



Evaluierung neuer Sicherheits-Biomarker in präklinischen Studien

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Mira Pavković
aus Prijedor (BiH)

Düsseldorf, März 2014

aus dem Institut für Toxikologie der Bayer Pharma AG Wuppertal
und der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

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

Referent: Prof. Dr. Hans-Werner Vohr

Korreferent: Prof. Dr. Eckhard Lammert

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Bestimmung von Nephro- und Hepatotoxizität in präklinischen Studien	3
1.1.1 Nierenphysiologie und -toxizität	3
1.1.2 Leberphysiologie und -toxizität	5
1.2 Toxikologische Modelle	7
1.2.1 Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität	8
1.2.2 Experimentelle Glomerulonephritis	9
1.2.3 Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität	10
1.3 Biomarker	12
1.4 microRNAs	16
1.4.1 Biogenese und Funktion von microRNAs	16
1.4.2 Extrazelluläre microRNAs	18
1.4.3 microRNAs als Biomarker	19
1.5 Ziel der Dissertation	21
2 Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Reagenzien und Chemikalien	23
2.1.2 Verbrauchsmaterial	24
2.1.3 Kits, Microarrays und MicroRNA Arrays	24
2.1.4 Geräte	25
2.1.5 Software	26
2.1.6 Puffer und Lösungen	27
2.1.7 qRT-PCR Assays, Oligonukleotide und miRNA-DIG Sonden	28
2.1.8 Versuchstiere und Zelllinien	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 <i>in vivo</i> Studien	30
2.2.1.1 Studiendesign: Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität	30
2.2.1.2 Studiendesign: Experimentelle Glomerulonephritis	30
2.2.1.3 Studiendesign: Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität	30
2.2.1.4 Harn- und Organaufarbeitung	31
2.2.1.5 Histologische Untersuchungen	31
2.2.2 <i>in vitro</i> Studie	32
2.2.2.1 Auftauen und Passagieren von Zellen	32

2.2.2.2	Behandlung von NRK-52e Zellen mit Cisplatin.....	32
2.2.2.3	Bestimmung der Zellviabilität.....	32
2.2.3	Messung von Proteinbiomarkern im Urin.....	33
2.2.3.1	MesoScale Discovery Plattform.....	33
2.2.3.2	Luminex Plattform.....	34
2.2.4	RNA Isolation, Quantifizierung und Qualitätskontrolle.....	35
2.2.4.1	Gesamt-RNA Isolation aus Gewebelysaten.....	35
2.2.4.2	microRNA Isolation aus Gewebe- oder Zelllysaten.....	35
2.2.4.3	microRNA Isolation aus Urin, Plasma oder Zellkultivierungsmedium.....	36
2.2.4.4	RNA Quantifizierung.....	36
2.2.4.5	RNA Qualitätskontrolle.....	37
2.2.5	Quantitative real-time PCR.....	37
2.2.5.1	Reverse Transkription von miRNAs (ABI).....	38
2.2.5.2	Preamplifikation von miRNAs (ABI).....	39
2.2.5.3	TaqMan® real-time PCR von miRNAs (ABI).....	40
2.2.5.4	Universelle Reverse Transkription von microRNAs (EXQ).....	41
2.2.5.5	Syber®Green real-time PCR von miRNAs (EXQ).....	41
2.2.5.6	PCR Auswertung.....	41
2.2.5.6.1	Absolute Quantifizierung von miRNAs mittels Standard Kurve.....	41
2.2.5.6.2	Relative Quantifizierung von miRNAs aus Gewebe.....	42
2.2.5.6.3	Relative Quantifizierung von miRNAs aus Urin und Plasma.....	43
2.2.5.6.4	Selektion veränderter miRNA (TaqMan Card Profiling).....	44
2.2.6	Microarray Analysen.....	45
2.2.6.1	Genexpression im Gewebe.....	45
2.2.6.1.1	Reverse Transkription (GeneChip® 3 IVT Express Kit).....	45
2.2.6.1.2	<i>in vitro</i> Transkription (GeneChip® 3 IVT Express Kit).....	46
2.2.6.1.3	Hybridisierung der RAE230_2.0 Arrays.....	47
2.2.6.1.4	Färben und Scannen der RAE230_2.0 Arrays.....	47
2.2.6.2	Auswertung der Genexpressionsdaten.....	48
2.2.6.2.1	Qualitätskontrolle und Kondensierung der RAE230_2.0 Arrays.....	48
2.2.6.2.2	Qualifizierung, statistische Analyse und Darstellung (RAE230_2.0 Arrays).....	48
2.2.6.2.3	Interpretation der Genexpressionsdaten (RAE230_2.0 Arrays).....	50
2.2.6.3	miRNA Expression im Gewebe.....	50
2.2.6.3.1	Polyadenylierung.....	50
2.2.6.3.2	Ligation mit dem Signalmolekül.....	51
2.2.6.3.3	Qualitätskontrolle mittels ELOSA.....	51
2.2.6.4	Auswertung der miRNA-Expressionsdaten.....	52
2.2.6.4.1	Qualitätskontrolle und Kondensierung der miRNA 3.0 Arrays.....	52
2.2.6.4.2	Qualifizierung, statistische Analyse und Darstellung (miRNA 3.0 Array).....	52
2.2.6.5	miRNA Analyse im Gewebe.....	53

2.2.7 <i>in situ</i> Hybridisierung	53
2.2.7.1 Ganzkörper-Perfusion und Organaufarbeitung	53
2.2.7.2 Ablauf der <i>in situ</i> Hybridisierung	54
2.2.7.3 Gegenfärbung und Auswertung	55
3 Ergebnisse	56
3.1 Pathologische und klinisch-chemische Befunde.....	56
3.1.1 Cisplatin Studie	56
3.1.2 Glomerulonephritis Studie	57
3.1.3 Methapyrilen Studie	59
3.2 Neue Proteinbiomarker für Nephrotoxizität.....	60
3.2.1 Messung neuer Proteinbiomarker für Nephrotoxizität inklusive Methodenvergleich ..	61
3.2.2 Spezifitätsprüfung neuer Proteinbiomarker für Nephrotoxizität	69
3.3 Messung von microRNAs im Urin	69
3.3.1 microRNA Profil im Urin nach Cisplatin Verabreichung	69
3.3.2 microRNA Profil im Urin nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum	77
3.3.3 Vergleich der microRNA Profile im Urin nach Verabreichung von Cisplatin oder nephrotoxischem Serum	81
3.3.4 microRNA Profil im Urin nach Verabreichung von Methapyrilen	82
3.3.5 microRNA Profil in einem <i>in vitro</i> Modell.....	83
3.4 Messung von microRNAs im Plasma.....	84
3.4.1 microRNA Profil im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum.....	85
3.4.2 microRNA Profil im Plasma nach Verabreichung von Methapyrilen	86
3.4.3 Vergleich der microRNA Profile im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum oder Methapyrilen	88
3.5 Genexpression im Gewebe nach Substanz-induzierter Schädigung	89
3.5.1 Genexpression in der Niere nach Cisplatin Verabreichung	89
3.5.2 Genexpression in der Niere nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum	92
3.5.3 Vergleich der Genexpression in der Niere nach Verabreichung von Cisplatin oder nephrotoxischem Serum	94
3.5.4 Genexpression in der Leber nach Methapyrilen Verabreichung.....	96
3.6 microRNA Expression im Gewebe mit Ziel-mRNA Identifikation	99
3.6.1 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Niere nach Cisplatin Verabreichung	99
3.6.2 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Niere nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum	100
3.6.3 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Leber nach Methapyrilen Verabreichung	101
3.7 microRNA Lokalisation im Gewebe.....	102
4 Diskussion.....	107
4.1 Charakterisierungen der Toxizitätsmodelle durch Genexpression.....	107
4.1.1 Nephrotoxizitätsmodelle	108

Inhaltsverzeichnis

4.1.2 Hepatotoxizitätsmodell.....	119
4.2 Biomarker Evaluierung	122
4.2.1 Re-Evaluierung von Nephrotoxizitäts-Proteinbiomarkern im Urin	122
4.2.2 Evaluierung von microRNAs im Urin als Nephrotoxizitäts-Biomarker.....	125
4.2.3 Evaluierung von microRNAs im Plasma als Toxizitäts-Biomarker.....	131
4.3 Ausblick	135
5 Zusammenfassung.....	137
6 Summary	138
Literaturverzeichnis	IX
Anhang	XXVII
Lebenslauf.....	XXXVIII
Danksagung	XXXIX
Eidesstattliche Erklärung	XL

Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
Ak	Antikörper
ALB	Albumin
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AST	Aspartat-Aminotransferase
AUC	<i>Area under curve</i>
BM	Biomarker
BUN	<i>Blood urea nitrogen</i>
CALB	Calbindin
CLU	Clusterin
Cp	Cisplatin
Ct	<i>Cycle threshold</i>
CysC	CysteinC
DIG	Digoxigenin
DIKI	<i>Drug-induced kidney injury</i>
DILI	<i>Drug-induced liver injury</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNase	Desoxyribonuklease
EC50	<i>Half maximal effective concentration</i>
EMA	European Medicines Agency
EXQ	Exiqon
FDA	Food and Drug Administration
GN	Glomerulonephritis
GST-Y γ	Glutathion-S-Transferase
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
KIM-1	Kidney injury molecule 1
LMX	Luminex
LoA	<i>Limits of agreement</i>
miRNA	microRNA
MPy	Methapyrilen
mRNA	Messenger RNA
MSD	Mesoscale Discovery
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NGAL	Neutrophilengelatase-assoziierte Lipocalin
NRK	<i>Normal rat kidney</i>
NTS	Nephrotoxisches Serum
OPN	Osteopontin
PCA	<i>Principal component analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonukleasen
ROC	<i>Receiver operating characteristic</i>
RPA-1	Renal papillary antigen 1
RevT	Reverse Transkription
RT	Raumtemperatur
TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases 1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
αGST	αGlutathion-S-Transferase
β2M	β-2-Microglobulin
ΔΔCt	Delta delta Ct

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung des Arzneimittelentwicklungsprozesses.	1
Abbildung 2 Aufbau der Niere (A) und eines Nephrons (B).	4
Abbildung 3 Modell der Leberstruktur (A) und eines Sinusoids (B).	6
Abbildung 4 Vereinfachte Abläufe bei Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität.	9
Abbildung 5 Aufbau des Glomerulus.	10
Abbildung 6 Strukturformel von Methapyrilen.	11
Abbildung 7 microRNA Biogenese.	17
Abbildung 8 Schematische Darstellung des Ablaufs der verschiedenen Studien.	31
Abbildung 9 Schematische Darstellung der zwei PCR Varianten.	38
Abbildung 10 Grundprinzip der Microarray Technologie.	45
Abbildung 11 Schematische Darstellung der <i>in situ</i> Hybridisierung.	53
Abbildung 12 Histopathologische Ergebnisse der Nieren nach Cisplatin Verabreichung.	56
Abbildung 13 Ergebnisse etablierter Nephrotoxizitäts Biomarker nach Cisplatin Verabreichung.	57
Abbildung 14 Histopathologische Ergebnisse der Nieren nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS).	58
Abbildung 15 Ergebnisse etablierter Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS).	59
Abbildung 16 Ergebnisse etablierter Hepatotoxizitäts Biomarker nach Methapyrilen (MPy) Verabreichung.	60
Abbildung 17 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Cisplatin (Cp) Verabreichung, gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen.	62
Abbildung 18 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS), gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen.	63
Abbildung 19 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von Cisplatin (Cp) oder nephrotoxischem Serum (NTS), jeweils gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen.	64
Abbildung 20 Urinprofil von 375 miRNAs von Kontrollratten und Cisplatin (Cp) behandelten Ratten über die Zeit.	70
Abbildung 21 Schematischer Ablauf der Normalisierung und Analyse von miRNA PCR-Profilierungsdaten.	71
Abbildung 22 Signifikant veränderte miRNAs im Urin nach Cisplatin (Cp) Verabreichung.	72
Abbildung 23 Schematischer Ablauf der Quantifizierung mittels Standardkurve und Analyse von miRNA PCR-Daten.	74
Abbildung 24 Verifizierung der Urinprofile der 18 selektierten miRNAs.	75
Abbildung 25 Die Top fünf miRNAs, deren Urinprofil am besten mit Auftreten und Stärke der tubulären Nekrose korrelierten.	76
Abbildung 26 Signifikant veränderte miRNAs im Urin nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS).	78
Abbildung 27 Urinprofil der 12 selektierten miRNAs über die Zeit nach der Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS).	80
Abbildung 28 Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Urin nach Verabreichung von Cisplatin (Cp) oder nephrotoxischem Serum (NTS).	81
Abbildung 29 Spezifische miRNAs im Urin nach Verabreichung von der Nierentoxine Cisplatin (Cp) und nephrotoxisches Serum (NTS) oder des Lebertoxins Methapyrilen (MPy).	82
Abbildung 30 Viabilitätskurven für Cisplatin (Cp) behandelte NRK-52e Zellen.	83
Abbildung 31 Einfluss der Cisplatin (Cp) Behandlung auf das miRNA Profile <i>in vitro</i>	84
Abbildung 32 Signifikant veränderte miRNAs im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS).	85
Abbildung 33 Signifikant veränderte miRNAs im Plasma nach Verabreichung von Methapyrilen (MPy).	87
Abbildung 34 Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS) oder Methapyrilen (MPy).	88
Abbildung 35 Genexpressionsanalyse in der Niere nach Cisplatin-induzierter Schädigung.	90
Abbildung 36 Genexpressionsanalyse in der Niere nach Schädigung induziert durch nephrotoxisches Serum (NTS).	93
Abbildung 37 Vergleich der Genverteilung auf toxikologische Kategorien nach Cisplatin (Cp) induzierter Nierenschädigung oder nach Schädigung durch nephrotoxisches Serum (NTS).	94
Abbildung 38 Potentiell spezifisch deregulierte Gene für Cisplatin-induzierten proximalen Tubulusschaden (A) oder NTS-induzierte Glomerulonephritis (B).	95
Abbildung 39 Genexpressionsanalyse in der Leber nach Methapyrilen-induzierter Schädigung.	97

Abbildung 40 microRNA und mRNA Interaktionen in der Niere nach Cisplatin Schädigung..... 100

