase II Maschinerie interagieren oder indem sie an Promotoren binden und Initiationskomplexe blockieren. Auch RNA-bindende Proteine können an die DNA rekrutiert werden (Mercer et al., 2009; Yoon et al., 2012).

Posttranskriptionelle Regulation

lncRNAs können komplementäre Sequenzen erkennen. Dies erlaubt hoch spezifische Interaktionen, wodurch verschiedene Stufen der posttranskriptionellen Prozessierung beeinflusst werden können, wie das Spleißen, die Editierung, der Transport, die Translation als auch die Degradierung des Zieltranskripts (Mercer et al., 2009; Yoon et al., 2012). Darüber hinaus können lncRNAs microRNAs binden, wodurch miR-Zieltranskripte indirekt in ihrer Expression posttranskriptionell reguliert werden (Yoon et al., 2012).

2.2.2 MicroRNAs

Bei microRNAs (miRs) handelt es sich um eine Familie von kleinen, nicht-kodierenden RNA Molekülen. Sie besitzen in der Regel eine Länge von 21-25 Nukleotiden, sind hochkonserviert und kommen in den Genomen von Pflanzen, Tieren, Pilzen und Viren vor. Ihre Funktion besteht darin, die Expression ihrer Zieltranskripte auf posttranskriptioneller Ebene zu regulieren (He and Hannon, 2004; Kusenda et al., 2006; Zhang et al., 2012). Fehlerhafte Expression oder Funktion von miRs steht im Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Erkrankungen wie Tumoren oder Immunerkrankungen. Schätzungsweise kodieren 1-5 % aller Gene in Tieren für miRs und 10-30 % aller für Proteine kodierenden Gene sind vorausgesagte Zieltranskripte, die durch miRs in ihrer Expression reguliert werden (Kusenda et al., 2006). Im Rahmen des ENCODE Projektes wurden bis zum Jahr 2012 8800 miRs identifiziert (Pennisi, 2012).

Die Biogenese und Wirkung der miRs ist in Abbildung 3 dargestellt und kurz beschrieben.

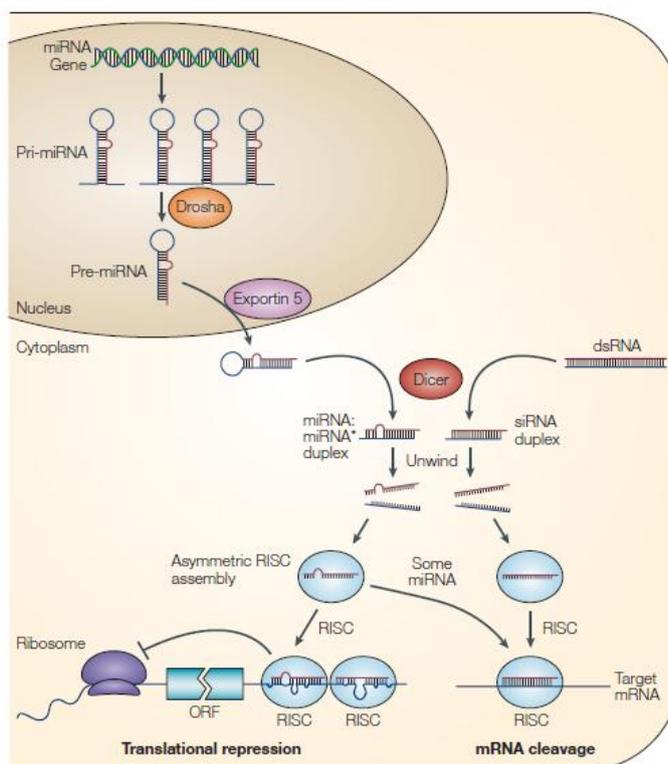


Abb. 3: Biogenese und Wirkung von microRNAs. Das ~ 1 kb lange pri-miR-Transkript wird zunächst im Nucleus durch die RNase III Drosha in eine ~ 70 Basen lange, haarnadelförmige pre-miR prozessiert. Die pre-miR wird durch Exportin 5 ins Zytoplasma transportiert und durch die RNase III Dicer in ein miR:miR*-Duplex umgewandelt. Der Duplex wird anschließend durch eine Helikase entwunden und der miR* Strang abgebaut. Der reife miR Strang wird in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut. RISC ist ein Ribonukleoprotein-Komplex der neben RNA vor allem Argonaute-Proteine enthält. Der RISC Komplex inklusive miR wirkt auf seine Ziel-mRNA entweder, indem die Translation unterdrückt oder indem die mRNA gespalten wird. Ob der eine oder andere Mechanismus stattfindet, ist abhängig von der Komplementarität zwischen miR und seinem Ziel-Transkript. (aus He & Hannon, 2004)

Posttranskriptionelle Regulation

MiRs gelten heute als einer der wichtigsten Faktoren in der Regulation der Genexpression. Die Regulation erfolgt posttranskriptionell durch Inhibierung der Translation oder Induktion des mRNA Abbaus. Welche Form der posttranskriptionellen Repression genutzt wird, hängt

von der Komplementarität zwischen miR und dem Ziel-Transkript ab. Eine vollständig komplementäre Basenpaarung führt zur Degradation der mRNA. Dieser Mechanismus findet vorwiegend in Pflanzen statt, ist aber auch bei Tieren beschrieben. Eine unvollständige Komplementarität zwischen miR und mRNA bewirkt hingegen eine Unterdrückung der Translation. Für diesen Mechanismus ist eine komplementäre Bindung mit den miR-Basen zwei bis acht ausreichend. Diese sechs Nukleotide lange Bindesequenz wird als sogenannte „*seed region*“ bezeichnet (Bartel et al., 2004; He and Hannon, 2004; Kusenda et al., 2006). Die Bindestellen für miRs beschränken sich in Tieren auf die 3'UTR der Zielgene, während miRs in Pflanzen sowohl in der 3'UTR als auch in der 5'UTR und im kodierenden Bereich binden können (Bartel et al., 2004; He and Hannon, 2004; Kusenda et al., 2006). Neuere Studien zeigen zusätzlich, dass miRs unter bestimmten Bedingungen eine Stimulation der Translation bewirken können (Vasudevan, 2012).

2.2.2.1 MiR-29 Familie

Die miR-29 Familie besteht aus drei Mitgliedern, die durch zwei unterschiedliche genomische Loci kodiert werden. Die miR-29b-1 und miR-29a werden vom Chromosom 7q32.3 transkribiert, während die miR-29b-2 und miR-29c vom Chromosom 1q32.2 transkribiert werden. Alle vier Mitglieder haben die gleiche Bindesequenz (*seed region*), mit der sie an Zieltranskripte binden (Kriegel et al., 2012; Patel and Nouredine, 2012). Für die miR-29 sind verschiedene Funktionen beschrieben, wie die Suppression der Tumorentstehung, die Induktion der zellulären Seneszenz, der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Kriegel et al., 2012; Patel and Nouredine, 2012). Die am besten beschriebene Eigenschaft der miR-29 ist jedoch ihre Rolle in der Prävention einer Fibrose. Ihre anti-fibrotischen Effekte übt miR-29 aus, indem sie an die mRNA von mindestens 16 verschiedenen Extrazellulärmatrixgenen, wie Kollagene, bindet und deren Expression beeinflusst (Kriegel et al., 2012). Die Herunterregulation der Expression von Kollagenen durch miR-29 findet in diversen Geweben statt (Kwiecinski et al., 2011; Liu et al., 2011; Qin et al., 2011; van Rooij et al., 2008; Wang et al., 2012; Xiao et al.). Starke anti-fibrotische Effekte wurden vor allem in der Niere und im Herzen gezeigt (Liu et al., 2011; Patel and Nouredine, 2012; Qin et al., 2011; van Rooij et al., 2008; Wang et al., 2012).

2.3 WNT1-inducible signaling pathway protein 1 (WISP1)

Das *WNT1-inducible signaling pathway protein 1* wird durch das WISP1 Gen kodiert und gehört zur CCN-Familie von Bindegewebs-Wachstumsfaktoren. Die CCN-Familie besteht aus sechs Cystein-reichen, 30-40 kDa großen Proteinen: *cystein rich 61* (CYR61/CCN1), *connective tissue growth factor* (CTGF/CCN2), *nephroblastoma overexpressed* (NOV/CCN3) und den *WNT1 inducible signaling pathway protein-1* (WISP1/CCN4), -2 (WISP2/CCN5), und -3 (WISP3/CCN6). Zu den biologischen Funktionen dieser Proteine zählt die Stimulierung der Mitose, der Zelladhäsion, der Apoptose, der Produktion extrazellulärer Matrix, der Induktion von Wachstumsstopps und der Migration (Brigstock, 2003). Diese Effekte werden vermutlich durch Bindung an Integrine auf der Zellmembran ausgelöst (Brigstock, 2003).

Die WISP1 Genexpression wird klassischerweise über den Wnt1/ β -Catenin-Signalweg induziert (Xu et al., 2000). Dieser führt zu einer nukleären Anreicherung von β -Catenin, wodurch die Transkriptionsfaktoren CREB und TCF/LEF aktiviert werden. Der WISP1 Promotor kann jedoch auch unabhängig von β -Catenin, z.B. über ERK1/2 und CREB, aktiviert werden (Venkatachalam et al., 2009).

Für WISP1 wie auch für alle anderen Mitglieder der CCN-Familie sind eine N-terminale Lokalisationssequenz und vier konservierte Domänen charakteristisch, denen jeweils einzelne Exons auf Genebene zuzuordnen sind: eine *insulin-like growth factor* bindende Domäne (IGFBP), eine von-Willebrand Typ C Domäne (VWC), eine Thrombospondin Typ-1 Domäne (TSP-1) und eine C-terminale Domäne (CT) (Berschneider and Königshoff, 2011) (Abb. 4).

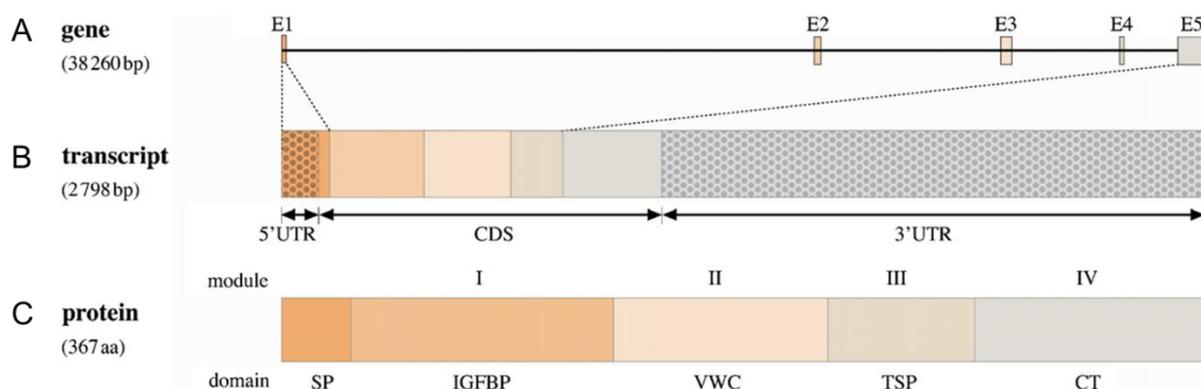


Abb. 4: (A) Das WISP1 Gen besteht aus fünf Exons mit vier dazwischenliegenden Introns und befindet sich auf Chromosom 8. Das WISP1 Transkript (B) und das WISP1 Protein (C) sind modular aufgebaut, wobei sowohl das Signalpeptid (SP) als auch die verschiedenen Domänen aus einem einzelnen Exon hervorgehen. Das Modul I ähnelt dem *insulin-like growth factor binding protein* (IGFBP), Modul II dem von-Willebrand Typ C (VWC), Modul III dem Thrombospondin Typ-I (TSP) und Modul IV einer C-terminalen Domäne (CT) (aus Berschneider & Königshoff, 2011). E = Exon; CDS = coding sequence.

Neben einem Vollängentranskript mit fünf Exons sind für WISP1 auch Spleißvarianten beschrieben, bei denen entweder nur das Exon 3 (= vWISP1) oder Exon 3 und Exon 4 (= vxWISP1) fehlen (Cervello et al., 2004; Tanaka et al., 2001, 2003; Yanagita et al., 2007).

Das Vollängentranskript kodiert für ein sezerniertes und 367 Aminosäuren langes Protein, das vorwiegend während der Organentwicklung, aber auch unter pathologischen Bedingungen, wie Fibrose oder Krebs, exprimiert wird (Berschneider and Königshoff, 2011) (Abb. 5). So ist die WISP1 Expression in diversen Tumoren, z.B. in Kolon, Lunge und Ösophagus, als auch in fibrotischem Gewebe erhöht (Chen et al., 2007; Colston et al., 2007; Königshoff et al., 2009; Margalit et al., 2003; Nagai and Watanabe, 2011; Pennica et al., 1998; Saxena et al., 2001). *In vitro* konnten für WISP1 proliferative, anti-apoptotische, hypertrophe und zellmigrationsfördernde Eigenschaften sowie die Erhöhung der Expression extrazellulärer Matrix gezeigt werden (Colston et al., 2007; Hou et al., 2011; Inkson et al., 2009; Königshoff et al., 2009; Reddy et al., 2011; Su et al., 2002; Venkatachalam et al., 2009; Xu et al., 2000). Auch die Spleißvarianten von WISP1, vWISP1 und vxWISP1, sind mit malignen Veränderungen in verschiedenen Geweben assoziiert (Cervello et al., 2004; Tanaka et al., 2001, 2003; Yanagita et al., 2007). Zusammenfassend deuten diese Beobachtungen darauf hin, dass WISP1 sowohl bei der Krebsentstehung als auch bei fibrotischen Prozessen eine wichtige Rolle spielt. Somit ist es vorstellbar, dass OTA, das ebenso fibrotische und onkogene Veränderungen im Nierengewebe bewirkt, über die Induktion dieses Gens seine nephropathischen Effekte vermittelt.

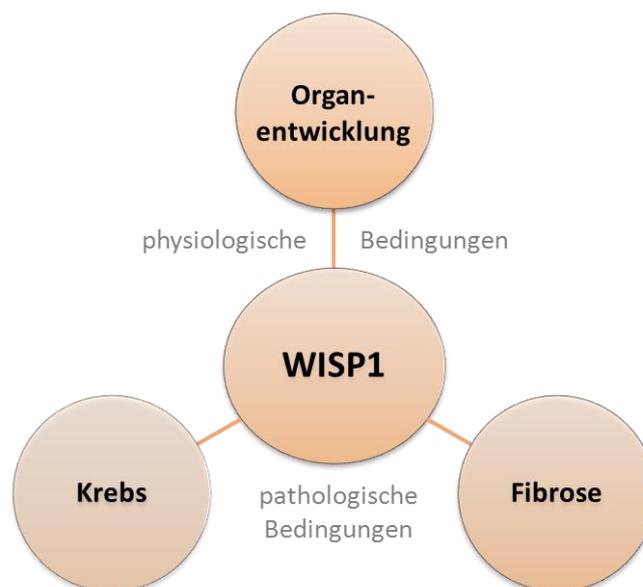


Abb. 5: WISP1 wird vorwiegend während der Organentwicklung und in malignem und fibrotisch verändertem Gewebe exprimiert

2.4 Zielsetzung der Arbeit

Ochratoxin A ist ein Stoffwechselprodukt von Schimmelpilzen, das in zahlreichen Lebens- und Futtermitteln zu finden ist und auf Grund seiner vielfältigen toxikologischen Effekte zu einer gesundheitlichen Beeinträchtigung für den Menschen führen kann. Grundsätzlich sind bei der toxischen Einschränkung der Gewebefunktion die Pathomechanismen Entzündung und Fibrose von Bedeutung, wovon vor allem die Niere betroffen ist. Die zu Grunde liegenden molekularbiologischen Ursachen dieser nephropathischen Effekte sind jedoch bisher nicht hinreichend aufgeklärt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die molekularbiologischen Hintergründe dieser fibrotischen und inflammatorischen Wirkung von OTA zu ergründen.

Da bei der Entstehung und im Verlauf von Erkrankungen Genexpressionsveränderungen eine wichtige Rolle spielen, sollte im Rahmen der Dissertation mit Hilfe Themen-spezifischer RT-qPCR-Arrays zunächst nach OTA-induzierten Veränderungen der Genexpression gesucht werden. Um die Expositionsbedingungen so nah wie möglich an eine Situation im menschlichen Körper anzupassen, sollte mit primären, humanen proximalen Tubuluszellen (RPTEC) gearbeitet werden, die für einen verlängerten Zeitraum (14 d) mit 10 nM OTA inkubiert werden. Dies entspricht einer Konzentration, die in humanem Nierengewebe erreicht werden kann. Die mit Hilfe der RT-qPCR-Arrays identifizierten, verändert exprimierten Gene sollten anschließend mit qPCR Experimenten in RPTEC Zellen als auch in einer humanen Nierenzelllinie (HEK293) überprüft und validiert werden.

Da dabei ein durch OTA-Exposition stark heraufreguliertes Gen, WISP1, identifiziert werden konnte, sollte im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf dieses Transkript gelegt werden. Dazu sollte einerseits die Charakterisierung der WISP1 Expression in verschiedenen humanen Zellen detailliert untersucht werden, andererseits sollten die genaue Sequenz, der Promotorbereich und die subzelluläre Lokalisation bestimmt werden. Weiterhin sollten für die Expression verantwortliche Signalwege identifiziert werden. Schließlich sollte eine ausführliche funktionelle Analyse des gefundenen alternativen WISP1-Transkripts unter Einbeziehung der anti-fibrotischen microRNA-29b angestellt werden, was den Zusammenhang zwischen der nephropathischen Wirkung von OTA und der Überexpression des alternativen Transkripts von WISP1 aufzeigen könnte.

3. Material & Methoden

3.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Alle verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte wurden, sofern nicht anderweitig aufgeführt, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen. Die verwendeten Chemikalien waren stets von analytischem Reinheitsgrad.

3.2 Zellbiologische Methoden

3.2.1 Verwendete Zellen und deren Kultivierung

In der vorliegenden Arbeit wurde mit zwei humanen Zelllinien und zwei Primärkulturen gearbeitet.

Tabelle 1: Verwendete Zellen

Name	Bezeichnung	Herkunft	Kultivierung
RPTEC	Humane proximale Tubulusepithelzellen in Primärkultur	Cambrex Bio Science, Wakersville, USA	Renales Epithelzell-Basalmedium mit Zellwachstums-Kit von ATCC
NHLF	Humane Lungenfibroblasten in Primärkultur	Cambrex Bio Science, Wakersville, USA	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen, durch Transfektion mit humanem Adenovirus 5 immortalisiert	ATCC, Manassas, USA	DMEM/Ham's F-12 Medium mit 10 % FCS
HK-2	Humane proximale Tubulusepithelzellen, durch Transfektion mit HPV-16 immortalisiert	ATCC, Manassas, USA	DMEM/Ham's F-12 Medium mit 10 % FCS

Die Zellen wurden im Brutschrank unter standardisierten Kulturbedingungen (37°C, 5% CO₂, 90 % relative Luftfeuchte) in Petrischalen kultiviert. Für die Versuche mit RPTEC und NHLF wurden die Passagen 2-10, mit HEK293 die Passagen 10-48 und mit HK-2 die Passagen 18-31 verwendet. Alle Arbeiten der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen.

Die verwendeten Reagenzien wurden vor der Anwendung auf 37°C erwärmt. Jeden 2.-3. Tag erfolgte ein Mediumwechsel. Bei Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden die

Zell-Zell- und Zell-Oberflächen-Kontakte mit EDTA-Lösung destabilisiert und anschließend die Zellen mit Trypsin vereinzelt und vollständig von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst. Durch Zugabe von serumhaltigem Medium wurde die restliche Trypsinwirkung beendet und die Zellen für Versuche und die weitere Kultivierung angesät. 24 h vor einem Experiment wurden die Zellen auf serumfreies Medium umgestellt, um unspezifische Effekte und Wechselwirkungen durch Inhaltsstoffe des Serums zu vermeiden.

EDTA-Puffer: 137 mM Natriumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid
6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
0,54 mM EDTA
pH 7,1 - 7,3

Trypsin-Lösung: 137 mM Natriumchlorid
2,7 mM Kaliumchlorid
6,5 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat
0,54 mM EDTA
0,1 % Trypsin
pH 7,1 - 7,3

3.2.2 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion ist eine Methode, bei der Fremd-DNA oder RNA zeitweilig in eine eukaryotische Zelle eingebracht wird. HEK293 Zellen wurden bei ca. 80-90 %-iger Konfluenz mit dem Polyfect Transfektionsreagenz (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers unter serumfreien Bedingungen mit Fremd-DNA transfiziert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte, indem die Zellen in Verdauungspuffer resuspendiert und für 12-18 h bei 50°C inkubiert wurden. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1), Schütteln und 10-minütiger Zentrifugation (16.000 g) befand sich die DNA in der oberen Phase. Anschließend wurde die DNA mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2 Volumenteilen Ethanol (96-100 %)

bei -20°C über Nacht gefällt, bei 4° C 15 min bei 16.000 g sedimentiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Die Resuspension der DNA erfolgte in Wasser.

Verdauungspuffer: 100 mM NaCl
10 mM Tris-Base pH 8,0
25 mM EDTA
0,5 % SDS
0,1 mg/ml Proteinase K (jeweils frisch zugeben)

3.3.2 Isolierung der Gesamt-RNA

Die RNA-Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers entweder unter Verwendung des InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit (STRATEC Molecular GmbH, Berlin) oder mit TRIzol Reagent (Invitrogen). Die Isolation der RNA mit dem InviTrap Spin Tissue Kit erfolgte aus HEK293, HK-2 und NHLF Zellen, die Isolation mit TRIzol aus RPTEC und zur Isolierung von microRNAs aus HEK293 Zellen.

3.3.3 Isolierung von Poly-A⁺ mRNA

Die Isolation von Poly-A⁺ mRNA aus Gesamt-RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers (Oligotex mRNA Spin-Column Protocol) mit Hilfe des Oligotex mRNA Mini Kits von Qiagen.

3.3.4 Isolierung nukleärer und cytoplasmatischer RNA

Die Abtrennung und Aufreinigung der Kernfraktion sowie die RNA-Isolation aus den nukleären und cytoplasmatischen Kompartimenten erfolgten nach Angaben des Herstellers mit Hilfe des PARISTM Kit von Ambion (Life Technologies, USA).

3.3.5 Plasmid-Minipräparation

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde das Invisorb Spin Plasmid Mini Two Kit von STRATEC Molecular GmbH nach Angaben des Herstellers verwendet.

3.3.6 Quantifizierung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mit dem Spektralphotometer NanoVue (VWR International GmbH, Darmstadt) bei 260 nm.

3.3.7 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von DNA-Fragmenten entsprechend ihrer Größe und erfolgte in 0,7-2,5 %-igen Agarosegelen mit 0,5-facher TAE-Lösung als Laufpuffer. Dazu wurden die Proben mit 6-fachem Ladepuffer von Peqlab (Erlangen) gemischt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Größenbestimmung der DNA wurde ein DNA-Größenmaßstab (Peqlab) mitgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte mit einer Ethidiumbromid-Lösung. Anschließend wurden die DNA-Fragmente in einem Transilluminator von UVP (Upland, USA) visualisiert und fotografiert.

50x TAE-Puffer: 2 M TRIS
 1 mM Eisessig
 0,05 M EDTA

3.3.8 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Extraktion elektrophoretisch aufgetrennter DNA wurden die entsprechenden DNA-Fragmente mit einem Transilluminator sichtbar gemacht, mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem QIAquick Gel Extraction Kit vom Qiagen extrahiert.

3.3.9 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt.

3.3.10 Klonierung von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Die Klonierung ist eine molekularbiologische Methode, bei der ein gewünschtes DNA-Fragment zur Gewinnung und identischen Vervielfältigung in einen Vektor integriert wird, um dieses DNA-Fragment genauer zu untersuchen.

3.3.10.1 Restriktion und Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Restriktion werden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die DNA an bestimmten Positionen schneiden und glatte oder überhängende Enden erzeugen. In der vorliegenden Arbeit wurden die zu klonierenden DNA-Fragmente gerichtet in die Plasmide eingefügt. Dazu

musste mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen gearbeitet werden, um sowohl im zu klonierenden Fragment als auch im Vektor zwei unterschiedliche, jeweils zueinander passende überhängende Enden zu erzeugen, die anschließend mit Hilfe einer T4-Ligase ligiert wurden. Die Restriktion erfolgte bei 37°C über Nacht, die Ligation bei 14°C über Nacht. Sowohl die Restriktionsenzyme, als auch die T4-Ligase und die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs (NEB, Ipswich, UK) bezogen.

3.3.10.2 TA Cloning

Mit Hilfe des TA Cloning Kits von Invitrogen wurden PCR-Produkte zur Sequenzierung oder zur weiteren Vermehrung direkt in den pCR2.1-Vektor integriert. Der pCR2.1 ist bereits linearisiert und hat an seinen Enden überhängende 3' Deoxy-Thymidin-Reste. Dadurch können die mit einer Taq-Polymerase synthetisierten PCR-Produkte, die an ihren 3' Enden Deoxy-Adenosin-Reste enthalten, direkt in den pCR2.1 ligiert werden.

3.3.10.3 Transformation von *E.coli*

Bei der Transformation wird Plasmid-DNA in kompetente *E.coli* Bakterien übertragen. Für die Versuche der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transformation mit One Shot® Top10 Competent Cells von Invitrogen. Ein Aliquot der kompetenten Zellen wurde vorsichtig auf Eis aufgetaut, 2-20 µl des Ligationsansatzes dazugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Hitzeschockbehandlung bei 42°C für genau 30 Sekunden, die die Aufnahme der Plasmide in die Bakterien bewirkt, erfolgte eine Inkubation der transformierten Zellen in 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) für mindestens 1 h bei 37°C im Schüttelinkubator. Anschließend wurden die Bakterien auf LB-Agar-Platen mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Im Falle einer Transformation mit dem pCR2.1-Vektor, der ein Gen für die β-Galaktosidase enthält, wurden die LB-Agar-Platte vor der Ausplattierung mit 40 µl X-Gal bestrichen, um eine Blau-Weiß-Selektion zu ermöglichen. Die weißen Kolonien enthielten das gewünschte DNA-Fragment.

3.3.10.4 Übernachtkultur und Bakterienlagerung

Die mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Kulturschale aufgenommenen Bakterien wurden für eine so genannte Mini-Plasmidpräparation in 5 ml LB-Medium mit 60 mg/l Ampicillin oder

50 mg/l Kanamycin überführt und über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Zur Aufbewahrung der transformierten Bakterien wurden 850 µl einer Übernachtskultur zusammen mit 150 µl Glycerin in ein Kryo-Gefäß pipettiert und bei –80°C gelagert.

LB-Medium: 10 g Trypton
5 g Hefe-Extrakt
10 g NaCl
add 1 l Wasser
pH 7.0 mittels 1 N NaOH eingestellt

3.3.10.5 Beschreibung selbst-konstruierter Plasmide

Kollagen 1A1 3'UTR Luziferase Reporter Vektor

Ein 629 bp großer Bereich der 3'untranslatierten Region (3'UTR) des humanen Kollagen 1A1 Gens, welcher drei Bindestellen für die miR-29b enthält, wurde mittels PCR amplifiziert. Die dafür verwendeten Primer sind in Tabelle 2 dargestellt, wobei der sense-Primer eine SpeI-Schnittstelle und der antisense-Primer eine HindIII-Schnittstelle enthielt. Das COL1A1 3'UTR PCR-Produkt und der miRNA Reporter Vektor von Signosis (Sunnyvale, USA) wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und SpeI geschnitten, durch ein Agarosegel aufgereinigt und daraus extrahiert. Anschließend wurden der Vektor und die COL1A1 3'UTR miteinander ligiert, transformiert und selektioniert. Der korrekte Einbau der COL1A1 3'UTR in den Vektor wurde durch Sequenzierung bestätigt.

Tabelle 2: Primer für die Herstellung des COL1A1 3'UTR Luziferase Reporter Vektors (pMiR-COL1A1 3'UTR)

	Sequenz (5'-3')	Größe
COL1A1 3'UTR sense	ATATAACTAGTGGGTTCTCGACTGCCAAAG	629 bp
COL1A1 3'UTR antisense	ATCGAAAGCTTGAGAGAGGTCCGAGAGCAGA	

pWISP1 SEAP Reporter Vektor

Um Promotorstudien durchzuführen, wurde ein 975 bp großes Fragment vor dem Translationsstartpunkt von WISP1 gewählt und in einen pSEAP2-Basic Reporter Vektor (siehe 3.4.5.2) kloniert. Dafür wurde der WISP1 Promotorbereich zunächst mittels PCR amplifiziert, durch ein Agarosegel aufgetrennt und extrahiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3 dargestellt. Der sense-Primer enthielt am 5' Ende eine XhoI-Schnittstelle und der

antisense-Primer am 3' Ende eine HindIII-Schnittstelle. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt direkt in den pCR2.1 als Zwischenvektor kloniert und positive Klone, die das PCR-Produkt enthalten, durch Sequenzierung identifiziert. Sowohl das subklonierte PCR-Produkt als auch der SEAPbasic Vektor wurden mit XhoI und HindIII geschnitten, durch ein Agarosegel aufgetrennt, eluiert und nachfolgend miteinander ligiert. Nach der Transformation wurden positive Klone selektioniert und durch Sequenzierung die korrekte Abfolge der Basen sowie die korrekte Position bestätigt.

Tabelle 3: Primer für die Herstellung des WISP1 Promotor SEAP Reporter Vektors (pWISP1-SEAP)

	Sequenz (5'-3')	Größe
pWISP1 sense	CTGGAGTCATGAAGGTGATGCTGTAACC	975 bp
pWISP1 antisense	AAGCTTAGAGGATCCGACCACCTCTC	

pWISP1-Intron 4 Luziferase Reporter Vektor

Das Intron 4 von WISP1 wurde zunächst mittels PCR amplifiziert, durch ein Agarosegel aufgetrennt und extrahiert. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 4 dargestellt. Der sense-Primer enthielt am 5' Ende eine MluI-Schnittstelle und der antisense-Primer am 3' Ende eine XhoI-Schnittstelle. Anschließend wurde das aufgereinigte PCR-Produkt direkt in den pCR2.1 als Zwischenvektor kloniert und positive Klone durch Sequenzierung identifiziert. Sowohl das subklonierte PCR-Produkt als auch der pGL3-Basic Vektor wurden mit MluI und XhoI geschnitten, durch ein Agarosegel aufgetrennt, eluiert und nachfolgend ligiert. Nach der Transformation wurden positive Klone selektioniert und durch Sequenzierung die korrekte Abfolge der Basen sowie die korrekte Position bestätigt.

Tabelle 4: Primer für die Herstellung des lncWISP1 Promotor Luziferase Reporter Vektors (pWISP1_Intron 4-pGL3)

	Sequenz (5'-3')	Größe
pWISP1_Intron4 sense	ATCGAACGCGTGTGGGTCCAGAGCAGGTGTGG	1875 bp
pWISP1-Intron4 antisense	ATCGACTCGAGGTTTCATGGATGCCTCTGGCTGGTA	

3.4 Polymerase-Kettenreaktion – PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode, die es ermöglicht, beliebige Abschnitte im Genom mit Hilfe einer DNA-Polymerase zu amplifizieren. Zusätzlich werden Primer benötigt, die das 5' und 3' Ende des zu vervielfältigenden DNA-Bereiches definieren. Die PCR verläuft in sich wiederholenden Zyklen, die aus Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation bestehen.