Abbildung 41 microRNA und mRNA Interaktionen in der Niere nach Schädigung durch nephrotoxisches Serum..... 101

Abbildung 42 microRNA und mRNA Interaktionen in der Leber nach Methapyrilen induzierter Schädigung. 102

Abbildung 43 Positiv und negativ *in situ* Hybridisierungs-Kontrollen in Niere und Leber. 103

Abbildung 44 Vorläufer (pre-) und reife miR-192 in Niere und Leber. 104

Abbildung 45 Vorläufer (pre-) und reife miR-26a in Niere und Leber. 105

Abbildung 46 Reife miR-10b und -100 in Niere und Leber. 106

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht etablierter Nierenfunktionsparameter bzw. –biomarker.	5
Tabelle 2 Qualifizierte Protein-Biomarker für Nephrotoxizität im Urin von Ratten.	14
Tabelle 3 Potentielle Protein-Biomarker für Nephrotoxizität im Urin von Ratten.....	15
Tabelle 4 PCR-Assays für Housekeeping-Gene im Gewebe von ABI.	28
Tabelle 5 miRNA PCR-Assays von Exiqon.	28
Tabelle 6 miRNA DIG-Sonden für <i>in situ</i> Hybridisierung von Exiqon.....	28
Tabelle 7 miRNA PCR-Assays von Applied Biosystems.....	28
Tabelle 8 Verwendete RNA Volumina bzw. Mengen in qRT-PCR.....	38
Tabelle 9 Zusammensetzung Reverse Transkription von Applied Biosystems (TQM).....	39
Tabelle 10 Ablauf der Reverse Transkription	39
Tabelle 11 Zusammensetzung PreAmplifikation von Applied Biosystems (TQM).....	39
Tabelle 12 Ablauf der PreAmplifikation	40
Tabelle 13 Zusammensetzung real time PCR von Applied Biosystems (TQM).....	40
Tabelle 14 Ablauf der PCR (TQM).....	40
Tabelle 15 Zusammensetzung (A) und Ablauf (B) Reverse Transkription von Exiqon.....	41
Tabelle 16 Zusammensetzung (A) und Ablauf (B) qPCR von Exiqon.....	41
Tabelle 17 Serielle Verdünnungsreihe zur Herstellung der Standardkurve	42
Tabelle 18 Einzelstrangsynthese der RevT vor IVT	46
Tabelle 19 Doppelstrangsynthese der RevT vor IVT.....	46
Tabelle 20 <i>in vitro</i> Transkription.....	46
Tabelle 21 aRNA Aufreinigung	46
Tabelle 22 Hybridisierung von RAE230_2.0 Arrays	47
Tabelle 23 Polyadenylierung	51
Tabelle 24 Hybridisierung von miRNA 3.0 Arrays	52
Tabelle 25 Übersicht der gemessenen Biomarker pro Plattform und Studie.	61
Tabelle 26 Statistischer Vergleich der Messmethoden.	65
Tabelle 27 Neue Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Cisplatin (Cp) Verabreichung.	66
Tabelle 28 Neue Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischen Serum (NTS)...	67
Tabelle 29 Spezifität neuer Nephrotoxizitäts Biomarker.....	69
Tabelle 30 Selektion von 18 miRNAs mit verändertem Urinprofil nach Verabreichung von Cisplatin.	73
Tabelle 31 Selektion von 12 miRNAs mit verändertem Urinprofil nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum.....	79
Tabelle 32 Urinprofile der 12 selektierten miRNAs von Wistar Kyoto (WKY) Ratten nach Verabreichung unterschiedlicher nephrotoxischer Serum (NTS) Dosen.	80
Tabelle 33 Urinprofil selektierter miRNAs von Sprague Dawley (SD) Ratten nach Verabreichung unterschiedlicher nephrotoxischer Serum (NTS) Dosen.	81
Tabelle 34 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität.	91
Tabelle 35 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse der Nephrotoxizität induziert durch nephrotoxisches Serum.....	94
Tabelle 36 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse Methapyrilen-induzierter Hepatotoxizität.	98

1 Einleitung

Die Erforschung und Entwicklung eines Arzneimittels ist ein langer, in mehrere Phasen gegliederter und kostenintensiver Prozess, mit dem Ziel, aus einer Vielzahl an potentiellen Arzneimittelkandidaten, den für ein bestimmtes Krankheitsbild geeignetsten zu selektieren. Es wird geschätzt, dass am Anfang dieses ca. zehn Jahre dauernden Prozesses 10.000 bis 25.000 chemische Substanzen für die Entwicklung eines Arzneimittels getestet werden und dass sich die Kosten bis zur Zulassung des Arzneimittels auf ca. 1 Mrd. € belaufen (BPI, 2013; Guengerich, 2011). Das Durchlaufen des gesamten Prozesses ist gesetzlich (Arzneimittelgesetz) bzw. behördlich (europäische Zulassungsbehörde: European Medicines Agency, EMA) geregelt, so dass ein standardisierter und dokumentierter Ablauf gewährleistet ist.

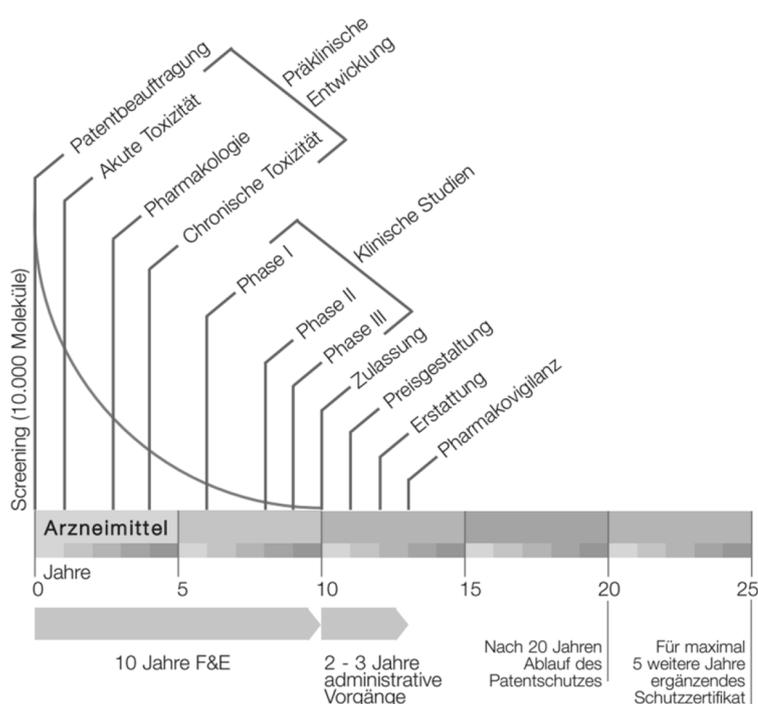


Abbildung 1 Vereinfachte Darstellung des Arzneimittelentwicklungsprozesses. F&E: Forschung und Entwicklung. Report Pharma-Daten 2013 des Bundesverbandes der Pharmazeutischen Industrie e.V. (BPI 2013)

Nach Identifizierung wirksamer chemischer Substanzen kann die Entwicklung eines Arzneimittels bis hin zur Zulassung grob in zwei Entwicklungsabschnitte unterteilt werden: die präklinische und klinische Entwicklung (Abb. 1). In letzterer wird der Arzneimittelkandidat am Menschen getestet. Bevor dies – verbunden mit entsprechenden Risiken – vertretbar ist, muss die in dem potentiellen Medikament eingesetzte Substanz ein vorgelagertes, umfangreiches Testprogramm durchlaufen: die sogenannte präklinische Entwicklung (Breitenbach and Fischer, 2013). In der präklinischen Entwicklung werden Arzneimittelkandidaten bezüglich ihrer pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften, sowohl mittels *in vitro* Methoden als auch *in vivo* an verschiedenen Tierarten, untersucht. Aus pharmakologischer Sicht gilt es, die pharmakodynamischen Eigenschaften bezüglich der Effizienz (in pharmakologischen Modellen) zu definieren, und aus kinetischer Sicht Einblicke in die Resorption, die Metabolisierung und die Eli-

1 Einleitung

mination der Substanz zu erlangen; aus toxikologischer Sicht sollen Basisdaten zur Erstellung eines Nutzen-Risiko-Profiles gesammelt werden, welches Voraussetzung für den Start einer klinischen Phase ist (Freissmuth, 2012). In dieser wie auch nach der Marktzulassung, dann unter dem Begriff der Pharmakovigilanz, werden weiterhin Daten bezüglich unerwünschter Arzneimittelwirkungen erhoben (Abb.1).

Wie oben erwähnt, wird in der präklinischen Phase die Grundlage für eine Abwägung zwischen Nutzen und Risiko geschaffen, da erstmalig potentiell negative Aspekte des Arzneimittelkandidaten aufgedeckt werden. Dies geschieht durch Untersuchung der Substanz im Hinblick auf den Einfluss auf Organe sowie Organfunktionen bei unterschiedlichen Verabreichungsmengen und –dauern. So wird sowohl die Wirkung Therapie-relevanter Dosen als auch die Wirkung z.T. wesentlich höherer Dosen (je nach Therapiegebiet 10- bis 50-fach über der therapeutischen Dosis) in unterschiedlich lang andauernden akuten, subakuten, subchronischen und chronischen Toxizitätsstudien untersucht (Schöffski et al., 2008). Hierbei können sich Funktionsbeeinträchtigungen und Organschäden zeigen, die diverse Ursachen haben können, wie z.B. die Metabolisierung der Substanz zu einem reaktiven Metaboliten, die Anreicherung in diversen Organen oder Geweben, Induktion von Organschäden, das Auslösen einer Immunreaktion, usw. Wird das resultierende Risiko im Vergleich zum Nutzen höher gewertet, wird die Substanz verworfen. Schätzungsweise werden 30-45% der Substanzen auf Grund von Toxizitäten während der präklinischen und klinischen Entwicklung aussortiert. In der Niere, dem Haupt-Eliminationsorgan, und der Leber, dem Haupt-Detoxifizierungsorgan, entfalten viele Substanzen eine toxische Wirkung. Arzneimittel-induzierte Nieren- und Leberschädigungen, auch als *drug induced kidney injury* (DIKI) und *drug induced liver injury* (DILI) bezeichnet, sind folglich häufige Ursachen für das Verwerfen eines Arzneimittelkandidaten und haben daher eine hohe Relevanz in der toxikologischen Forschung (Guengerich, 2011). Die etablierten Nachweismethoden von DIKI und DILI weisen jedoch viele Nachteile, wie Invasivität oder geringe Sensitivität auf.

Ausgehend davon, dass von der gesamten Investition der Pharmaindustrie in Forschung & Entwicklung über 20% für die präklinische und über 50% für die klinische Phase aufgebracht werden, ist die Einstellung eines Entwicklungsprojekts umso verlustreicher desto weiter es fortgeschritten war (EFPIA, 2013). Folglich würde eine frühere Detektion und eine bessere Diagnose von Organtoxizität, konkret von DIKI und DILI, die Entwicklungskosten senken; zusätzlich und von ethischem Wert könnten Versuchstierzahlen in der Präklinik und auch das Risiko bei einer Anwendung im Menschen reduziert werden.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, zu einer Verbesserung der Detektion bzw. Vorhersage von Organtoxizität in präklinischen Studien beizutragen, indem neue Biomarker für DIKI und DILI (re-)evaluiert sowie die zugrundeliegenden molekularen Abläufe untersucht werden. Einführend werden zunächst Niere und Leber sowie die klassischen Parameter zur Detektion der jeweiligen Toxizität vorgestellt. Dem folgend werden die verwendeten Modellsysteme beschrieben. Dar-

auffin werden Biomarker per se definiert, beschrieben und eine neue Klasse von Biomarker Kandidaten vorgestellt. Die Einleitung wird dann mit einer Beschreibung der Ziele der vorliegenden Arbeit abgeschlossen.

1.1 Bestimmung von Nephro- und Hepatotoxizität in präklinischen Studien

Im Folgenden werden die Funktion, der Aufbau und die üblicherweise angewandten Möglichkeiten der Bestimmung von Nieren- und Lebertoxizität dargestellt.

1.1.1 Nierenphysiologie und -toxizität

Die wichtigsten Funktionen der Niere sind: die Regulation von Volumen und Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit (u.a. Erhaltung des Wasser- und Elektrolyten-Haushaltes und des Säure-Base Gleichgewichtes), die endokrine Aktivität (z.B. Renin und Erythropoetin) und die Ausscheidung endogener Abfallprodukte. Die hohe Anfälligkeit der Niere für toxische Substanzen lässt sich auf eben diese letzte Filter- und Resorptionfunktion zurückführen, die mit einer Anreicherung von potentiell toxischen Metaboliten einhergeht (Kahl et al., 2010).

Die kleinste funktionelle Einheit, mit der die Niere (Abb. 2A) Abfallprodukte aus dem Blut filtert, ist das Nephron (Abb. 2B). Dieses besteht aus dem Glomerulus, einem Kapillarknäuel in dem der nahezu proteinfreie, plasma-isotone Primärharn aus dem Blut ultrafiltriert wird, und dem Tubulusapparat (proximaler Tubulus, Henlesche Schleife und distaler Tubulus), in dem die Rückresorption von Elektrolyten, kleinen Molekülen und einem Teil des Wassers stattfindet. Die abschließende Wasserrückresorption findet im darauffolgenden Sammelrohr statt und der dadurch entstandene Endharn fließt in den Harnleiter ab.

Durch den stetigen und großen Blutfluss ist die Niere konstant einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, durch Filtration und Rückresorption können toxische Substanzen aufkonzentriert werden oder es entstehen toxische Metaboliten durch den eigenen Fremdstoffmetabolismus (Kahl et al., 2010). Da viele Xenobiotika im Glomerulus aus dem Blut gefiltert werden und so zu den proximalen Tubuli gelangen, die ihrer Funktion entsprechend aktiv Substanzen aus dem Primärharn resorbieren, tritt DIKI am häufigsten in der Form von akuter tubulärer Schädigung auf. Des Weiteren können Immunzell-vermittelte Hypersensitivitäts-Reaktionen gegen ein Medikament akute interstitielle Nephritis oder über eine Podozyten-Zytotoxizität glomerulären Schaden auslösen. Letzterer führt immer zu einem anschließenden tubulären Schaden, der durch die hohe Menge an Protein im Filtrat ausgelöst wird (Dieterle and Sistare, 2010).

Es gibt unterschiedliche Verfahren einen Schaden in der Niere festzustellen. Eine Beeinträchtigung der Nierenfunktionen kann u.a. durch die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt werden. Dabei wird das Primärharn-Gesamtvolumen, welches von allen Glomeruli in einer vorher definierten Zeiteinheit hergestellt wird, berechnet. In der Praxis wird dies häufig von der Höhe der Creatininausscheidung abgeleitet (Dieterle und Sistare, 2010). Creatinin ist ein harnpflichti-

1 Einleitung

ges Stoffwechselprodukt, das vor allem in der Skelettmuskulatur aus der Verstoffwechslung von Creatin entsteht. Da Creatinin frei gefiltert und nicht in den proximalen Tubuli resorbiert wird, wird im Sinne dieser Ableitung angenommen, dass die Plasmakonzentration des Creatinins gleich der Konzentration im Primärharn ist. Dadurch lässt sich die GFR als Quotient der Creatinin Gesamtmenge im Harn durch das Produkt der Creatinin-Konzentration im Blut und der Zeit berechnen.

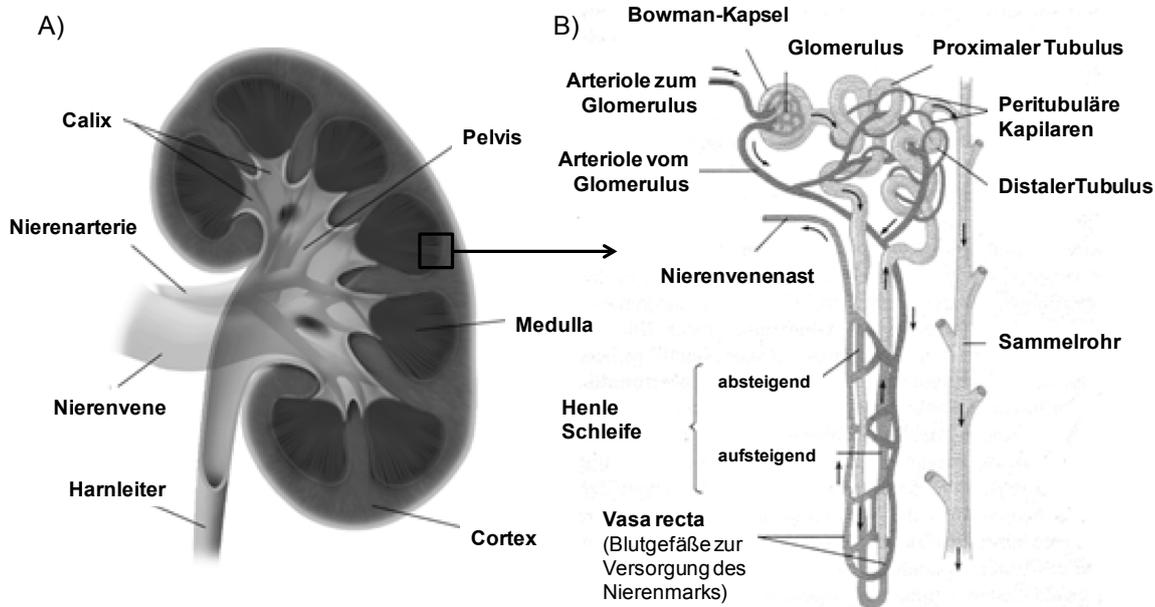


Abbildung 2 Aufbau der Niere (A) und eines Nephrons (B). (Heuer, 2009)

Die Nierenfunktion kann auch indirekt über die Messung harnpflichtiger Abbauprodukte im Serum ermittelt werden. Diese Methode ist seit Jahrzehnten etabliert und wird auch in klinischen Studien eingesetzt. Die gängigsten Parameter sind das oben beschriebene Creatinin sowie der Blut-Harnstoff-Stickstoff (englisch *blood urea nitrogen*, BUN), welcher während des Protein-Abbaus beim Harnstoff-Zyklus in der Leber entsteht. Beide Abbauprodukte werden über die Niere eliminiert, sodass ein Anstieg im Serum indirekt auf eine Funktionsstörung bzw. Schädigung jener hinweist (Kacew and Lee, 2012). Weitere Nierenparameter sind in Tab. 1 gelistet, die Mehrheit wird im Urin gemessen und ist mit typischen Nierenfunktionen assoziiert. Nachteilig jedoch ist bei allen eine meist hohe Insensitivität, d.h. erst bei schwerwiegenden Schäden kommt es zum Anstieg im Urin bzw. Serum. In Tierstudien können final die Nieren selbst histopathologisch untersucht und eventuelle Schäden lokalisiert werden. Über diverse *in vitro* Modelle, wie z.B. perfundierte und isolierte Tubuli oder die Zellkultur von primären oder immortalisierten Nierenzellen, kann die Nephrotoxizität von Substanzen aus folgenden Gründen nur bedingt ermittelt werden. Beeinflussungen auf das Gesamtsystem können nicht direkt nachgewiesen werden, separierte isolierte Nephron-Kompartimente erlauben nur Aussagen über den jeweilig isolierten Teil, und primäre Nierenzellen dedifferenzieren innerhalb kurzer Zeit in Zellkultur (Weiland, 2007). Unter anderem aus diesen Gründen sind *in vitro* Methoden vorrangig nur für erste

Substanz-Screenings oder die Aufklärung einzelner, subzellulärer Toxizitäts-Mechanismen geeignet, nicht jedoch für eine Vorhersage der Nephrotoxizität.

Tabelle 1 Übersicht etablierter Nierenfunktionsparameter bzw. -biomarker. modifiziert (Lash, 2009)

Parameter/ Biomarker	Hinweis auf Störung / Schädigung von...
Urin Osmolarität	Allgemeiner Flüssigkeitshaushalt
Urin Volumen	Allgemeiner Flüssigkeitshaushalt
Urin pH	Säure-Base Gleichgewicht
Elektrolyte (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻)	Zusammensetzung der Extrazellulärflüssigkeit
Urin Glukose	Rückresorption im proximalen Tubulus
Creatinin Exkretion	Glomeruläre Filtration
Proteinuria (< 20 kDa)	Rückresorption im proximalen Tubulus
Proteinuria (> 20 kDa)	Glomerulärer Schaden - Basalmembran
Enzymuria (NAG, GGT, ...)	Schaden bestimmter Nephron-Segmente
BUN und Creatinin im Serum	Glomeruläre Filtration

1.1.2 Leberphysiologie und -toxizität

Die Leber erfüllt ebenfalls essentielle Funktionen im Körper: (1) Synthese von Glukose (Glukoneogenese), Cholesterin und Plasmaproteinen, wie Albumin, α - und β -Globulin, Gerinnungsfaktoren oder Akute-Phase-Proteinen (Fibrinogen, Prothrombin); (2) Bildung der Galle; (3) Speicherung von Glukose in Form von Glykogen, Fett und einigen Vitaminen sowie (4) Abbau und Detoxifikation von endogenen Stoffen (Bilirubin, Ammoniak, Steroidhormonen) und, insbesondere aus toxikologischer Sicht wichtig, von exogenen Substanzen (Kahl et al., 2010).

Über die Leberarterie (Arteria hepatica propria) wird sauerstoffreiches Blut vom Herzen und über die Pfortader (Vena portae) venöses Blut, mit den im Darm resorbierten Stoffen, zur Leber transportiert. Mikroanatomisch ist die Leber in viele kleine hexagonale Abschnitte unterteilt, an deren Eckpunkten je ein Ast der Leberarterie, der Pfortader und ein Gallengang liegen (Abb. 3A). Dieser Bereich wird auch als Glisson'sches Dreieck oder Periportales Feld bezeichnet. Das Blut von Leberarterie und Pfortader läuft in sogenannten Sinusoiden zusammen, zwischen denen die Leberzellen (Hepatozyten) zu Balken angeordnet liegen (Abb. 3B). Die Sinusoide haben ein diskontinuierliches Endothel, sodass hier der Stoffaustausch mit den Hepatozyten stattfinden kann. Des Weiteren findet man in diesem Bereich Kupfferzellen, spezielle Makrophagen des nativen Immunsystems, und Strenzellen, die eine Rolle bei Differenzierungs- und Regenerationsprozessen spielen. Das sinusoidale Blut fließt letztlich in die Zentralvenen (Vena centralis), die schließlich in die großen Lebervenen (Venae hepaticae) münden.

Die in den Hepatozyten stattfindende Biotransformation dient der eigentlichen Umwandlung von endogenen und exogenen Stoffen zu ausscheidbaren Endprodukten und wird in mindestens zwei Phasen unterteilt. In Phase I werden funktionelle Gruppen eingebaut bzw. demaskiert, sodass die Wasserlöslichkeit und Konjugierbarkeit der Metaboliten erhöht wird. Meist handelt es

1 Einleitung

sich dabei um Oxidierungen, wie z.B. die Mono-Oxygenierungen durch Mitglieder der Cytochrom-P450-Enzymfamilie, welche überdurchschnittlich hoch in der Leber exprimiert sind. In Phase II werden an die in Phase I entstandenen Zwischenprodukte funktionelle Gruppen konjugiert, sodass gut wasserlösliche Moleküle entstehen. Beispiele der Phase II Enzyme sind die Glutathion-S-Transferasen, welche das Tripeptid Glutathion konjugieren, oder die Sulfotransferasen, die Sulfatgruppen an Produkte der Phase I konjugieren. Zum Schluss werden die nun wasserlöslichen Endprodukte entweder über die Nieren oder über die Galle ausgeschieden. Diese Phase bezeichnet man oft als Phase III, und die daran beteiligten Membran-Transportproteine als Phase III Transporter.

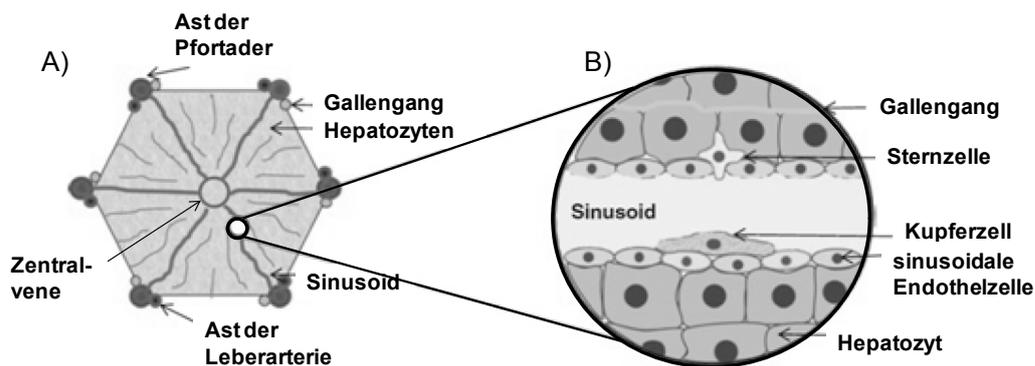


Abbildung 3 Modell der Leberstruktur (A) und eines Sinusoids (B). modifiziert (Kaminskas and Boyd, 2011)

DILI lässt sich in zwei Arten klassifizieren: die intrinsische (DILI-1) und die idiosynkratische Art (DILI-2). DILI-1 ist oft vorhersagbar, reproduzierbar und dosisabhängig. Durch diese Dosisabhängigkeit lassen sich Schwellenwerte ermitteln, ab welchen Toxizität auftritt, wenn die Leber z.B. die Detoxifizierungsfunktion nicht mehr leisten kann. DILI-2 ist nicht vorhersagbar und wahrscheinlich dosisunabhängig (Ozer et al., 2010b). Die Ursachen von DILI-2 sind noch weitestgehend unbekannt und da sie häufig erst in der klinischen Phase auftritt, wird im Folgenden nur auf DILI-1 eingegangen, welches dann synonym mit DILI verwendet wird.

Ähnlich der Niere, weist die Leber aufgrund ihrer Funktion eine Anfälligkeit gegenüber Toxinen auf. Einerseits gelangen alle resorbierten Stoffe aus dem Darm direkt in die Leber und die Hepatozyten, andererseits kann die Bioaktivierung in den Hepatozyten selbst zu reaktiven, toxischen Intermediaten führen. Letzteres tritt in präklinischen Studien häufig auf. Weitere DILI-Mechanismen sind die Induktion von Apoptose und Nekrose, Inflammation und immunvermittelte Reaktionen sowie die Inhibition der endogenen Reparaturmechanismen (Holt and Ju, 2006).

Eine einfache Zytotoxizität lässt sich an kultivierten Hepatozyten (primär oder immortalisiert) (Tuschl et al., 2007), z.B. über die Messung des abundant exprimierten Enzyms LDH (Laktatdehydrogenase) im Zellmedium, testen. Neben den Limitationen von *in vitro* Experimenten per se (keine vollständige metabolische Aktivität, Dedifferenzierung primärer Zellen) liefert der LDH-Test nur einen Hinweis auf Nekrose und nicht Apoptose (Vinken et al., 2009). Nekrose der He-

patozyten *in vitro*, d.h. *in vivo* ein akuter Schaden des Lebergewebes, lässt sich auch über die Messung von Leberenzymen, wie Alanin-Aminotransferasen (ALT) oder Aspartat-Aminotransferasen (AST), in Serum nachweisen. Die ALT Messung wird in präklinischen und klinischen Studien als Gold-Standard für die Diagnose von Leberschädigungen angesehen und gilt nach Ansicht der amerikanischen Zulassungsbehörde Food and Drug Administration (FDA) als der entscheidende DILI Parameter (Shi et al., 2010). Einschränkend ist hervorzuheben, dass ein ALT Anstieg im Serum erst bei gravierender Schädigung oder sogar in Abwesenheit von Hepatozyten Nekrose auftreten kann, z.B. bei Schädigung der Muskulatur. In Ratten die sowohl an Substanz-induzierter Muskel- als auch Leberschädigung litten, konnte ein signifikanter Anstieg von ALT und AST in Serum gemessen werden (Laterza 2009). Die intrahepatische Cholestase (Gallenstauung) ist ebenfalls eine Ausprägung akuter Hepatotoxizität, die u.a. über einen Anstieg von Alkalische Phosphatase (ALP) oder Bilirubin im Serum diagnostiziert wird. ALP ist in vielen Geweben exprimiert, kommt aber in relativ hohen Mengen in Gallengangsepithelzellen vor. Bilirubin ist ein Abbauprodukt des Hämoglobins, welches normalerweise über die Galle ausgeschieden wird. Nachteilig bei der ALP-Messung ist, dass ein Anstieg auch bei Knochenkrankungen möglich ist (Tobiume et al., 1997). Chronische Hepatotoxizität kann über fibrotische Veränderungen zu Leberzirrhose oder Tumorentwicklung führen (Schnellmann, 2013). Die Histopathologie ist vor allem bei dieser Art von Veränderungen eine zuverlässige Nachweismethode; ein akuter Leberschaden lässt sich ebenso eindeutig nachweisen und lokalisieren.