3.4.1 DNase-Verdau und reverse Transkription

Der DNase Verdau dient dem Abbau eventueller Verunreinigungen durch genomische DNA und wurde mittels DNase I und dem dazugehörigem Puffer von NEB bei 37°C für 10 min durchgeführt. Anschließend wurde die RNA in doppelsträngige cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben, die im Gegensatz zu genomischer DNA keine Introns mehr enthält. Zu jeder umgeschriebenen RNA wurde ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase (RT) mitgeführt, die in der PCR bzw. qPCR als Negativkontrolle diente. Dazu wurde dem DNase-Verdau Ansatz (10 µl) 4 µl Wasser zugegeben und dann in zwei Ansätze aufgeteilt, 4 µl für den RT-freien Ansatz und 10 µl für den Ansatz mit RT, und anschließend der Reaktionsmix dazu pipettiert. DTT, Reverse Transkriptase und 5x First-Strand Buffer stammen aus dem SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Kit von Invitrogen.

Tabelle 5: Pipettierschema für die reverse Transkription

Reagenz	1 x Reaktionsmix mit RT	1 x Reaktionsmix ohne RT
Wasser	15,74 µl	7,33 µl
5x First-Strand Buffer	5,71 µl	2,29 µl
DDT (100 mM)	0,36 µl	0,14 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1,43 µl	0,57 µl
RNase Out (40 U/µl)	0,71 µl	0,29 µl
Random Primer (0,3 µg/µl)	0,96 µl	0,38 µl
Reverse Transkriptase (200 U/µl)	0,36 µl	-

Tabelle 6: Temperaturprofil der reversen Transkription

Schritt	Temperatur	Dauer
Anlagerung	25°C	5 min
Gegenstrangsynthese	42°C	30 min
Enzyminaktivierung	95°C	5 min

3.4.2 Qualitative PCR

Die qualitative PCR erfolgte zur Etablierung von Primern, zur Herstellung von Plasmiden und zur Identifizierung des alternativen WISP1 Transkripts und wurde mit dem Taq PCR Kit von Qiagen gemäß dem in Tabelle 7 dargestellten Pipettierschema durchgeführt.

Tabelle 7: Pipettierschema für die PCR

Reagenz	1xReaktionsmix
10x PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
Sense Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Antisense Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,25 µl
Template (15 ng/µl - 1 µg/µl)	1 µl
Mg ²⁺ (bei Bedarf, 25 mM)	1 µl
Wasser	add 25 µl

3.4.3 Quantitative Real-Time PCR - qPCR

Die qPCR ermöglicht im Gegensatz zur herkömmlichen PCR eine Quantifizierung und grafische Darstellung des Fortschritts der Amplifikation. Dies erfolgt unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR[®]-Green I, der an doppelsträngige DNA bindet, wodurch die Vermehrung des PCR-Produktes mit einer Erhöhung des gemessenen Fluoreszenzsignals einhergeht. Abschließend wurde durch eine graduelle Erhöhung der Temperatur bis auf 95°C eine Schmelzkurve erstellt, anhand derer die Spezifität des Produkts ermittelt werden konnte. Die qPCR erfolgte mit dem Platinum[®] Quantitative PCR SuperMix-UDG von Invitrogen nach

Angaben des Herstellers und unter Zugabe der spezifischen Primer für das zu untersuchende Gen. Die qPCR wurde mit Hilfe der $2^{\Delta\Delta Cq}$ -Methode ausgewertet, bei der die Expression eines Zielgens auf die Expression der nicht regulierten Referenzgene 18s rRNA und/oder GAPDH bezogen und anschließend die Differenz zwischen Kontrolle und behandelten Zellen gebildet wurde.

Tabelle 8: In der qPCR verwendete Primer

Primer	Accession	Sequenz 5`-3`	Länge in bp	Anlagerungs- Temp. in °C
18s rRNA	X03205	Sense: GCATATGCTTGTCTCAAAGA Antisense: CCAAAGGAACCATAACTGAT	101	55
GAPDH	NM_002046.3	Sense: AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA Antisense: AATGAAGGGGTCATTGATGG	556	58
APC	NM_00112751 1.2	Sense: TGCAGAGAAGTTGGAAGTGTG Antisense: TCAGTGCAATGTGCTGACAA	116	58
BCR	NM_004327.3	Sense: TGGAGTACCAGCCCTACCAG Anti: CTCCGCAATCCTCAAACTC	156	62
CDKN2A (p16)	NM_000077.4	Sense: CCCCCACTACCGTAAATGTCCAT Antisense: CTGCCATTTGCTAGCAGTGT	246	58
CYP19A1	NM_000103.3	Sense: AGGTGCTATTTGTCATCTGCTC Antisense: TGGTGGAATCGGGTCTTTATGG	128	62
DSP	NM_004415.2	Sense: GCAGTCTACTGAAGCATAACC Antisense: CTTCTGTAGTCTGGGGTTACG	216	58
FN1	NM_212476.1	Sense: CCATAAAGGGCAACCAAGAG Antisense: AAACCAATTCTTGGAGCAGG	142	56
GYS1	NM_002103.4	Sense: TTCTACAACAACCTGGAG Antisense: CTGAGCAGATAGTTGAGC	409	56
HIC1	NM_006497.3	Sense: CGACGACTACAAGAGCAGCAGC Antisense: CAGGTTGTCACCGAAGCTCTC	130	64
TNF	NM_000594.3	Sense: AGTTGTGTCTGTAATCGCCCTAC Antisense: CTAAGCAAACCTTATTCTCGCC	54	60
WISP1	NM_003882.3	Sense: TGCTTCTGTAACCTGAGCTGTA Antisense: GGCCATAAGGGCTGACTGCTTC	152	60
COL1A1	NM_000088.3	Sense: TCTGGCGCTCCCATGGCTCT Antisense: GCCCTGCGGCACAAGGGATT	166	60
COL3A1	NM_000090.3	Sense: AGGGGAGCTGGCTACTTCTC Antisense: AGGACTGACCAAGATGGGAA	95	60
COL4A1	NM_001845.4	Sense: GGTATTCCAGGATGCAATGG Antisense: TCTCACCTGGATCACCTTC	124	60

3.4.4 RT-qPCR-Array

Um Gene zu identifizieren, die durch eine 14-tägige Exposition mit 10 nM OTA in RPTECs verändert exprimiert werden, wurden RT² Profiler PCR Arrays im 384-well Format der Firma SABiosciences (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Mit Hilfe der 384-well PCR Arrays kann die Expression von 84 themenspezifischen Genen gleichzeitig in vier verschiedenen Proben untersucht werden. Jeder PCR Array beinhaltet zusätzlich fünf Referenzgene (β -2-Mikroglobulin, Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1, Ribosomales Protein L13a, GAPDH und β -Aktin) sowie interne Kontrollen zur Funktionalität und Qualität der Arrays (Abb. 6).

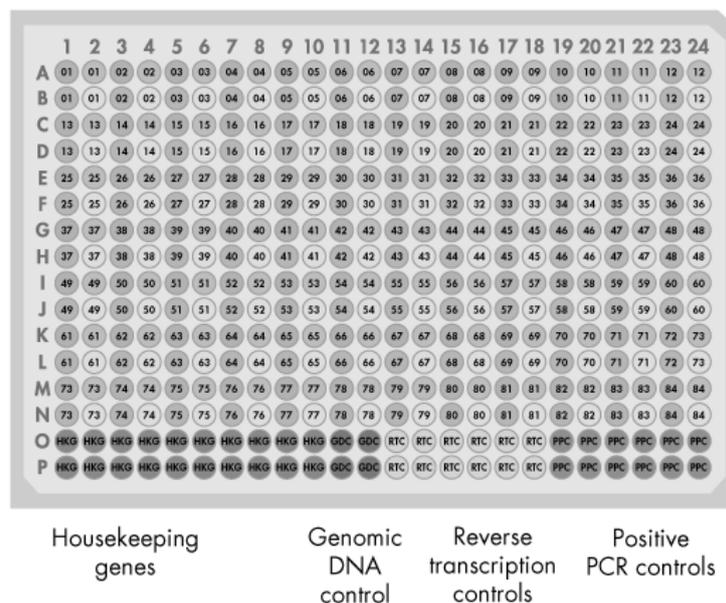


Abb. 6: Layout eines 384-well RT² Profiler PCR Arrays (www.sabiosciences.com)

Vor der Durchführung der Arrays wurde die RNA aus den RPTECs mittels TRIzol isoliert und anschließend mit dem SABiosciences RT² First Strand Kit in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde zusammen mit dem SABiosciences RT² qPCR Master Mix in die PCR Array Platten pipettiert und die qPCR in einem PCR-Gerät von Applied Biosystems (ABI 7900HT) durchgeführt. Sowohl die Reverse Transkription als auch die PCR Arrays erfolgten nach den Angaben des Herstellers. Die PCR Array Rohdaten wurden nach der $2^{\Delta\Delta C_q}$ -Methode über ein webbasiertes Datenauswertesystem ausgewertet, das von SABiosciences für Anwender der PCR Arrays bereitgestellt wird. Als reguliert angesehen wurden Gene, deren Expression sich nach OTA-Exposition um mindestens das 1,8-fache im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle verändert haben. Folgende Arrays kamen zur Anwendung:

- *Human Cell Cycle* (PAHS-020E)
- *Human Signal Transduction PathwayFinder* (PAHS-014E)
- *Human Oncogenes & Tumor Suppressor Genes* (PAHS-502E)
- *Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)* (PAHS-090E)

3.4.5 „Rapid Amplification of cDNA ends“-PCR (RACE-PCR)

Mit Hilfe der RACE-PCR ist es möglich, das unbekannte 5' und 3' Ende einer mRNA ausgehend von einer bekannten internen Sequenz zu amplifizieren (Frohman et al., 1988). In dieser Arbeit wurde für die 3' und 5' RACE das Marathon™ cDNA Amplification Kit inklusive des Advantage 2 Polymerase Mixes (für die PCR-Reaktion) nach Angaben des Herstellers verwendet (Clontech, Mountain View, USA). Das Marathon™ cDNA Amplification Kit ist dadurch gekennzeichnet, dass sowohl die 5' als auch die 3' RACE mit der identisch Adapter-ligierten cDNA durchgeführt werden können. Als Ausgangsmaterial wurde Poly-A⁺ mRNA eingesetzt. Die für die 5' und 3' RACE-PCR verwendeten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt. Um das 5' RACE-PCR-Produkt besser zu identifizieren, wurde eine zusätzliche „nested“ PCR (= „geschachtelte“ PCR) durchgeführt.

Im Anschluss an die RACE wurde das jeweilige PCR-Produkt mittels DNA-Gelelektrophorese aufgetrennt, aus dem Agarosegel extrahiert, in den pCR2.1-Vektor ligiert und in *E. coli* amplifiziert. Mittels Sequenzierung wurde die Sequenz des PCR-Produkts ermittelt, wodurch auch die jeweiligen Enden der RNA eindeutig bestimmt werden konnten.

Tabelle 9: In der RACE-PCR verwendete Primer

Primer	Sequenz 5'-3'
5'RACE	CAGGCTTGGGTGTAGTCCAGAACAGCTA
Nested 5'RACE	GGGTCCAGATCAGGGTAACTAAGGCTCA
3'RACE	GACCCTTGGCCTCCATTTCTGTCTCTAA

3.4.6 TaqMan® qPCR zur Quantifizierung von microRNAs

Die TaqMan® PCR ist eine qPCR, bei der eine TaqMan®-PCR-Polymerase mit 5' Exonukleaseaktivität zur Anwendung kommt. Es wird eine Oligonukleotidsonde verwendet, die am 5' Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert ist und am 3' Ende einen Quencher trägt, der das Fluoreszenzsignal des Reporters unterdrückt. Erst wenn die TaqMan®-

PCR-Polymerase im Verlauf der Synthese des neuen Stranges an die Sonde gelangt, wird die Sonde durch die 5'Exonukleaseaktivität der Polymerase zerlegt und der Reporter kann Fluoreszenz emittieren.

In der vorliegenden Arbeit wurden microRNAs durch eine 2-Stufen qPCR mit Hilfe des TaqMan[®] Reverse Transcription Kit und des TaqMan[®] microRNA Assays von Invitrogen bestimmt. Als Referenz-RNA wurde RNU6 genutzt.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Protein-Isolation

Die Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend, je nach Verwendung, mit ERK-, CST- oder RIPA-Lysepuffer lysiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt, 10 min bei 16.000 g zentrifugiert und mit dem Überstand weiter gearbeitet. Bei Verwendung des RIPA-Lysepuffers wurde das Lysat vor der Zentrifugation mehrmals durch eine Kanüle geschert, um die Viskosität zu erniedrigen.

3.5.2 Proteinbestimmung mit BCA-Reagenz

Die Proteinbestimmung wurde nach der BCA (Bicinchinonsäure)-Methode durchgeführt, bei der Proteine in alkalischer Lösung Cu^{2+} -Ionen zu Cu^+ -Ionen reduzieren (Biuret-Reaktion), die dann mit BCA einen violetten Farbkomplex bilden. Dafür wurden 20 μl 4 % Kupfersulfat zu je 1 ml BCA-Reagenz (Thermo Scientific, Waltham, USA) gegeben. 15 μl der Standardreihe mit BSA (0, 100, 300, 500, 700 mg/l) und 2-10 μl der Proben wurden mit 200 μl BCA-Reaktionsgemisch für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Absorption bei 560 nm in einem Photometer gemessen (Tecan, Männedorf, Schweiz).

3.5.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine auf eine Trägermembran übertragen und anschließend mittels Antikörpern nachgewiesen werden können.

3.5.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-PAGE können Proteine gemäß ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Proben mit gleichen Proteinmengen wurden 1:1 mit Laemmli-Puffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Die SDS-PAGE-Gele (Tabelle 10) wurden in einer Gelelektrophorese-Apparatur eingespannt und Lauf-Puffer hinzugefügt. Die Proben wurden anschließend in die Taschen der Gele pipettiert. Durch die Anwesenheit von SDS in den verwendeten Polyacrylamidgelen und in den Puffern und durch das Aufkochen erhalten die Proteine negative Ladungen und werden denaturiert, wodurch die Auftrennung nach ihrer Molekülmasse ermöglicht wird. Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 11 mA für 30 min, gefolgt von 22 mA für ca. 1 h 45 min. Bei jedem Gel wurde ein Proteingrößenstandard von peqlab mitgeführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines SDS-PAGE-Gels

Reagenz	Trenngel (in ml)		Sammelgel (in ml) 3 %
	10%	12%	
Acrylamid/Bis 26:0,7	-	-	0,288
Acrylamid/Bis 29,3:0,53	2,14	2,55	-
APS 10 %	0,075	0,075	0,03
SDS 10 %	0,125	0,125	0,025
0,5 M TRIS, pH 6,8	-	-	0,625
1,5 M TRIS, pH 8,8	1,563	1,563	-
TEMED	0,01	0,02	0,01
Wasser	2,713	1,88	1,54

3.5.3.2 Transfer der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf zwei Lagen Filterpapier (A. Hartenstein, Würzburg) wurde die Nitrozellulosemembran (Whatman, Kent, UK) gelegt, darauf das Proteingel, gefolgt von zwei weiteren Lagen Filterpapier. Sowohl die Membran als auch die Filterpapiere wurden vorher mit Transferpuffer angefeuchtet. Die Übertragung erfolgte im Semi-dry-Verfahren in einem entsprechenden Gerät (Biometra, Göttingen) für ca. 50 min bei 2 mA/cm² Membran.

3.5.3.3 Immunoblot

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulosemembran 5 min mit 1x TBS gewaschen, für mindestens 1 h die noch freien Proteinbindestellen auf der Membran mittels des in der *blocking solution* enthaltenen Milcheiweißes blockiert, gefolgt von drei 5-minütigen Waschschritten in TBS/Tween 0,1 %. Die Inkubation mit dem Erst-Antikörper (AK) erfolgte über Nacht bei 4°C in TBS/Tween 0,1 % mit 5 % BSA. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran erneut gewaschen und für mindestens 2 h mit dem an eine Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweit-AK in TBS/Tween 0,1 % mit 5 % Milchpulver geschwenkt. Nach wiederholtem Waschen mit TBS wurde die Membran für 3 min mit ECL-Reagenz inkubiert. Bei dieser Reaktion wird das ECL-Reagenz durch die Antikörper-gekoppelte Peroxidase umgesetzt, wodurch Chemolumineszenz entsteht. Diese Chemolumineszenz wurde mit einem Geldokumentationsgerät von BioRad detektiert und mit der Quantity One 1-D Analysis Software densitometrisch ausgewertet. Als Beladungskontrolle dienten HSP90 oder β -Aktin, im Falle von phospho-ERK wurde das unphosphorylierte Protein als Beladungskontrolle verwendet. Wenn unterschiedliche Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden sollten, wurden die gebundenen Antikörper mit *Stripping Buffer* (Thermo Scientific) entfernt.

Tabelle 11: Im Western Blot verwendete Antikörper

Erst-AK	Verdünnung	Hersteller	Zweit-AK	Verdünnung	Hersteller
WISP1	1:500	Santa Cruz	Anti-rabbit	1:1000	Cell Signaling
WISP1	1:500	Santa Cruz	Anti-mouse	1:1000	Cell Signaling
WISP1	1:2000	Abcam	Anti-goat	1:1000	Cell Signaling
ERK	1:1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1:1000	Cell Signaling
phospho-ERK	1:1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1:1000	Cell Signaling
β -Catenin	1:1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1:1000	Cell Signaling
HSP90	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:3000	Rockland
β -Aktin	1:1000	Cell Signaling	Anti-rabbit	1:1000	Cell Signaling

3.5.4 ELISA

Der ELISA (Enzyme Linked Immunosorbant Assay) ist ein Antikörper-basiertes Nachweisverfahren, mit dem u.a. Proteine im Zellkulturmedium nachgewiesen werden können.

3.5.4.1 Kollagen-ELISA

Zur Bestimmung der Kollagen I, III und IV Gehalte in den Zellkulturüberständen wurden Aliquote der Zellkulturüberstände zusammen mit Vollers-Puffer über Nacht bei 4°C in 96-well Immunosorp-Platten (Nunc, Thermo Scientific) inkubiert. Für Kollagen I wurde 40 µl, für Kollagen III 100 µl und für Kollagen IV 20 µl des Zellkulturüberstandes (von jeweils 300 µl) verwendet. Zusätzlich wurde jeweils eine Standardreihe aufgetragen. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/0,05% Tween-20 wurde mit 2% BSA in PBS/0,05% Tween-20 für 2 h unspezifische Bindestellen abgesättigt. Die Inkubation mit Kollagen-Antikörpern erfolgte in 2% BSA/PBS/0,05% Tween-20 für 2 h. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde für 1 h mit einem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen. Anschließend wurde das Meerrettich-Peroxidase-Substrat für 15 min dazugegeben und im Dunkeln inkubiert. Durch die Enzym-katalysierte Reaktion kommt es zu einem Farbumschlag. Diese Reaktion wurde mit 25 µl 1 M H₂SO₄ gestoppt und die Absorption bei 490 nm in einem Photometer gemessen. Die Kollagen-Gehalte in den Proben wurden an Hand einer Standardreihe bestimmt und auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

Tabelle 12: Im Kollagen-ELISA verwendete Antikörper

Erst-AK	Verdünnung	Hersteller	Zweit-AK	Verdünnung	Hersteller
Kollagen, Typ I	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland
Kollagen, Typ III	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland
Kollagen, Typ IV	1:1000	Rockland	Anti-rabbit	1:5000	Rockland

3.5.4.2 WISP1-ELISA

Die WISP1-Proteinbestimmung in den Zellkulturüberständen erfolgte mit einem Sandwich-ELISA-Kit von R&D Systems (Minneapolis, USA) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der WISP1-Gehalt wurde an Hand einer Standardreihe bestimmt und im Anschluss auf die Proteinkonzentration der jeweiligen Probe bezogen.

3.5.5 Reporter-gen-Assay

Reporter gene sind Gene oder Genfragmente, die an andere Gene gekoppelt werden, um deren Aktivitäten, Qualitäten oder Effekte nachweisbar zu machen. Für Promotorstudien wird die zu untersuchende Promotorregion vor ein Reporter gen eingefügt, so dass die Expression des Reporter gens unter der Kontrolle des jeweiligen Promotors steht. Wenn durch einen Stimulus, z.B. OTA, der Promotor aktiviert und so die Expression des nachgeschalteten Gens angeregt wird, kann dies durch die gesteigerte Expression des nachgeschalteten Gens (dem Reporter genprodukt) quantifiziert werden. Für Analysen von 3'UTRs wird ein 3'UTR-Fragment hinter das Reporter gen eingefügt. Das Reporter gen steht unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors. Bindet nun ein regulierendes Element an die 3'UTR, kann dies zum Abbau des Transkripts oder zur Translationshemmung führen. Dies kann durch eine veränderte Proteinexpression des Reporter genprodukts nachgewiesen werden.

3.5.5.1 Plasmide für Reporter-Gen-Analysen

Die in den Reporter-Gen-Analysen verwendeten Plasmide sind in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Hersteller
pCR[®]2.1	linearisierter Vektor zur Subklonierung und Sequenzierung von PCR-Produkten, siehe 3.3.8.2	Invitrogen
pSEAP2-Basic	exprimiert das Reporter-Gen SEAP und ermöglicht den Einbau cis-regulatorischer Elemente vor das Reporter-Gen	Clontech
pcDNA3.1/His/lacZ	exprimiert β -Galaktosidase, deren Aktivität zur Normalisierung der SEAP-Assays genutzt wurde	Invitrogen
pGL3-Basic	exprimiert das Reporter-Gen Luziferase und ermöglicht den Einbau cis-regulatorischer Elemente vor das Reporter-Gen	Promega
pGl4.74 [hRluc/TK]	exprimiert Renilla Luziferase, deren Aktivität zur Normalisierung in Luziferase-Assays genutzt wurde	Promega
pCMV-MiR-29b	pCMV-MIR Vector, der miR-29b exprimiert	Origene
pMiR-29b	miRNA Reporter Vektor, der eine miR-29b Bindestelle hinter dem Luziferasegen enthält, für Luziferase-Assays	Signosis
WISP1 3'UTRa	1-1960 bp des WISP1 3'UTR im miTarget 3'UTR Target Vector für Luziferase Assays (pTZX-MT01-Vektor)	GeneCopeia
pMiR-COL1A1 3'UTR	COL1 3'UTR Fragment im miRNA Reporter Vektor für Luziferase-Assays, siehe 3.3.8.5	
pWISP1-SEAP	klassischer WISP1 Promotor im pSEAP2-basic für SEAP-Assays, siehe 3.3.8.5	
pWISP1_Intron4-pGL3	Intron 4 von WISP1 als putativer lncWISP1 Promotor im pGL3-Basic für Luziferase Assay, siehe 3.3.8.5	

3.5.5.2 Sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP)-Assay

Der SEAP-Assay wurde zur Untersuchung des klassischen WISP1 Promotors verwendet. Die Sekretorische Alkalische Phosphatase (SEAP) ist bei diesem Assay das Reporter-Gen und wird bei Aktivierung des Promotors in den Zellkulturüberstand sezerniert. Für die Experimente wurden HEK293 Zellen auf eine 24-well-Platte ausgesät und bei ca. 90 %-iger Konfluenz mit den Plasmiden und in Medium ohne Serum transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, das 10 nM OTA enthielt. 48 h nach Transfektion wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit 0,1 ml 20 mM MOPS + 0.1% Triton-X-100, pH 7.4 lysiert. 60 μ l der Lysate wurden mit 60 μ l SEAP-Puffer für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l der Proben mit 100 μ l AttoPhos-AP-Lösung von Promega gemischt. Dabei wird das Substrat durch die SEAP-Aktivität in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt, das

in einem Photometer gemessen wurde. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase exprimierender Vektor (pcDNA3.1/ His/lacZ) verwendet. Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde durch eine enzymatische Farbreaktion mit ONPG (O-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) quantifiziert. Hierfür wurden 10 μ l des Zelllysates mit 50 μ l Cleavage Buffer und 20 μ l ONPG (4 mg/ml) für 30 min bei 37°C inkubiert und die Absorption bei 405 nm gemessen.

3.5.5.3 Luziferase Reporter Assay

Der Luziferase Assay wurde zur Untersuchung eines alternativen WISP1 Promotors verwendet, wobei *firefly* Luziferase als Reporter gen diente. Dieses Enzym setzt Luziferin zu Oxyluziferin um. Dabei wird Licht emittiert, das mit einem Luminometer gemessen werden kann. Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz wurde ein β -Galaktosidase exprimierender Vektor (pcDNA3.1/ His/lacZ) verwendet (siehe 3.5.5.2). Für die Experimente wurden HEK293 Zellen auf eine 24-well-Platte ausgesät und bei ca. 90 %-iger Konfluenz mit den Plasmiden in serumfreiem Medium transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, das 10 nM OTA enthielt. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und der Assay unter Verwendung des Luziferase Reporter Assay Systems von Promega (Madison, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Luziferaseaktivität wurde mit einem Luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad) gemessen.

3.5.5.4 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay

Der Dual-Luciferase[®] Assay wurde zur Untersuchung von 3'UTRs und miR-Bindestellen verwendet, hierbei diente ebenso die *firefly* Luziferase als Reporter gen. Zusätzlich wurde die *renilla* Luziferase, die unter der Kontrolle eines nicht-regulierbaren Promotors steht, als Kontrolle für die Transfektionseffizienz verwendet. Die *renilla* Luziferase setzt Coelenterazin zum ebenfalls Licht-emittierenden Produkt Coelenteramid um.

Der Dual-Luciferase[®] Assay erfolgte unter Verwendung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dafür wurden HEK293 Zellen auf eine 24-well-Platte ausgesät und bei ca. 90 %-iger Konfluenz in serumfreiem Medium mit Reporterplasmiden, Expressionsplasmiden oder miRNAs transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, das 10 nM oder 100 nM OTA enthielt. Die Lyse der Zellen erfolgte 48 h nach Transfektion. Die Luziferaseaktivität wurde mit einem Luminometer gemessen.

3.5.6 Puffer für proteinbiochemische Methoden

Tabelle 14: Verwendete Puffer für proteinbiochemische Methoden

Puffer	Inhaltsstoffe
10x PBS	137 mM Natriumchlorid, 2,7 mM Kaliumchlorid, 8,1 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 1,5 mM Kaliumhydrogenphosphat
ERK	0,1 % Triton X-100 in PBS, Proteasehemmer-Cocktail (1:500), 0,2 mM Natrium-orthovanadat
CST	20 mM TRIS, pH 7,5, 150 mM Natriumchlorid, 1 % Triton X-100, Proteasehemmer-Cocktail, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 2,5 mM Natriumpyrophosphat, 1 mM β -Glycerolphosphat
RIPA	150 mM Natriumchlorid, 10 mM TRIS, pH 7,4, 1 % Nonidet P-40, 0,1 % SDS, 1 % Natriumdeoxycholat, 0,1 % Triton X-100, Proteasehemmer-Cocktail (1:500), 1 mM EDTA, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 mM Natriumfluorid
10x TBS	170 mM Tris-HCl, 30 mM TRIS, 1,37 M Natriumchlorid
Laemmli	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10 % SDS, 2-Mercaptoethanol, Glycerol, 0,01 % Bromphenolblau
Laufpuffer	25 mM TRIS, 3,47 mM SDS, 0,19 M Glycin
Transferpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
Vollers-Puffer	150 mM Na_2CO_3 , 0,35 M NaHCO_3
HRP-Substrat	4,6 mM o-Phenylenediamine, 75 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 38 mM Zitronensäure, 0,015% H_2O_2
10x Cleavage Buffer	34,2 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 5 mM KCl, 0,5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
SEAP-Puffer	60 mM L-Homoarginin, 3 mM MgCl_2 , 0,2 mM ZnCl_2 , 100 mM Tris-HCl, pH 9,3

3.6 Bioinformatik

Es wurden verschiedene im Internet zur Verfügung stehende Datenbanken und Programme verwendet:

Tabelle 15: Verwendete Online-Datenbanken und -Programme

Name	Verwendung	URL
Pubmed	Genanalysen, Sequenzanalysen	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Ensembl	Genanalysen, Sequenzanalysen	http://www.ensembl.org/index.html
RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5	Datenauswertung PCR- Arrays	http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php
NEBcutter	Suche nach Restriktionsschnittstellen	http://tools.neb.com/NEBcutter2/
AliBee	Sequenzvergleiche	http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html
microRNA.org	Vorhersage von miR- Bindestellen	http://www.microrna.org/microrna/home.do
targetscan	Vorhersage von miR- Bindestellen	http://www.targetscan.org/
Primer3	Primersuche	http://frodo.wi.mit.edu/
Primer-BLAST	Primersuche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
qPrimerDepot	Primersuche	http://primerdepot.nci.nih.gov/
Revseq	Umkehr von Sequenzen	http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/revseq
BLAST	Sequenzsuche und - vergleiche	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/

3.7 Statistik

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Tabellen-Kalkulationsprogramm Microsoft Excel und mit den Statistik- und Graphik-Programmen SigmaPlot 8.0 und GraphPad Prism 5.0. Die statistische Überprüfung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen GraphPad Prism 5.0 und Microsoft Excel. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit nicht-parametrischen Testmethoden mittels des Programms *GraphPad Prism 5.0* getestet. Bei den PCR-Arrays wurden signifikante Unterschiede mit Hilfe des Student-T-Test ermittelt. Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ erreicht.

4. Ergebnisse & Diskussion

4.1 Durch Ochratoxin A verursachte Genexpressionsveränderungen

Ein erstes Ziel der Arbeit war es, in primären humanen Nierenzellen Gene zu identifizieren, deren Expression durch verlängerte OTA-Exposition beeinflusst wird. Dafür wurden humane proximale Tubuluszellen (RPTEC) in Primärkultur mit 10 nM OTA, einer Konzentration, die im menschlichen Nierengewebe erreicht werden kann, für 14 Tage inkubiert. Mittels dieser Expositionsbedingungen lässt sich die Situation im menschlichen Körper am besten nachahmen.

4.1.1 Durch Ochratoxin A verursachte Genexpressionsveränderungen in humanen proximalen Tubuluszellen (RPTEC)

Die durch OTA ausgelösten Genexpressionsänderungen wurden zunächst mit Hilfe so genannter PCR-Arrays ermittelt. Es wurden vier verschiedene, nach Themen zusammengestellte kommerzielle Arrays gewählt, von denen jeder mindestens in zwei unabhängigen Versuchen verwendet wurde. Folgende Arrays kamen zur Anwendung:

- *Human Cell Cycle*
- *Human Signal Transduction PathwayFinder*
- *Human Oncogenes & Tumor Suppressor Genes*
- *Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT)*

Mittels jedes Arrays konnte das Expressionsniveau von 84 verschiedenen Genen untersucht werden. Da einige Gene auf mehreren der oben genannten Arrays vertreten waren, konnte die Expression von insgesamt 218 unterschiedlichen Genen analysiert werden. Die Rohdaten wurden mit Hilfe eines web-basierten Auswerteprogrammes von SABiosciences (zusätzlich stichpunktartig manuell) analysiert und die relativen Expressionsunterschiede (*fold change*) zwischen unbehandelten und OTA-behandelten Zellen berechnet. Eine Liste aller untersuchten Gene und ihrer veränderten Expression findet sich in der Anlage RT² Profiler PCR-Array Rohdaten. In Abbildung 7 sind die Gene dargestellt, deren Expression durch OTA um mindestens das 1,8-fache verändert wurde. Dabei handelt es sich um lediglich 12 von 218

untersuchten Genen. Mit einer 54,5-fach erhöhten Expression im Vergleich zur Kontrolle wurde *WNT1 inducible signaling pathway protein 1* (WISP1) am stärksten durch OTA beeinflusst. Des Weiteren führte OTA zu einer Expressionsänderung folgender Gene: *lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)* (LTA; 4,5-fach), *hypermethylated in cancer* (HIC1; 3,38-fach), *cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1* (CYP19A1; 3,03-fach), *Matrixmetalloproteinase 10* (MMP10; 2,41-fach), *serpin peptidase inhibitor, clade E, member 1* (SERPINE1; 2,15-fach), *breakpoint cluster region* (BCR; 2,09-fache), *adenomatous polyposis coli* (APC; 1,97-fach), *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A; 1,85-fach), *tumor necrosis factor* (TNF; 1,8-fach), *glykogen synthase 1 (muscle)* (GYS1; -2,08-fach) und *desmoplakin* (DSP; -2,17-fach).

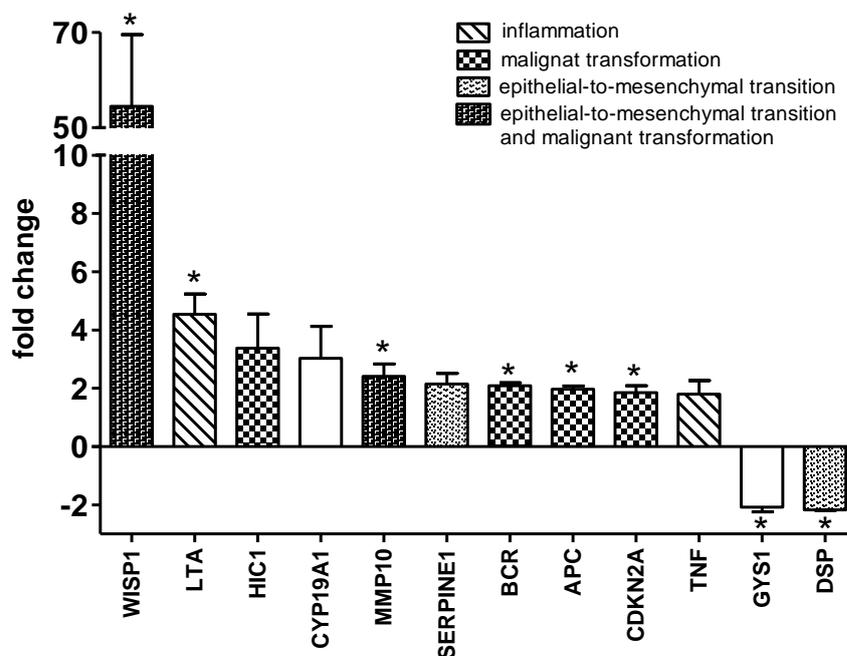


Abb. 7: Genexpressionsänderungen in RPTEC nach 14 Tagen Inkubation mit 10 nM OTA. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM der Expressionsänderungen (fold change, $2^{\Delta\Delta Cq}$) der Gene, die im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle mindestens 1,8-fach verändert exprimiert wurden. $n \geq 2$, * $p < 0,05$.

4.1.2 Validierung der PCR-Array Ergebnisse

Um die Ergebnisse der PCR-Arrays zu validieren, wurden quantitative PCRs (qPCRs) durchgeführt. Die Expressionsänderung dieser Gene wurde zusätzlich in zwei weiteren

Nierenzelllinien, HEK293¹ und HK-2¹ Zellen, untersucht. Dafür wurden RPTEC Zellen für 14 Tage, HEK293 und HK-2 Zellen auf Grund ihres schnelleren Stoffwechsels für 24 Stunden mit 10 nM OTA inkubiert. In Tabelle 16 sind die Expressionsänderungen (*fold change*) der einzelnen Gene dargestellt. Es zeigte sich, dass beide Methoden für manche Gene ähnliche Expressionsänderungen ergaben, jedoch bei einigen keine übereinstimmenden Änderungen mehr nachweisbar waren. So war die Expressionssteigerung der Gene WISP1, LTA und CDKN2A sowohl mittels PCR-Array in RPTEC als auch mittels qPCR in RPTEC, HEK293 und HK-2 nachweisbar. Die Expression von TNF wurde laut PCR-Arrays um das 1,8-fache gesteigert, jedoch nicht signifikant. Die qPCR zeigte hingegen, dass 10 nM OTA eine signifikante Steigerung der TNF Expression in RPTECs, HEK293 und HK-2 Zellen bewirkt. Die Expression von GYS1 wurde laut PCR-Arrays signifikant gesenkt. Die Analyse mittels qPCRs bestätigte die Expressionsabnahme, wobei sie in den RPTEC und HK-2 Zellen signifikant war, in den HEK293 Zellen mit einer Abnahme um das 1,3-fache nicht. Die übrigen Gene, für die in den PCR-Arrays eine Expressionsänderung durch OTA gezeigt werden konnte, zeigten in den qPCR Experimenten keine veränderte Expression bei allen drei Nierenzelltypen.

Tabelle 16: Durch 10 nM OTA hervorgerufene Veränderung der Genexpression ermittelt durch PCR-Arrays (RPTEC) und qPCR (RPTEC, HEK293 und HK-2 Zellen). Dargestellt ist der Mittelwert±SEM der Expressionsänderungen (in *fold change*). n ≥ 2, * p < 0,05. # Versuche wurden im Rahmen der Masterarbeit von Frau Luise Schumann durchgeführt und werden hier zur Vergleichbarkeit gezeigt.

	PCR-Array	qPCR		
	RPTEC	RPTEC	HEK293	HK-2
WISP1	54,5*	35,0*	230*	25,0* [#]
LTA	4,55*	2,6*	4,9* [#]	3,2* [#]
HIC1	3,4	1,0	-1,2 [#]	-1,1 [#]
CYP19A1	3,0	nicht detektierbar	1,3 [#]	1,2 [#]
MMP10	2,4*	1,5	1,1 [#]	1,5 [#]
SERPINE1	2,2	-1,3	-1,2 [#]	-1,2 [#]
BCR	2,1*	2,0	1,0 [#]	-1,1 [#]
APC	2,0*	1,5	-1,0 [#]	1,2 [#]
CDKN2A	1,9*	2,8*	3,4* [#]	2,1* [#]
TNF	1,8	5,2*	8,9*	1,8* [#]
GYS1	-2,1*	-2,0*	-1,3 [#]	-1,8* [#]
DSP	-2,2*	-1,0	-1,1 [#]	1,2 [#]

¹ Die Versuche in HEK293 und HK-2 Zellen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Frau Luise Schumann durchgeführt und sind zum Vergleich der Ergebnisse in RPTEC Zellen hier aufgeführt

4.1.3 Diskussion

Um die molekularen Grundlagen der nephropathischen Wirkung von OTA im Menschen zu ergründen, ist es wichtig, den Einfluss von OTA auf die Genexpression zu charakterisieren. Ferner ist es notwendig, die gewählten Expositionsbedingungen so nah wie möglich an die *in vivo* Situation anzupassen, d.h. solche Konzentrationen zu wählen, die durch die Ernährung im humanen Blut erreicht werden können. Bisher wurden in Untersuchungen zum Einfluss von OTA auf die Genexpression in Nierenzellen aus der Ratte oder dem Menschen relativ hohe OTA-Konzentrationen (0,3 – 50 μM) verwendet (Arbillaga et al., 2007; Jennings et al., 2012; Luhe et al., 2003). So wurde in verschiedenen humanen Nierenzellen (hPrim, RPTEC/TERT1, HK-2), die für bis zu 3 Tage mit 0,3 bis 5 μM OTA inkubiert wurden, sowie in Rattennierenzellen (primär und NRK-52E), wobei die Ratten mit 3 mg OTA pro kg und Tag gefüttert wurden, die Genexpressionsveränderungen mit Hilfe von Microarrays analysiert. Dabei ergab sich, dass OTA diverse Signalwege reguliert, die für das Zytoskelett, das Nukleosom, die Translation, die Transkription, die Ubiquitinierung und den Zellzyklus von Bedeutung sind (Jennings et al., 2012). Diese Ergebnisse waren zwischen den verschiedenen Zellmodellen teilweise reproduzierbar, auch zwischen Ratte und Mensch. In einer weiteren Studie wurden HK-2 Zellen für 6 bis 24 Stunden mit 50 μM OTA inkubiert, wobei nach 24 h Inkubation nur noch 51 % der Zellen lebten. Microarrays ergaben, dass 50 μM OTA in diesen Zellen die Expression von Genen beeinflusst, die bei der Atmungskette und bei der Antwort auf oxidativen Stress eine Rolle spielen (Arbillaga et al., 2007). Allerdings stellen 50 μM OTA eine irrelevante Konzentration dar, die auch bei hoher Belastung im Menschen nicht gefunden werden kann.

Auf Grund dessen wurde zur Untersuchung der Genexpression in der vorliegenden Arbeit mit 10 nM OTA eine Konzentration verwendet, wie sie in Folge einer erhöhten Aufnahme durch die Ernährung durchaus im Blut erreicht werden kann (Zaied et al., 2011). Dazu wurden zwei humane Nierenzellmodelle (RPTEC, HEK293) für Genexpressionsuntersuchungen mit 10 nM OTA für bis zu 14 Tage (RPTEC) behandelt. Die Analyse der verwendeten PCR Arrays ergab, dass eine 14-tägige Exposition in RPTEC zu Änderungen der Expression von 12 Genen führte, die bei fibrotischen (WISP1, MMP10, SERPINE1, DSP) und entzündlichen (TNF, LTA) Prozessen, bei der Tumorentstehung (HIC1, APC, WISP1, BCR, CDKN2A), beim Fremdstoffmetabolismus (CYP19A1) und auch beim Glukosestoffwechsel (GYS1) eine Rolle spielen. Um diese Befunde zu untermauern, wurde die Expression dieser Gene in RPTEC,

HEK293² und HK-2² Zellen mittels qPCRs untersucht. Es zeigte sich, dass die mit Hilfe der RT-qPCR-Arrays ermittelten Genexpressionsänderungen für folgende Gene in der qPCR bestätigt werden konnten: WISP1, LTA, TNF, CDKN2A und GYS1.

Die RNA-Expression von WISP1 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*) wurde in allen drei Nierenzellmodellen am stärksten gesteigert. WISP1 ist ein profibrotischer Wachstumsfaktor, der sowohl in fibrotischem Gewebe als auch in Tumoren überexprimiert wird (Calvisi et al., 2005; Colston et al., 2007; Königshoff et al., 2009; Margalit et al., 2003). In renalen Epithelzellen könnte eine durch OTA verursachte Überexpression von WISP1 zu fibrotischen Veränderungen und/oder malignen Transformationen beitragen.

Die RNA-Expression von LTA (*lymphotoxin alpha*) und TNF (*tumor necrosis factor*) wurde sowohl in RPTEC als auch in HEK293 und HK-2 Zellen gesteigert. Beide Zytokine gehören der Tumornekrosefaktor-Familie an und sind wichtige Entzündungsmediatoren und Immunmodulatoren. Sie aktivieren unter anderem den Transkriptionsfaktor NF-κB, der für die Entstehung von Entzündungen verantwortlich ist und auch mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird. In proximalen Tubuluszellen aus dem Opossum (OK Zellen) aktiviert OTA im nanomolaren Bereich NF-κB (Sauvant et al., 2005a). Daher ist zu vermuten, dass OTA über eine Sekretion von TNF und LTA NF-κB aktiviert und so chronische Entzündungsprozesse in Gang setzt, die letztlich zu einer Nierenfibrose oder auch zur malignen Transformation von Nierenzellen führen können. Dies wird auch dadurch bekräftigt, dass verschiedene Studien zeigen, dass TNF an der Entstehung verschiedener Nierenerkrankungen beteiligt ist (Navarro and Mora-Fernández, 2006; Sanchez-Niño et al., 2010).

CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*, p16) ist ein wichtiges Tumorsuppressorgen, das für die Zellzykluskontrolle verantwortlich ist, indem es CDK4 inhibiert und somit den Übergang aus der G1- in die S-Phase des Zellzyklus blockiert. CDKN2A ist in einer Vielzahl von Tumoren mutiert (Foulkes et al., 1997; Liggett and Sidransky, 1998; Ruas and Peters, 1998). Ein diabetisches Milieu führt in proximalen Tubuluszellen u.a. zu einer Induktion von CDKN2A. Dies ist verbunden mit Zellzyklusarrest und einem Wechsel zu hypertrophem und Seneszenz-artigem Phänotyp (Wolf, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde CDKN2A in allen verwendeten Nierenepithelzellen durch 10 nM OTA verstärkt exprimiert. OTA könnte demzufolge eine anti-proliferative, aber hypertrophe Wirkung ausüben. Hypertrophe Effekte von OTA wurden bereits beschrieben. So führen sehr niedrige OTA-Konzentrationen (0,3-1

² Die Versuche in HEK293 und HK-2 Zellen wurden im Rahmen der Masterarbeit von Frau Luise Schumann durchgeführt und sind zum Vergleich der Ergebnisse in RPTEC Zellen hier aufgeführt

nM) in RPTEC zu einer Zellhypertrophie (Schwerdt et al., 2007). In primären proximalen Tubuluszellen aus der Ratte hatte OTA nach 24 h hypotrophe, nach 72 h Inkubation jedoch hypertrophe Effekte (Gekle et al., 1995).

GYS1 (*glycogen synthase 1*) ist ein Gen, das für ein Schlüsselenzym der Glykogensynthese kodiert und in RPTEC, HEK293 und HK-2 Zellen nach OTA-Exposition vermindert exprimiert wurde. Tierexperimentelle Arbeiten an Hühnern und Ratten ergaben widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf den Einfluss von OTA auf den Glykogengehalt in verschiedenen Geweben. In Ratten konnte ein verminderter Glykogengehalt in der Leber, aber ein erhöhter Glykogengehalt im Herzen nachgewiesen werden (Suzuki and Satoh, 1973). Andere Studien führten zu dem Ergebnis, dass OTA durch Hemmung des Glykogenabbaus zu einem erhöhten Glykogengehalt im Lebergewebe und so zu einer Glykogenspeicherkrankheit (Typ 10) beiträgt (Huff et al., 1979; Warren and Hamilton, 1980). Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte verminderte Expression der GYS1 in Nierenepithelzellen spricht für eine gestörte Synthese von Glykogen in der Niere, was zu einem verminderten Glykogengehalt führen würde. Dies zeigt, dass OTA auch in der Niere den Glykogenstoffwechsel beeinträchtigt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die durch OTA verursachten Genexpressionsveränderungen bei den verwendeten humanen Nierenepithelzellen gut übereinstimmen. Sie zeigen, dass bereits nanomolare (und damit relevante) OTA-Konzentrationen Effekte auf die Genexpression haben, die sich von den potentiell unspezifischen Wirkungen hoher Konzentrationen deutlich unterscheiden. Dies bestätigt frühere Beobachtungen, die zeigen, dass schon nanomolare OTA-Konzentrationen sehr kleine, aber entscheidende Veränderungen hervorrufen können (Gekle et al., 2005). Demnach wirkt OTA im nanomolaren Konzentrationsbereich nicht als „klassisches“ Toxin, sondern als spezifischer Modulator zellulärer Signalwege.

Auf Grund der starken OTA-induzierten Expressionssteigerung der WISP1 RNA wurde in folgenden Untersuchungen der Fokus auf diese RNA gelegt.

4.2 Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Expression

WISP1 (*WNT1 inducible signaling pathway protein 1*; CCN4) ist ein profibrotischer und onkogener Wachstumsfaktor. In den RT-qPCR-Arrays und qPCRs stellte sich heraus, dass die WISP1 RNA durch OTA in verschiedenen humanen Nierenepithelzellen stark überexprimiert wird. In weiteren Versuchen wurde der Einfluss von OTA auf die WISP1 Expression detaillierter untersucht.

4.2.1 Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Genexpression

RPTEC Zellen

Zunächst wurde die durch OTA induzierte zeitabhängige Expression von WISP1 in der primären Zellkultur näher untersucht. RPTEC Zellen haben als primäre Zellen ein verlangsamtes Wachstum bzw. einen verlangsamten Stoffwechsel im Vergleich zu etablierten Zelllinien. Deshalb wurden RPTEC Zellen bis zu 14 Tage mit 10 nM OTA inkubiert und anschließend die WISP1 Genexpression mittels qPCR bestimmt. Nach einer 2-tägigen OTA Exposition veränderte sich die WISP1 Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht (*fold change* 1,03). Nach 7- bzw. 14-tägiger Exposition war die WISP1 Expression signifikant um das 3,1 bzw. 23,9-fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesteigert (Abb. 8).

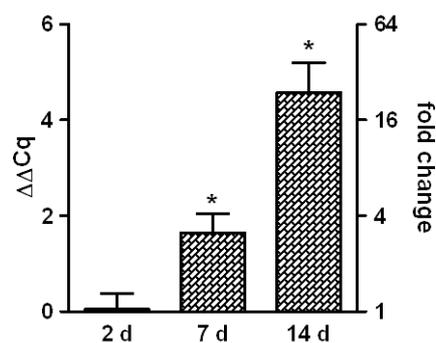


Abb. 8: Zeitabhängigkeit der OTA-induzierten WISP1-Genexpression in RPTEC. Inkubation mit 10 nM OTA für 2, 7 und 14 Tage. $n \geq 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

HEK293 Zellen

HEK293 Zellen sind eine etablierte humane, embryonale Nierenzelllinie. Sie verfügen über ein vergleichsweise schnelles Wachstum und wurden daher bis zu 24 h mit OTA inkubiert. Abbildung 5 zeigt die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der OTA-induzierten WISP1-Genexpression in HEK293-Zellen. Nach 6, 12 bzw. 18 Stunden führte OTA zu einer Steigerung der WISP1 Expression auf das 1,6-, 2,8- bzw. 12,8-fache. Eine 24-stündige Inkubation mit OTA bewirkte eine signifikante und deutliche Überexpression von WISP1 (*fold change* 230-fach; Abb. 9A). In einer anderen Versuchsreihe konnte die Konzentrationsabhängigkeit dieser Expressionssteigerung gezeigt werden: 24-stündige Inkubation mit 1 nM OTA führte zur 1,9-fachen Expressionssteigerung von WISP1. 10 nM bzw. 100 nM OTA bewirkten eine signifikante Steigerung auf das 17,2- und 34,9-fache. Diese vermehrte Expression konnte auch in einem Agarosegel gezeigt werden (Abb. 9C).

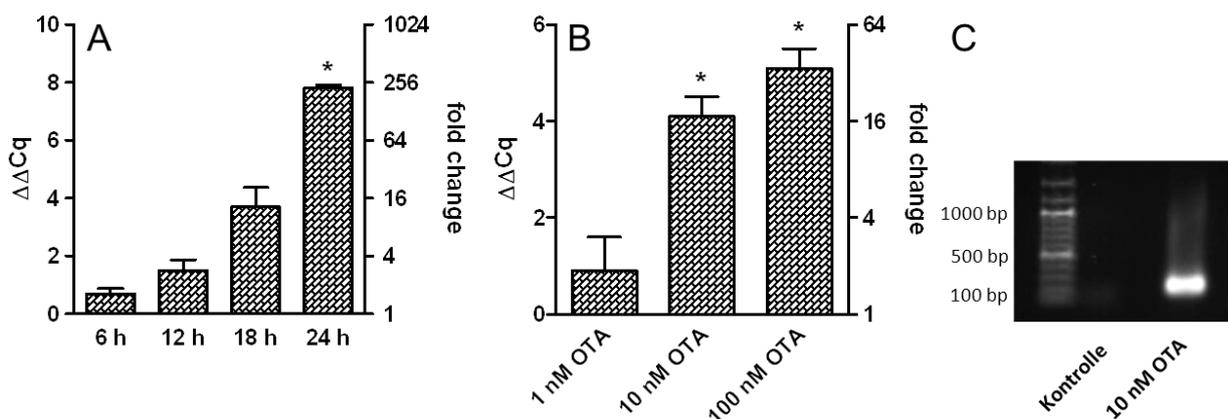


Abb. 9: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der OTA-induzierten WISP1-Genexpression in HEK293 Zellen. Inkubation mit 10 nM OTA für 6 h, 12 h, 18 h und 24 h (A) oder mit 1 nM, 10 nM und 100 nM OTA für 24 h (B). In C wurden Aliquote der entsprechenden qPCR aus A auf einem Agarosegel aufgetragen (24 h OTA). $n \geq 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

NHLF Zellen

NHLF Zellen sind primäre, humane Lungenfibroblasten. Sie dienen als nicht-epitheliale Zellen dem Vergleich mit den renalen Epithelzellen. Da NHLF primäre Zellen sind und einen relativ langsamen Stoffwechsel aufweisen, wurden sie wie die renalen primären Zellen bis zu 14 Tage mit 10 nM OTA inkubiert. Weder eine 2-tägige (*fold change* -1,1) noch eine 14-tägige OTA Exposition (*fold change* -1,3) führte zu einer Änderung der WISP1-Genexpression (Abb.

10). Humane Lungenfibroblasten reagieren somit, im Gegensatz zu den renalen Epithelzellen, auf eine Exposition mit OTA nicht mit einer vermehrten Expression von WISP1, was auf einen zelltyp- und organspezifischen Effekt von OTA deutet.

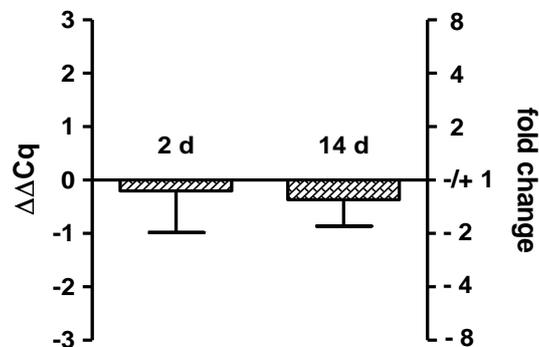


Abb. 10: Zeitabhängigkeit der OTA-induzierten WISP1-Genexpressionsänderung in NHLF. Inkubation mit 10 nM OTA für 2 bzw. 14 Tage. $n \geq 2$ (MW \pm SEM)

4.2.2 Einfluss von Ochratoxin A auf die WISP1-Proteinexpression

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte die durch OTA-induzierte vermehrte Expression von WISP1 auf Proteinebene bestätigt werden. Dafür wurden sowohl RPTEC als auch HEK293 Zellen mit OTA inkubiert und anschließend die Zellproteine isoliert bzw. der Zellkulturüberstand abgenommen. Es wurden drei verschiedene WISP1 Antikörper im Western Blot und zwei weitere Antikörper im ELISA verwendet. Wie die Abbildung 11 exemplarisch zeigt, war es weder in den Zelllysaten noch im 7-fach aufkonzentrierten Zellkulturüberstand möglich, ein WISP1 Protein zu detektieren. Lediglich kommerzielles rekombinantes WISP1 Protein wurde im Western Blot detektiert. Offensichtlich wird durch OTA zwar die WISP1 RNA-Expression verstärkt, jedoch führt dies nicht zu einer gesteigerten Proteinexpression.

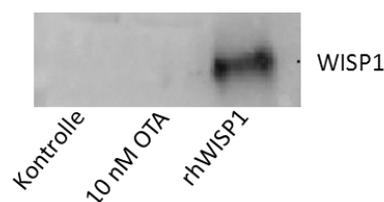


Abb. 11: Western Blot gegen WISP1 in HEK293 Zelllysate nach 24-stündiger OTA Exposition. Als Kontrolle diente rekombinantes WISP1 Protein (0,5 μ g).

4.2.3 Ochratoxin A induziert ein alternatives WISP1-Transkript (IncWISP1)

Auf Grund der Tatsache, dass es nicht möglich war, ein WISP1 Protein zu detektieren, wurde die OTA-induzierte WISP1 RNA in weiteren Versuchen detaillierter untersucht. Da die in den qPCR Experimenten verwendeten Primer kommerziell erworben wurden, was eine genaue Lokalisation des damit erhaltenen Produkts im WISP1-Gen unmöglich machte, wurde zunächst das PCR-Produkt sequenziert. Dadurch konnte identifiziert werden, welcher Abschnitt von WISP1 durch diese Primer amplifiziert wurde: es ist ein 152 bp langer Abschnitt des fünften und damit letzten Exons von WISP1 (Abb. 12).

Humanes WISP1 Gen (32 260 bp):

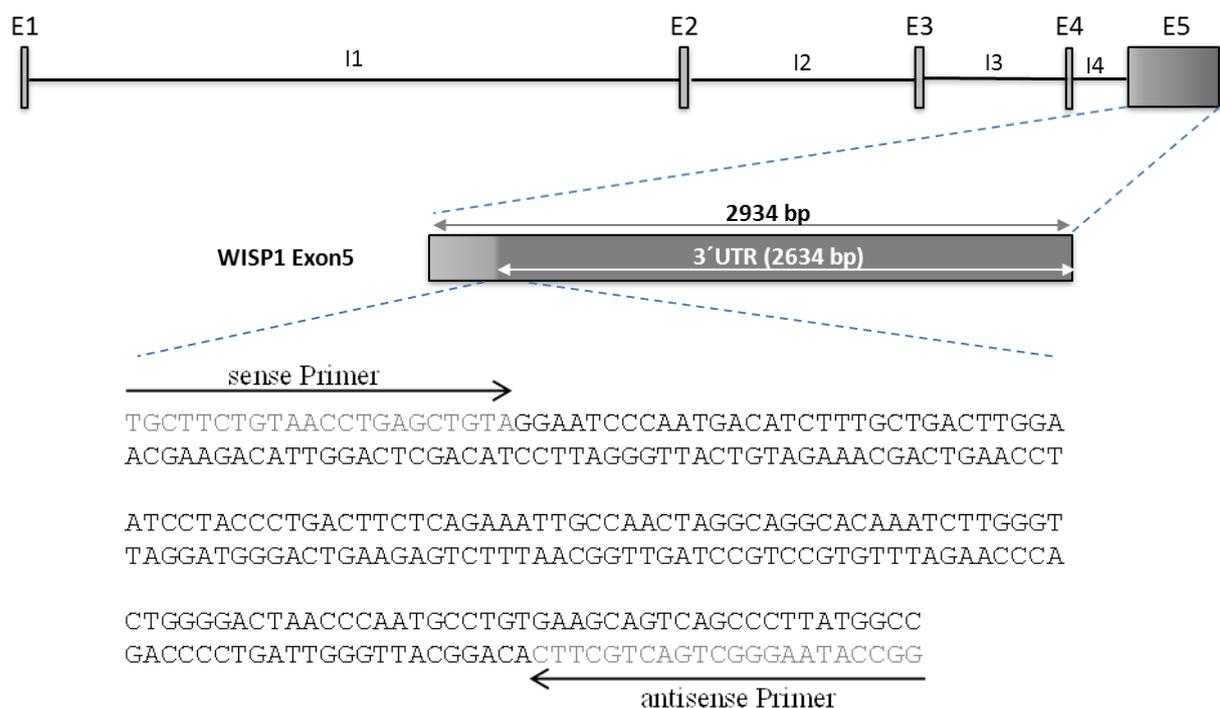


Abb. 12: Schematische Darstellung des WISP1 Gens sowie der Lokalisation und Sequenz des durch die kommerziellen WISP1 Primer amplifizierten PCR-Fragments

Anschließend wurden die 3' und 5' Enden der OTA-induzierten WISP1 RNA mit Hilfe einer RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) charakterisiert. Zusätzlich wurden qualitative PCRs unter Verwendung diverser WISP1 Primer (siehe Anlage Primer Walking) durchgeführt, um die RACE Ergebnisse zu bestätigen. Es zeigte sich, dass weder die gesamte WISP1

mRNA noch eine der bereits bekannten Spleiß-Varianten von WISP1 in HEK293 exprimiert wird. Es stellte sich dagegen heraus, dass OTA zur vermehrten Expression eines bisher unbekanntes alternativen WISP1 Transkriptes führt, welches vermutlich nicht für ein Protein kodiert. Dieses alternative Transkript wurde lncWISP1 (für long noncoding WISP1) genannt (Abb. 13).

Darüber hinaus konnte mittels PCR gezeigt werden, dass auch in RPTEC Zellen durch OTA ausschließlich dieses alternative Transkript von WISP1 exprimiert wird. Wie Abbildung 13 zeigt, beginnt lncWISP1 im vierten Intron und involviert einen Teil des fünften Exons, wobei sich 1698 nt in der 3' untranslated Region (3'UTR) befinden.

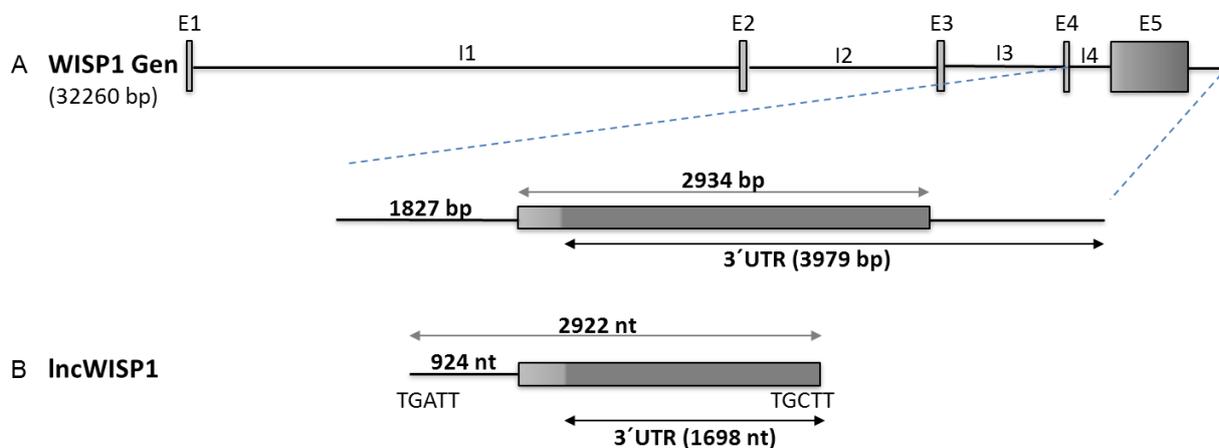


Abb. 13: Ochratoxin A induziert ein alternatives Transkript von WISP1 (lncWISP1). Schematische Darstellung des gesamten WISP1 Gens und eines Abschnitts des vierten Introns, Exon 5 und der 3'UTR (A) und des durch OTA induzierten alternativen Transkripts von WISP1 (B). Die eingezeichneten Basen kennzeichnen den Beginn bzw. das Ende der jeweiligen Sequenz.