1.2 Toxikologische Modelle

Zur Untersuchung und zum Verständnis von Mechanismen, Abläufen und zugrundeliegenden Ursachen von Substanz-induzierter Organschädigung wurden toxikologische Modelle entwickelt. Meist sind dies Tierstudien, die mit einer gezielten Behandlung mit bereits bekannten Organtoxinen (Modellsubstanzen) durchgeführt werden. Durch das Sammeln unterschiedlicher Probearten (Blut, Urin oder Gewebe) zu unterschiedlichsten Zeitpunkten (vor, nach oder während der Behandlung) können, nach Untersuchung dieser Proben, die molekularen pathologischen Mechanismen aufgeklärt werden. Diese Modelle werden anschließend auch zur Vorhersage der Toxizität ähnlicher Substanzen oder zur Biomarker-Suche genutzt. Da toxikologische Endpunkte oft eine Ähnlichkeit zu bestimmten Krankheiten aufweisen, werden etablierte Krankheits-Modelle ebenfalls als toxikologische Modelle verwendet (Aufklärung gemeinsamer pathologischer Mechanismen). In der präklinischen Entwicklung ist die Ratte als Modelltier für regulatorisch vorgeschriebene toxikologische Studien etabliert und wird daher in toxikologischen Modellen bevorzugt eingesetzt.

Im Folgenden werden mehrere für die vorliegende Arbeit relevante Modelle und ihre Wirkungsweisen vorgestellt.

1.2.1 Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität

Das Zytostatikum Cisplatin (*cis*-Diammindichloroplatinum(II), Cp) wird, sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin, zur Behandlung von diversen Karzinomen verabreicht. Sein Wirkmechanismus beruht auf der Bildung von DNA-Addukten, was wiederum zur Hemmung der DNA-Replikation und zur Induktion von Apoptose in stark proliferierenden Tumorzellen führt (Barabas et al., 2008). Der limitierende Faktor für den Cp-Einsatz bei Krebspatienten sind Nebenwirkungen wie Gastrointestinal-, Oto-, Neuro- und Nephrotoxizität, da die entsprechenden Organe auf eine relativ hohe Zellerneuerungs- und damit Proliferationsrate angewiesen sind. Nephrotoxizität wurde auch bei Ratten als Folge einer Cp-Behandlung festgestellt (Chopra et al., 1982), sodass sich Cp über die Zeit als Modellschadstoff für Nierenschädigung etabliert hat.

Die Eliminierung von Cp erfolgt hauptsächlich über die Niere, wo es zunächst im Glomerulus filtriert wird. Im proximalen Tubulus wird Cp nicht resorbiert, sondern aktiv und spezifisch über den *Organic cation transporter 2* (OCT2) aus dem peritubulären Raum in die Zellen transportiert; zusätzlich diffundiert es auch passiv hinein (Yao et al., 2007). Im Menschen werden OCT-Isoformen auch in anderen Organen exprimiert, diese sind jedoch nicht spezifisch für Cp. OCT2 kommt hauptsächlich in der Niere in proximalen Tubuli vor und ist somit ursächlich für die Nieren-spezifische Cp Anreicherung und die damit verbundene Schädigung (Ciarimboli et al., 2005). Die Zellen des proximalen Tubulus haben keine hohe Teilungsrate, sodass die zytostatische Wirkung von Cp wahrscheinlich sekundär ist. Die genauen Abläufe der Cp-induzierten Nephrotoxizität sind relativ gut untersucht, aber noch sind nicht alle Mechanismen vollständig aufgeklärt. Es wird angenommen, dass die Akkumulation und Umwandlung zu reaktiven Metaboliten eine Rolle spielt, die die Bildung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) einleiten, welche dann zu Membran-Peroxidation, mitochondrialer Dysfunktion (Brady et al., 1990), Inhibition der Proteinsynthese (Leibbrandt et al., 1995) und allgemein zu oxidativem Stress führen. Ein identifizierter toxischer Metabolit ist ein reaktives Thiol, welches durch die Glutathion-Konjugation und die darauffolgende Metabolisierung (u.a. durch die γ -Glutamyltranspeptidase) entsteht (Townsend et al., 2003). Schlussendlich führt dies zur Apoptose bzw. Nekrose, wobei die Apoptose sowohl über den intrinsischen (Caspase-9 Aktivierung durch ROS-geschädigte Mitochondrien) als auch über den extrinsischen Weg (Rezeptor-abhängige Caspase-8 Aktivierung durch den Tumornekrosefaktor α (*tumor necrosis factor α* , TNF α) induziert wird (Kaushal et al., 2001; Tsuruya et al., 2003). Auf Genexpressionsebene konnte ebenfalls eine Hochregulierung von Genen gemessen werden, die mit Apoptose, aber auch mit Detoxifikation und Gewebeumbau assoziiert werden (Huang et al., 2001). Eine vereinfachte Zusammenstellung dieser durch Cp verursachten Vorgänge ist in Abb. 4 dargestellt.

In Ratten ist vor allem das S3 Segment (gerader, absteigender Abschnitt; pars recta) der proximalen Tubuli an der cortico-medullären Grenze geschädigt. Aus diesem Grund wird Cp auch als

Modellsubstanz für die Induktion von proximalen Nierentubulus-Schäden in Ratten eingesetzt. Geringere histopathologische Veränderungen sind aber auch in distalen Tubuli sichtbar (Yao et al., 2007).

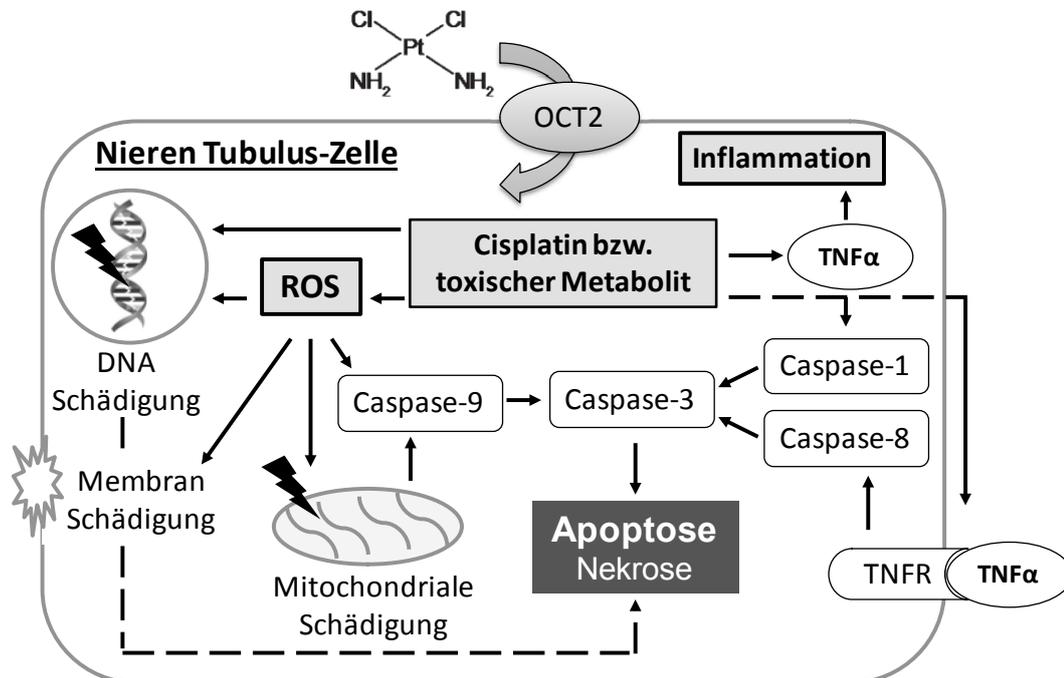


Abbildung 4 Vereinfachte Abläufe bei Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität. OCT2: Organic cation transporter, ROS: Reactive oxygen species, TNF α : Tumor necrosis factor α , TNFR: Tumor necrosis factor receptor. modifiziert (Yao et al., 2007)

1.2.2 Experimentelle Glomerulonephritis

Glomerulonephritis (GN) ist beim Menschen die häufigste Ursache für Nierenversagen und kann durch Infektionen, Medikamente aber auch Autoimmunität ausgelöst werden. Das Krankheitsmodell, die experimentelle GN, wird entweder durch die Immunisierung von Ratten oder Mäusen mit Teilen ihrer glomerulären Basalmembran (*glomerular basement membrane*, GBM) oder durch die Injektion von nephrotoxischem Serum (NTS) induziert. Das NTS wird in einer anderen Tierart, meist Schaf oder Kaninchen, durch die Immunisierung dieser Tierart hergestellt. Die im Serum enthaltenen Schaf Antikörper (Ak) gegen die GBM lagern sich dann in den Glomeruli an und lösen die erste, noch heterologe Phase der Krankheit aus. Die fremden Ak werden vom Immunsystem der Ratten bzw. Mäuse erkannt, welches wiederum eigene Ak gegen diese bildet und somit die autologe Phase auslöst (Pusey, 2003). Zunächst gerinnt das Blut, das Komplementsystem wird aktiviert und verschiedene Leukozyten, hauptsächlich Monozyten bzw. Makrophagen, wandern in die Glomeruli ein (Tam et al., 1999). Neben der Inflammation führt dieses zur mechanischen Verstopfung der glomerulären Kapillaren und dadurch zur lokalen Hypertension. Die weitere Akkumulation von Zellen, sowohl durch Infiltration von Immunzellen als auch durch Proliferation von glomerulären Epithelzellen und Podozyten, und die Produktion von Fibrin und Proteinen der extrazellulären Matrix

1 Einleitung

(ECM) innerhalb der Bowman Kapsel, führen zur Entstehung GN typischen Halbmond-förmigen Zellhaufen (Tipping and Timoshanko, 2005). Dadurch wird das glomeruläre Kapillarknäul zusammengedrückt und der Fluss des Ultrafiltrates gehemmt. Als Folge treten fibrotische Veränderungen (Glomerulosclerosis) und Tubulitis auf, welche zum völligen Nierenversagen führen. Zur Darstellung der betroffenen Glomerulus Kompartimente ist in Abb. 5 der Aufbau eines normalen Glomerulus zu sehen.

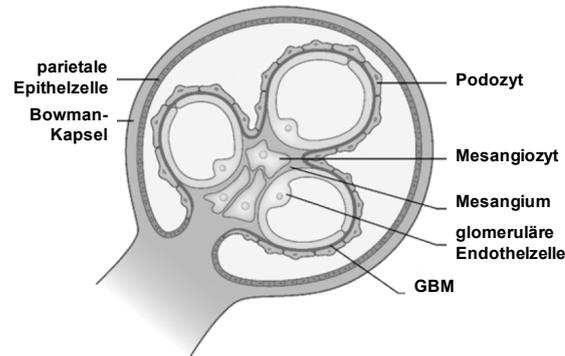


Abbildung 5 Aufbau des Glomerulus. GBM: glomeruläre Basalmembran, modifiziert (Pichler et al., 2013)

Die immunologischen Prozesse bei der GN Entstehung und Entwicklung sind sehr komplex und größtenteils noch nicht aufgeklärt, da sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunantwort beteiligt sind (Reynolds, 2011). Zur zellulären Antwort gehören die in einer GN abundanten Makrophagen (Han et al., 2013), die ROS produzieren und die Glomeruli schädigen sowie die CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen, die u.a. zytolytische Perforine und Granzyme ausschütten (Tipping and Holdsworth, 2006). Autologe Ak, vor allem Immunglobulin G (IgG), können ca. eine Woche nach NTS Verabreichung in den Glomeruli detektiert werden (Tam et al., 1999) und weisen auf die humorale Immunantwort hin. Insgesamt ist die Immunantwort wahrscheinlich T-Helferzelle-1 (Th1) abhängig. Th1-Zellen entstehen aus einer Th0-Zelle durch Zytokin-Aktivierung und Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cell*, APC). APCs tragen Proteinkomplexe auf ihrer Zelloberfläche (*major histocompatibility complex*, MHC), die der Identifikation körpereigener Zellen dienen, und bei der Ratte durch die RT1 Genregion kodiert werden, die homolog zur menschlichen *Human leucocyte antigen* (HLA)-Region ist (Reynolds, 2011). Die RT1 Regionen sind bei den unterschiedlichen Ratten-Stämmen verschieden und scheinen, für die unterschiedliche Anfälligkeit von Ratten-Stämmen gegenüber NTS-induzierter GN ursächlich zu sein (D'Souza et al., 2013); z.B. sind Wistar Kyoto Ratten sehr empfindlich gegenüber NTS-induzierter Schädigung (Kanno et al., 1998; Reynolds, 2011).