4.2.4 lncWISP1 ist eine nukleär angereicherte lange nicht-kodierende RNA

Für eine detailliertere Charakterisierung von lncWISP1 wurden HEK293 Zellen für 24 h mit 10 nM OTA inkubiert und anschließend die zellulären Kompartimente mit Hilfe des PARISTM Kit (Ambion, Life Technologies, USA) in die nukleären und zytoplasmatischen Anteile separiert. Aus beiden Fraktionen wurde die RNA isoliert und mit qPCR Experimenten überprüft, in welcher subzellulären Fraktion lncWISP1 detektierbar ist. Es stellte sich heraus, dass lncWISP1 mit einer über 100-fachen Anreicherung im Nukleus nachweisbar ist (Abb. 14). Als Kontrolle wurde die subzelluläre Verteilung des *housekeeping* Gens GAPDH

bestimmt. GAPDH war hauptsächlich in der cytoplasmatischen Fraktion nachweisbar (Abb. 14).

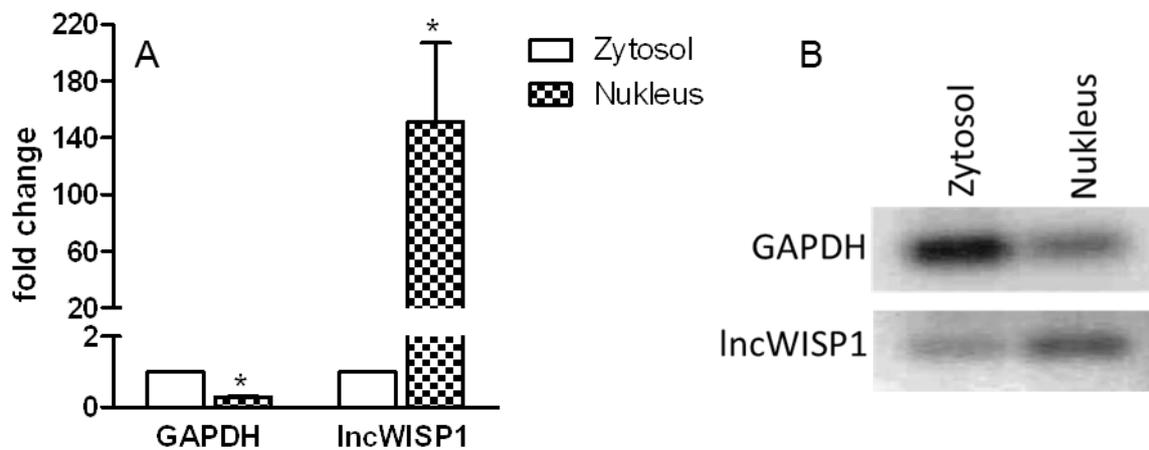


Abb. 14: Subzelluläre Verteilung von GAPDH und lncWISP1. (A) HEK293 Zellen wurden für 24 h mit 10 nM OTA inkubiert, die Zelllysate in zytoplasmatische und nukleäre Kompartimente aufgeteilt und anschließend mittels qPCR der mRNA Gehalt von GAPDH und lncWISP1 in beiden Fraktionen bestimmt (*fold change* in Bezug zur zytoplasmatischen Fraktion =1). In B wurden Aliquote der PCR-Experimente (GAPDH 25 Zyklen; lncWISP1 35 Zyklen) in einem Agarosegel aufgetragen. $n > 3$ (MW \pm SEM)

4.2.5 Diskussion

Das humane WISP1 Gen ist auf Chromosom 8 lokalisiert und codiert für ein sezerniertes, matrizelluläres Protein, das zu einer Familie von Bindegewebswachstumsfaktoren (CCN-Familie) gehört. WISP1, auch CCN4 genannt, wird überwiegend während der Organentwicklung exprimiert, aber auch während pathologischer Prozesse wie fibrotischen oder malignen Veränderungen (Berschneider and Königshoff, 2011). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von qPCR Experimenten gezeigt werden, dass die WISP1 RNA sowohl in primären humanen proximalen Tubuluszellen (RPTEC) als auch in HEK293 Zellen durch OTA verstärkt exprimiert wird. Ebenfalls wird die WISP1 RNA-Expression in der renalen Epithelzelllinie HK-2 konzentrationsabhängig durch OTA gesteigert (Schumann, 2012).

Die durch OTA induzierte WISP1 Expression in HEK293 Zellen ist in Wirklichkeit wohl noch deutlicher als hier angegeben, weil unter Kontrollbedingung mehrfach die WISP1 mRNA erst nach qPCR-Zyklus 45 oder zum Teil gar nicht detektierbar war, während in den OTA-exponierten Zellen der Schwellenwert immer deutlich früher (ca. bei Zyklus 30) überschritten

wurde. In solchen Fällen wurde eine Differenz von 10 Zyklen zwischen Kontrolle und OTA festgelegt, woraus sich eine 1024-fach höhere Expression (fold change = 2^{10} Zyklen) von WISP1 ergab. Diese Berechnungsweise führt somit eher zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Expressionssteigerung von WISP1.

In den primären humanen Lungenfibroblasten, in denen die WISP1 RNA ca. bei qPCR Zyklus 30 detektiert werden konnte, konnte kein OTA-induzierter Anstieg der WISP1 Expression beobachtet werden. Dies spricht für einen Zelltyp- und eventuell auch Gewebe-spezifischen Effekt von OTA. Dass die Niere das Haupt-Zielorgan der toxischen Wirkung von OTA ist, wurde bereits beschrieben und ist bedingt dadurch, dass OTA vorrangig durch die Niere metabolisiert und ausgeschieden wird und die Niere außerdem stark durchblutet wird (Gekle et al., 2005). Dementsprechend zeigen sich toxische Wirkungen vor allem im Nierengewebe. Auch ein Zelltyp-spezifischer Effekt von OTA wurde bereits gezeigt. In Nierenepithelzellen und Nierenfibroblasten aus der Ratte zeigte sich, dass in beiden Zelltypen die gleiche Konzentration an OTA akkumuliert wird, jedoch die Fibroblasten eine geringere Empfindlichkeit gegenüber der toxischen, anti-proliferativen Wirkung von OTA aufweisen (O'Brien et al., 2001). Dies wurde darauf zurückgeführt, dass Fibroblasten möglicherweise über Entgiftungsmechanismen verfügen, die in Epithelzellen nicht vorhanden sind.

Obwohl es durch OTA zu einem starken Expressionsanstieg der WISP1 RNA kam, war es nicht möglich, mittels Western Blot oder ELISA das WISP1-Protein nachzuweisen. Dies warf die Frage auf, welche Funktion diese durch OTA vermehrt exprimierte RNA hat bzw. welche Besonderheiten sie aufweisen könnte, was zu einer detaillierteren Betrachtung der vermehrt exprimierten WISP1 RNA führte. Für WISP1, wie auch für alle anderen Mitglieder der CCN-Familie, sind eine N-terminale Lokalisationssequenz und vier konservierte, homologe Domänen charakteristisch, denen jeweils einzelne Exons auf Genebene zuzuordnen sind: eine *insulin-like growth factor* bindende Domäne (IGFBP), eine von-Willebrand Typ C Domäne (VWC), eine Thrombospondin Typ-1 Domäne (TSP-1) und eine C-terminale Domäne (CT). Neben einem Vollängentranskript mit fünf Exons sind für WISP1 auch Spleißvarianten beschrieben, bei denen entweder nur das Exon 3 (VWC Domäne) oder Exon 3 und Exon 4 (VWC und TSP Domäne) fehlen (Cervello et al., 2004; Tanaka et al., 2001, 2003; Yanagita et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe einer 5' und 3' RACE-PCR gezeigt werden, dass OTA in Nierenepithelzellen weder die Expression des Vollängentranskripts, noch einer der beiden Spleißvarianten von WISP1 induziert, sondern ein bisher noch nicht beschriebenes alternatives Transkript vermehrt exprimiert wird. Dieses alternative Transkript wurde lncWISP1 (für long noncoding WISP1) genannt. Durch den Einsatz entsprechender

Primer, konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um eine zirkuläre ncRNA handelt. Zirkuläre ncRNAs sind eine kürzlich identifizierte, neuartige Klasse von ncRNAs, die auf post-transkriptioneller Ebene regulatorisch wirken (Hansen et al., 2013). Weiterhin konnte die subzelluläre Verteilung von lncWISP1 bestimmt werden. Dabei ergab sich, dass sich lncWISP1 im Nukleus anreichert. Somit handelt es sich bei diesem alternativen WISP1-Transkript höchstwahrscheinlich um ein nicht-Protein-kodierendes Transkript. Diese Vermutung basiert zum einen darauf, dass mindestens zwei der verwendeten Antikörper zur Detektion des WISP1 Proteins gegen die Aminosäuren 311 bis 367 von WISP1 gerichtet waren und diese Aminosäuren im fünften Exons kodiert sind. Da lncWISP1 diesen Bereich enthält, hätten die Antikörper bei Vorhandensein eines im korrekten Leserahmen translatierten und dann korrekt gefalteten WISP1 Peptides dieses detektieren müssen. Zum anderen ist bei nukleärer Anreicherung einer RNA davon auszugehen, dass eine Translation, die normalerweise im Zytosol erfolgt, nicht stattfindet. Diese Überlegungen schließen natürlich nicht aus, dass es durch den zwar geringen Teil zytoplasmatischer lncWISP1-RNA zur Bildung eines alternativen Proteins kommt, das die Wirkung von OTA vermitteln könnte. Auf jeden Fall stellt sich die Frage, auf welche Weise, insbesondere über welche Signalwege OTA die Expression des lncWISP1 steigert.

4.3 Ochratoxin A induziert lncWISP1 über den MEK/ERK-Signalweg

4.3.1 Untersuchung potentieller Signalwege zur lncWISP1-Induktion

Um Signalwege zu identifizieren, die an der OTA-induzierten Expressionssteigerung von lncWISP1 beteiligt sind, wurde zunächst der kanonische Wnt-Signalweg, der den klassischen Weg der WISP1-Aktivierung darstellt, untersucht. Der Wnt-Signalweg wird durch Bindung des Signalproteins Wnt an seinen Rezeptor aktiviert und führt dazu, dass β -Catenin nicht phosphoryliert und dadurch nicht mehr abgebaut wird. Demnach bewirkt eine Aktivierung dieses Signalweges eine Akkumulation von β -Catenin in der Zelle, wodurch dieses im Zellkern an Transkriptionsfaktoren binden kann und die Transkription von Zielgenen wie WISP1 anregt. Wie die Abbildung 15 zeigt, führte eine Inkubation mit 10 nM OTA weder in RPTEC noch in HEK293 Zellen zu veränderten β -Catenin Proteinmengen.

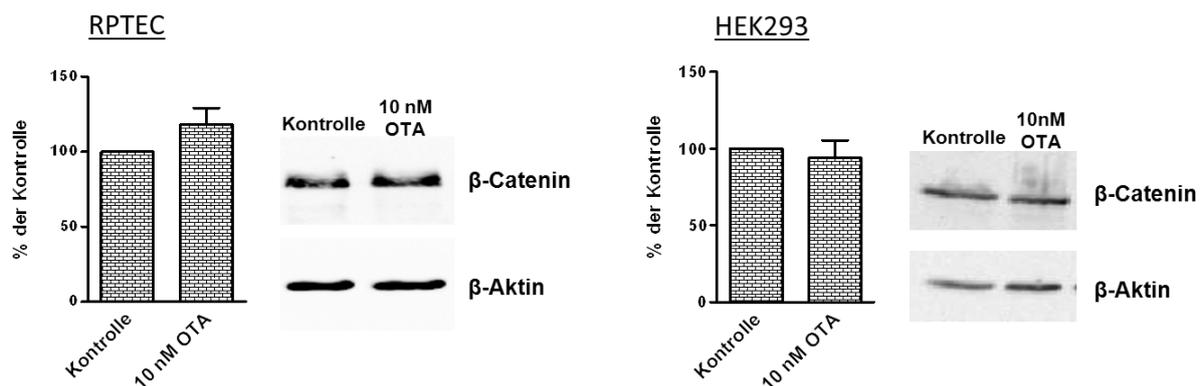


Abb. 15: Western Blot gegen β -Catenin in RPTEC und HEK293 Zellen nach 48 h oder 24 h Inkubation mit 10 nM OTA. $n = 4$ (MW \pm SEM)

Ferner zeigt die Abbildung 16, dass die Expression von lncWISP1 unabhängig von p38- (p38-mitogenaktivierte Proteinkinase), JNK- (c-Jun N-terminale Kinase), PKA- (Proteinkinase A), PKC- (Proteinkinase C) oder MSK1- (mitogen- und stressaktivierte Kinase 1) abhängigen Signalwegen ist. Demnach spielen weder der Wnt-Signalweg noch verschiedene andere Signalwege eine Rolle bei der OTA-induzierten WISP1 Expression.

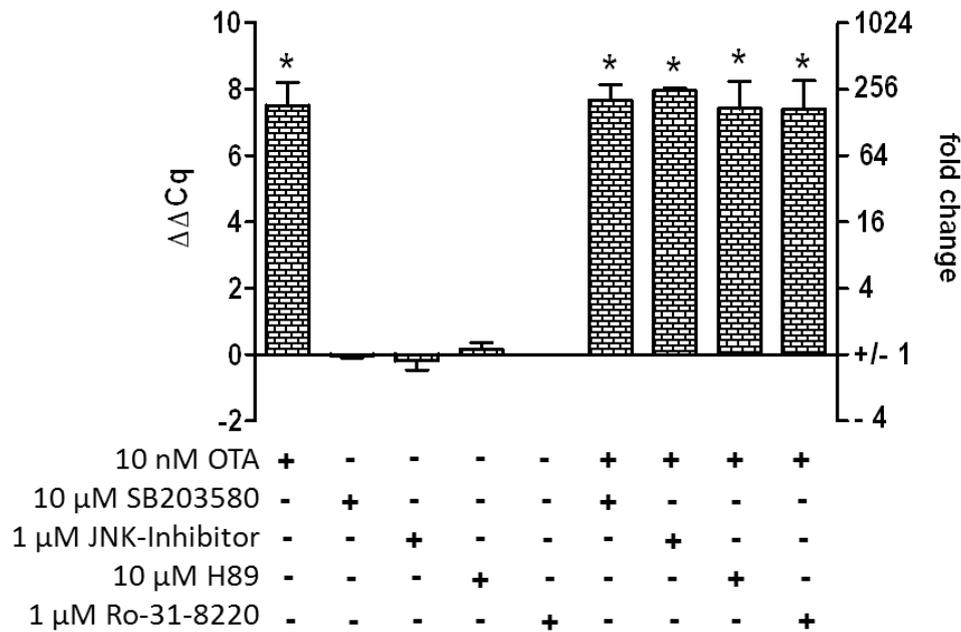


Abb.16: Einfluss verschiedener Signalweg-Inhibitoren auf die OTA-induzierte lncWISP1-Expression. HEK293 Zellen wurden für 24 h mit den dargestellten Inhibitoren mit oder ohne 10 nM OTA inkubiert. Anschließend wurde die lncWISP1-Expression mittels qPCR quantifiziert. n = 3 (MW±SEM); * p < 0,05 gegenüber unbehandelten Kontrollzellen. SB203580, p38-Inhibitor; H89, PKA- und MSK1-Inhibitor; Ro-31-8220, PKC- und MSK1-Inhibitor.

4.3.2 Die Rolle des MEK/ERK-Signalweges

Da es Veröffentlichungen gibt, die beschreiben, dass die WISP1 Expression auch über den MEK/ERK-Signalweg aktiviert werden kann, wurde getestet, ob dieser Signalweg eine Rolle bei der OTA-induzierten lncWISP1 Expression spielt. Im Gegensatz zu den bisher getesteten Signalwegen führte OTA in RPTEC Zellen in einer Zeitspanne von 3 h bis zu 14 Tagen zur Aktivierung des ERK1/2 Signalwegs. Der stärkste Effekt auf die ERK1/2-Phosphorylierung war nach 48 h zu beobachten (Abb. 17). Die Inhibierung der ERK-Kinase MEK1/2 durch U0126 verhinderte die durch OTA induzierte Phosphorylierung von ERK1/2. In HEK293 Zellen erhöhte OTA die ERK1/2-Phosphorylierung nach 30 min um das 3,5-fache und konnte ebenfalls durch U0126 inhibiert werden (Abb. 17).

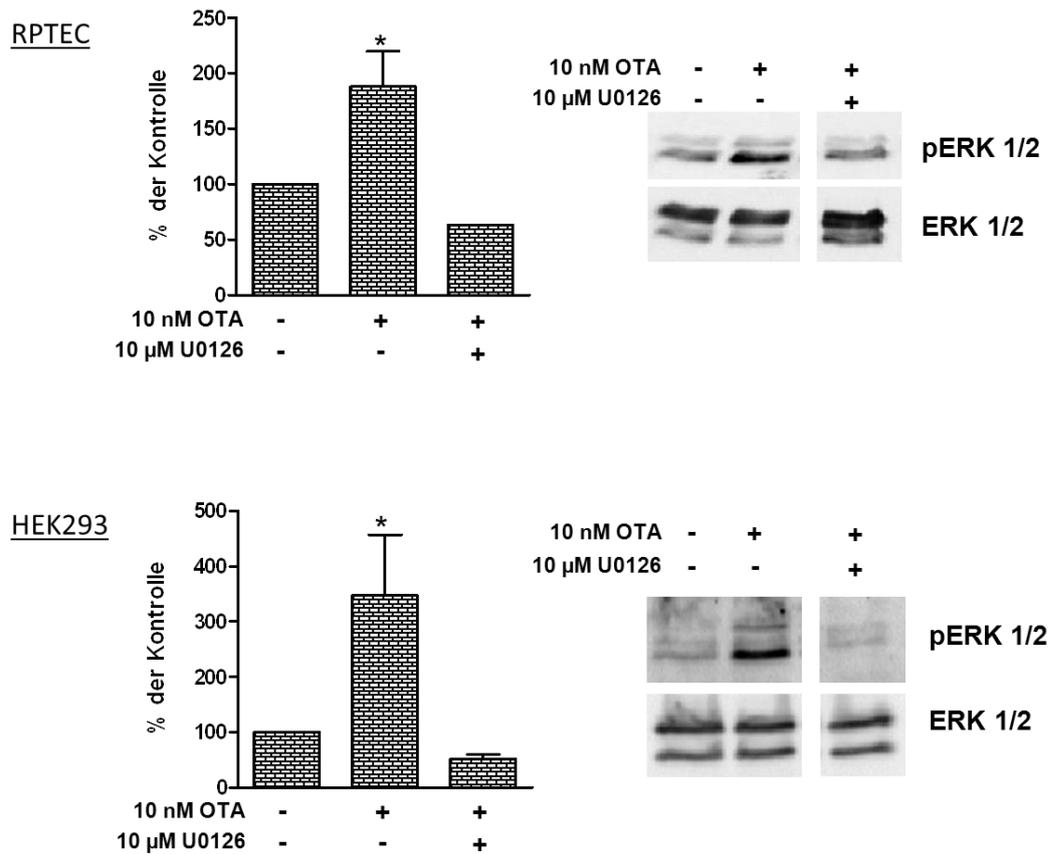


Abb.17: ERK1/2-Phosphorylierung in RPTEC und HEK293 Zellen nach 48-stündiger bzw. 30-minütiger Inkubation mit 10 nM OTA. Der Western Blot zeigt phosphoryliertes und unphosphoryliertes ERK1/2 nach OTA-Inkubation mit oder ohne U0126 (MEK1/2-Inhibitor). $n = 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$ gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Inhibierung der ERK1/2-Phosphorylierung die 288-fache OTA-induzierte lncWISP1 Expression um 96 % (= 12,2-fach) reduziert wird (Abb. 18). Dieses Ergebnis demonstriert, dass bei der Regulation von lncWISP1 durch OTA der ERK/MEK-Signalweg involviert ist.

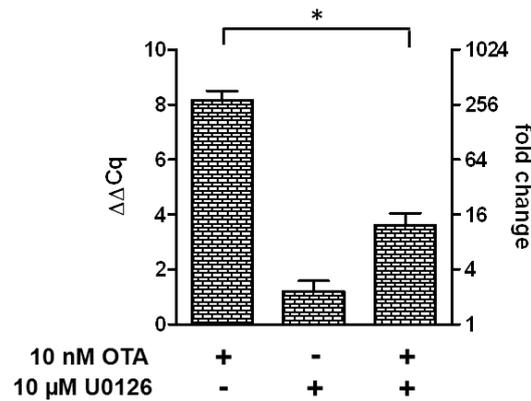


Abb.18: Einfluss des MEK1/2-Inhibitors U0126 auf die OTA-induzierte lncWISP1-Expression. HEK293 Zellen wurden 24 h mit 10 nM OTA und/oder 10 μM U0126 inkubiert und die lncWISP1-Expressionsänderung mittels qPCR bestimmt. n = 6 (MW±SEM); * p < 0,05.

4.3.3 Ochratoxin A interagiert mit intrazellulären Signalproteinen

Um die Wirkung von OTA auf die Zelle zu verstehen, ist es notwendig, den Ort seiner Interaktion zu kennen. Prinzipiell könnte OTA an einen Membranrezeptor binden und dadurch Signalwege aktivieren, die zu einer lncWISP1-Expression führen, oder über Transportproteine oder Diffusion in die Zelle gelangen und dort mit Signalproteinen interagieren. Um dies zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit BSA-gekoppeltem OTA, welches nicht in die Zelle gelangen kann, inkubiert und mit Hilfe von qPCRs ermittelt, ob es zu einer Steigerung der lncWISP1-Expression kommt. In Abbildung 19 ist ersichtlich, dass Inkubation mit 10 nM OTA zu einer signifikanten Steigerung der lncWISP1-Expression führte. Das BSA-gekoppelte OTA (10 nM; effektive Konzentration) hatte hingegen keinen Einfluss auf die lncWISP1-Expression (Abb. 19). Demnach muss OTA für die Aktivierung der lncWISP1-Transkription höchst wahrscheinlich mit intrazellulären Komponenten reagieren.

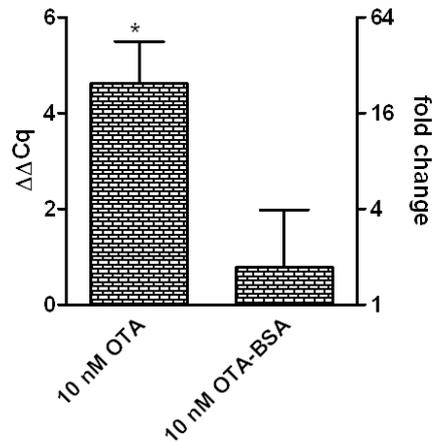


Abb.19: Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit 10 nM OTA oder 10 nM OTA-BSA-Konjugat auf die lncWISP1-Expression in HEK293 Zellen. n = 3 (MW \pm SEM); * p < 0,05 gegenüber unbehandelten Kontrollzellen.

4.3.4 Diskussion

Die WISP1 Genexpression wird klassisch über den Wnt/ β -Catenin-Signalweg vermittelt, kann aber auch über ERK1/2-abhängige Mechanismen aktiviert werden (Venkatachalam et al., 2009; Xu et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lncWISP1 Expression nicht über den kanonischen Wnt-Signalweg erfolgt. Auch die Inhibierung anderer bedeutender Signalwege (JNK, p38, PKA, PKC, MSK1) hatte keinen Einfluss auf die OTA-induzierte lncWISP1 Expression. Demgegenüber erwies sich ERK1/2 als wichtiges Signalmolekül für die verstärkte Aktivierung von lncWISP1 und lag nach OTA-Exposition sowohl in RPTEC als auch in HEK293 Zellen phosphoryliert, also in aktivierter Form vor. Veränderte ERK1/2-Phosphorylierung wurde auch in Mäusenieren beobachtet, nachdem die Mäuse mit OTA gefüttert wurden (Marin-Kuan et al., 2007). Auch in einer Nierenzelllinie aus dem Hund konnte eine verstärkte ERK1/2-Phosphorylierung durch OTA beobachtet werden (Schramek et al., 1997).

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass OTA für eine Aktivierung der lncWISP1-Transkription zunächst in die Zelle transportiert werden bzw. diffundieren muss. Diverse Publikationen beschreiben, dass OTA über organische Anionentransporter in die Tubuluszellen der Niere aufgenommen (Anzai et al., 2010; Gekle et al., 2005; Zhang et al., 2004) und über erleichterte Diffusion oder auch über aktive Transporter wie den organischen Anionentransporter 4 (OAT4) oder das sogenannte *multidrug resistance protein 2*

(MRP2) in den Urin ausgeschieden wird (Babu et al., 2002; Leier et al., 2000). Die vorliegende Arbeit zeigt somit, dass OTA zur Ausübung seiner nephropathischen Wirkungen bzw. zur Beeinflussung zellulärer Signalwege in die Zelle gelangen muss. Im Zytosol kann OTA dann an diverse Proteine binden. Diese Bindung erfolgt je nach Protein mit unterschiedlicher Spezifität (Schwerdt et al., 1999b). Somit ist es vorstellbar, dass OTA von intrazellulärer Seite an Signalproteine bindet und so zur Aktivierung der MEK/ERK-Signalkaskade führt.

Die Abbildung 20 fasst den hier gefundenen Signalweg, der die Expression von lncWISP1 zur Folge hat, zusammen, wobei bisher nicht bekannt ist, wie OTA die Phosphorylierung von MEK1/2 bewirkt. Auf jeden Fall muss es zu einer Aktivierung des Promotors von lncWISP1 kommen, wobei nicht geklärt ist, um welchen Promotor es sich dabei handelt, den, der zur Expression des WISP1 Proteins führt, oder um einen alternativen Promotor mit nicht bekannter Position vor dem lncWISP1-Transkript.

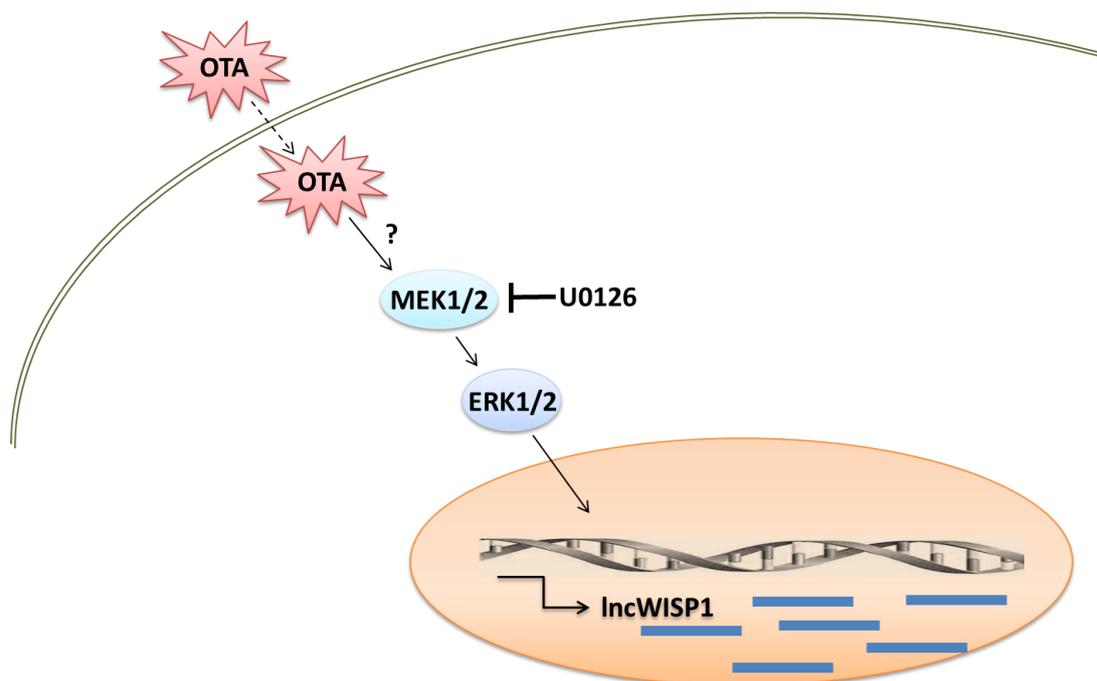


Abb.20: Schema des OTA-induzierten Signalweges zur Aktivierung der lncWISP1-Expression

4.4 Identifizierung des lncWISP1-Promotors

4.4.1 Ochratoxin A induziert einen alternativen lncWISP1-Promotor

Da lncWISP1 ein alternatives Transkript darstellt, ist es möglich, dass seine Expression von einem eigenen Promotor gesteuert wird. Deshalb war es Ziel der weiteren Untersuchungen, den Promotor dieses alternativen WISP1-Transkriptes zu identifizieren. Der klassische WISP1-Promotor befindet sich vor dem ersten Intron des WISP1-Gens. Um zu untersuchen, ob dieser Promotorbereich durch OTA aktiviert wird und zu einer Transkription von lncWISP1 führt, wurde ein an die sekretorische alkalische Phosphatase (SEAP) -gekoppeltes 975 bp großes WISP1-Promotorkonstrukt, welches sich auf der DNA vor dem 1. Exon von WISP1 befindet, in HEK293 Zellen transfiziert. Die Abbildung 21 zeigt, dass OTA-Exposition nicht zur Aktivierung des klassischen WISP1-Promotors führte.

Deshalb war es naheliegend zu vermuten, dass es einen alternativen Promotor gibt, der sich in der Nähe des lncWISP1 befindet. Auf Grund dessen wurde ein 1875 bp großer Bereich, der vor dem Abschnitt des lncWISP1-Transkripts auf der DNA liegt, als putativer, OTA-induzierbarer Promotor untersucht. Dieses alternative lncWISP1-Promotorkonstrukt wurde in einem pGL3-Basic-Plasmid vor das *firefly* Luziferasegen gekoppelt und HEK293 Zellen damit transfiziert. 24 h nach Transfektion erfolgte eine 24-stündige OTA-Inkubation (10 nM). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die *firefly* Luziferase-Aktivität gemessen. Es zeigte sich eine nahezu 2-fache OTA-induzierte Steigerung der Luziferase-Aktivität (Abb. 21), wohingegen sich die Aktivität der von dem promotorfreien Kontrollvektor exprimierten Luziferase durch OTA-Inkubation nicht veränderte (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis zeigt, dass für die Induktion der lncWISP1-Expression ein alternativer Promotor und demzufolge auch eine alternative Transkriptionsstartstelle genutzt wird.

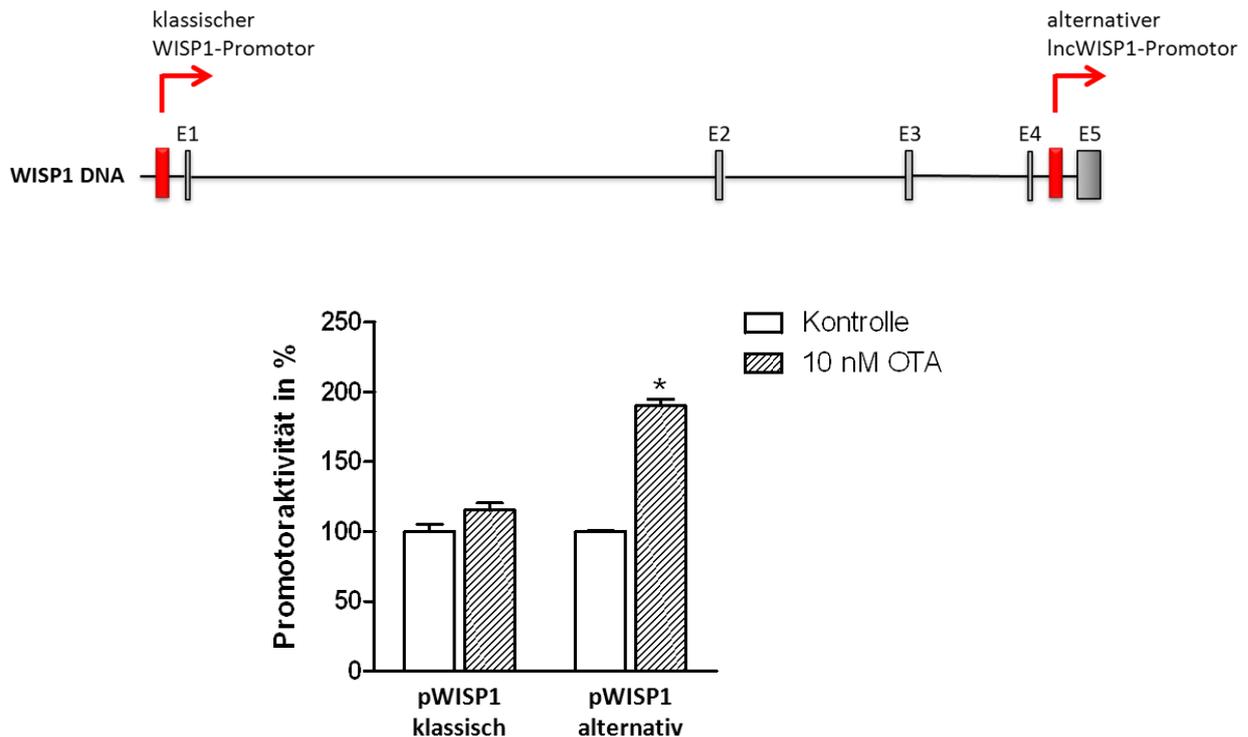


Abb.21: OTA-induzierte Promotoraktivität. HEK293 Zellen wurden mit dem klassischen WISP1-Promotor enthaltenden Plasmid (pWISP1-SEAP) oder einem alternativen WISP1-Promotor enthaltenden Plasmid (pWISP1_Intron4-pGL3) transfiziert. 24 Stunden nach Transfektion erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit 10 nM OTA und anschließend die Messung der SEAP- (klassisch) bzw. Luciferase- (alternativ) Aktivität. $n \geq 2$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

4.4.2 Diskussion

Ein Promotor ist ein Bereich auf der DNA, der die geregelte RNA-Expression eines Gens ermöglicht und am 5' Ende und somit vor dem RNA-kodierenden Bereich liegt. Er enthält cis-regulatorische Elemente, die für eine akkurate und effiziente Initiation der Transkription benötigt werden (Ayoubi and Van De Ven, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst getestet, ob zur Initiierung der Transkription der langen nicht-kodierenden RNA IncWISP1 der kanonische WISP1 Promotor verwendet wird. Dieser befindet sich im DNA-Bereich vor dem ersten Exon von WISP1 und kann durch die Transkriptionsfaktoren CREB und β -Catenin aktiviert werden (Venkatachalam et al., 2009; Xu et al., 2000). Der SEAP-Promotor-Assay ergab, dass OTA nicht zur Aktivierung dieses Promotors führt, wodurch dessen Beteiligung an der OTA-induzierten Transkription von IncWISP1 ausgeschlossen wurde. Da es sich bei IncWISP1 um ein alternatives Transkript handelt, wurde die Nutzung eines alternativen Promotors in Betracht gezogen.

Die Verwendung alternativer Promotoren kann die Vielfalt und Flexibilität der Genexpression erhöhen (Ayoubi and Van De Ven, 1996). Auch durch alternatives Spleißen von Primärtranskripten, durch Rekombination genomischer RNA und durch die Variation der Transkriptionstermination kann die Diversität der transkribierten RNA erhöht werden (Ayoubi and Van De Ven, 1996; Pal et al., 2012). Neuere Studien deuten jedoch darauf hin, dass die verschiedenen Transkriptvarianten eines Genes zu einem größeren Teil durch die Nutzung alternativer Promotoren als - wie bislang angenommen - durch alternatives Spleißen entstehen (Pal et al., 2011). Schätzungsweise verwenden bis zu 50 % aller humanen Gene alternative Promotoren (Baek et al., 2007; Davuluri et al., 2008; Kimura et al., 2006). Wobei die aus der Verwendung alternativer Promotoren resultierenden Transkriptvarianten entweder in alternative Protein-Isoformen translatiert werden oder nicht-kodierende Transkripte bleiben (Pal et al., 2012).

Es gibt Hinweise darauf, dass solche alternativen Mechanismen, die streng reguliert stattfinden, durch spezifische Stimuli wie Wachstumsfaktoren ausgelöst werden (Pal et al., 2012). Somit ist es ebenso vorstellbar, dass auch exogene Stimuli wie OTA die Aktivierung alternativer Promotoren bewirken können.

Um die Hypothese zu prüfen, ob zur Initiation der IncWISP1 Transkription ein alternativer Promotor genutzt wird, wurde der DNA-Bereich vor dem Abschnitt des IncWISP1 Transkripts, d.h. das Intron 4 der ursprünglichen WISP1 DNA, vor das Luziferasegen eines Vektors kloniert und der Einfluss von OTA auf Aktivität dieser DNA-Sequenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass OTA Exposition zur Steigerung der Luziferaseaktivität führt. Dieses Ergebnis belegt, dass bei der Transkription von IncWISP1 ein alternativer Promotor zur Anwendung kommt, wobei bisher nicht bekannt ist, welche regulatorischen Elemente bzw. Transkriptionsfaktoren für die Aktivierung dieses Promotors verantwortlich sind. Denkbar wäre somit, dass die gezeigte OTA-induzierte Aktivierung von ERK1/2 zur Aktivierung eines seiner typischen Transkriptionsfaktoren wie c-Myc, Elk1, c-jun oder SRF führt und so die Transkription von IncWISP1 bewirkt.

Es bleibt die Frage nach der Funktion bzw. der Bedeutung des durch den alternativen Promotor gesteuerten alternativen Transkripts IncWISP1.

4.5 Ochratoxin A vermindert die Wirkung der miR-29b

Das OTA-regulierte alternative WISP1 Transkript enthält einen Bereich der 3'UTR. 3'UTRs haben wichtige regulatorische Funktionen, da sie die Translation, Stabilität und die subzelluläre Lokalisation von mRNAs beeinflussen können (Mercer et al., 2011). Diese Regulation wird u.a. über RNA-bindende Proteine oder von miRs vermittelt. Durch Bindung einer miR an die entsprechende Bindestelle einer Ziel-mRNA kann deren Expression post-transkriptionell geändert werden. Um die Funktion von lncWISP1 zu bestimmen, wurde *in silico* nach potentiellen miR-Bindestellen in der WISP1 3'UTR gesucht. Dafür wurde die Datenbank *TargetScan* (<http://www.targetscan.org/>) verwendet. Diese Datenbank ermöglicht die Berechnung der Wahrscheinlichkeit einer Interaktion zwischen einer miRNA und dem potentiellen Zieltranskript (Friedman et al., 2009). In Tabelle 17 sind diejenigen miRs aufgelistet, die laut TargetScan mit der 3979 bp langen WISP1 3'UTR interagieren können.

Tabelle 17: Vorausgesagte miR-Bindestellen in der 3979 bp langen WISP1 3'UTR

microRNA Cluster	Bindestelle in der WISP1 3'UTR
miR-29abcd	Position 152-158, 1955-1961
miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907	Position 155-161
miR-214/761/3619-5p	Position 285-291
miR-27abc/27a-3p	Position 631-638, 1913-1919, 3638-3644
miR-23abc/23b-3p	Position 1436-1443, 3812-3819
miR-24/24ab/24-3p	Position 3272-3279
miR-128/128ab	Position 3638-3644

Die laut *in silico* Vorhersage mit der WISP1 3'UTR interagierende miR-29 Familie hat sehr heterogene Eigenschaften. Eine der am besten beschriebenen Funktionen der miR-29 besteht in ihrer anti-fibrotischen Wirkung (Kriegel et al., 2012; Kwiecinski et al., 2011, 2012; Liu et al., 2011; Patel and Nouredine, 2012; Qin et al., 2011; van Rooij et al., 2008; Wang et al., 2012; Xiao et al., 2012), die durch die Hemmung der Synthese der extrazellulären Matrix zu Stande kommt. Auf Grund der Tatsache, dass beide lncWISP1 Transkripte (in RPTEC und HEK293 Zellen) eine miR-29 Bindestelle enthalten und auf Grund des Einflusses der miR-29 auf die Regulation der extrazellulären Matrix, wurde der Fokus in der vorliegenden Arbeit auf den miR-29 Cluster, im Speziellen die miR-29b, gerichtet, um die molekularen Grundlagen der fibrotischen Eigenschaften von OTA besser zu verstehen.

4.5.1 Ochratoxin A und miR-29b regulieren die WISP1 3'UTR

Nicht-kodierende RNAs können miRs binden und konkurrieren damit mit miR-Zieltranskripten um miRs. Da *in silico* Analysen ergaben, dass die gesamte WISP1 3'UTR verschiedene miR Bindestellen enthält, wurde überprüft, ob eine lncWISP1 Induktion durch OTA zur Reduzierung miR-Wirkung an der 3'UTR führt, was auf eine Schwamm-ähnliche Wirkung von lncWISP1 deuten würde. Dafür wurden HEK293 Zellen mit einem Plasmid transfiziert, bei dem ein Luziferasegen mit den Basenpaaren 1-1960 (Abb. 22A) der insgesamt 3970 bp langen WISP1 3'UTR verknüpft worden ist. Dieser Bereich der WISP1 3'UTR beinhaltet *in silico* vorhergesagte Bindestellen für die miR-29, -15, -214, -27 und -23 Cluster. Eine Steigerung der Luziferaseaktivität würde bedeuten, dass eine oder mehrere dieser miRs nicht mehr an die WISP1 3'UTR binden, sodass eine vermehrte Translation der transkribierten Luziferase-mRNA stattfinden kann.

Inkubation mit OTA führte in den mit dem WISP1 3'UTR Plasmid transfizierten Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Luziferaseaktivität auf 150 % (Abb. 22B). Dies bedeutet, dass die miRs, die unter physiologischen Bedingungen an diesen Bereich der WISP1 3'UTR binden können, durch die Folgen der OTA Exposition daran gehindert werden, indem entweder die Expression dieser miRs verringert wird oder indem die miRs durch Bereitstellen alternativer Bindestellen in lncWISP1 weggefangen werden.

Im Folgenden wurde der Fokus auf die miR-29b gelegt, da ihr wichtige Funktionen in der Regulation der extrazellulären Matrix zukommt und *in silico* für die WISP1 3'UTR (1-1960 Nukleotide) eine miR-29b Bindestelle an der Position 152-158 vorausgesagt ist (Tab. 17). Um zu überprüfen, ob die miR-29b tatsächlich mit dem *in silico* berechneten Bereich in der 3'UTR von WISP1 interagiert, wurden die Zellen sowohl mit dem WISP1 3'UTR Luziferase Plasmid als auch mit einem miR-29b-überexprimierenden Plasmid (pCMV miR-29b) transfiziert. Die Co-Transfektion führte zu einer signifikanten Senkung der Luziferaseaktivität auf 28 % im Vergleich zu den Zellen, die nicht mit dem miR-29b-überexprimierenden Plasmid transfiziert worden waren (Abb. 22). Dies lässt sich so erklären, dass bei Co-Transfektion die miR-29b mit der WISP1-3'UTR interagiert, was zur verringerten Expression der Luziferase führte.

Somit bewirkt OTA eine Steigerung der WISP1 3'UTR Luziferaseaktivität, wohingegen die Überexpression der miR-29b eine Senkung der Luziferaseaktivität bewirkt. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass miR-29b an die WISP1 3'UTR bindet.

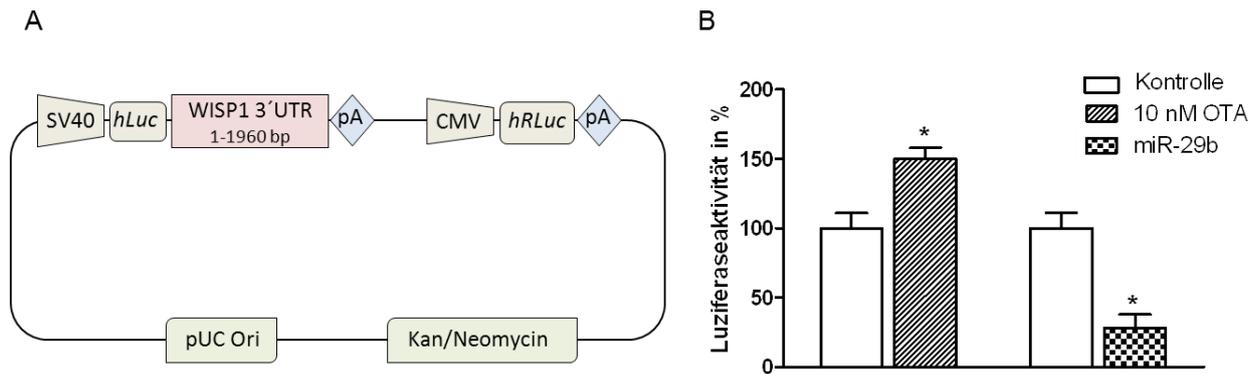


Abb.22: Einfluss von OTA und miR-29b auf die WISP1 3'UTR-abhängige Luziferase Aktivität. (A) Schema des WISP 3'UTR-enthaltenden Plasmids (basierend auf pEZX-MT01 der Firma GeneCopoeia), das sowohl ein *firefly* Luziferasegen (hLuc) enthält, das unter der Kontrolle eines SV40 Promotors steht, und an das die WISP1 3'UTR (1 – 1960bp) gekoppelt ist, als auch ein *renilla* Luziferasegen (hRLuc), das unter der konstitutiven Kontrolle eines CMV Promotors steht. (B) HEK293 Zellen wurden mit 0,2 μ g des WISP1 3'UTR-enthaltenden Plasmids alleine oder zusammen mit 0,05 μ g eines pCMV miR-29b Expressionsplasmids transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gegen 10 nM OTA-enthaltendes Medium ausgetauscht und nach weiteren 24 h die Luziferaseaktivität bestimmt. $n \geq 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

4.5.2 Posttranskriptionelle Regulation der miR-29b durch Ochratoxin A

Um den direkten Einfluss von OTA bzw. lncWISP1 auf die miR-29b Wirkung zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen mit einem Plasmid transfiziert, bei dem das Gen der *firefly* Luziferase an einen DNA-Abschnitt gekoppelt ist, der ausschließlich eine miR-29b Binderegion enthält (miR-29b-Reporterplasmid; Abb. 23A). Inkubation mit 10 nM und 100 nM OTA bewirkte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Luziferaseaktivität auf 129 % bzw. 265 % im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, was zeigt, dass durch OTA Exposition die endogene miR-29b daran gehindert wird, an den Reportervektor zu binden und so die Luziferase vermehrt exprimiert werden kann. Wurde dagegen ein miR-29b-überexprimierendes Plasmid zusammen mit dem miR-29b Reporterplasmid transfiziert, führte dies zur signifikanten Abnahme der Luziferaseaktivität auf 28 %. (Abb. 23B).

Um auszuschließen, dass eine OTA-induzierte Verringerung der miR-29b Genexpression für die Zunahme der Luziferaseaktivität in den Reporterassays verantwortlich ist, wurde eine miR-29b TaqMan® qPCR durchgeführt. Die Abbildung 23C zeigt, dass weder 10 nM noch 100 nM OTA die Expression der miR-29b signifikant beeinflusst.

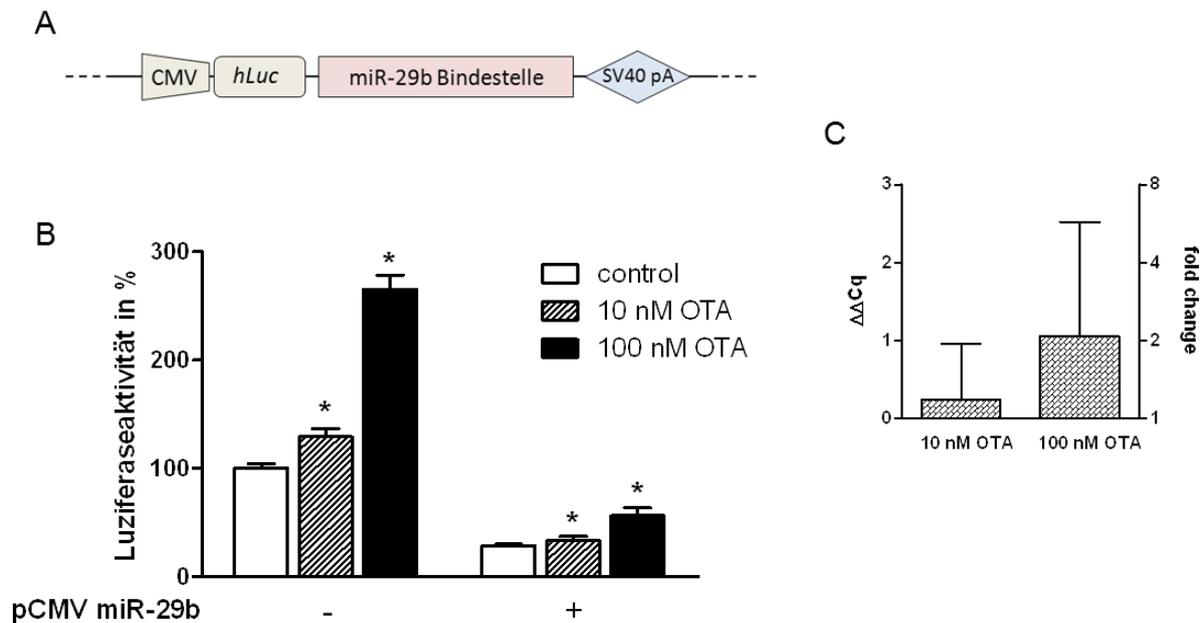


Abb.23: Einfluss von OTA auf die miR-29b-abhängige Luziferaseaktivität.(A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts des miR-29b Luziferaseplasmids, das ein *firefly* Luziferasegen enthält, das unter der Kontrolle eines CMV Promotors steht, und an das ein Abschnitt mit einer miR-29b-Bindestelle gekoppelt ist. (B) HEK293 Zellen wurden mit 0,2 µg des miR-29b Luziferaseplasmids alleine oder zusammen mit 0,05 µg eines pCMV miR-29b Expressionsplasmids transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gegen 10 nM oder 100 nM OTA enthaltendes Medium ausgetauscht und nach weiteren 24 h die Luziferaseaktivität bestimmt.(C) HEK293 Zellen wurden 24 h mit 10 nM oder 100 nM OTA inkubiert und anschließend die miR-29b Genexpression mittels TaqMan[®] qPCR Assay gemessen. n ≥ 3 (MW±SEM); * p < 0,05

4.5.3 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden neuartige lncRNAs identifiziert, die durch Inkubation mit OTA in verschiedenen humanen Nierenzellen vermehrt exprimiert werden. LncRNAs stellen eine wichtige Klasse von RNAs dar, die an einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt sind. Eine der ihnen zugesprochenen Funktionen ist, dass sie selbst als Signalmoleküle dienen und z.B. als Transkriptionsfaktoren die Transkription anderer Gene regulieren (Derrien et al., 2012; Mercer et al., 2009; Nagano and Fraser, 2011; Wang and Chang, 2011). Zusätzlich bieten lncRNAs vielfältige Möglichkeiten der post-transkriptionellen Genregulation (Yoon et al., 2012). So können lncRNAs durch Bindung an Ziel-mRNAs deren Translation sowohl fördern als auch inhibieren. Auch durch alternative Bindung RNA-bindender Proteine oder miRs kann das Spleißen und die Translation der mRNA-Vorstufen verändert werden (Yoon et al., 2012).

Um die Funktion der hier erstmals beschriebenen langen nicht-kodierenden RNA lncWISP1 zu bestimmen, wurde zunächst *in silico* nach potentiellen miRs gesucht, die an lncWISP1 binden können. Dabei stellte sich heraus, dass das in HEK293 Zellen durch OTA vermehrt exprimierte lncWISP1 eine Bindestellen für die miR-29b, die eine der in der Literatur gut beschriebenen miR mit vorwiegend anti-fibrotischen Wirkungen ist (Kriegel et al., 2012; Patel and Nouredine, 2012), aber auch für die miR-15-, -214 und -27 Cluster enthält. In HEK293 Zellen konnte außerdem bestätigt werden, dass die miR-29b mit der WISP1 3'UTR interagiert, was zur verminderten Luziferase-Aktivität des die WISP1 3'UTR-enthaltenden Reportervektors führte. Dagegen bewirkte die Inkubation mit OTA einen Anstieg der WISP1 3'UTR-abhängigen Luziferaseaktivität. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Effekt wäre, dass OTA durch Induktion der lncWISP1-Expression alternative miR-Bindestellen, sowohl für die miR-29- als auch für die miR-15-, miR-214- und miR-27-Cluster, bereitstellt, wodurch weniger dieser miRs an den Reporter-Vektor binden können und so die Luziferaseexpression und damit letztlich auch die Luziferase-Aktivität gesteigert wird. Für die miR-29b konnte dies durch den Einsatz eines Reporter-Vektors, der ausschließlich eine Bindestelle für miR-29b enthält, bestätigt werden. Denn auch in diesem Fall zeigte sich, dass OTA zu einem Ansteigen der Luziferaseaktivität führte. Wichtig in diesem Zusammenhang ist auch, dass die Expression der reifen miR-29b per se durch OTA nicht verändert wurde, was zeigt, dass Expressionsänderungen der miR-29b nicht für die veränderten Aktivitäten in den Luziferase Assays verantwortlich sind und die miR-29b demnach post-transkriptionell reguliert wird.

Die durch OTA ausgelöste starke Expression von lncWISP1 könnte somit dazu führen, dass alternative Bindestellen für die miR-29b bereitgestellt werden (miR-29b Schwamm) und die miR-29b dadurch vermindert oder gar nicht mehr an andere Zieltranskripte binden kann. Dies würde bedeuten, dass die miR-29b in ihrer physiologischen Wirkung eingeschränkt bzw. inhibiert würde. Dadurch könnte lncWISP1 indirekt die Expression der miR-29b Zieltranskripte (z.B. Kollagene) post-transkriptionell regulieren. Die Überprüfung dieser Hypothese war das Ziel weiterer Untersuchungen.

4.6 Einfluss der miR-29b auf die Kollagen-Expression

Für die miR-29b ist in diversen Zelllinien gezeigt, dass sie sowohl die Gen- als auch Proteinexpression verschiedener Kollagen unterdrückt (Kwiecinski et al., 2011; Liu et al., 2011; Qin et al., 2011; van Rooij et al., 2008; Wang et al., 2012; Xiao et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit sollte in HEK293 Zellen bestätigt werden, dass das vermehrte Vorhandensein der miR-29b in Form einer Zugabe von so genannten *mimics* (kleine, chemisch modifizierte doppelsträngige RNAs, die endogene miRs nachahmen und eine funktionelle Analyse der miRs ermöglichen) oder durch gezielte Überexpression zu einer Verringerung der Kollagensynthese führt.

4.6.1 MiR-29b reduziert die Kollagen I, III und IV-Expression

HEK293 Zellen wurden mit 10 nM oder 50 nM miR-29b *mimic* oder mit einer als Kontrolle dienenden miR *mimic* („*scrambled*“ miR) transfiziert und für 48 h inkubiert. Die miR-29b-Menge wurde dadurch um das 41- (10 nM) bzw. 128-fache (50 nM) gesteigert (Abb. 24A). Zusätzlich bewirkte eine Transfektion mit miR-29b *mimics* eine signifikante und konzentrationsabhängige Abnahme der Kollagen I, III und IV-Proteinmenge im Zellkulturüberstand (Abb. 24B). Dieser Effekt war für Kollagen I am stärksten ausgeprägt. Auch die Menge an COL1A1, COL3A1 und COL4A1 mRNA wurde durch die Transfektion des miR-29b *mimics* konzentrationsabhängig erniedrigt (Abb. 24C), wobei dieser Effekt wieder für die COL1A1 mRNA am deutlichsten war. Diese Ergebnisse zeigen, dass miR-29b in HEK293 Zellen die mRNA verschiedener Kollagene abbaut, sodass sowohl weniger Kollagen mRNA als auch weniger Kollagenprotein detektierbar ist.

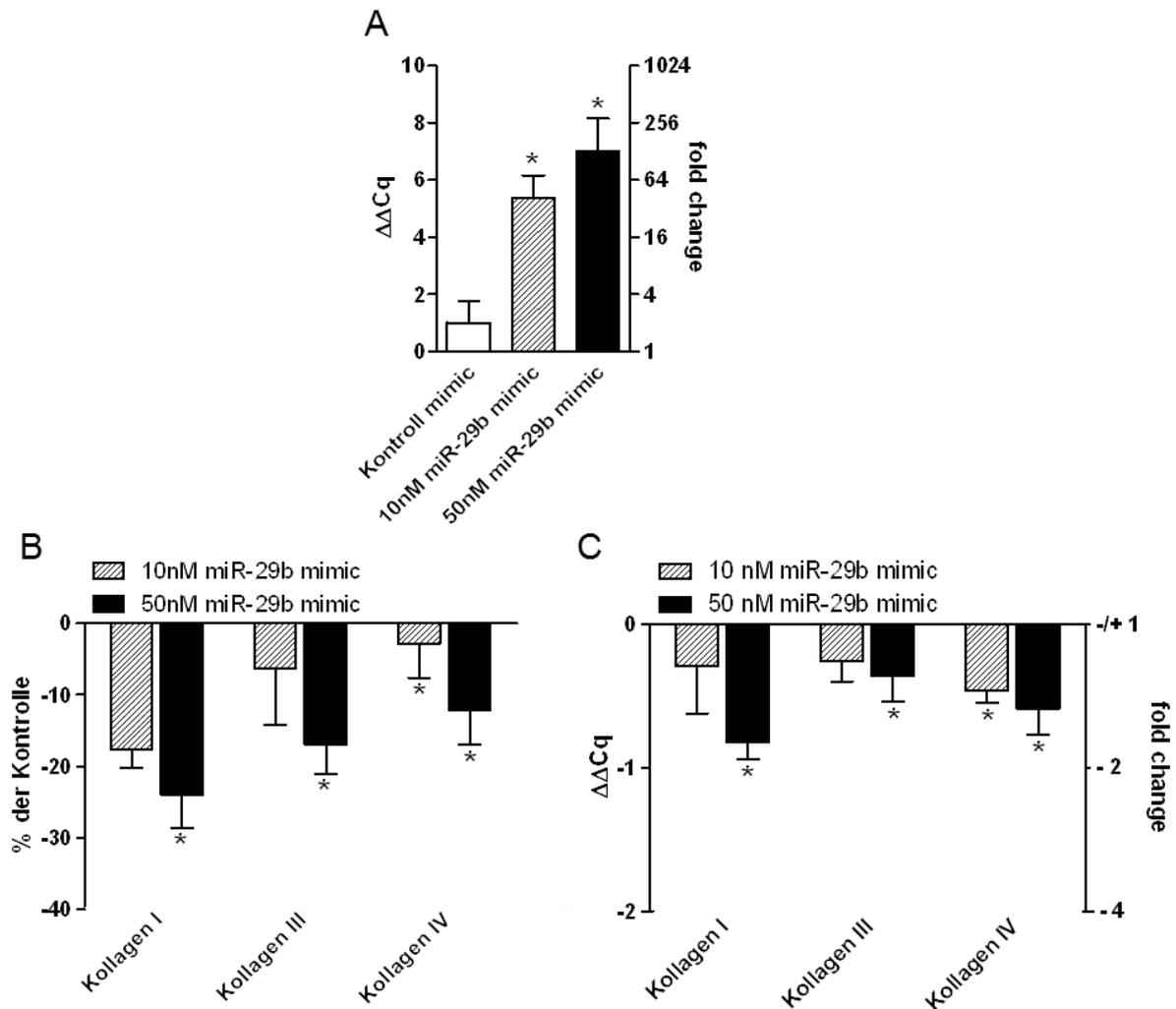


Abb. 24: Repression der Kollagenexpression durch miR-29b. HEK293 Zellen wurden 48 h mit 10 nM oder 50 nM miR-29b *mimic* oder einer Kontroll *mimic* transfiziert. Anschließend wurde die RNA isoliert und die miR-29b mRNA Expression mittels TaqMan® PCR bestimmt (A). Zusätzlich wurde entweder der Kollagen I, III bzw. IV Proteingehalt in den Zellkulturüberständen mittels ELISA (B) oder die RNA isoliert und die Kollagen I, III bzw. IV mRNA-Gehalt mittels qPCR ermittelt (C). $n \geq 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

Der Befund der post-transkriptionellen Regulation der Kollagenexpression durch miR-29b wurde zusätzlich dadurch bekräftigt, dass die Co-Transfektion eines miR-29b Expressionsplasmides eine signifikante Verringerung der Kollagen I 3'UTR-gekoppelten Luziferaseaktivität auf 46 % bewirkte (Abb. 25B). *In silico* sind für die Kollagen I 3'UTR drei miR-29b Bindestellen berechnet. Dieser Versuch belegt damit die Interaktion zwischen der miR-29b und den vorhergesagten Bindestellen.

Insgesamt zeigen die Versuche zum Einfluss der miR-29b auf die Kollagenexpression, dass die miR-29b auch in HEK293 Zellen anti-fibrotische Effekte ausübt.