1.2.3 Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität

Methapyrilen ([N,N-dimethyl-N'-Pyridyl-N'(2-thienylmethyl)-1,2-ethanediamin, MPy) wurde in den frühen 1940er Jahren als Antihistamin in den USA entwickelt und patentiert (Strukturformel siehe Abb. 6). Wegen seiner sedativen Wirkung kam es 1947 als Bestandteil von Schlafmittel

auf den Markt. Nachdem eine karzenogene Wirkung in Ratten Ende der 1970er nachgewiesen wurde, ist MPy aus dem Handel gezogen worden (Lijinsky et al., 1980). Eine Karzenogenität konnte danach weder in Mäusen (Richardson et al., 1994) noch in Meerschweinchen oder Hamstern nachgewiesen werden (Lijinsky et al., 1983); auch im Menschen gab es keine Anzeichen für eine kanzerogene Wirkung (Mirsalis, 1987). Dies birgt den Anschein, dass die MPy-Karzenogenität speziesspezifisch sein könnte. Karzenogene werden in genotoxische und nicht-genotoxische Substanzen unterschieden. Die genotoxischen induzieren direkt, die nicht-genotoxischen indirekt (z.B. über ROS oder die Anregung der Proliferation) DNA-Mutationen (Ellinger-Ziegelbauer et al., 2008). Da MPy im Ames-Test (Andrews et al., 1980), im Transformations-Assay (Pienta et al., 1977) und im Comet-Assay *in vivo* (Rothfuss et al., 2010) als negativ bezüglich direkter DNA-Schädigung klassifiziert wurde, wird es als ein nicht-genotoxisches Karzenogen angesehen. Die kanzerogene Wirkung von MPy basiert höchstwahrscheinlich auf der, durch intensive Metabolisierung in der Rattenleber, entstehenden Zellschädigung, die schließlich zur Induktion einer regenerativen Hyperplasie führt.

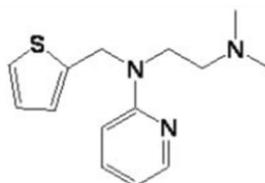


Abbildung 6 Strukturformel von Methapyrilen. (Graham et al., 2008)

In primären Ratten-Hepatozyten konnte eine Transformation von MPy zum einen durch das Phase I Enzym CYP2C11 nachgewiesen werden (Ratra et al., 1998a). Zum anderen konnte in der Galle von MPy-behandelten Ratten ein glucuronidierter MPy-Metabolit gemessen werden. Dies deutet auf Phase II Glucuronidierung und die Exkretion über die Galle hin (Ratra et al., 2000). Des Weiteren treten auch Glutathion-konjugierte MPy-Metaboliten und eine Glutathion-Abnahme im Zusammenhang mit einer MPy-Toxizität auf (Gao et al., 2010; Ratra et al., 1998b). Dies lässt die Entstehung von reaktiven Metaboliten vermuten, die dann an zelluläre Proteine binden können und dadurch deren Funktion stören. Außerdem spielt Glutathion eine entscheidende Rolle bei der Detoxifizierung von elektrophilen Intermediaten und freien Radikalen, so dass oxidativer Stress nach Abnahme der Glutathion Level auch als eine mögliche Ursache der MPy-Toxizität angesehen wird. In anderen Untersuchungen wurden mitochondriale Proliferation, der Verlust der mitochondrialen Ca^{2+} -Homöostase und erhöhte Permeabilität der Mitochondrienmembran über die Öffnung von Porenkomplexen ebenfalls mit MPy-Toxizität assoziiert (Ratra et al., 1998b; Reznik-Schuller and Lijinsky, 1981). Neuere Toxicogenomics und Proteomics Ergebnisse konnten viele der beschriebenen Effekte auf Genexpressions- und Protein-Ebene bestätigen. So wurden Gene und Proteine, die mit Stress Response, Apoptose, aber auch Regeneration und Proliferation assoziiert sind, nach einer MPy-Behandlung hochreguliert (Auman et al., 2007; Craig et al., 2006; Ellinger-Ziegelbauer et al., 2005; Hamadeh et al., 2002).

1 Einleitung

Das MPy-induzierte histopathologische Bild ist meist moderat, sodass es bevorzugt zu mechanistischen Analyse von nicht-genotoxischen Kanzerogenen verwendet wird. Es umfasst hepatocelluläre Nekrose im periportalen Bereich sowie Lipid Vakuolisierung, Inflammation mit Infiltration von mononukleären Zellen und Gallengangs Hyperplasie (Graichen et al., 1985; Hamadeh et al., 2002).

1.3 Biomarker

Der Begriff Biomarker (BM) setzt sich zusammen aus den Wörtern „biologischer Marker“ und steht im Allgemeinen für Indikatoren eines physiologischen, meist patho-physiologischen Zustandes (Strimbu and Tavel, 2010). Die Biomarker Definitions-Arbeitsgruppe des National Health Institute (NIH) definierte BM als ein Charakteristikum, welches objektiv gemessen werden kann und evaluiert ist als Indikator für normale biologische Prozesse, für pathologische Prozesse oder für pharmakologische Reaktionen auf eine therapeutische Behandlung (NIH, 2001). Abhängig davon, ob BM indikativ, diagnostisch oder prognostische sind, können sie in verschiedenen Untergruppen zusammengefasst werden (Jain, 2010). Im Folgenden wird BM als Indikator eines pathologischen Zustands verstanden. Ein BM an sich kann verschiedenartig sein: einfache Moleküle wie Metaboliten, Kohlenhydrate, Steroide oder Lipide, aber auch komplexere Moleküle wie DNA, RNA, Proteine oder sogar Zellen können als BM dienen.

Da BM meist spezifische und zugleich sensitive Indikatoren sind, stehen sie auch in der Entwicklung von neuen Pharmaka im Fokus. In präklinischen sowie in klinischen Studien gibt es eine Vielzahl etablierter BM, wie die oben erwähnten Transaminasen im Serum als BM für Hepatotoxizität oder BUN als BM für Nephrotoxizität. Da diese etablierten BM oftmals deutliche Nachteile, wie geringe Sensitivität oder mangelnde Spezifität aufweisen, wird kontinuierlich in die Suche, Qualifizierung und Validierung neuer BM investiert, um zukünftig das Risiko für Tier und Mensch in präklinischen und klinischen Studien reduzieren zu können. Zusätzlich könnten Dauer und Kostenintensität für die Entwicklung neuer Substanzen reduziert werden (Dieterle and Sistare, 2010).

Ein idealer BM sollte entsprechend der FDA folgende Merkmale aufweisen: 1.) er sollte spezifisch mit einem bestimmten pathologische Zustand assoziiert sein, 2.) er sollte ähnliche physiologische Zustände differenzieren können, 3.) er sollte in wenig invasiven, leicht zugänglichen Quellen, wie in Serum/Plasma oder im Urin, vorhanden sein, 4.) er sollte schnell, einfach, akkurat und günstig detektierbar sein, mit einem messbaren Basallevel als Referenz und 5.) er sollte translational, d.h. sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien einsetzbar sein (Wallace et al., 2001). Dem folgend sollte ein Sicherheits-BM detektierbar sein, bevor ein irreversibler Organschaden eintritt (sensitiv), und er sollte auch mit dem jeweiligen Organ assoziiert sein (organspezifisch). Durch die Spezifität zum pathologischen Mechanismus bzw. zum Organ wäre

dieser auch *in vitro* anwendbar und könnte zusätzlich zur molekularen Aufklärung beitragen (Amacher, 2010).

Basierend auf den idealen Charakteristika ist der Evaluierungsprozess neuer BM in mehrere Stufen unterteilt. In einer ersten Stufe müssen potentielle BM für einen bestimmten pathologischen Zustand identifiziert und in mehreren Studien verifiziert werden, die dasselbe Erkrankungsbild zeigen. In einer zweiten Stufe muss gezeigt werden, dass diese BM spezifisch sind für diesen bestimmten pathologischen Zustand und letztlich muss eine validierte Messmethode entwickelt werden. Die Validität der Messmethode für einen BM bezieht sich auf bioanalytische Merkmale des Test-Systems, wie u.a. Sensitivität (Detektionsgrenzen), Spezifität (Kreuzreaktivität mit ähnlichen Molekülen) und Reproduzierbarkeit (Intra- und Interassay-Varianz). Wenn alle Kriterien nachweislich gemessen, beschrieben und definiert wurden, gilt der BM Test als valide (Jain, 2010). Ein BM kann abschließend mit einem validierten Test für einen bestimmten Kontext qualifiziert werden. Die Qualifizierung wird offiziell von einer Zulassungsbehörde (FDA, EMA), basierend auf den Ergebnissen einer ausgiebigen Evaluierung des BMs in dem angestrebten Kontext, z.B. der Diagnose einer spezifischen Organschädigung in präklinischen Rattenstudien, erteilt werden (Muller and Dieterle, 2009). Bisher ist eine Vielzahl an potentiellen BM in der Literatur beschrieben worden, aber nur wenige wurden validiert, qualifiziert und werden tatsächlich eingesetzt (Poste, 2011).

Dem Predictive Safety Testing Consortium (PSTC), einem Zusammenschluss mehrerer Pharmaunternehmen, ist es 2008 gelungen, sieben Protein-BM zur Detektion von Nephrotoxizität durch die FDA und EMA für den Einsatz in präklinischen Rattenstudien zu qualifizieren (EMA, 2009); diese sind in Tab. 2 beschrieben. Die pharmazeutischen Unternehmen und die FDA hatten das Ziel, durch die Zusammenarbeit im PSTC eine Verbesserung der Vorhersage und Diagnose von Organschädigungen in präklinischen Studien durch die Anwendung neuer Sicherheits-BM zu erreichen.

Zunächst wurden die bei Toxizitätsstudien am häufigsten betroffenen Organe benannt: Niere, Leber, Skelettmuskulatur, Blutgefäßsystem, Herz und Hoden. Darauf folgend wurden, basierend auf Literaturdaten, BM-Kandidaten selektiert beziehungsweise in Studien, die jeweils diese spezifischen Organschäden zeigten, identifiziert, durch *proof-of-concept* Studien verifiziert und schließlich regulatorisch qualifiziert Tab. 2 (Dennis et al., 2013). Anschließend wurden die entsprechenden Ergebnisse veröffentlicht. Am Beispiel akuter Nierenschädigung konnte gezeigt werden, dass alle sieben BM bei Messungen im Rattenurin eine frühere Detektion im Vergleich zu Serum Creatinin oder BUN erlaubten und darüber hinaus noch zusätzliche Informationen, wie z.B. die Lokalisation des Schadens, liefern (Dieterle et al., 2010b).

1 Einleitung

Tabelle 2 Qualifizierte Protein-Biomarker für Nephrotoxizität im Urin von Ratten. a: Evaluiert vom PSTC, qualifiziert für akute tubuläre Schäden; b: evaluiert vom PSTC, qualifiziert für glomeruläre Schäden; c: evaluiert von HESI, qualifiziert für Schäden des Sammelrohres

qualif. BM	Übertrifft sCrea/BUN	Lokalisation des Nierenschadens	Beschreibung
ALB	JA ^a	proximaler Tubulus / Glomerulus	<p>Albumin: Häufigstes Protein im Blut, 66-69 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Wegen stark negativer Ladung nicht frei im Glomerulus gefiltert; nur kleiner Teil in Primärharn nachweisbar • Erhöht im Urin bei glom. Schaden oder bei unvollständiger Resorption durch geschädigte proximale Tubuli (Swain et al., 2011; Ware et al., 2011; Yu et al., 2010)
CLU	JA ^a	proximaler / distaler Tubulus	<p>Clusterin: Glykoprotein, 75-80 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • In vielen Geweben exprimiert und sekretiert • Erhöhte Expression in der Niere nach Schädigung gefolgt von Sekretion in den Urin (Dieterle et al., 2010a; Hidaka et al., 2002; Rosenberg and Silken- sen, 1995)
CysC	JA ^b	proximaler Tubulus / Glomerulus	<p>Cystatin C: Extrazelluläre Cysteine-Protease, 13 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • In allen kernhaltigen Zellen exprimiert • Glomerulär frei gefiltert • Genutzt zur Bestimmung der GFR, vergl. mit sCrea • In der Niere vor allem in prox. Tubuluszellen exprimiert und dort auch resorbiert • Erhöht im Urin bei glom. und prox. Tubulus Schaden (Dieterle et al., 2010a; Hoffmann et al., 2010a; Togashi et al., 2013a; Togashi et al., 2012)
KIM-1	JA ^a	proximaler Tubulus	<p>Kidney injury molecule 1: Typ I Transmembranprotein, 100 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Nicht im gesunden Nierengewebe exprimiert • Erhöhte Expression in prox. Tubulus Epithelzellen bei Toxizität • Bei Schädigung der prox. Tubuli Abspaltung und Abgabe der Ektodomäne in den Urin (Ozer et al., 2010a; Vinken et al., 2012; Zhou et al., 2008)
RPA-1	JA ^c	Sammelrohr	<p>Renal paillary antigen-1: Membran-gebundenes Glykoprotein, >100 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Stark exprimiert im papillären Sammelrohr • Erhöht im Urin bei Sammelrohrschädigung (Betton et al., 2012; Harpur et al., 2011; Price et al., 2010)
TFF3	JA ^b	proximaler / distaler Tubulus	<p>Trefoil factor 3: Hormon, 6-7 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exprimiert und sekretiert in Mukus-produzierenden und diversen anderen Epithelzellen • Reduzierte Expression in Nieren nach Schädigung • Reduzierte Mengen im Urin nach Nierenschädigung (Early et al., 2013; Wadey et al., 2013; Yu et al., 2010)
Total Prot.	JA ^b	Glomerulus	<p>Totale Proteinmenge:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Urin normalerweise nahezu Protein-frei • Negativ geladene oder >70 kDa Proteine passieren Blut-Harn-Schranke im Glomerulus nicht • Restprotein Resorption zusätzlich im prox. Tub. • Erhöht im Urin bei glom. Schaden (Dieterle et al., 2010a; Swain et al., 2012; Tonomura et al., 2010)
β2m	JA ^b	proximaler Tubulus / Glomerulus	<p>β-2-Microglobulin: MHC-I Subunit, 12 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • In der Membran aller kernhaltiger Zellen exprimiert • Glomerulär frei gefiltert. • Resorption im prox. Tubulus • Erhöht im Urin bei glom. und prox. Tubulus Schaden (Dieterle et al., 2010a; Gatanaga et al., 2006; Vinken et al., 2012)

Weiterhin führte dieser erste Qualifizierungsprozess für BM zur Veröffentlichung erster FDA-Richtlinien bezogen auf die Qualifizierung von Hilfsmitteln in der Medikamentenentwicklung (FDA, 2010). So wurde daraufhin das *Renal papillary antigen 1* (RPA-1) als BM für Nierenschädigungen im Bereich der Sammelrohre in präklinischen Studien qualifiziert. Diese Evaluierung wurde in einem anderen Kollaborations-Projekt, dem Health and Environmental Sciences Institute (HESI) Komitee Biomarker of Nephrotoxicity, durchgeführt (Harpur et al., 2011).