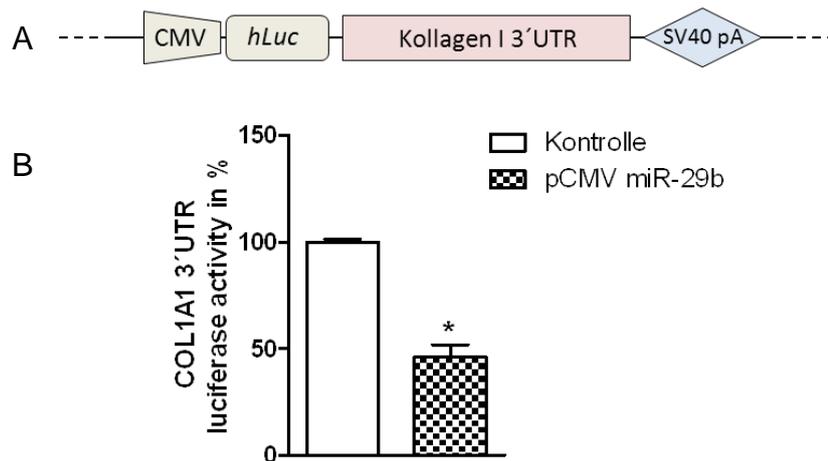


Abb. 25: Einfluss der miR-29b auf die Kollagen I 3'UTR-abhängige Luziferaseaktivität. (A) Schematische Darstellung eines Abschnitts des miR-29b Luziferaseplasmids, das ein *firefly* Luziferasegen enthält, das unter Kontrolle eines CMV Promotors steht, und an das die Kollagen I 3'UTR gekoppelt ist. (B) HEK293 Zellen wurden mit einem COL1A1 3'UTR Reporterplasmid alleine oder zusätzlich mit einem pCMV miR-29b Expressionsplasmid transfiziert und die Luziferaseaktivität nach 48 h gemessen. $n \geq 3$ (MW \pm SEM); * $p < 0,05$

4.6.2 Diskussion

Die miR-29b gehört zu einer Familie von microRNAs bestehend aus miR-29a, miR-29b1, miR-29b2 und miR-29c. Alle vier Mitglieder haben die gleiche Bindesequenz (*seed region*), mit der sie an Zieltranskripte binden. Die am besten beschriebene Eigenschaft aller miR-29 Mitglieder ist ihre anti-fibrotische Wirkung. Ihre anti-fibrotischen Effekte übt miR-29a/b/c aus, indem sie an mindestens 16 verschiedene extrazelluläre Matrixgene wie Kollagene binden kann und deren Expression beeinflusst (Kriegel et al., 2012). Die miR-29a/b/c verursachte verminderte Expression von Kollagenen findet in diversen Geweben statt (Kwecinski et al., 2011; Liu et al., 2011; Qin et al., 2011; van Rooij et al., 2008; Wang et al., 2012; Xiao et al.). So konnte in humanen Fibroblasten aus der Haut gezeigt werden, dass miR-29b die Bildung von Kollagen I post-transkriptionell unterdrückt (Cheng et al., 2012). Auch in hepatischen Sternzellen erwiesen sich alle miR-29 Mitglieder als Suppressor der Kollagen I und IV Synthese (Kwecinski et al., 2011). In Lungenfibroblasten aus der Maus können die miR-29 Mitglieder eine durch Bleomycin induzierte Lungenfibrose verhindern, indem der TGF- β /Smad3-Signalweg inhibiert und dadurch die Expression von Genen der extrazellulären Matrix wie Kollagen I und III, Fibronectin und *α -smooth muscle actin* unterdrückt wird (Xiao et al., 2012). Des Weiteren scheint miR-29a/b/c eine Rolle bei der Entwicklung einer kardialen Fibrose nach Myokardinfarkt zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass die miR-29 Mitglieder nach einem Myokardinfarkt vermindert exprimiert

werden, wodurch deren Zieltranskripte wie Kollagene verstärkt exprimiert werden (Van Rooij et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der miR-29b auf die Kollagenexpression in HEK293 Zellen untersucht. Dabei ergab sich, dass die Erhöhung der intrazellulären miR-29b-Menge (entweder durch Gabe von miR-29b *mimics* oder durch Transfektion eines miR-29b-überexprimierenden Plasmids) zur verminderten Expression der Kollagen I, III und IV mRNA- und Proteinmenge führte. Die Wirkung der miR-29b auf Kollagen I war dabei am stärksten ausgeprägt. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass die Kollagen I 3'UTR drei vorhergesagte miR-29b Bindestellen enthält, wohingegen die Kollagene III und IV lediglich zwei *in silico* vorhergesagte miR-29b Bindestellen enthalten.

Mittels des in dieser Arbeit generierten Kollagen I 3'UTR-gekoppelten Luziferase-Reportervektors konnte außerdem gezeigt werden, dass die miR-29b tatsächlich mit der 3'UTR des Kollagen I interagieren kann. Diese Beobachtungen sind übereinstimmend mit den Resultaten anderer Studien und beweisen, dass die miR-29b auch in der etablierten humanen Nierenzelllinie HEK293 die Synthese der extrazellulären Matrix beeinflusst. Dass der miR-29b eine Bedeutung bei der Entstehung einer Nierenfibrose zukommt, ist bereits beschrieben. So wurde gezeigt, dass es im Laufe von fibrotischen Veränderungen im Nierengewebe zur Aktivierung des TGF- β -Signalweges kommt. Dies wiederum führt zur Suppression der miR-29 Expression und geht mit einer verstärkten Synthese extrazellulärer Matrixproteine einher (Qin et al., 2011; Wang et al., 2012). In so genannten Dahl Salz-empfindlichen Ratten führt Gabe von Salz zu Bluthochdruck und interstitieller Nierenfibrose. Weiterhin wird die Salz-induzierte Nierenschädigung durch verminderte miR-29b Expression ausgelöst, was mit einer erhöhten Expression extrazellulärer Matrix einhergeht (Liu et al., 2011). Da in den vorherigen Ergebnissen gezeigt wurde, dass OTA wahrscheinlich durch vermehrte Expression von lncWISP1 zur verminderten Wirkung der miR-29b führt (siehe 4.5), wurde in den folgenden Untersuchungen überprüft, ob es einen Zusammenhang zwischen der fibrotischen Wirkung von OTA und der verminderten Aktivität der miR-29b gibt.

4.7 Die profibrotische Wirkung von Ochratoxin A ist miR-29b-abhängig

4.7.1 Ochratoxin A erhöht die Kollagenexpression post-transkriptionell

Die nephropathische Wirkung von OTA ist bereits in vielen Studien beschrieben. OTA führt zu entzündlichen und fibrotischen Veränderungen im Nierengewebe. Diese geht unter anderem mit einer erhöhten Sekretion von Kollagenen einher.

4.7.1.1 Einfluss von Ochratoxin A auf die Kollagen Proteinexpression

Um den Einfluss von OTA auf die Proteinexpression verschiedener Kollagene zu untersuchen, wurden HEK293 Zellen für 48 h mit 10 nM oder 100 nM OTA inkubiert und anschließend im Zellkulturüberstand die Kollagenmenge mittels ELISA quantifiziert. Die Abbildung 26 zeigt, dass eine Exposition mit 10 nM oder 100 nM OTA zur Erhöhung des Kollagen I, III und IV-Gehaltes im Zellkulturüberstand führte. Dies belegt den profibrotischen Effekt von OTA in HEK293 Zellen.

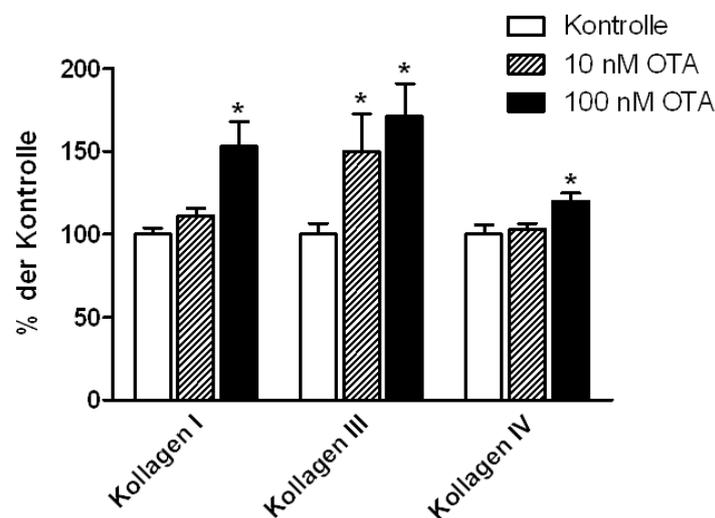


Abb. 26: Konzentrationsabhängigkeit der OTA-induzierten Kollagen Proteinexpression. HEK293 Zellen wurden 48 h mit 10 nM oder 100 nM OTA inkubiert und anschließend der Kollagen I, III und IV Gehalt in den Zellkulturüberständen mittels ELISA gemessen und auf den Proteingehalt in den Zelllysaten bezogen. n = 5 (MW±SEM); * p < 0,05

4.7.1.2 Einfluss von Ochratoxin A auf die Kollagen I, III und IV mRNA-Expression

Der transkriptionelle Einfluss von OTA auf die Kollagenexpression wurde mittels qPCR untersucht. Dafür wurden die HEK293 Zellen 48 h mit 10 nM oder 100 nM OTA inkubiert, anschließend die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Änderung der Expression der Kollagen I, III und IV mRNA bestimmt. Wie in Abbildung 27 ersichtlich ist, hatten weder 10 nM OTA noch 100 nM OTA einen Einfluss auf die Kollagen mRNA-Expression. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu dem Einfluss von OTA auf die Kollagen Proteinexpression (Abb. 26) und legt den Schluss nahe, dass die Kollagenexpression durch OTA post-transkriptionell reguliert wird.

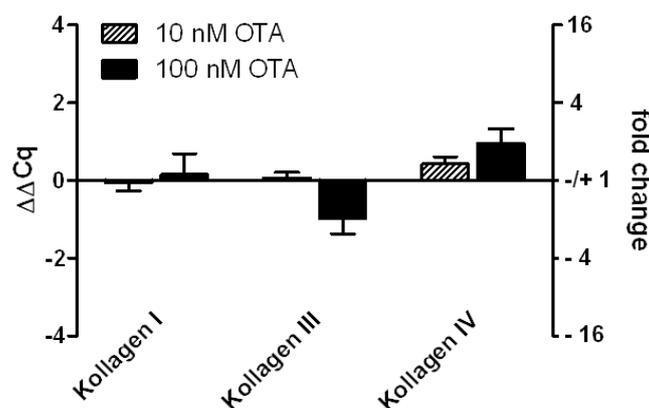


Abb. 27: Einfluss von OTA auf die Kollagen Genexpression. HEK293 Zellen wurden 48 h mit 10 nM oder 100 nM OTA inkubiert und anschließend die Änderung der Kollagen I, III und IV mRNA Expression mittels qPCR bestimmt. n = 3 (MW±SEM)

4.7.1.3 Einfluss von Ochratoxin A auf die Funktion der Kollagen I 3'UTR

Um die Hypothese der post-transkriptionellen Regulation der Kollagenexpression zu überprüfen, wurde untersucht, ob durch OTA Exposition die Funktion der 3'UTR der Kollagen-Transkripte beeinflusst werden kann. Dafür wurde der in Punkt 3.3.9.5 beschriebene Kollagen I-3'UTR enthaltende Luziferasevektor verwendet. Eine Beeinflussung der Kollagen I 3'UTR-Funktion würde sich in einer veränderten Luziferaseaktivität bemerkbar machen. *In silico* werden für die Kollagen I 3'UTR drei miR-29b Bindestellen vorhergesagt. Die Wechselwirkung der miR-29b mit der Kollagen I 3'UTR wurde bereits in 4.6.1 bestätigt (siehe Abb. 25). Exposition der mit diesem Reporterplasmid transfizierten Zellen mit 10 nM oder 100 nM OTA erhöhte konzentrationsabhängig die Luziferaseaktivität auf 111 % bzw. 157

% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 28). Dieses Ergebnis beweist, dass OTA die Bildung von zumindest Kollagen I post-transkriptionell beeinflussen kann.

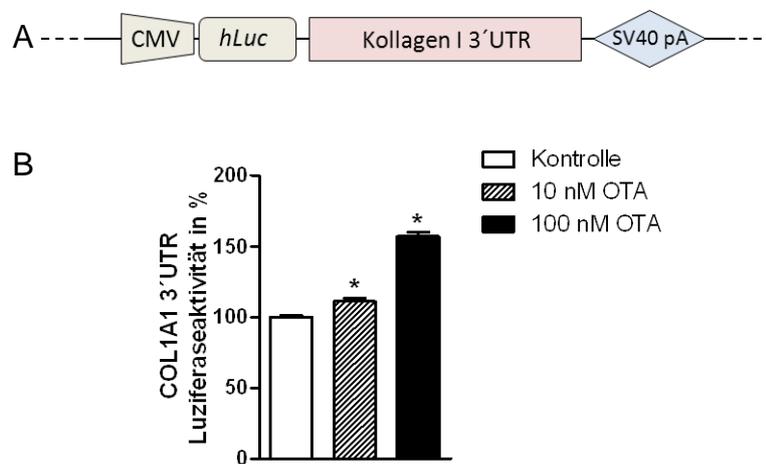


Abb. 28: Einfluss von OTA auf die Kollagen I 3'UTR-abhängige Luziferaseaktivität. (A) Schematische Darstellung eines Abschnitts des miR-29b Luziferase-Reporterplasmids, das ein *firefly* Luziferasegen (hLuc) enthält, das unter Kontrolle eines CMV Promotors steht und an das die 3'UTR des Kollagen I gekoppelt wurde. (B) HEK293 Zellen wurden mit 0,2 µg des Kollagen I 3'UTR-gekoppelten Luziferase-Reporterplasmids transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gegen OTA-freies, 10 nM OTA oder 100 nM OTA enthaltendes Medium ausgetauscht und nach weiteren 24 h die Luziferaseaktivität gemessen. n = 3 (MW±SEM); * p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrolle

4.7.2 Einfluss der miR-29b auf die Ochratoxin A-induzierte Erhöhung des Kollagen-Proteingehalts im Medium

Nachdem gezeigt werden konnte, dass OTA die Kollagensynthese post-transkriptionell steigert, sollte im Folgenden mittels Kollagen-ELISA gezeigt werden, dass diese Regulation von der miR-29b abhängig ist. Wie bereits gezeigt, bewirkt die Inkubation mit 10 nM oder 100 nM OTA eine Steigerung der Kollagen I, III und IV Proteinexpression (Abb. 26). Zusätzliche Transfektion mit einem Überschuss an miR-29b (*mimic*, 50 nM) führte dazu, dass OTA keinen Einfluss mehr auf die Kollagen Proteinexpression ausüben konnte (Abb. 29A). Unter diesen Expositionsbedingungen verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen der miR-29b Expression und der Expression des durch OTA induzierten lncWISP1 Transkripts zu Gunsten der miR-29b (Abb. 29B), sodass die miR-29b in sehr hoher Kopienzahl vorliegt, also auf hohem Niveau geklemmt ist. Durch den Überschuss an miR-29b reicht die Kapazität des durch OTA induzierten miR-29b Schwammes (lncWISP1, bzw. andere, noch nicht

identifizierte Schwämme) vermutlich nicht mehr aus, um die gesamte miR-29b alternativ zu binden. Dadurch kann die überschüssige miR-29b an die 3'UTR der Kollagene binden und deren Expression inhibieren (Abb. 29C).

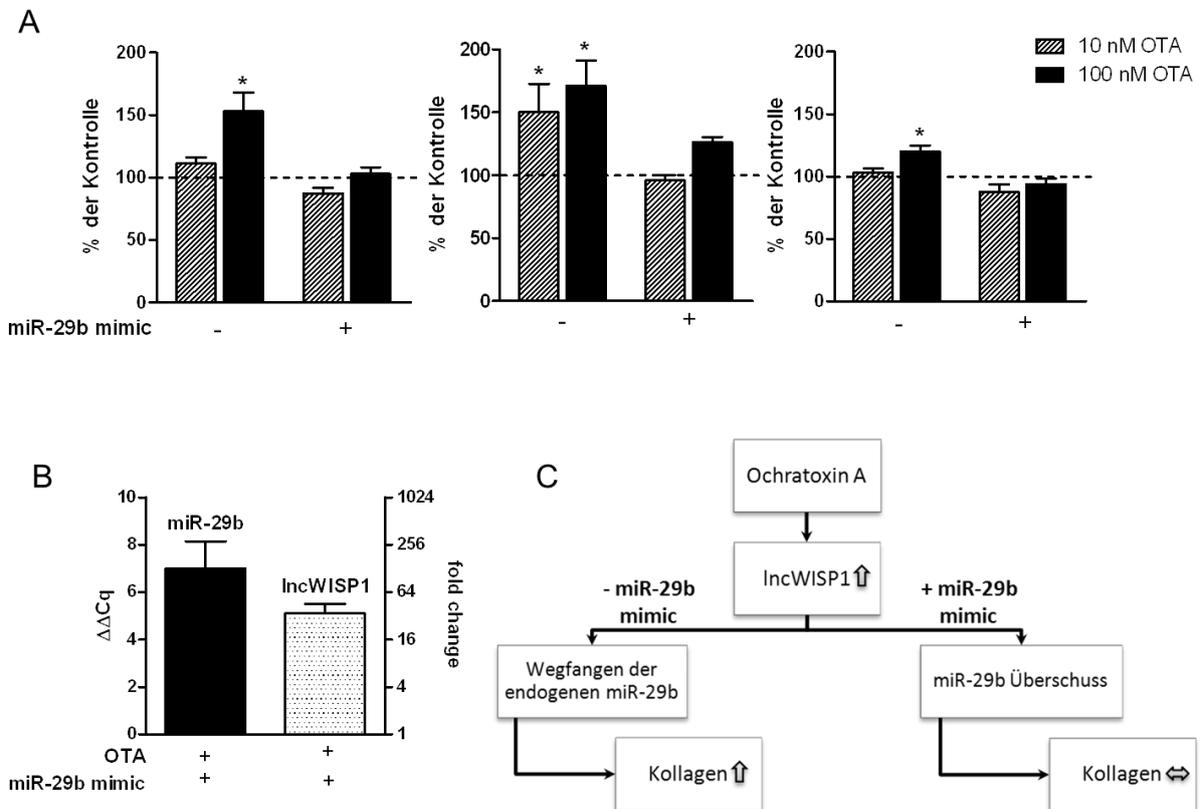


Abb. 29: Einfluss erhöhter miR-29b-Mengen auf die durch OTA induzierte Kollagen Proteinexpression. (A) HEK293 Zellen wurden entweder mit 50 nM miR-29b *mimic* oder einer Kontroll *mimic* transfiziert und nach 24 h das Medium gegen 10 nM oder 100 nM OTA enthaltendes Medium ausgetauscht. Nach weiteren 48 h wurde der Kollagengehalt im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt und auf den Proteingehalt in den Zelllysaten bezogen. (B) zeigt, dass es durch eine gleichzeitige Inkubation mit OTA und miR-29b mimics zur verstärkten Expression der miR-29b im Vergleich zur lncWISP1 Expression kommt. (C) Schematische Darstellung der Versuchsstrategie und der Konsequenzen auf die in A gezeigte Kollagenexpression. n = 3 (MW±SEM); * p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrolle

4.7.3 Diskussion

Fibrotische Gewebsveränderungen sind durch die vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix (z.B. Kollagen) gekennzeichnet und stellen einen wichtigen Faktor bei der Entstehung von Nierenerkrankungen dar (Boor et al., 2010; Klahr and Morrissey, 2002). OTA wird für die Entstehung fibrotischer Nierenerkrankungen in Schweinen verantwortlich gemacht (Elling and Moller, 1973; Stoev et al., 2012). Auch im Menschen wird die vermehrte Aufnahme von OTA über die Nahrung mit dem Auftreten fibrotischer Nierenerkrankungen wie z.B. der

Balkan Nephropathie in Zusammenhang gebracht (Peraica et al., 2008; Vrabcheva et al., 2004). Ebenso zeigten Zellkulturexperimente, dass OTA die Sekretion von Kollagenen sowohl in Nierenzelllinien als auch in Nierenzellen in Primärkultur erhöht (Sauvant et al., 2005b; Schwerdt et al., 2007). Um dies zu bestätigen, wurde in der vorliegenden Arbeit die OTA-induzierte Sekretion von Kollagenen untersucht. Die Inkubation mit 10 nM oder 100 nM OTA führte zur konzentrationsabhängigen Zunahme der Kollagen I, III und IV-Proteinmenge im Medium, wodurch gezeigt werden konnte, dass nanomolare OTA-Konzentrationen die Entstehung fibrotischer Veränderungen in HEK293 Zellen begünstigt. Weiterhin wurde der Einfluss von OTA auf die Genexpression der Kollagene I, III und IV untersucht. Dabei zeigte sich, dass Inkubation mit OTA nicht zu einer geänderten Kollagen mRNA-Expression führte. Da die Proteinmenge der Kollagene sich hingegen erhöhte, deutet dies darauf hin, dass durch OTA die Kollagenbildung post-transkriptionell beeinflusst wurde. Diese Schlussfolgerung konnte durch den Einsatz des Kollagen I 3'UTR Luziferase-Reportervektors weiter erhärtet werden. Inkubation mit 10 nM oder 100 nM OTA führte zum konzentrationsabhängigen Anstieg der COL1A1 3'UTR-gekoppelten Luziferaseaktivität. Diese Beobachtung unterstützt die in 4.5.3 formulierte Hypothese, dass durch OTA Exposition über die Induktion der lncWISP1-Expression alternative miR-29b-Bindestellen bereitgestellt werden und so miR-29b nur noch in geringerem Maß an die Kollagen I 3'UTR binden kann. LncWISP1 würde demzufolge als sogenannte kompetitive endogene RNA (ceRNA) bzw. als endogener miR-Schwamm wirken. Kompetitive endogene RNAs oder miR-Schwämme regulieren andere RNA-Transkripte, indem sie um gemeinsame miRs konkurrieren (Ebert and Sharp, 2010; Salmena et al., 2011).

Die Untersuchung der Schwamm-Funktion der lncRNAs ist ein sehr junges Forschungsgebiet. Daher gibt es bisher nur wenige Veröffentlichungen, die dieses Phänomen beschreiben. Zum ersten Mal wurde dieser Mechanismus im Jahr 2007 in Pflanzen dargestellt (Franco-Zorrilla et al., 2007). In den darauffolgenden Jahren konnte die Schwamm-Funktion von lncRNAs jedoch auch im Tier und im Menschen gezeigt werden (Cazalla et al., 2010; Cesana et al., 2011; Wang et al., 2010). So beeinflusst die Muskel-spezifische lncRNA linc-MD1 die Muskeldifferenzierung, indem linc-MD1 die miR-133 und miR-135 wegfängt und dadurch deren Ziel-Transkripte, welche Transkriptionsfaktoren der Muskel-spezifischen Genexpression darstellen, reguliert (Cesana et al., 2011). Dabei ist zu bemerken, dass auch nukleär lokalisierte RNAs, sowohl endogene als auch artifizielle, als miR-Schwamm fungieren können (Cazalla et al., 2010; Ebert and Sharp, 2010).

Um auch in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Relevanz der Expression des miR-29b-Schwammes lncWISP1 aufzuzeigen, sollte der Zusammenhang zwischen der fibrotischen Wirkung von OTA und der anti-fibrotischen Wirkung der miR-29b hergestellt werden. Dafür wurde miR-29b mittels *mimics* im Überschuss zu den Zellen gegeben (miR-29b Klemme) und anschließend der Effekt von OTA auf die Kollagen-Proteinexpression untersucht. Dabei ergab sich, dass der Überschuss an miR-29b die OTA-induzierte Kollagenbildung verhinderte. Durch dieses Manöver hat sich das Verhältnis zwischen der Menge an miR-29b und dem OTA-induzierten lncWISP1-Transkript zu Gunsten der miR-29b geändert, sodass das miR-29b-Niveau nicht unter eine funktionell relevante Menge gefallen ist. Dies zeigt, dass die profibrotische Wirkung von OTA abhängig von der miR-29b ist und deutet erneut darauf hin, dass das alternative Binden der miR-29b durch lncWISP1 zur erhöhten Kollagen-Proteinexpression beiträgt.

5. Zusammenfassende Diskussion

Eine durchschnittliche Ernährung führt zu einer nahezu unvermeidbaren Aufnahme von OTA, weshalb es in niedrigen Konzentrationen (~ 1 nM) im menschlichen Blut detektiert werden kann (Coronel et al., 2010; Miraglia M, 2002; Sauvant et al., 2005b; Schwerdt et al., 2007). Durch Anreicherungsmechanismen können im Nierengewebe höhere Konzentrationen erreicht werden. Untersuchungen der letzten Jahre haben gezeigt, dass OTA in nanomolaren Konzentrationen subtile Einflüsse auf Nierenzellen ausübt, die zu einem profibrotischen Geschehen führen (Sauvant et al., 2005b; Schwerdt et al., 2007). Die diesem Prozess zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher jedoch wenig verstanden, beinhalten aber höchstwahrscheinlich Genexpressionsänderungen.

Auf Grund dessen wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von OTA auf die Genexpression mittels RT-qPCR-Arrays in humanen primären proximalen Tubuluszellen (RPTEC) untersucht. Die RPTEC Zellen wurden über einen verlängerten Zeitraum (14 Tage) mit 10 nM OTA exponiert. Diese Bedingungen gewährleisteten eine Situation, die im Rahmen der Zellkultur so nah wie möglich die Verhältnisse im menschlichen Körper widerspiegelt. Die RT-qPCR-Arrays ergaben eine Expressionsänderung von Genen, die an malignen und inflammatorischen Prozessen sowie an der epidermalen-zu-mesenchymalen Transition beteiligt sind. Diese Ergebnisse konnten mittels qPCR in den humanen Nierenzellen RPTEC, HEK293 und HK-2 teilweise bestätigt werden. Dabei war die stärkste OTA-induzierte Expressionssteigerung bei der WISP1 mRNA zu beobachten. Diese vermehrte Expression war in humanen Lungenfibroblasten (NHLF Zellen) jedoch nicht nachzuweisen. Dies spricht für einen Zelltyp- und Gewebe-spezifischen Effekt von OTA, der auch in anderen Studien bereits beschrieben wurde (O'Brien et al., 2001). WISP1 ist ein sezerniertes Protein, das zu einer Familie von Bindegewebswachstumsfaktoren gehört und sowohl während der Organentwicklung als auch während pathologischer Prozesse, wie Fibrose und Krebs, überexprimiert wird (Chen et al., 2007; Königshoff et al., 2009; Nagai and Watanabe, 2011; Saxena et al., 2001). Da es nicht möglich war, mittels Antikörpern ein WISP1 Protein zu detektieren, wurde das durch OTA Exposition vermehrt gebildete WISP1 Transkript detailliert untersucht. Dabei zeigte sich, dass durch OTA Exposition weder das Vollängentranskript noch eine der bereits beschriebenen Splicevarianten von WISP1 exprimiert werden, sondern ein langes, vermutlich nicht-kodierendes Transkript von WISP1, welches einen Teil der 3'UTR beinhaltet und vor allem im Nukleus lokalisiert ist. Dieses Transkript wurde lncWISP1 (= long noncoding WISP1) genannt.

Da es sich bei lncWISP1 um ein alternatives Transkript handelt, stellte sich die Frage, ob zur Transkription von lncWISP1 der kanonische Signalweg, der zur Expression der ursprünglichen WISP1 mRNA führt und β -Catenin beinhaltet, genutzt wird. Es konnten jedoch sowohl der klassische Signalweg als auch andere Signalwege (JNK, p38, PKA, PKC, MSK1) bei der lncWISP1 Expression ausgeschlossen werden. Es zeigte sich hingegen, dass die Transkription über den MEK/ERK-Signalweg erfolgt. Darüber hinaus wird für die lncWISP1 Expression ein alternativer Promotor genutzt, wohingegen der klassische WISP1 Promotor nicht durch OTA induziert wird. Die Verwendung alternativer Promotoren stellt einen weit verbreiteten Mechanismus (bis zu 50 % aller humanen Gene) dar, der zur Expression von alternativen Transkripten führen kann und dadurch die Vielfalt und Flexibilität der Genexpression erhöht (Ayoubi and Van De Ven, 1996; Kimura et al., 2006; Baek et al., 2007; Davuluri et al., 2008). Um den Signalweg, der zur Induktion der lncWISP1 Expression führt, umfassender aufzuklären, sollten in zukünftigen Untersuchungen sowohl Interaktionspartner von OTA im Zytosol als auch die funktionelle Gruppe im OTA-Molekül, die für die Toxizität verantwortlich ist, identifiziert werden. Dies könnte z.B. unter Verwendung von OTA-Derivaten erfolgen, bei denen das Chlorid-Ion durch andere Halogene ausgetauscht ist.

Dass nicht-kodierende RNAs eine essentielle Rolle in physiologischen als auch pathologischen Prozessen spielen, haben Forschungsergebnisse der letzten Jahre gezeigt. Auf Grund dessen war es von besonderem Interesse die Funktion der hier erstmals beschriebenen langen nicht-kodierenden RNA lncWISP1 zu bestimmen. LncRNAs können die Genexpression unter anderem post-transkriptionell regulieren, indem sie z.B. miRs wie ein Schwamm binden. Daher wurde zunächst *in silico* nach potentiellen miRs gesucht, die mit lncWISP1 interagieren können. Dabei stellte sich heraus, dass lncWISP1 in seiner 3'UTR unter anderem eine Bindestelle für die miR-29b, die eine der in der Literatur gut beschriebenen miR mit vorwiegend anti-fibrotischen Wirkungen ist (Kriegel et al., 2012; Patel and Nouredine, 2012), enthält. Die Interaktion zwischen der WISP1 3'UTR und der miR-29b konnte mit Hilfe eines die WISP1 3'UTR-enthaltenden Reportervektors gezeigt werden. Eine Inkubation mit OTA bewirkte einen Anstieg der WISP1 3'UTR-abhängigen Luziferaseaktivität. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Effekt wäre, dass OTA durch Induktion der lncWISP1-Expression alternative miR-29b-Bindestellen bereitstellt, wodurch weniger dieser miRs an den Reporter-Vektor binden können und so die Luziferase-Aktivität gesteigert wird. Dies deutet darauf hin, dass die miR-29b post-transkriptionell durch alternative Bindung reguliert wird. lncWISP1 würde demzufolge als sogenannte kompetitive

endogene RNA (ceRNA) bzw. als endogener miR-Schwamm wirken, was bedeutet, dass lncWISP1 andere RNA-Transkripte reguliert, indem es um gemeinsame miRs konkurriert (Ebert and Sharp, 2010; Salmena et al., 2011). Allerdings würde die nukleäre Lokalisation von lncWISP1 einen Import der miR-29b in den Zellkern erfordern, wodurch die Bindungsrate der miR-29b an die im Zytosol lokalisierten Ziel-mRNA verringert wäre. Um den nukleären Import der miR-29b zu zeigen, ist es in weiteren Untersuchungen wichtig, die genaue subzelluläre Lokalisation der miR-29b vor und nach einer Überexpression lncWISP1 zu bestimmen. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben der miR-29b auch andere miRs, die ebenso mit lncWISP1 interagieren können, eine Rolle bei der Schwamm-Funktion von lncWISP1 spielen. Da die miR-29b jedoch einen wichtigen Einfluss auf die Matrixhomöostase ausübt und dadurch fibrotische Gewebsveränderungen verhindern kann (Liu et al., 2011; Wang et al., 2012; Xiao et al., 2012), wurde in der vorliegenden Arbeit der Fokus auf diese miR gelegt. Tatsächlich konnte in HEK293 Zellen gezeigt werden, dass externe Gabe der miR-29b zur verminderten Protein- und mRNA-Expression der Kollagene I, III und IV führt. Darüber hinaus verhinderte ein Überschuss der miR-29b (miR-29b Klemme) die OTA-induzierte gesteigerte Kollagen Proteinexpression. Diese Beobachtung zeigt, dass die miR-29b an der OTA-vermittelten gesteigerten Matrixproduktion beteiligt ist.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte in der vorliegenden Arbeit eine erweiterte Hypothese für die profibrotischen Effekte von OTA aufgestellt werden. Demnach trägt OTA durch Induktion einer nukleären, langen nicht-kodierenden RNA (lncWISP1), welche die anti-fibrotische miR-29b in ihrer Wirkung inhibiert, indirekt zur gesteigerten Matrixbildung bei und begünstigt so fibrotische Gewebsveränderungen (Abb. 30).

Offen bleibt, in welchem Umfang lncWISP1 allein für die profibrotischen Effekte von OTA verantwortlich ist bzw. ob und inwiefern andere molekulare Mechanismen (evtl. zusätzlich exprimierte miR-Schwämme) daran beteiligt sind. Um dies abzuschätzen sollte durch gezielte Überexpression von lncWISP1 (unabhängig von OTA) die für OTA gezeigten Effekte auf die miR-29b-Wirkung und die Kollagenexpression wiederholt bzw. bestätigt werden. Weiterhin sollte die miR-29b-Bindestelle in lncWISP1 gezielt mutiert oder deletiert werden, um zu zeigen, dass die Effekte auf die miR-29b-Aktivität und die anti-fibrotische Wirkung dadurch aufgehoben werden. Alternativ könnte lncWISP1 auch durch die Verwendung von siRNA inhibiert werden.

Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob lncWISP1 weitere Funktionen im Zellkern zukommen, z.B. die Beeinflussung anderer miRs oder Genexpressionsänderungen, bzw. ob die lncWISP1 Expression auch durch andere Zellstressoren induziert wird und lncWISP1

somit einen Indikator darstellt, der einen allgemeinen Stresszustand anzeigt. Diesbezüglich ist es auch wichtig, die lncWISP1-Expression in pathologischem humanem Nierengewebe zu untersuchen, da es vorstellbar ist, dass lncWISP1 einen neuartigen, diagnostischen oder prognostischen Biomarker darstellt, der zur Risikoabschätzung fibrotischer sowie maligner Nierenerkrankungen verwendet werden könnte.

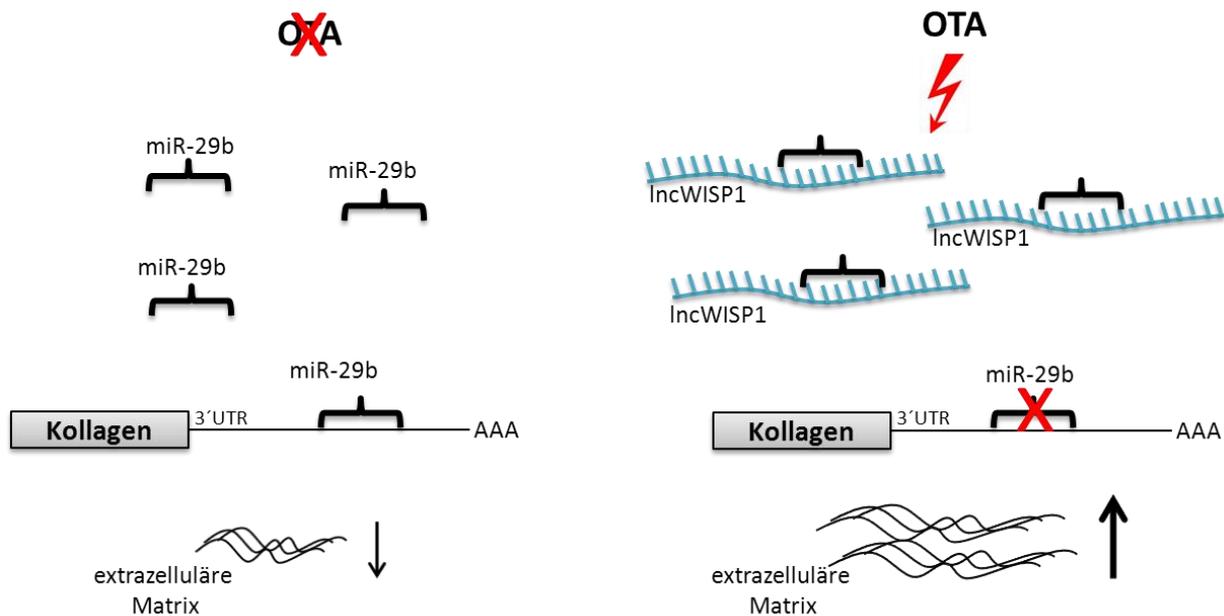


Abb. 30: Hypothetisches Modell der OTA-induzierten Kollagenbildung. In Abwesenheit von OTA (links) wird die Kollagen mRNA durch Bindung der miR-29b inaktiviert, was zur verminderten Bildung extrazellulärer Matrix beiträgt. In Anwesenheit von OTA (rechts) wird die miR-29b durch OTA-induziertes lncWISP1 im Nukleus alternativ gebunden und die Kollagen mRNA wird translatiert, wodurch eine erhöhte Menge an extrazellulärer Matrix entsteht.

6. Schlussfolgerung

Im Rahmen der Dissertation sollten molekularbiologische Grundlagen der nephropathischen Wirkung von OTA aufgeklärt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt:

- OTA in nanomolaren Konzentrationen verändert die Expression von Genen, die mit Entzündungsprozessen, einer malignen Transformation und einer epidermalen-zu-mesenchymalen Transition assoziiert sind. Diese Expressionsänderungen sind für die Gene WISP1, TNF, LTA, CDKN2A und GYS1 in RPTEC, HEK293 und HK-2 Zellen validierbar, wobei die stärksten Expressionsänderungen bei WISP1 auftreten.
- Durch OTA wird ein alternatives Transkript von WISP1 induziert, bei dem es sich um eine nukleär angereicherte, lange nicht-Protein-kodierende RNA handelt, die lncWISP1 genannt wurde.
- lncWISP1 wird durch OTA zeit- und konzentrationsabhängig in den epithelialen Nierenzellen RPTEC und HEK293 vermehrt exprimiert, in primären Lungenfibroblasten (NHLF) jedoch nicht. Dies zeigt den Zell- und Gewebespezifischen Effekt von OTA.
- Die OTA-vermittelte lncWISP1 Expression wird über den MEK/ERK-Signalweg induziert, wobei die Transkription über die Aktivierung eines alternativen Promotors erfolgt.
- MiR-29b kann mit der miR-29b Bindestelle im lncWISP1 interagieren.
- MiR-29b senkt in HEK293 Zellen die Kollagenexpression sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene.
- OTA vermindert konzentrationsabhängig die Wirkung der miR-29b im Luziferase-Reporter-Assay, wohingegen die Expression der miR-29b nicht beeinflusst wird.
- OTA steigert die Proteinexpression von Kollagenen. Diese profibrotische Wirkung kann durch einen Überschuss an miR-29b inhibiert werden.

Schlussfolgernd kann die profibrotische Wirkung von OTA dadurch erklärt werden, dass OTA die Expression von lncWISP1 induziert. lncWISP1 wiederum stellt alternative Bindestellen für die miR-29b bereit, wodurch miR-29b nicht mehr an ihre eigentlichen Zieltranskripte (u.a. diverse Kollagene) bindet, sodass deren Expression moduliert wird. Damit begünstigt lncWISP1 und somit auch OTA indirekt fibrotische Prozesse, indem die anti-fibrotische miR-29b in ihrer Wirkung unterdrückt wird.

Literaturverzeichnis

- Al-Anati, L., and Petzinger, E. (2006). Immunotoxic activity of ochratoxin A. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 29, 79–90.
- Aleo, M.D., Wyatt, R.D., and Schnellmann, R.G. (1991). Mitochondrial dysfunction is an early event in ochratoxin A but not oosporein toxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicology and Applied Pharmacology* 107, 73–80.
- Anzai, N., Jutabha, P., and Endou, H. (2010). Molecular mechanism of ochratoxin a transport in the kidney. *Toxins* 2, 1381–1398.
- Arbillaga, L., Azqueta, A., Van Delft, J.H.M., and López de Cerain, A. (2007). In vitro gene expression data supporting a DNA non-reactive genotoxic mechanism for ochratoxin A. *Toxicology and Applied Pharmacology* 220, 216–224.
- Ayoubi, T. a, and Van De Ven, W.J. (1996). Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* 10, 453–460.
- Babu, E., Takeda, M., Narikawa, S., Kobayashi, Y., Enomoto, A., Tojo, A., Cha, S.H., Sekine, T., Sakthisekaran, D., and Endou, H. (2002). Role of human organic anion transporter 4 in the transport of ochratoxin A. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1590, 64–75.
- Baek, D., Davis, C., Ewing, B., Gordon, D., and Green, P. (2007). Characterization and predictive discovery of evolutionarily conserved mammalian alternative promoters. *Genome Research* 17, 145–155.
- Bartel, D.P., Lee, R., and Feinbaum, R. (2004). MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function *Genomics : The miRNA Genes.* *Cell* 116, 281–297.
- Benesic, A., Mildenerger, S., and Gekle, M. (2000). Nephritogenic ochratoxin A interferes with hormonal signalling in immortalized human kidney epithelial cells. *European Journal of Physiology* 439, 278–287.
- Berschneider, B., and Königshoff, M. (2011). WNT1 inducible signaling pathway protein 1 (WISP1): a novel mediator linking development and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 43, 306–309.
- Boor, P., Ostendorf, T., and Floege, J. (2010). Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets. *Nat Rev Nephrol* 6, 643–656.
- Brigstock, D.R. (2003). The CCN family: a new stimulus package. *The Journal of Endocrinology* 178, 169–175.
- Bullerman, L.B., and Bianchini, A. (2007). Stability of mycotoxins during food processing. *International Journal of Food Microbiology* 119, 140–146.

- Calvisi, D.F., Conner, E. a, Ladu, S., Lemmer, E.R., Factor, V.M., and Thorgeirsson, S.S. (2005). Activation of the canonical Wnt/beta-catenin pathway confers growth advantages in c-Myc/E2F1 transgenic mouse model of liver cancer. *Journal of Hepatology* 42, 842–849.
- Castegnaro, M., Canadas, D., Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Chernozemsky, I.N., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Balkan endemic nephropathy: role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research* 50, 519–529.
- Cazalla, D., Yario, T., Steitz, J. a, and Steitz, J. (2010). Down-regulation of a host microRNA by a Herpesvirus saimiri noncoding RNA. *Science* 328, 1563–1566.
- Cervello, M., Giannitrapani, L., Labbozzetta, M., Notarbartolo, M., D'Alessandro, N., Lampiasi, N., Azzolina, A., and Montalto, G. (2004). Expression of WISPs and of their novel alternative variants in human hepatocellular carcinoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1028, 432–439.
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369.
- Chen, L.-L., and Carmichael, G.G. (2010). Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Current Opinion in Cell Biology* 22, 357–364.
- Chen, P.-P., Li, W.-J., Wang, Y., Zhao, S., Li, D.-Y., Feng, L.-Y., Shi, X.-L., Koeffler, H.P., Tong, X.-J., and Xie, D. (2007). Expression of Cyr61, CTGF, and WISP-1 correlates with clinical features of lung cancer. *PloS One* 2, e534.
- Cheng, J., Wang, Y., Wang, D., and Wu, Y. (2012). Identification of Collagen 1 as a Post-transcriptional Target of miR-29b in Skin Fibroblasts: Therapeutic Implication for Scar Reduction. *The American Journal of the Medical Sciences* 0, 1–6.
- Chopra, M., Link, P., Michels, C., and Schrenk, D. (2010). Characterization of ochratoxin A-induced apoptosis in primary rat hepatocytes. *Cell Biology and Toxicology* 26, 239–254.
- Colston, J.T., De la Rosa, S.D., Koehler, M., Gonzales, K., Mestril, R., Freeman, G.L., Bailey, S.R., and Chandrasekar, B. (2007). Wnt-induced secreted protein-1 is a prohypertrophic and profibrotic growth factor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1839–1846.
- Coronel, M.B., Sanchis, V., Ramos, a J., and Marin, S. (2010). Review. Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation. *Food Science and Technology International* 16, 5–18.
- Costa, F.F. (2007). Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene* 386, 1–10.
- Creppy, E.E., Kern, D., Steyn, P.S., Vlegaar, R., Röschenhaler, R., and Dirheimer, G. (1983). Effect of OTA analogues on yeast aminoacyl-tRNA synthetases. *Toxicology Letters* 19, 217–224.
- Crick, F. (1970). Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* 227, 6–8.

- Davuluri, R. V., Suzuki, Y., Sugano, S., Plass, C., and Huang, T.H.-M. (2008). The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends in Genetics* 24, 167–177.
- Derrien, T., Guigó, R., and Johnson, R. (2012). The Long Non-Coding RNAs: A New (P)layer in the “Dark Matter”. *Frontiers in Genetics* 2, 1–6.
- Djebali, S., Davis, C. a, Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., et al. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature* 489, 101–108.
- Ebert, M.S., and Sharp, P.A. (2010). Emerging Roles for Natural MicroRNA Sponges Minireview. *Curr Biol* 20, R858–R861.
- 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. *The EFSA Journal* 365, 1–56.
- Elling, F., and Moller, T. (1973). Mycotoxic nephropathy in pigs. *Bulletin of the World Health Organization* 49, 411–418.
- Fernández-Cruz, M.L., Mansilla, M.L., and Tadeo, J.L. (2010). Mycotoxins in fruits and their processed products: Analysis, occurrence and health implications. *Journal of Advanced Research* 1, 113–122.
- Foulkes, W.D., Flanders, T.Y., Pollock, P.M., Haywardt, N.K., and Gene, C. (1997). The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular Medicine* 3, 5–20.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., García, J.A., and Paz-Ares, J. (2007). Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 39, 1033–1037.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 19, 92–105.
- Frohman, M.A., Dush, M.K., and Martin, G.R. (1988). gene-specific primer. *PNAS* 85, 8998–9002.
- Gagliano, N., Donne, I.D., Torri, C., Migliori, M., Grizzi, F., Milzani, A., Filippi, C., Annoni, G., Colombo, P., Costa, F., et al. (2006). Early cytotoxic effects of ochratoxin A in rat liver: a morphological, biochemical and molecular study. *Toxicology* 225, 214–224.
- Gekle, M., Pollock, C., and Silbernagl, S. (1995). Time- and Concentration-Dependent Ochratoxin A on Growth of Proximal Primary Culture1 Biphasic Effect of Tubular Cells in dysfunction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 275, 397–404.
- Gekle, M., Sauvant, C., and Schwerdt, G. (2005). Ochratoxin A at nanomolar concentrations: a signal modulator in renal cells. *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 118–130.
- Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, a M., Creppy, E.E., Dirheimer, G., and Pfohl-Leskowicz, a (1995). Formation of ochratoxin A metabolites and DNA-adducts in monkey kidney cells. *Chemico-biological Interactions* 95, 175–187.

- Hagelberg, S., Hult, K., and Fuchs, R. (1989). Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties. *Journal of Applied Toxicology* 9, 91–96.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 000, 1–7.
- He, L., and Hannon, G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics* 5, 522–531.
- Hou, C.-H., Chiang, Y.-C., Fong, Y.-C., and Tang, C.-H. (2011). WISP-1 increases MMP-2 expression and cell motility in human chondrosarcoma cells. *Biochemical Pharmacology* 81, 1286–1295.
- Huff, W.E., Doerr, J. a, and Hamilton, P.B. (1979). Decreased glycogen mobilization during ochratoxicosis in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 37, 122–126.
- Inkson, C. a, Ono, M., Bi, Y., Kuznetsov, S. a, Fisher, L.W., and Young, M.F. (2009). The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Cells, Tissues, Organs* 189, 153–157.
- Jennings, P., Weiland, C., Limonciel, A., Bloch, K.M., Radford, R., Aschauer, L., McMorrow, T., Wilmes, A., Pfaller, W., Ahr, H.J., et al. (2012). Transcriptomic alterations induced by Ochratoxin A in rat and human renal proximal tubular in vitro models and comparison to a rat in vivo model. *Archives of Toxicology* 86, 571–589.
- El Khoury, A., and Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. *Toxins* 2, 461–493.
- Kimura, K., Wakamatsu, A., Suzuki, Y., Ota, T., Nishikawa, T., Yamashita, R., Yamamoto, J., Sekine, M., Tsuritani, K., Wakaguri, H., et al. (2006). Diversification of transcriptional modulation: large-scale identification and characterization of putative alternative promoters of human genes. *Genome Res.* 16, 55–65.
- Klahr, S., and Morrissey, J. (2002). Obstructive nephropathy and renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 283, F861–875.
- Königshoff, M., Kramer, M., Balsara, N., Wilhelm, J., Amarie, O.V., Jahn, A., Rose, F., Fink, L., Seeger, W., Schaefer, L., et al. (2009). WNT1-inducible signaling protein – 1 mediates pulmonary fibrosis in mice and is upregulated in humans with idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 119, 772–787.
- Kriegel, A.J., Liu, Y., Fang, Y., Ding, X., and Liang, M. (2012). The miR-29 family : genomics , cell biology , and relevance to renal and cardiovascular injury and cardiovascular injury. *Physiol. Genomics* 44, 237–244.
- Kumagai, S. (1985). Ochratoxin A: plasma concentration and excretion into bile and urine in albumin-deficient rats. *Food and Chemical Toxicology* 23, 941–943.

- Kusenda, B., Mraz, M., Mayer, J., and Pospisilova, S. (2006). MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* *150*, 205–215.
- Kwieceński, M., Noetel, A., Elfimova, N., Trebicka, J., Schievenbusch, S., Strack, I., Molnar, L., Von Brandenstein, M., Töx, U., Nischt, R., et al. (2011). Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PLoS One* *6*, 1–13.
- Kwieceński, M., Elfimova, N., and Noetel, A. (2012). Expression of platelet-derived growth factor-C and insulin-like growth factor I in hepatic stellate cells is inhibited by miR-29. *Laboratory Investigation* *00*, 1–10.
- Leier, I., Hummel-Eisenbeiss, J., Cui, Y., and Keppler, D. (2000). ATP-dependent para-aminohippurate transport by apical multidrug resistance protein MRP2. *Kidney International* *57*, 1636–1642.
- Liggett, W.H., and Sidransky, D. (1998). Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer. *J Clin Oncol* *16*, 1197–1206.
- Liu, Y., Taylor, N.E., Lu, L., Jr, A.W.C., Nicholas, R., Yeo, N.C., and Liang, M. (2011). Renal medullary microRNAs in Dahl salt-sensitive rats: miR-29b regulates several collagens and related genes. *Hypertension* *55*, 974–982.
- Luhe, A., Hildebrand, H., Bach, U., Dingermann, T., and Ahr, H.-J. (2003). A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicological Sciences* *73*, 315–328.
- Mally, A. (2012). Ochratoxin a and mitotic disruption: mode of action analysis of renal tumor formation by ochratoxin A. *Toxicological Sciences* *127*, 315–330.
- Margalit, O., Eisenbach, L., Amariglio, N., Kaminski, N., Harmelin, a, Pfeffer, R., Shohat, M., Rechavi, G., and Berger, R. (2003). Overexpression of a set of genes, including WISP-1, common to pulmonary metastases of both mouse D122 Lewis lung carcinoma and B16-F10.9 melanoma cell lines. *British Journal of Cancer* *89*, 314–319.
- Marin-Kuan, M., Nestler, S., Verguet, C., Bezençon, C., Piguet, D., Delatour, T., Mantle, P., Cavin, C., and Schilter, B. (2007). MAPK-ERK activation in kidney of male rats chronically fed ochratoxin A at a dose causing a significant incidence of renal carcinoma. *Toxicology and Applied Pharmacology* *224*, 174–181.
- Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nature* *5*, 317–323.
- Mattick, J.S., and Makunin, I. V (2006). Non-coding RNA. *Human Molecular Genetics* *15 Spec No*, R17–29.
- Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* *10*, 155–159.

- Mercer, T.R., Wilhelm, D., Dinger, M.E., Soldà, G., Korbie, D.J., Glazov, E. a, Truong, V., Schwenke, M., Simons, C., Matthaei, K.I., et al. (2011). Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions. *Nucleic Acids Research* 39, 2393–2403.
- Van der Merwe, K.J., Steyn, P.S., and Fourie, L. (1965). Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* Wilh. *Nature* 205, 1112–1113.
- Milićević, D., Jurić, V., Stefanović, S., Jovanović, M., and Janković, S. (2008). Survey of slaughtered pigs for occurrence of ochratoxin A and porcine nephropathy in Serbia. *International Journal of Molecular Sciences* 9, 2169–2183.
- Miraglia M, B.C. (2002). Assessment of dietary intake of Ochratoxin A by the population of EU Member States. *Reports on Tasks for Scientific Cooperation* 1–153.
- Nagai, Y., and Watanabe, M. (2011). Clinical significance of Wnt-induced secreted protein-1 (WISP-1/CCN4) in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* 31, 991–998.
- Nagano, T., and Fraser, P. (2011). No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* 145, 178–181.
- Navarro, J.F., and Mora-Fernández, C. (2006). The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17, 441–450.
- O'Brien, E., Heussner, a H., and Dietrich, D.R. (2001). Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences* 63, 256–264.
- O'Brien, E., Prietz, A., and Dietrich, D.R. (2005). Investigation of the teratogenic potential of ochratoxin A and B using the FETAX system. *Birth Defects Research (Part B)* 74, 417–423.
- Ozçelik, N., Koşar, a, and Soysal, D. (2001). Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders. *Toxicology Letters* 121, 9–13.
- Pal, S., Gupta, R., Kim, H., Wickramasinghe, P., Baubet, V., Showe, L.C., Dahmane, N., and Davuluri, R. V (2011). Alternative transcription exceeds alternative splicing in generating the transcriptome diversity of cerebellar development. *Genome Research* 21, 1260–1272.
- Pal, S., Gupta, R., and Davuluri, R. V (2012). Alternative transcription and alternative splicing in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 136, 283–294.
- Patel, V., and Nouredine, L. (2012). MicroRNAs and fibrosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 21, 410–416.
- Pennica, D., Swanson, T. a, Welsh, J.W., Roy, M. a, Lawrence, D. a, Lee, J., Brush, J., Taneyhill, L. a, Deuel, B., Lew, M., et al. (1998). WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14717–14722.
- Pennisi, E. (2012). ENCODE Project Writes Eulogy For Junk DNA. *Science* 337, 1159–1161.

- Peraica, M., Domijan, A.-M., Miletić-Medved, M., and Fuchs, R. (2008). The involvement of mycotoxins in the development of endemic nephropathy. *Wiener Klin Wochenschr* *120*, 402–407.
- Pfohl-Leszkowicz, A., and Manderville, R. a (2007). Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. *Molecular Nutrition & Food Research* *51*, 61–99.
- Pohland, A.E., Nesheim, S., and Friedman, L. (1992a). Ochratoxin A: A review (Technical Report). *Pure & Appl. Chem.* *64*, 1029–1046.
- Pohland, A.E., Nesheim, S., and Friedman, L. (1992b). Ochratoxin A: A review (Technical Report). *Pure & Appl. Chem.* *64*, 1029–1046.
- Qin, W., Chung, A.C.K., Huang, X.R., Meng, X., Hui, D.S.C., Yu, C., Sung, J.J.Y., and Lan, H.Y. (2011). TGF-beta / Smad3 Signaling Promotes Renal Fibrosis by Inhibiting miR-29. *J Am Soc Nephrol.* *22*, 1462–1474.
- Rahimtula, A.D., and Bereziat, J.-C. (1988). Lipid peroxidation as a possible cause of ochratoxin A toxicity. *Biochemical Pharmacology* *37*, 4469–4477.
- Reddy, V.S., Valente, A.J., Delafontaine, P., and Chandrasekar, B. (2011). Interleukin-18/WNT1-inducible signaling pathway protein-1 signaling mediates human saphenous vein smooth muscle cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology* *226*, 3303–3315.
- Ringot, D., Chango, A., Schneider, Y.-J., and Larondelle, Y. (2006). Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-biological Interactions* *159*, 18–46.
- Rinn, J.L., and Chang, H.Y. (2012). Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annual Review of Biochemistry* *81*, 145–166.
- Van Rooij, E., Sutherland, L.B., Thatcher, J.E., DiMaio, J.M., Naseem, R.H., Marshall, W.S., Hill, J. a, and Olson, E.N. (2008). Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 13027–13032.
- Ruas, M., and Peters, G. (1998). The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochimica Et Biophysica Acta* *1378*, F115–F177.
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., and Pandolfi, P.P. (2011). A ceRNA Hypothesis: The Rosetta Stone of a Hidden RNA Language? *Cell* *146*, 353–358.
- Sanchez-Niño, M.D., Benito-Martin, A., Gonçalves, S., Sanz, A.B., Ucerro, A.C., Izquierdo, M.C., Ramos, A.M., Berzal, S., Selgas, R., Ruiz-Ortega, M., et al. (2010). TNF superfamily: a growing saga of kidney injury modulators. *Mediators of Inflammation* *2010*, 1–11.
- Sauvant, C., Holzinger, H., and Gekle, M. (2005a). Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistr y The Nephrotoxin Ochratoxin A Induces Key Parameters of Chronic Interstitial Nephropathy in Renal Proximal Tubular Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry* *15*, 125–134.

- Sauvant, C., Holzinger, H., Mildenerger, S., and Gekle, M. (2005b). Exposure to nephrotoxic ochratoxin A enhances collagen secretion in human renal proximal tubular cells. *Mol Nutr Food Res* 49, 31–37.
- Sava, V., Reunova, O., and Velasquez, A. (2006). Acute neurotoxic effects of the fungal metabolite ochratoxin-A. *Neurotoxicology* 27, 82–92.
- Saxena, N., Banerjee, S., Sengupta, K., Zoubine, M.N., and Banerjee, S.K. (2001). Differential expression of WISP-1 and WISP-2 genes in normal and transformed human breast cell lines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 228, 99–104.
- Schramek, H., Wilflingseder, D., Pollack, V., Freudinger, R., Mildenerger, S., and Gekle, M. (1997). Ochratoxin A-induced stimulation of extracellular signal-regulated kinases 1/2 is associated with Madin-Darby canine kidney-C7 cell dedifferentiation. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 1460–1468.
- Schumann, L. (2012). Nephropathische Wirkungen von Ochratoxin A auf verschiedene Nierenzelllinien. Masterarbeit.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Mildenerger, S., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999a). The nephrotoxin ochratoxin A induces apoptosis in cultured human proximal tubule cells. *Cell Biology and Toxicology* 15, 405–415.
- Schwerdt, G., Freudinger, R., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1999b). Ochratoxin A-binding proteins in rat organs and plasma and in different cell lines of the kidney. *Toxicology* 135, 1–10.
- Schwerdt, G., Holzinger, H., Sauvant, C., Königs, M., Humpf, H.-U., and Gekle, M. (2007). Long-term effects of ochratoxin A on fibrosis and cell death in human proximal tubule or fibroblast cells in primary culture. *Toxicology* 232, 57–67.
- Stoev, S.D., Gundasheva, D., Zarkov, I., Mircheva, T., Zapryanova, D., Denev, S., Mitev, Y., Daskalov, H., Dutton, M., Mwanza, M., et al. (2012). Experimental mycotoxic nephropathy in pigs provoked by a mouldy diet containing ochratoxin A and fumonisin B1. *Experimental and Toxicologic Pathology* 64, 733–741.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J., and Dietrich, D.R. (2000). Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74, 499–510.
- Su, F., Overholtzer, M., Besser, D., and Levine, A.J. (2002). WISP-1 attenuates p53-mediated apoptosis in response to DNA damage through activation of the Akt kinase. *Genes & Development* 16, 46–57.
- Suzuki, S., and Satoh, T. (1973). Effects of ochratoxin A on tissue glycogen levels in rats. *Japan. J. Pharmacol.* 23, 415–419.
- Taft, R., Pang, K., and Mercer, T. (2010). Noncoding RNAs: regulators of disease. *J Pathol* 220, 126–139.

- Taft, R.J., Pheasant, M., and Mattick, J.S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays* 29, 288–299.
- Tanaka, S., Sugimachi, K., Saeki, H., Kinoshita, J., Ohga, T., Shimada, M., and Maehara, Y. (2001). A novel variant of WISP1 lacking a Von Willebrand type C module overexpressed in scirrhous gastric carcinoma. *Oncogene* 20, 5525–5532.
- Tanaka, S., Sugimachi, K., Kameyama, T., Maehara, S.-I., Shirabe, K., Shimada, M., Wands, J.R., and Maehara, Y. (2003). Human WISP1v, a member of the CCN family, is associated with invasive cholangiocarcinoma. *Hepatology* 37, 1122–1129.
- Tatu, C. a, Orem, W.H., Finkelman, R.B., and Feder, G.L. (1998). The etiology of Balkan endemic nephropathy: still more questions than answers. *Environmental Health Perspectives* 106, 689–700.
- Vasudevan, S. (2012). Posttranscriptional upregulation by microRNAs. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 3, 311–330.
- Venkatachalam, K., Venkatesan, B., Valente, A.J., Melby, P.C., Nandish, S., Reusch, J.E.B., Clark, R. a, and Chandrasekar, B. (2009). WISP1, a pro-mitogenic, pro-survival factor, mediates tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha)-stimulated cardiac fibroblast proliferation but inhibits TNF-alpha-induced cardiomyocyte death. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 14414–14427.
- Vrabcheva, T., Petkova-Bocharova, T., Grosso, F., Nikolov, I., Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M., and Dragacci, S. (2004). Analysis of ochratoxin A in foods consumed by inhabitants from an area with balkan endemic nephropathy: a 1 month follow-up study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 2404–2410.
- Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 43, 904–914.
- Wang, B., Komers, R., Carew, R., and Winbanks, C. (2012). Suppression of microRNA-29 Expression by TGF-b1 Promotes Collagen Expression and Renal Fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 23, 252–265.
- Wang, J., Liu, X., Wu, H., Ni, P., Gu, Z., Qiao, Y., Chen, N., Sun, F., and Fan, Q. (2010). CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Research* 38, 5366–5383.
- Wangikar, P.B., Dwivedi, P., and Sinha, N. (2004). Teratogenic effects of ochratoxin A in rabbits. *World Rabbit Science* 12, 159–171.
- Warren, M.F., and Hamilton, P.B. (1980). Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 40, 522–525.
- Wolf, G. (2000). Cell cycle regulation in diabetic nephropathy. *Kidney International* 58, 59–66.
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuča, K., Wang, X., Chen, G., and Yuan, Z. (2011). Metabolic pathways of ochratoxin A. *Current Drug Metabolism* 12, 1–10.