Neben den qualifizierten Nephrotoxizitäts-BM gibt es weitere vielversprechende Kandidaten (Fuchs and Hewitt, 2011), wie α GST (α Glutathion-S-transferase) oder NGAL (Lipocalin-2, *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) für proximale Nierentubulusschäden (Gautier et al., 2010; Wadey et al., 2013). Eine Zusammenfassung noch nicht qualifizierter potentieller BM für Nephrotoxizität in Rattenstudien ist in Tab. 3 dargestellt.

Tabelle 3 Potentielle Protein-Biomarker für Nephrotoxizität im Urin von Ratten.

potentielle BM	Lokalisation des Nierenschadens	Beschreibung
CALB	distaler Tubulus	<p>Calbindin: Vitamin-D abhängiges Ca^{2+}-bindendes Protein, 28 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exprimiert im Interstitium und in der Niere • In der Niere in distalen Tubuli lokalisiert • Erhöht im Urin bei Schädigung der distalen Tubuli (Fuchs et al., 2012; Hoffmann et al., 2010b; Takashi et al., 1996)
NGAL	proximaler / distaler Tubulus	<p>Neutrophilengelatine-assoziertes Lipocalin: Transportprotein von bakteriellen Siderophoren, 25 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exprimiert im Interstitium von Neutrophilen und Epithelzellen • mRNA in der Niere in dist. Tubuli exprimiert, als Protein im prox. Tubuli lokalisiert • Erhöht im Urin bei Schädigung der dist. oder prox. Tubuli (Hoffmann et al., 2010a; Hoffmann et al., 2010b; Mishra et al., 2003; Sieber et al., 2009; Tonomura et al., 2010)
OPN	proximaler / distaler Tubulus	<p>Osteopontin: Phosphoryliertes Glykoprotein, ca. 40 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Exprimiert in Osteoblasten und diversen Epithelzellen • Erhöhte Expression nach Nierenschädigung • In der Niere im absteigenden Ast der Henle'schen Schleife lokalisiert • Erhöht im Urin bei Schädigung der dist. oder prox. Tubuli (Fuchs et al., 2012; Wadey et al., 2013; Xie et al., 2001)
TIMP-1	Glomerulus	<p>Tissue inhibitors of metalloproteinases: MMP-Inhibitor Glykoprotein, 28 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • In diversen Epithelzellen exprimiert • Glomerulär frei gefiltert • Erhöht im Urin bei glom. Schaden und bei inflammatorischen Reaktionen in der Niere (Fuchs et al., 2012; Hoffmann et al., 2010b; Sieber et al., 2009)
α GST	proximaler Tubulus	<p>α-Glutathiontransferase: Phase II Enzym, ca. 50 kDa</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ubiquitär in Zytosol exprimiert • Am höchsten in der Leber, gefolgt von der Niere; dort vor allem in den prox. Tubuli • Erhöht im Plasma bei Leberschädigungen • Erhöht im Urin bei prox. Tubulus Schaden (Gautier et al., 2010; Harpur et al., 2011; McDuffie et al., 2013; Swain et al., 2011)

1 Einleitung

Neue BM für Hepatotoxizität konnten bisher nicht qualifiziert werden, obwohl einerseits, wie oben beschrieben, die vorhandenen BM nicht ausreichend spezifisch und sensitiv das Spektrum der verschiedenen Leberschäden abdecken können (Ennulat et al., 2010) und andererseits bereits potentielle Marker beschrieben worden sind (Ramaiah, 2011). Für das antioxidative Leberenzym Paraoxonase 1 (PON-1) wurden z.B. nach Leberschädigung mit Tetrachlorkohlensstoff niedrigere Serumwerte in Ratten gemessen (Ferre et al., 2001). Diese konnten aber nicht verlässlich mit anderen Hepatotoxinen reproduziert werden (Adler et al., 2010). α GST und GLDH, beides hoch exprimierte Enzyme in der Leber, sind ebenfalls potentielle Serum BM für Hepatotoxizität in Ratten (Giffen et al., 2002; O'Brien et al., 2002).

1.4 microRNAs

Seit der ersten Entdeckung von microRNAs (miRNA, miR) 1993 in *C.elegans* (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) und dem dann folgenden Nachweis auch in höheren Lebewesen (Lagos-Quintana et al., 2001; Pasquinelli et al., 2000) ist das miRNA Forschungsgebiet exponentiell gewachsen.

MicroRNAs sind 20-23 Nukleotide (nt) lange, nicht-kodierende und evolutionär konservierte kleine RNA-Moleküle (Ibanez-Ventoso et al., 2008). Nach der aktuellen Version von miRBase *release* 20 (miRBase, 2013), einer Datenbank für miRNAs, sind 711 miRNAs in Ratten, 1887 in Mäusen und 2560 humane miRNAs bekannt (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Neben ihren essentiellen intrazellulären Aufgaben, die im folgenden Abschnitt beschrieben werden, lenkte vor allem auch die extrazelluläre Präsenz das Interesse der Biomarkerforschung auf die miRNAs, welches im Abschnitt 1.4.2 näher erläutert wird.

1.4.1 Biogenese und Funktion von microRNAs

Die Transkription der meisten miRNA-Gene, die in Introns oder Exons von mRNA-kodierenden Genen oder in nicht-mRNA-kodierenden Bereichen liegen können, erfolgt durch die Polymerase II (Lee et al., 2004). Die miRNA Transkription wird ähnlich wie die mRNA Transkription z.B. durch diverse Transkriptionsfaktoren oder über Promoter-Methylierungen reguliert. Das primäre Transkript, die pri-miRNA (Abb. 7) besitzt am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kappe und oft einen 3'-Poly-A-Schwanz (Lee et al., 2002). Die von der pri-miRNA gebildete Sekundärstruktur enthält einen *hairpin-loop*, der noch im Kern von der RNase III Endonuklease Drosha erkannt wird, sodass beide Enden abgespalten werden. Die entstandene ca. 70 nt lange, doppelsträngige RNA mit *hairpin-loop* wird pre-miRNA genannt (Lee et al., 2003). Diese wird Ran-GTP-abhängig mittels Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Im Zytoplasma formiert sich dann der RISC-*loading complex* (RLC), der u.a. aus der RNase III Endonuklease Dicer und einem RNA-bindenden Argonautprotein (AGO) mit Endonuklease-Aktivität besteht (Winter and Diederichs, 2011). Über AGO bindet der RLC

die exportierte pre-miRNA, was zur Dicer-abhängigen Abspaltung des *hairpin-loops* führt (Carmell and Hannon, 2004). Die entstandene Duplex-miRNA (20-23 nt) dissoziiert mit dem AGO-Protein vom RLC und bildet mit weiteren Faktoren den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Infolgedessen werden die Stränge, wahrscheinlich durch Helicasen, voneinander getrennt und einer der Duplex Stränge wird degradiert (*passanger* Strang), während der andere im Komplex verbleibt; dieser wird als *guide* Strang oder reife miRNA bezeichnet (Winter and Diederichs, 2011). Genauen Abläufe und Trigger, die entscheiden, welcher der Stränge *passanger* oder *guide* wird, sind noch nicht geklärt. Anfänglich wurde angenommen, dass ein Strang instabiler ist und degradiert wird, doch die Identifikation beider Stränge als *guide* Strang in Abhängigkeit vom Expressionsort relativierte die Hypothese (Chiang et al., 2010). Die Strangherkunft der reifen miRNA spiegelt sich in der Nomenklatur wider. Zu dem gängigen Namen (miR-Nummer, z.B. miR-125) kann bei bekannter Zuordnung der *passenger* Strang mit einem Stern markiert werden (miR-125*). Möglich und heutzutage favorisiert ist auch eine allgemeinere Benennung: die 5'- oder 3'-Herkunft wird als Suffix angegeben, z.B. miR-125-5p oder miR-125-3p (Elton et al., 2011; Griffiths-Jones, 2004).

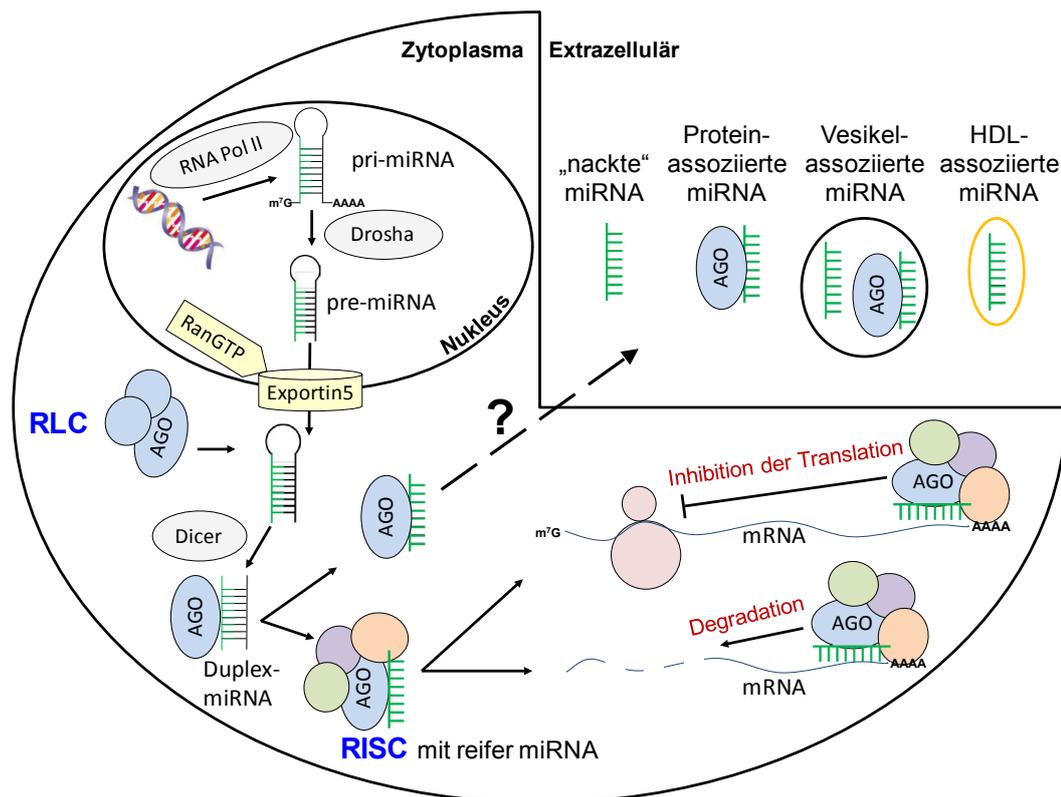


Abbildung 7 microRNA Biogenese. AGO: Argonautprotein, RNA Pol II: RNA-Polymerase II, RLC: RISC-loading complex, RISC: RNA-induced silencing complex, modifiziert (Etheridge et al., 2011)

Mit Hilfe der inkorporierten reifen miRNA kann der gesamte RISC komplementär an eine mRNA binden und dadurch die Translation der mRNA inhibieren, bei unvollständiger Komplementarität, oder die mRNA Degradation initiieren, bei vollständiger Komplementarität (Bartel, 2004; Eulalio et al., 2008). Die Funktion der miRNAs liegt dementsprechend in der post-

1 Einleitung

transkriptionalen Regulation der Genexpression. Da auch eine nicht vollständig komplementäre Bindung zwischen miRNA-RISC und mRNA für einen negativen Effekt auf die Genexpression ausreichend ist, kann eine miRNA hunderte mRNAs regulieren und umgekehrt kann eine mRNA durch mehrere miRNAs reguliert werden (Filipowicz et al., 2008). Es wird geschätzt, dass über 50% der proteinkodierenden Gene in Säugetieren durch miRNAs reguliert werden (Krol et al., 2010). Davon lässt sich ableiten, dass miRNAs an diversen physiologischen und zellulären Prozessen beteiligt sind, wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Stammzellerhaltung, Fettmetabolismus und Insulinsekretion (Wiemer, 2007).

Es konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Gewebe oder gleiche Organe in unterschiedlichen Entwicklungsstadien eine differenzielle miRNA Expression aufweisen (Landgraf et al., 2007; Lee et al., 2006). Beispiele sind die leberspezifische miR-122 (Lagos-Quintana et al., 2002), die im Muskel angereicherten miR-133a und -b (Sempere et al., 2004), die stammzell-spezifische miR-302 Familie (Barroso-del Jesus et al., 2009) oder die kardiomyozytenspezifische miR-208a (van Rooij et al., 2007). Die Spezifität von miR-208a z.B. beruht auf der Lokalisation des miRNA-Gens im Gen für die α Untereinheit der schweren Kette des kardialen Myosins. Des Weiteren sind miRNAs auch Teil gut untersuchter Transkriptionsfaktor-Netzwerke, wie dem p53-Netzwerk (Hermeking, 2012). Ihre Beteiligung an essentiellen Abläufen führt auch zu einer Assoziation mit diversen Erkrankungen. Für eine Vielzahl an miRNAs konnte eine Deregulation in kardiovaskulären, Leber- oder Nierenerkrankungen und Krebs nachgewiesen werden (Ceman and Saugstad, 2011; Li et al., 2010; Szabo and Bala, 2013; Visone and Croce, 2009; Wang and Lee, 2009).

1.4.2 Extrazelluläre microRNAs

Erstmalig konnten bereits 1947 Nukleinsäuren im menschlichen Plasma nachgewiesen werden (Mandel and Metais, 1947). Darauf folgten einige Beschreibungen von extrazellulärer DNA oder mRNA in Plasma, Serum oder Urin (Chan et al., 2003; Kamm and Smith, 1972; Leon et al., 1977). Nach Entdeckung der miRNAs in der Zelle wurden diese zunächst *in vitro* außerhalb von Zellen detektiert (Valadi et al., 2007). *In vivo* wurden extrazelluläre miRNAs zuerst im Serum - auch zirkulierende miRNAs genannt - gefunden (Chen et al., 2008; Chim et al., 2008; Mitchell et al., 2008) und danach in weiteren Körperflüssigkeiten, wie u.a. in Urin, Tränenflüssigkeit, Muttermilch, Speichel oder Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit (Weber et al., 2010).