- Xiao, J., Meng, X., Huang, X., and Chung, A. (2012). miR-29 inhibits bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Molecular Therapy* 1–10.
- Xu, L., Corcoran, R.B., Welsh, J.W., Pennica, D., and Levine, a J. (2000). WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes & Development* 14, 585–595.
- Yanagita, T., Kubota, S., Kawaki, H., Kawata, K., Kondo, S., Takano-Yamamoto, T., Tanaka, S., and Takigawa, M. (2007). Expression and physiological role of CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 mRNA splicing variants in chondrocytes. *FEBS J* 274, 1655–1665.
- Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2012). Posttranscriptional Gene Regulation by Long Noncoding RNA. *Journal of Molecular Biology*.
- Zaied, C., Bouaziz, C., Azizi, I., Bensassi, F., Chour, A., Bacha, H., and Abid, S. (2011). Presence of ochratoxin A in Tunisian blood nephropathy patients. Exposure level to OTA. *Experimental and Toxicologic Pathology* 63, 613–618.
- Zhang, X., Groves, C.E., Bahn, A., Barendt, W.M., Prado, M.D., Rödiger, M., Chatsudthipong, V., Burckhardt, G., and Wright, S.H. (2004). Relative contribution of OAT and OCT transporters to organic electrolyte transport in rabbit proximal tubule. *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 287, F999–1010.
- Zhang, Z., Qin, Y.-W., Brewer, G., and Jing, Q. (2012). MicroRNA degradation and turnover: regulating the regulators. *Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA* 3, 593–600.
- Zingerle, M., Silbernagl, S., and Gekle, M. (1997). Reabsorption of the nephrotoxin ochratoxin A along the rat nephron in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 280, 220–224.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ad	Auf (lat.)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Adenomatous polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchinonsäure
BCR	Breakpoint Cluster Region
BSA	Rinder Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ca ²⁺	Kalzium
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CMV	Cytomegalovirus
CO ₂	Kohlendioxid
COL	Kollagen
CREB	cAMP response element-binding protein
CST Puffer	Zellysepuffer
C-Terminal	Carboxyterminal
Cu ²⁺	Kupfer
CYP19A1	Cytochrom P450, Familie 19, Subfamilie A, Polypeptid 1
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2´-Desoxy-Nukleosid-5`-Triphosphat
DSP	Desmoplakin
DTT	Dithiotheit
ECL	Elektrochemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ENCODE	Encyclopedia of DNA Elements

ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
et al.	Und andere (lat.: et alii)
EtOH	Ethanol
FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FN1	Fibronektin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GYS1	Glykogensynthase 1
HCl	Salzsäure
HEK-293	Human embryonic kidney cells 293
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIC1	Hypermethylated in cancer 1
HK-2	humane proximale Tubuluszellen
hLuc	Firefly Luziferase
hRLuc	Renilla Luziferase
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
hsa	Homo sapiens
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HSP90	Hitzeschockprotein 90
g	Gramm
h	Stunde (hora)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LB-Medium	Luria Bertanie Medium
lncRNA	Lange nicht-kodierende Ribonukleinsäure
lncWISP1	Langes nicht-kodierendes Transkript von WISP1
LTA	Lymphotoxin alpha
M	Molar
mA	Milliampere
MEK	MAP Kinase Kinase
Mg ²⁺	Magnesium
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP10	Matrixmetalloproteinase 10
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
miRNA	MicroRNA
MW	Mittelwert
n	Anzahl

NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	nicht-kodierende RNA
ng	Nanogramm
NHLF	humane Lungenfibroblasten (normal human lung fibroblasts)
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
N-Terminal	Aminoterminal
OTA	Ochratoxin A
p	Wahrscheinlichkeit
pA	Polyadenylierungssignal
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepuffertes Salz (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RISC	RNA induced silencing complex
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
RNU6	U6 small nuclear RNA
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
pH	Pondus hydrogenii
pre-miRNA	Vorläufer miRNA
pri-miRNA	Primäre miRNA
qPCR	Quantitative Real Time PCR
RPTEC	Humane proximale Tubuluszellen (renal proximal tubule epithelial cells)
SDS	Natriumdodekylsulfat
SEAP	Sekretorische alkalische Phosphatase
SEM	Standardfehler
SERPINE1	Serpinpeptidase-Inhibitor, clade E, member 1
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose (Salt-Optimized+Carbon)
SV40	Simian-Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TEMED	Tetraethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WISP1	Wnt1 inducible signaling pathway protein
UV	Ultraviolett
UTR	Untranslatierter Bereich
X-Gal	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

RT² Profiler PCR-Array Rohdaten

1. Human Cell Cycle PCR Array

Tabelle 18: Relative Expressionsunterschiede (*fold change*) im Human Cell Cycle PCR Arrays zwischen unbehandelten und OTA-behandelten Zellen (10 nM, 14 d) in RPTEC. Berechnet über ein Web-basiertes Auswerteprogramm von SABiosciences.

Gensymbol	Fold Change	
	RNA-Isolation 1	RNA-Isolation 2
ABL1	1,22	1,43
ANAPC2	0,38	0,78
ANAPC4	1,64	0,51
DIRAS3	1,48	0,44
ATM	0,80	0,63
ATR	0,95	1,01
BAX	0,99	1,60
BCCIP	1,30	1,25
BCL2	1,09	1,69
BIRC5	1,48	5,07
BRCA1	1,30	1,75
BRCA2	1,48	1,85
CCNB1	1,25	1,09
CCNB2	2,41	0,53
CCNC	0,97	0,75
CCND1	0,98	1,01
CCND2	0,96	1,01
CCNE1	0,92	0,58
CCNF	1,12	9,29
CCNG1	0,79	0,89
CCNG2	0,90	0,48
CCNH	0,88	1,07
CCNT1	1,39	1,29
CCNT2	0,79	1,04
CDC16	1,21	1,48
CDC2	1,05	0,69
CDC20	0,60	0,17
CDC34	0,49	0,89
CDK2	0,88	2,65
CDK4	1,12	0,87
CDK5R1	0,80	1,11
CDK5RAP1	0,22	0,65
CDK6	1,22	1,61
CDK7	0,97	1,60
CDK8	1,51	0,50
CDKN1A	1,11	1,82
CDKN1B	0,53	1,38

CDKN2A	1,15	0,87
CDKN2B	0,63	0,57
CDKN3	1,15	1,57
CHEK1	1,06	1,18
CHEK2	0,63	1,22
CKS1B	1,11	0,66
CKS2	1,24	1,40
CUL1	1,20	0,48
CUL2	1,09	1,11
CUL3	1,64	3,33
DDX11	0,79	0,65
DNM2	0,17	1,39
E2F4	0,82	0,76
GADD45A	0,74	0,42
GTF2H1	1,20	1,36
GTSE1	2,58	2,93
HERC5	0,67	0,57
HUS1	0,72	1,44
KNTC1	0,59	3,42
KPNA2	1,61	0,97
MAD2L1	0,97	1,06
MAD2L2	0,46	0,61
MCM2	1,17	1,56
MCM3	1,41	0,51
MCM4	0,72	1,73
MCM5	0,68	0,31
MKI67	0,32	0,82
MNAT1	0,95	0,99
MRE11A	1,60	0,50
NBN	1,42	0,49
PCNA	0,86	1,01
RAD1	1,21	1,85
RAD17	1,15	1,46
RAD51	1,48	9,29
RAD9A	0,68	2,19
RB1	1,49	0,71
RBBP8	0,89	1,13
RBL1	1,58	1,80
RBL2	1,34	0,83
RPA3	0,94	1,64
SERTAD1	1,07	0,72
SKP2	0,79	2,52
SUMO1	0,78	1,11
TFDP1	0,55	0,62
TFDP2	1,62	0,81
TP53	1,81	1,44
UBA1	1,59	1,16

2. Human Signal Transduction PathwayFinder PCR Array

Tabelle 19: Relative Expressionsunterschiede (*fold change*) im Human Signal Transduction PathwayFinder PCR Arrays zwischen unbehandelten und OTA-behandelten Zellen (10 nM, 14 d) in RPTEC. Berechnet über ein Web-basiertes Auswerteprogramm von SABiosciences.

Gensymbol	Fold Change				
	RNA-Isolation 3	RNA-Isolation 4	RNA-Isolation 5	RNA-Isolation 6	RNA-Isolation 7
ATF2	1,07	0,67	0,89	1,11	1,17
BAX	1,36	0,75	0,78	1,27	1,27
BCL2	2,46	0,93	1,29	1,24	1,29
BCL2A1	1,06	1,11	1,48	0,79	0,91
BCL2L1	1,05	1,27	0,93	1,78	1,72
NAIP	1,53	0,83	0,92	1,20	1,19
BIRC2	1,07	0,87	1,22	1,29	1,28
BIRC3	0,92	0,89	0,82	1,18	1,02
BMP2	1,62	1,04	2,05	1,21	1,45
BMP4	1,42	0,47	2,32	0,97	1,15
BRCA1	0,78	0,62	1,24	1,82	1,56
CCL2	0,72	0,45	0,45	0,50	0,54
CCL20	0,60	0,68	1,10	0,66	0,62
CCND1	0,76	0,91	0,63	1,10	0,91
CD5	0,38	1,04	4,03	7,40	8,47
CDK2	1,50	0,77	0,88	0,85	0,80
CDKN1A	1,19	1,37	1,52	1,17	1,33
CDKN1B	2,26	0,88	1,01	1,68	1,57
CDKN2A	2,28	2,14	2,41	1,61	1,67
CDKN2B	1,37	1,23	1,31	1,30	1,43
CEBPB	2,26	0,81	0,45	1,38	1,28
CSF2	0,71	0,86	1,10	0,75	0,64
CXCL9	0,92	1,04	6,25	0,87	1,08
CYP19A1	0,40	2,56	7,66	1,93	2,59
EGR1	1,92	2,84	1,35	1,21	1,29
EN1	0,92	1,04	1,80	0,87	1,08
FAS	0,61	0,63	0,71	1,22	1,29
FASLG	0,92	0,49	4,75	0,77	3,78
FASN	4,52	1,62	1,36	1,16	1,28
FN1	1,75	1,17	1,03	1,40	1,67
FOS	1,46	0,70	0,71	1,26	1,14
FOXA2	0,70	0,53	5,23	0,92	1,41
GADD45A	1,38	0,96	0,82	3,09	3,22
GREB1	0,92	0,60	5,22	0,44	0,36
GYS1	1,20	0,42	0,29	0,26	0,25
HK2	1,05	1,35	1,09	1,23	1,48
HOXA1	1,19	1,93	1,81	1,23	1,30
HSF1	0,93	1,30	1,29	0,97	1,15
HSPB1	0,61	1,74	1,47	1,72	1,94
HSP90AA2	0,26	0,66	1,15	0,92	1,16
ICAM1	1,21	0,80	0,96	1,19	1,32

IGFBP3	0,96	1,32	1,11	1,44	1,36
IKBKB	0,66	2,00	1,26	1,38	1,19
IL1A	0,81	0,93	0,95	1,48	1,48
IL2	0,92	0,63	3,90	1,26	1,21
IL4	0,92	3,67	1,80	4,37	5,13
IL4R	1,01	0,60	0,87	0,82	0,97
IL8	2,05	0,85	1,13	1,75	1,75
IRF1	1,62	0,69	0,77	1,59	1,64
JUN	1,32	3,74	1,78	1,35	1,44
KLK2	0,92	0,37	1,99	4,66	2,79
LEF1	1,46	0,60	1,55	0,76	0,95
LEP	1,31	1,04	12,97	0,77	0,40
LTA	2,83	5,40	4,66	2,89	6,94
MDM2	1,27	0,68	0,83	1,31	1,30
MMP10	2,00	1,36	1,77	2,96	3,97
MMP7	0,67	0,56	0,60	0,95	0,93
MYC	0,98	3,29	1,16	1,07	1,05
NFKB1	1,10	0,84	1,16	0,88	0,93
NOS2	0,17	1,19	10,84	1,20	0,83
NRIP1	0,94	0,85	0,70	1,86	1,83
ODC1	1,12	1,64	1,86	1,39	1,26
PECAM1	0,92	1,04	1,80	3,50	0,97
PPARG	0,86	1,33	1,91	1,23	1,40
PRKCA	1,48	0,93	0,86	1,04	1,06
PRKCE	1,21	0,89	0,61	1,34	1,60
PTCH1	1,44	1,14	1,06	1,90	1,57
PTGS2	2,45	0,79	2,12	1,48	1,82
RBP1	1,05	0,62	0,67	0,97	1,24
SELE	1,42	2,52	1,81	1,95	1,76
SELPLG	3,17	1,04	1,80	0,72	1,25
TANK	1,02	0,59	0,68	1,26	1,37
TCF7	0,92	1,04	1,80	0,86	0,93
TERT	0,92	1,48	1,80	0,87	1,08
TFRC	1,17	1,32	1,83	1,41	1,46
PMEPA1	1,15	1,58	1,59	1,24	1,17
TNF	2,54	1,00	1,93	1,08	0,91
TP53	1,33	1,75	0,77	0,80	0,84
TP53I3	0,82	1,96	0,94	2,02	2,16
VCAM1	0,87	0,59	0,86	0,53	0,55
VEGFA	0,59	2,05	0,73	0,97	0,93
WISP1	1,82	68,19	29,82	90,91	81,67
WNT1	0,92	1,04	1,80	0,87	1,08
WNT2	1,39	1,37	3,31	0,49	0,62

3. Human Oncogene & Tumor Suppressor Genes PCR Array

Tabelle 20: Relative Expressionsunterschiede (*fold change*) im Human Oncogene & Tumor Suppressor Genes PCR Arrays zwischen unbehandelten und OTA-behandelten Zellen (10 nM, 14 d) in RPTEC. Berechnet über ein Web-basiertes Auswerteprogramm von SABiosciences.

Gensymbol	Fold Change				
	RNA-Isolation 3	RNA-Isolation 4	RNA-Isolation 5	RNA-Isolation 6	RNA-Isolation 7
ABL1	1,39	1,23	1,18	1,04	1,01
AKT1	1,10	1,02	0,82	0,82	0,74
APC	1,94	2,33	1,74	2,13	1,69
ATM	2,24	1,21	1,13	1,14	0,83
BAX	1,32	1,08	1,00	1,08	0,88
BCL2	2,31	1,52	1,14	1,29	0,97
BCL2L1	0,91	1,25	1,08	1,32	0,97
BCR	2,29	2,17	2,20	2,13	1,63
BRCA1	0,14	0,76	0,42	1,13	0,77
BRCA2	0,57	0,94	0,58	1,11	0,82
CASP8	2,45	1,22	0,70	1,49	0,93
CCND1	0,44	0,84	0,63	1,14	0,96
CDH1	1,01	1,64	1,07	0,59	0,43
CDK4	1,37	1,36	0,90	0,95	1,07
CDKN1A	1,84	1,20	1,18	1,30	1,35
CDKN2A	2,99	2,94	2,25	1,92	1,73
CDKN2B	0,89	1,43	0,98	1,27	1,11
CDKN3	0,48	0,78	0,70	0,84	0,92
CTNNB1	0,95	1,30	0,92	1,19	0,89
E2F1	0,94	1,33	0,73	1,22	0,92
EGF	1,48	0,95	0,49	1,08	0,76
ELK1	2,78	1,45	1,51	1,04	0,89
ERBB2	1,02	1,10	0,79	1,30	0,71
ESR1	0,61	1,27	0,97	0,51	0,65
ETS1	1,78	1,13	0,99	1,09	0,97
FHIT	1,66	1,05	1,00	0,85	0,86
FOS	0,55	0,87	0,80	0,96	0,73
FOXD3	3,05	0,66	0,59	1,12	1,06
HGF	0,74	0,63	0,30	0,69	1,00
HIC1	8,58	2,54	1,75	1,96	2,09
HRAS	0,96	1,00	1,19	1,38	1,03
IGF2R	1,77	0,88	0,81	1,35	0,99
JAK2	1,55	1,16	1,00	1,08	0,98
JUN	0,64	1,23	1,10	1,24	0,87
JUNB	0,80	0,68	0,55	0,95	0,64
JUND	1,19	0,82	0,63	0,78	0,72
KIT	0,60	0,66	0,59	1,15	1,20
KITLG	1,57	1,25	0,95	1,10	1,10
KRAS	1,94	0,97	1,00	0,93	0,83
MCL1	1,22	1,06	0,92	0,75	0,72

MDM2	1,62	1,04	1,03	1,23	1,11
MEN1	0,38	0,86	0,67	1,51	1,11
MET	1,00	1,35	1,29	1,14	1,09
MGMT	1,49	1,07	1,11	0,86	0,93
MLH1	1,04	1,30	0,97	0,90	0,91
MOS	3,05	0,66	0,59	1,15	1,20
MYB	3,05	0,32	0,30	1,15	1,20
MYC	0,74	1,30	1,70	1,23	1,00
MYCN	0,47	0,62	0,39	0,85	1,44
NF1	0,37	0,93	0,72	1,38	1,00
NF2	1,39	1,05	0,84	1,22	1,08
NFKB1	2,09	1,14	1,06	1,15	0,76
NFKBIA	1,73	1,17	1,20	0,97	0,89
NRAS	0,74	0,94	0,91	1,27	1,14
PIK3C2A	1,46	1,13	0,91	1,08	0,89
PIK3CA	0,32	1,18	0,68	1,28	1,24
PML	1,24	0,93	0,74	1,00	0,76
PRKCA	1,21	1,16	1,23	1,08	1,04
RAF1	1,11	0,81	0,90	0,98	0,91
RARA	1,43	0,97	0,60	1,11	1,50
RASSF1	1,33	0,80	0,62	0,86	0,60
RB1	1,67	1,37	0,87	1,30	1,28
REL	1,27	0,92	0,85	0,96	0,94
RET	0,86	1,58	1,06	0,61	0,57
ROS1	3,05	0,66	0,59	1,15	1,20
RUNX1	0,88	1,27	1,18	1,05	1,06
RUNX3	1,80	0,66	0,59	1,44	4,29
S100A4	0,62	0,84	0,90	1,62	1,58
SERPINB5	3,05	0,96	0,59	1,15	1,20
SH3PXD2A	0,45	0,98	0,57	1,13	1,09
SMAD4	1,73	1,12	0,82	1,01	0,92
SRC	2,31	0,96	0,88	1,21	1,06
STAT3	1,54	1,05	0,91	1,26	0,99
STK11	0,92	0,95	0,53	0,76	0,78
TGFB1	0,93	1,02	1,07	1,26	1,20
TNF	5,13	1,38	1,52	1,33	1,15
TP53	2,89	0,91	0,98	1,00	1,06
TP73	3,05	0,66	0,59	0,87	1,14
TSC1	0,86	0,96	1,01	1,56	1,40
VHL	2,64	1,34	1,25	1,38	1,34
WT1	0,95	0,89	0,60	1,44	1,50
WWOX	0,53	0,90	0,79	1,56	1,21
XRCC1	0,62	0,93	1,13	1,24	0,99
ZHX2	0,80	1,13	1,14	1,63	1,37

4. Human Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) PCR Array

Tabelle 21: Relative Expressionsunterschiede (*fold change*) im Human Epithelial to Mesenchymal Transition PCR Arrays zwischen unbehandelten und OTA-behandelten Zellen (10 nM, 14 d) in RPTEC. Berechnet über ein Web-basiertes Auswerteprogramm von SABiosciences.

Gensymbol	Fold Change	
	RNA-Isolation 8	RNA-Isolation 9
AHNAK	1,33	0,75
AKT1	1,34	0,93
BMP1	1,33	1,31
BMP7	1,20	1,17
CALD1	1,00	0,86
CAMK2N1	1,10	1,31
CAV2	1,11	1,29
CDH1	1,03	0,58
CDH2	1,07	0,69
COL1A2	0,52	4,91
COL3A1	0,76	0,27
COL5A2	0,79	0,90
CTNNB1	1,28	1,23
DSC2	0,67	0,93
DSP	0,43	0,48
EGFR	1,63	1,00
ERBB3	1,45	1,01
ESR1	1,24	2,15
F11R	1,42	1,28
FGFBP1	0,91	2,69
FN1	3,49	1,11
FOXC2	3,37	1,17
FZD7	0,90	1,24
GNG11	0,73	1,11
GSC	1,29	1,55
GSK3B	0,98	0,91
IGFBP4	1,02	1,16
IL1RN	1,45	3,19
ILK	0,97	0,96
ITGA5	1,52	0,99
ITGAV	1,20	1,40
ITGB1	1,76	0,63
JAG1	1,43	0,97
KRT14	2,11	2,70
KRT19	1,58	1,13
KRT7	0,45	0,58
MAP1B	1,12	0,92
MITF	0,72	1,02
MMP2	1,81	1,41
MMP3	0,82	1,00

MMP9	0,47	3,95
MSN	2,64	0,99
MST1R	7,62	0,55
NODAL	1,44	3,01
NOTCH1	1,21	2,00
NUDT13	0,66	0,51
OCLN	1,26	0,76
PDGFRB	1,29	1,10
PLEK2	1,13	0,97
PPPDE2	1,18	1,32
PTK2	1,07	0,66
PTP4A1	1,74	1,68
RAC1	1,78	1,61
RGS2	0,80	0,72
SERPINE1	2,66	1,64
SIP1	1,00	1,14
SMAD2	1,32	1,55
SNAI1	0,95	1,21
SNAI2	1,38	0,79
SNAI3	1,08	1,46
SOX10	5,71	1,55
SPARC	1,11	1,10
SPP1	0,85	0,80
STAT3	1,01	1,18
STEAP1	0,90	0,99
TCF3	1,82	1,72
TCF4	1,27	1,06
TFPI2	0,78	1,17
TGFB1	2,10	1,69
TGFB2	1,68	1,50
TGFB3	1,08	0,98
TIMP1	1,11	1,16
TMEFF1	1,42	0,98
TMEM132A	1,55	1,95
TSPAN13	0,66	0,92
TWIST1	1,29	2,50
VCAN	1,25	1,15
VIM	1,38	1,27
VPS13A	1,08	0,95
WNT11	1,04	0,70
WNT5A	1,40	1,19
WNT5B	1,51	1,13
ZEB1	1,12	0,63
ZEB2	0,99	0,82

Primer Walking

Bei der sogenannten „Primer Walking“ Methode kommen Primer zur Anwendung, die in verschiedenen Regionen einer mRNA liegen. Ist das zu untersuchende Transkript auf einen bestimmten Bereich eingegrenzt, werden überlappende Primer eingesetzt, um die 3' und 5' Enden so genau wie möglich zu identifizieren.

In der Abbildung 31 sind das Volllängentranskript von WISP1 sowie die beiden Splicevarianten WISP1v (ohne Exon 3) und WISP1vx (ohne Exon 3 und 4) dargestellt (nicht maßstabsgetreu). Die Pfeile symbolisieren die Primer (siehe Tabelle 22) die eingesetzt wurden, um zu bestimmen, ob das Volllängentranskript von WISP1 und/oder WISP1v und WISP1vx exprimiert werden.

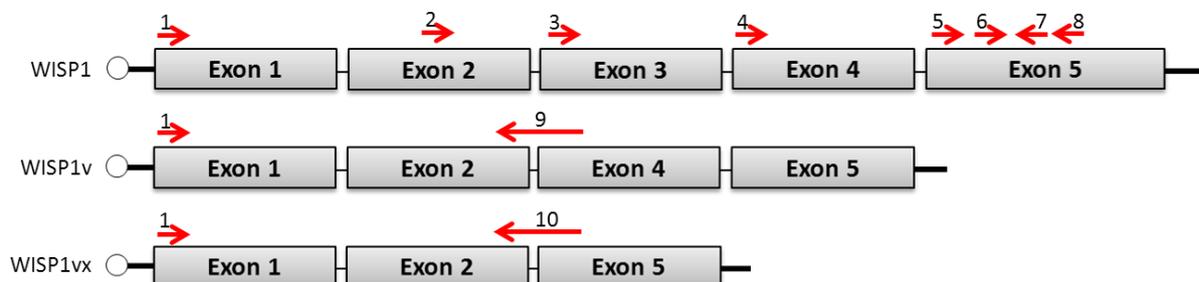


Abb. 31: Schematische Darstellung des WISP1 Volllängentranskripts und der Splicevarianten WISP1v und WISP1vx.

Tabelle 22: Im Primer Walking verwendete Primer zur Bestimmung, ob das WISP1 Volllängentranskripts und/oder die Splicevarianten WISP1v und WISP1vx exprimiert werden.

Sequenz 5' - 3'	
1	AGAGGTGGTCGGATCCTCTG
2	CTCAGCAGCTTGGGGACAAC
3	CTACAACAACGGCCAGTCCT
4	CATGGCACAGGAACTGCATA
5	GGGAAGAAGTGTCTGGCTGT
6	TGCTTCTGTAACCTGAGCTGTA
7	CAGGCATTGGGTAGTCCCC
8	GGCCATAAGGGCTGACTGCTTC
9	TCCACCTCACCCACAGCATGTGC
10	GCCAGACACTTCTCCCTGCGTG

Tabelle 23: Im Primer Walking verwendete Primer zur Ermittlung der IncWISP1 Sequenz bzw. zur Bestätigung der 5' und 3' RACE Ergebnisse

Sequenz 5'-3'	Lokalisation	Ausrichtung
AAGGTGGAATGCTCCCACAT	Intron 4	sense
CCCTCCTTGCTTGAGGATGCTG	Intron 4	sense
GTGTCCCCTGAGTGTGGAGT	Intron 4	sense
AAGGTACCAGCTGCAGAGGA	Intron 4	sense
CGTGGGAGCATTGTAAAG	Intron 4	sense
GGGAAGAAGTGTCTGGCTGT	Exon 5	sense
TGGCTGTGTACCAGCCAGA	Exon 5	sense
CCAGAGGCATCCATGAACCT	Exon 5	sense
GTGCTGCATCCCCTACAAGT	Exon 5	sense
TGCTTCTGTAACCTGAGCTGTA	Exon 5	sense
CAGGCATTGGGTTAGTCCCC	Exon 5, 3'UTR	antisense
GGCCATAAGGGCTGACTGCTTC	Exon 5, 3'UTR	antisense
GGGCTGAGCAGCACCATCAG	Exon 5, 3'UTR	antisense
AGTGACTIONGGAAAGGCTGGA	Exon 5, 3'UTR	antisense
TCCATTTCTTGGGATTTAGGC	Exon 5, 3'UTR	antisense
TTCATCTGAATGGACCCAAAG	Exon 5, 3'UTR	antisense
ATTCTATTGTTCCAAATTCATCT	Exon 5, 3'UTR	antisense
GGCAGGCTCCAAATAATAGATTATTC	Exon 5, 3'UTR	antisense
CAGTACCTCTTGGCAGGCTC	Exon 5, 3'UTR	antisense
GGCAGGCTCCAAATAATAGATTATTC	Exon 5, 3'UTR	antisense
CAGTACCTCTTGGCAGGCTC	Exon 5, 3'UTR	antisense
TCACAGTGTAGGGGTGAAGAGA	Exon 5, 3'UTR	antisense
CAAACCTAATCTGTACCCTTCACAG	Exon 5, 3'UTR	antisense
TGACCTTTCCTGTCTCTGG	Exon 5, 3'UTR	antisense
CAAGCAGGACAAGGGAGAAG	Exon 5, 3'UTR	antisense
TGGGTCTCTCAAGGCTCTGT	Exon 5, 3'UTR	antisense
CACACCCCTACCTGAACCTG	Exon 5, 3'UTR	antisense
ATGCAAAGCACTGAGAGCAA	Exon 5, 3'UTR	antisense
CCAAGTGGGTGACTCTGGTT	Exon 5, 3'UTR	antisense
CAGGGGATTCCTGGATTTT	Exon 5, 3'UTR	antisense
TTGGGGAGGTCACAGTAAGG	Exon 5, 3'UTR	antisense

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §5 der Promotionsordnung der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Zur Durchführung der Arbeit und zur Erstellung der Dissertationsschrift wurden nur die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Aussagen und Gedanken wurden in der Dissertationsschrift als solche kenntlich gemacht.

Ich erkläre hiermit auch, dass die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Name

Ort, Datum

Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mir die Entstehung dieser Dissertation möglich gemacht haben und mich auf meinem Weg dorthin unterstützt haben.

Ich bedanke mich...

... besonders bei Herrn PD Dr. rer. nat. Gerald Schwerdt für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine stetige Unterstützung und wertvolle Hilfe bei Problemen und Unklarheiten.

... bei Herrn Prof. Dr. med. Michael Gekle, dass er mir die Bearbeitung dieses Dissertationsthemas am Institut für Physiologie ermöglichte. Weiterhin bedanke ich mich für die immer wertvollen Hinweise und die ständige Diskussionsbereitschaft.

... bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. Neubert für die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät I.

... bei Frau Luise Schumann für die Validierung der RT-qPCR-Array Ergebnisse in HEK293 und HK-2 Zellen.

... bei allen Mitarbeitern des Julius-Bernstein-Instituts für Physiologie, für die Unterstützung bei Problemen und Fragen und dafür, dass sie für ein sehr angenehmes Arbeitsumfeld sorgten.

Besonderer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, da sie in allen Lebenslagen für mich da waren.

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Isabell Hennemeier
Geburtstag: 29.12.1984
Geburtsort: Ebersdorf, Thüringen

■ Schulbildung

1991 – 1995 Grundschole in Ebersdorf
1995 – 1997 Regelschule in Remptendorf
1997 – 2003 Christian-Gottlieb-Reichard-Gymnasium in Bad Lobenstein
Abschluss 12. Klasse: Abitur

■ Lehrausbildung

08.2003 – 09.2004 Chemielaborantin bei Thioplast Chemicals in Greiz

■ Studium

2004 – 2010 Studium der Ernährungswissenschaften an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
Akademischer Grad: Dipl. Trophologin (Note: 1,1)
04.2009 – 02.2010 Bearbeitung der Diplomarbeit mit dem Thema:
„Untersuchungen zum chemopräventiven Potential *in vitro* verdauter Brote in der humanen Kolon-Adenomzelllinie LT 97“ am Institut für Ernährungswissenschaften der FSU Jena/
Lehrbereich Toxikologie (Note: 1,0)
11.2010 Diplomarbbeitspreis für hervorragende wissenschaftliche Leistungen im Studium und bei der Anfertigung der Diplomarbeit verliehen durch den Alumni und Partner der FSU Jena Ernährungswissenschaften & LifeSciences e.V.

■ Berufliche Laufbahn

04.2010 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Julius-Bernstein-Institut für Physiologie, Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

■ Publikationen

Schlörmann W, Hiller B, Jahns F, Zöger R, **Hennemeier I**, Wilhelm A, Lindhauer MG, Gleis M. Chemopreventive effects of in vitro digested and fermented bread in human colon cells. *Eur J Nutr.* 2012; 51 (7): 827-39.

Hennemeier I, Humpf HU, Gekle M, Schwerdt G. The food contaminant and nephrotoxin ochratoxin A enhances Wnt1 inducible signaling protein 1 and tumor necrosis factor- α expression in human primary proximal tubule cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 2012; 56 (9): 1375-84.

Hennemeier I, Schumann L, Humpf HU, Grossmann C, Gekle M, Schwerdt G. The long noncoding RNA lncWISP1 acts as miR-29b sponge leading to altered matrix homeostasis. *RNA* (in Revision)

■ Vorträge

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2012) Influence of a nanomolar Ochratoxin A concentration on gene expression in human kidney cells. 34th Mycotoxin Workshop, Braunschweig, Germany.

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2013) The long noncoding RNA lncWISP1: a potential miR-29b sponge leading to altered matrix homeostasis. GRK 1591 Retreat, Freyburg, Germany.

■ Posterpräsentationen

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2011) Influence of ochratoxin A on gene expression in primary human proximal tubule cells. 90nd Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Regensburg, Germany.

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2011) Ochratoxin A influences the expression of genes involved in renal pathophysiology in primary human proximal tubule cells. 33th Mycotoxin Workshop, Freising, Germany.

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2012) Signaling pathways involved in Ochratoxin A-induced expression of WNT1 inducible signaling protein 1 in primary human kidney cells. 91nd Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Dresden, Germany.

Hennemeier I, Gekle M, Schwerdt G (2013) Altered matrix homeostasis due to a new miR-29b sponge. 92nd Annual Meeting of the Deutsche Physiologische Gesellschaft, Heidelberg, Germany.