Der extrazelluläre Raum ist reich an Ribonukleasen (Sorrentino, 1998), dennoch weisen miRNAs ein hohes Maß an Stabilität auf, auch gegenüber inadäquater Lagerung, pH-Wert Schwankungen und Einfrier-Auftau-Zyklen (Li et al., 2011b; McDonald et al., 2011; Mitchell et al., 2008; Mraz et al., 2009). Die Ursache der miRNA Stabilität liegt wahrscheinlich darin begründet, dass miRNAs extrazellulär wahrscheinlich nicht „nackt“ vorliegen, sondern an Proteine wie AGO,

Nucleophosmin 1 oder *high-density lipoprotein (HDL)* gebunden sind (Arroyo et al., 2011; Vickers et al., 2011; Vickers and Remaley, 2012; Wang et al., 2010c) sowie in Vesikeln eingepackt sein können (Xu et al., 2013) (Abb. 7). Der Terminus Vesikel steht hier stellvertretend für diverse membranumschlossene Partikel, in denen miRNAs bereits identifiziert wurden (Hoy and Buck, 2012), z.B. apoptotische Körperchen (Zernecke et al., 2009), Exosomen (Valadi et al., 2007) und Mikrovesikel (Muralidharan-Chari et al., 2009). Die Art der extrazellulären Form scheint dabei miRNA abhängig zu sein, da gezeigt wurde, dass z.B. die miR-122 im Plasma immer an das AGO2-Protein gebunden ist, während einige miRNAs der let-7 Familie extrazellulär bevorzugt in Vesikel gefunden werden (Creemers et al., 2012).

Ausgehend von diesen unterschiedlichen extrazellulären miRNA Formen gibt es unterschiedliche Hypothesen, wie die miRNAs die Zellen verlassen (Turchinovich et al., 2011). Einerseits ist passiver Export durch Nekrose denkbar, d.h. ein Auslaufen des Zellinhalts nach einer Membranschädigung; dieser wäre funktionslos und nicht zielgerichtet. Andererseits weisen Exosomen mit differenziell eingepackten miRNAs im Vergleich zum Donor-Zellinhalt (Mittelbrunn et al., 2011) auf einen selektiven und aktiven Export hin. Dies könnte bei zirkulierenden miRNAs mit interzellulärer Kommunikation als mögliche Funktion verbunden sein (Boon and Vickers, 2013). Mittels *in vitro* Versuchen wurde nachgewiesen, dass Zellen miRNAs exportieren können, welche dann von anderen Zellen aufgenommen werden und dort die Genexpression regulieren können (Hergenreider et al., 2012; Kosaka et al., 2010; Zhang et al., 2010b). Messungen im humanen Serum zeigten, dass miRNA in Menge und Zusammensetzung relativ stabil sind und dass es keine großen Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt (Chen et al., 2008). Die Ergebnisse verschiedener und unabhängiger Messungen zeigten eine große Überlappung der gefundenen miRNAs (Reid et al., 2011), was zusätzlich die Hypothese eines aktiven Exportes unterstützt.

1.4.3 microRNAs als Biomarker

Welche Funktion vor allem aktiv abgegebene zirkulierende miRNAs haben oder haben könnten ist bisher noch nicht eindeutig nachgewiesen, aber mit der Entdeckung der extrazellulären miRNAs wurde direkt ihr potentiell diagnostischer Einsatz als miRNA-BM erkannt. So wurde noch im Entdeckungsjahr gezeigt, dass sich die miRNA-Profile im Serum zwischen gesunden Individuen und Patienten mit B-Zell Lymphoma unterscheiden; konkret wurden bei den Krebspatienten erhöhte Serumlevel von drei miRNAs, miR-21, -155 und -210, identifiziert (Lawrie et al., 2008). Darauf folgend wurde für verschiedene Krebserkrankungen, wie Leukämie, Lungen-, Kolorektal-, Brust- oder Leberkarzinome, eine Vielzahl an potentiellen miRNA-BM im Serum beschrieben (Brase et al., 2010; Cortez and Calin, 2009).

Die Idee von miRNAs als BM ist naheliegend, da die Charakteristika zellfreier miRNAs den Anforderungen eines idealen BM (s. Abschnitt 1.3) entsprechen: Sie sind (1) in diversen, leicht

1 Einleitung

zugänglichen Körperflüssigkeiten messbar, (2) relativ stabil, (3) zwischen verschiedenen Spezies konserviert und (4) gewebespezifisch bzw. mit einem physiologischen oder pathologischen Zustand spezifisch assoziiert. Da miRNAs Nukleinsäuren sind, ist eine sensitive Messung mittels quantitativer Polymerase-Ketten-Reaktion (*quantitative polymerase chain reaction*, qPCR) möglich. Weiterhin ist vor allem ihre konservierte Sequenz im Vergleich zu Protein-BM vorteilhaft, da sie den Einsatz als translationalen BM in präklinischen und klinischen Studien ermöglicht. Protein-BM zeigen z.T. eine hohe Diversität zwischen toxikologisch relevanten Spezies, aufgrund von Sequenzvariationen im kodierenden Gen und post-translationaler Modifikationen des Proteins. Dies erfordert meist eine aufwändige Herstellung spezies-spezifischer Ak für denselben BM, was nachteilig für die Quantifizierung und Translationalität eines BM ist (Etheridge et al., 2011).

Den vielversprechenden Ergebnissen der Krebsforschung folgend konnten auch für andere Erkrankungen miRNA-BM im Blut identifiziert werden. Veränderte miRNA-Profile im Serum wurden bei rheumatoider Arthritis, Arthrose (Osteoarthritis), Arteriosclerosis obliterans, Sepsis oder bei Herzinfarkten (*acute myocardial infarction*, AMI) gefunden (D'Alessandra et al., 2010; Ji et al., 2009; Li et al., 2011a; Murata et al., 2010; Nakasa et al., 2008; Vasilescu et al., 2009). Einer der identifizierten AMI-BM ist miR-208, die Kardiomyozyten-spezifisch ist und im Serum nur nach Herzinfarkt, nicht aber nach Niereninfarkt ansteigt, sodass die spezifische Assoziation mit einer Schädigung des Herzgewebes eindeutig belegt ist, in Ratten wie auch im Menschen (D'Alessandra et al., 2010; Ji et al., 2009; Wang et al., 2010b). Nach dem Nachweis von Exosomen im Urin (Pisitkun et al., 2004) in denen auch miRNAs gefunden wurden (Miranda et al., 2010), wurden bald auch potentielle miRNA-BM im Urin beschrieben. Zunächst ebenfalls für Krebserkrankungen (Prostata-, Nierenzell- oder Blasenkarzinom), dann auch für den systemischen Lupus erythematosus oder die Immunoglobulin Nephropathy (Argyropoulos et al., 2013; Mlcochova et al., 2013; Wang et al., 2010a). Zuletzt konnten unterschiedliche Urinprofile zwischen Patienten mit und ohne akute Nierenschädigung nachgewiesen werden (Ramachandran et al., 2013).

Als eine neue Quelle von potentiellen BM haben miRNAs auch in der präklinischen/ klinischen Forschung Bedeutung erlangt; z.B. wurde die gerade erwähnte, bei Herzinfarkt im Serum erhöhte miR-208 ebenso in einem weiteren kardiotoxischen Modell als BM identifiziert, indem Ratten mit Isoproterenol behandelt wurden, was zur myokardialen Schädigung und zu einem Anstieg der miRNA im Serum führte (Ji et al., 2009). Isoproterenol ist ein häufig eingesetztes und gut beschriebenes Modelltoxin für die Induktion von akuter Herzschädigung (Clements et al., 2010).

In einem Lebertoxizitätsmodell, bei dem DILI durch eine Acetaminophen Behandlung von Mäusen induziert wurde, konnte ein Anstieg der in der Leber exprimierten miRNAs, miR-122 und -

192, im Plasma nachgewiesen werden (Wang et al., 2009b). Ähnliches konnte auch in Ratten und in Humanproben gemessen werden (Laterza et al., 2009; Starkey Lewis et al., 2011). In weiteren Studien mit Ratten konnte ein signifikanter Anstieg von miR-122 im Serum nur bei spezifischer hepatozellulärer Schädigung gemessen werden und das meist früher oder eindeutiger als bei etablierten BM wie z.B. ALT (Laterza et al., 2009; Starckx et al., 2013).

Insgesamt zeigten Untersuchungen verschiedener Rattenmodelle für Leberschädigungen, dass sich die jeweiligen miRNA-Profile im Plasma unterscheiden. Dies lässt vermuten, dass zwischen akuter und chronischer Hepatotoxizität unterschieden werden könnte (Yamaura et al., 2012).

MiRNA-Profile im Urin von Ratten wurden bisher in Hepatotoxizitäts-Modellen untersucht. Nach Acetaminophen- und Tetrachlorkohlenstoff-induzierter Leberschädigung wurden zehn miRNAs gefunden, deren Level im Rattenurin anstiegen (Yang et al., 2012). Die Leber-spezifische miR-122 gehörte nicht dazu.

Im Hinblick auf Diagnose von Nierentoxizität mit Hilfe von miRNAs sind bisher nur wenige Untersuchungen beschrieben. In einem Mausmodell für Nierenfibrose als auch in Patienten mit Nierenfibrose wurden erhöhte Mengen einer miRNA (miR-21) im Serum gemessen (Glowacki et al., 2013). In zwei anderen Mausmodellen zur Nierenschädigung konnten ein signifikanter Anstieg von miR-10a und -30d im Urin gemessen werden. Da beide miRNAs in der Niere exprimiert werden, wurden sie als nicht-invasive und spezifische Urin-BM für Nierenschädigungen vorgeschlagen (Wang et al. 2012b). Veränderte Profile von miR-21 und -155 wurden auch im Urin von Ratten nach induzierter Nierenschädigung gemessen (Saikumar et al., 2012).

1.5 Ziel der Dissertation

Substanz-induzierte Organschädigungen, wie Arzneimittel-induzierte Nieren- und Leberschädigungen, stellen häufige Probleme in der Forschung und Entwicklung von Arzneimitteln dar. Die etablierten Biomarker zur Detektion dieser Organschäden (z.B. die Messung von Serum Creatinin für Nieren- oder von ALT für Leberschädigung) sind weder sensitiv noch spezifisch genug. Eindeutige Befunde ergeben sich derzeit nur durch histopathologische Untersuchungen, die invasiv sind und deshalb nur nach Sektion der Tiere in toxikologischen Studien oder nach Organbiopsie bei Patienten, durchführbar. Um Organschädigungen frühzeitig, eindeutig und nicht invasiv diagnostizieren zu können und so Versuchstiere, Zeit und Kosten in der präklinischen Entwicklung einzusparen, wird intensiv nach neuen Sicherheits-Biomarkern gesucht. Bei gezeigter Übertragbarkeit der Biomarker-Eigenschaften auf den Menschen könnten diese auch in klinischen Studien eingesetzt werden.

Für eine Gruppe von Urinproteinen wurde der Einsatz zur Bestimmung von Nephrotoxizität in präklinischen Studien behördlich zugelassen. Des Weiteren führte die Ausweitung der Biomark-

1 Einleitung

ersuche auf eine neue Molekülklasse, die microRNAs, bisher zu vielversprechenden Kandidaten im Falle der Hepato- und Kardiotoxizität.

In der vorliegenden Arbeit sollten, an Hand der oben beschriebenen Nephro- und Hepatotoxizitätsmodelle, zunächst die neuen Proteinbiomarker im Urin für Nephrotoxizität re-evaluiert werden. Der Fokus lag auf dem Vergleich zu etablierten Parametern und auf der spezifischen Detektion der Schädigung. Parallel dazu sollten dabei zwei gängige technisch validierte Plattformen zur Messung dieser Biomarker im Hinblick auf die Übereinstimmung der Ergebnisse sowie auf die Übereinstimmung der gemessenen absoluten Konzentrationen verglichen werden. Letzteres ist für die Definition von Basalleveln von Bedeutung.

Darauf sollten microRNAs als neue Biomarker für Leber- und Nierentoxizität evaluiert werden. Dies beinhaltete die Messung von microRNAs in Gewebe, Plasma und Urin, und die Etablierung eines Normalisierungs- und Quantifizierungsansatzes für Urin-bzw. Plasma-microRNA PCR-Daten. Potentielle microRNA-Biomarker in Urin und Plasma sollten bezüglich ihrer Sensitivität (Vergleich zu pathologischen Endpunkten und etablierten Parametern), Organspezifität (Niere vs. Leber) und Lokalisationsspezifität innerhalb der Niere (proximaler Nierentubulus vs. Glomerulus) evaluiert werden, um potentielle Nephro- oder Hepatotoxizitäts Biomarker zu identifizieren bzw. bereits beschriebene näher zu charakterisieren. Eine Übertragbarkeit der potentiellen microRNA-Biomarker auf ein *in vitro* Modell sollte mittels der Behandlung der Nierentubulus Zelllinie NRK-52e mit Cisplatin geprüft werden.

Weiterführend sollten die toxikologischen Modelle mittels Genexpressionsanalysen der betroffenen Organe mechanistisch charakterisiert sowie mittels miRNA Messungen im jeweiligen Gewebe regulatorische Netzwerke aufgedeckt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien und Chemikalien

- Accutase®; PAA The cell culture company; Österreich
- Albumin Lösung aus Rinderserum (BSA, 30%); Sigma, USA
- Anti-Digoxigenin-alkalische phosphatase vom Schaaf; Roche, Schweiz
- Anti-Rat Glomeruli Serum vom Schaaf; Probetex, USA
- CASYclean; Roche, USA
- CASYton; Roche, USA
- Cisplatin; Sigma Aldrich, USA
- Cisplatin; Sigma, Deutschland
- Destilliertes Wasser (RNase frei); Gibco® by life technologies, Deutschland
- Dinatriumphosphat; Sigma-Aldrich, USA
- Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 1g/l D-Glu und Pyruvat; Gibco® by life technologies, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid); Affymetrix (Ambion), USA
- DNase (RNase frei); Qiagen, Deutschland
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); Sigma, Deutschland
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS; RNase-frei); Gibco® by life technologies, Deutschland
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Sigma, Deutschland
- Eosin B; Sigma-Aldrich, USA
- Essigsäure; Merck, Deutschland
- Ethanol (100 %); Merck, Deutschland
- Eukitt; Fluka, Sigma-Aldrich, USA
- Fetales Rinderserum (FBS); PAA The cell culture company; Austria
- Formaldehyde; Merck, Deutschland
- Glutaraldehyde (25% Lösung); Sigma-Aldrich, USA
- HRP-Conjugated Streptavidin; Affymetrix, USA
- Kaliumacetat; Sigma, Deutschland
- Kaliumchlorid; Sigma, Deutschland
- Lachshoden-DNA (Salmon testes DNA); Sigma, Deutschland
- Levamisolhydrochlorid; Sigma-Aldrich, USA
- Methanol; Merck, Deutschland
- Methapyrilen; Sigma Aldrich, USA
- 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromide (MTT); Sigma-Aldrich, USA
- Natriumchlorid; Sigma, Deutschland
- Natriumnitrit; Sigma-Aldrich, USA
- Natriumphosphat; Sigma-Aldrich, USA
- NBT/BCIP ready-to-use Tabletten; Roche, Schweiz
- Normales Schaafs Serum; Jackson Immunoresearch, USA
- Penicillin/Streptomycin-Lösung (10,000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Strepromycin); Sigma-Aldrich, USA
- Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS); Gibco® by life technologies, Deutschland
- Proteinase K; Qiagen , Deutschland
- RNA 6000 Ladder; Ambion Inc., USA
- RNALater; Qiagen , Deutschland
- Sodium dodecyl sulfate (SDS); Sigma-Aldrich, USA
- SSC Puffer (Saline-Sodium Citrate, 20x); Sigma-Aldrich, USA
- Stop Solution; Affymetrix, USA
- Streptavidin-HRP (Horseradish-Peroxidase); Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
- TaqMan® Geneexpression Master Mix; Applied Biosystems by life technologies, USA

2 Material und Methoden

- TaqMan® Preamplification Master Mix; Applied Biosystems by life technologies, USA
- TaqMan® Universal Master Mix II, no UNG; Applied Biosystems by life technologies, USA
- TE-Puffer (RNase frei 20x, 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 2,5); Invitrogen by life technologies, USA
- TE-Puffer (Tris-EDTA, RNase-frei); Acros Organics, Thermo Fisher Scientific Inc.
- TMB-Substrat Lösung ; Pierce, Thermo Fisher Scientific, USA
- TMB-Substrat Lösung ; Affymetrix, USA
- Trizma® hydrochlorid; Fluka, Sigma-Aldrich, USA
- Tween® 20; Sigma-Aldrich, USA
- Wasserstoffperoxid 30%; Sigma-Aldrich, USA
- Xylol; Sigma Aldrich, USA
- β-Mercaptoethanol; Sigma, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterial

- 384-Well Reaktionsplatten; Applied Biosystems by life technologies, USA
- 6-Well Platten (steril); Sarstedt, Deutschland
- 96-Well Platten (steril); Falcon, Becton Dickinson, Deutschland
- 96-Well Platten; Becton Dickinson, USA
- ABI Prism® 96-Well Optical Reaction Plates with Barcode; Applied Biosystems by life technologies, USA
- Combitips plus 10 ml/5 ml/0,5 ml; Eppendorf, Deutschland
- Deckgläser (24 x 24 mm); Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Deutschland
- Einwegkanülen Stericon (21G); Braun, Deutschland
- Einwegspritzen (1 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml); BD Biosciences, Deutschland
- Eppendorfgefäße (0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml); Eppendorf AG
- Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml); BD Biosciences, Deutschland
- Fixogum; Marabu, Deutschland
- Flat bottim Immobilizer Amino - 8 well strip; Affymetrix, USA
- Gewebekulturflaschen, T75; BD Biosciences
- Low-bind Eppendorfgefäße (0,5 ml); Eppendorf, Deutschland
- MicroAmp® Optical Adhesive Film; Applied Biosystems by life technologies, USA
- Objektträger Superfrost® PLUS; Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Deutschland
- PCR Softtubes (0,5 ml); Biozym Scientific, Deutschland
- Phase Lock Gel Heavy Tubes (2 ml); 5Prime, Deutschland
- Pipetten, gestopft (10 ml, 25 ml); Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen,
- Pipetten, gestopft, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml); BD Falcon, Deutschland
- Pipetten, gestopft, steril, breite Öffnung (5 ml, 10 ml); BD Falcon, Deutschland
- Pipettenspitzen, 10 µl; Biozym Scientific GmbH, Deutschland
- Pipettenspitzen, 20 µl; ART® 20 Pipet Tips, Molecular Bio Products, Inc., USA
- Pipettenspitzen, steril (µl: 2,5; 10; 20; 100; 1000; 2500); Eppendorf und Biozym, Deutschland
- Röhrchen (steril, 8 ml); Sarstedt, Deutschland
- Rundfilter 11cm, Macherey-Nagel, Deutschland
- UV-Star® 384-Well-Platten; Greiner Bio-One GmbH, Deutschland

2.1.3 Kits, Microarrays und MicroRNA Arrays

- Affymetrix® Flashtag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit; Affymetrix, USA
- Argutus AKI Test® Assay Kit; Meso Scale Discovery, USA
- CellTiter-Glo Luminescent Zellviabilitäts Assay; Promega, USA
- Combur 9 Test dip-stick; Roche, Schweiz
- GeneChip® 3"IVT Express Kit; Affymetrix, USA
- GeneChip® Hybridisation, Wash and Stain Kit; Affymetrix, USA
- GeneChip® Microarray; Rat Expression, Array 230_2.0; Affymetrix, USA

- GeneChip® miRNA 3.0 Array; Affymetrix, USA
- GeneChip® Rat Genome 230 2.0 Array; Affymetrix, USA
- Kidney Injury Panel 1 Assay Kit; Meso Scale Discovery, Meso Scale Diagnostics, LLC; USA
- Kidney Toxicity Panels 1 und 2; Luminex xMAP, Novagen, EMD Chemicals, Inc., Merck KGaA, USA
- miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimierungs Kit Nr.5; Exiqon, Dänemark
- miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR, ExiLENT SYBR®Green Master Mix; Exiqon, Dänemark
- miRCURY LNATM Universal RT microRNA PCR, Universal cDNA Synthesis Kit II; Exiqon, Dänemark
- miRNeasy Mini Kit; Qiagen, Deutschland
- Pico RNA Chips; Agilent Technologies, Deutschland
- Pico RNA Reagents & Supplies; Agilent Technologies, Deutschland
- Rat B2M Assay Kit; Meso Scale Discovery, USA
- Rat Clusterin Assay Kit; Meso Scale Discovery, USA
- RNA 6000 Nano Chips; Agilent Technologies, Deutschland
- RNA 6000 Nano Reagents & Supplies; Agilent Technologies, Deutschland
- RNase free DNase Set; Qiagen, Deutschland
- RNeasy Mini Kit; Qiagen, Deutschland
- Small RNA Chips; Agilent Technologies, Deutschland
- Small RNA Reagents & Supplies; Agilent Technologies, Deutschland
- TaqMan® MicroRNA Reverse Transcriptions Kit, Applied Biosystems by life technologies, USA
- TaqMan® Rodent MicroRNA Arrays A und B, Applied Biosystems by life technologies, USA
- Universal Rat Reference RNA; Stratagene, Agilent Technologies, Deutschland

2.1.4 Geräte

- 12-Kanalpipette (25-200 µl); Dunn Labortechnik, Deutschland
- Absaugpumpe Vacusafe; IBS Integra BioScience, Deutschland
- Analysenwaage; Mettler/Toledo, Deutschland
- Bioanalyser 2100; Agilent Technologies, Deutschland
- Eppendorf Concentrator 5301; Eppendorf, Deutschland
- Eppendorf Plus Multipipette; Eppendorf, Deutschland
- Eppendorf Zentrifuge 5415D; Eppendorf, Deutschland
- Eppendorf Zentrifuge 5415R; Eppendorf, Deutschland
- Eppendorf-Pipetten (2,5 µl, 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl); Eppendorf, Deutschland
- Fluorometer CytoFluor II; PerSeptive Biosystems, USA
- Fluorometer Ultra; Tecan, Schweiz
- GeneChip® Fluidic Station 400; Affymetrix, USA
- GeneChip® Hybridization oven 640; Affymetrix, USA
- GeneChip® Scanner 3000; Affymetrix, USA
- Hybridisierungsöfen; Heraeus Instruments, Deutschland
- Inkubator 6000; Heraeus Instruments, Deutschland
- Inverses Mikroskop DMIRB; Leica, Deutschland
- Inverses Mikroskop Fluovert FS; Leica, Deutschland
- Magnet Stand-96; Ambion, USA
- Mikroskop Axioplan; Zeiss, Deutschland
- MIRAX SCANNER; Zeiss, Deutschland
- Multipipette BioPette (2-20 µl); Axon, USA
- Photometer mit Limineszenzfunktion SpectraFlour Plus; Tecan, Schweiz
- Photometer, SPECTRA max PLUS; Molecular Devices Corporation, USA
- Plattenlesegerät MSD SECTOR; Meso Scale Discovery, USA
- Plattenschüttler TPM-2; Sarstedt, Deutschland
- Real-time PCR Gerät HT7900; Applied Biosystemy by life technology, USA

2 Material und Methoden

- Real-time PCR Gerät ViiA7; Applied Biosystems by life technology, USA
- Schüttler KS250basis; IKA Labortechnik, Deutschland
- Schwingmühle MM200; Retsch, Deutschland
- Spectrophotometer Lambda SCAN 200; MWG-Biotech, Deutschland
- Stahlkugeln (5 mm); Retsch, Deutschland
- Sterilbank; Beck+Thies, Deutschland
- Thermocycler: PTC-200; MJ Research; Biozym Scientific, Deutschland
- Thermomixer comfort (1,5 ml); Eppendorf, Deutschland
- TruTemp DNA Microheating System, Robbins Scientific; Dunn Labortechnik, Deutschland
- Vortex REAX 2000; Heidolph, Deutschland
- Vortex REAX top; Heidolph, Deutschland
- Vortex-Genie2; Scientific Industry. Inc, USA
- Zellzählgerät CASY®; Innovartis, Roche, Schweiz
- Zentrifuge 4-15K; Sigma, Deutschland
- Zentrifuge 4-16K; Sigma, Deutschland

2.1.5 Software

- AGCC Software: Command Console® 3.0.1; Affymetrix, USA
- Agilent 2100 Bioanalyzer Software (2100 expert); Agilent Technologies, Deutschland
- CytoCalc™; PerSeptive Biosystems, USA
- CytoFluor IITM; PerSeptive Biosystems, USA
- DataAssist™ 3.01; Applied Biosystems by life technologies, USA
- ExpressionConsole 1.3; Affymetrix, USA
- Genedata Database 7.6; Genedata, Schweiz
- Genedata Refiner Array 7.6; Genedata, Schweiz
- Genedata solutions in silico: Analyst 7.6; Genedata, Schweiz
- GraphPad Prism 5.04 und 6.0; GraphPad Software, Inc., USA
- Ingenuity IPA; Version: 14400082; Ingenuity® Systems, USA
- KC4 (KinetiCalc for Windows); MWG-Biotech, Deutschland
- Magellan 2.2; Tecan, Schweiz
- MIRAX SCAN Software; Zeiss, Deutschland
- MIRAX Viewer; Carl Zeiss MicroImaging, Deutschland
- MSD Discovery Workbench® Analysis Software; Meso Scale Discovery, USA
- RQ Manager 1.2.1; Applied Biosystems by life technologies, USA
- SDS 2.4.1; Applied Biosystems by life technologies, USA
- SoftMax Pro v 4.3 Enterprise Edition; Molecular Devices, USA
- ViiA7 RUO; Applied Biosystems by life technologies, USA

2.1.6 Puffer und Lösungen

Lyse-Puffer (Gesamt-RNA Isolation):
 50 ml RLT-Puffer (RNeasy Mini Kit)
 0,5 ml β -Mercaptoethanol
 Bei RT 1 Monat haltbar

MTT-Lösung (für Zytotox-Assay):
 5 mg/ ml PBS
 Steril filtriert
 Bei 4°C 3 Jahre haltbar

0,02% PBS-T (für ELOSA):
 500 ml 1x PBS
 100 μ l Tween-20

Wasch-Puffer (für ELOSA):
 500 ml 5x SSC
 250 μ l SDS (final 0,05%)
 25 μ l BSA (final 0,005%)
 Lösen bei 42°C

Blocking Lösung (für ELOSA):
 475 ml PBS
 25 ml BSA (final 5%)

Natriumphosphat Puffer (für Perfusion):
 Lösung A: 2,3g NaH_2PO_4 ad 333 ml H_2O
 Lösung B: 14,2g Na_2HPO_4 ad 2000 ml H_2O
 1260 ml Lösung B mit 240 ml Lösung A mischen
 pH 7,4 einstellen

Spül-Puffer (für Pefusion):
 1000 ml Natriumphosphat-Puffer
 7 g Natriumnitrit

Fixierungs-Lösung:
 400 ml 25% Glutardialdehyd (final 1%)
 750 ml <40% Formalin (final 3%)
 8850 ml Natriumphosphat-Puffer
 70 mg Natriumnitrit

1M Tris-HCl (für ISH):
 15.75 g Tris-HCl einwiegen
 Lösen in 100 ml RNase-freien Wasser
 pH kontrollieren

0,5 M EDTA (für ISH):
 18.81 g EDTA einwiegen
 Lösen in ca. 70 ml RNase-freien Wasser
 Mit NaOH (10 N) pH 8-9 einstellen
 Auf 100 ml auffüllen

5 M NaCl (für ISH):
 29,22 g NaCl einwiegen
 Lösen in 100 ml RNase-freien Wasser
 Zum Lösen ggf. leicht erhitzen

0,1% PBS-T (für ISH):
 500 ml 1x PBS
 500 μ l Tween-20

0,3% H_2O_2 (für ISH):
 1 ml 30% H_2O_2
 Ad 100 ml mit 100% Methanol
 Frisch ansetzen

Proteinase-K Puffer (für ISH):
 900 ml RNase-freies Wasser vorlegen
 5 ml 1 M Tris-HCl dazugeben
 2 ml 0,5 M EDTA dazugeben
 0,2 ml 5 M NaCl dazugeben
 Auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

KTBT Puffer (für ISH):
 900 ml RNase-freies Wasser vorlegen
 7,9 g Tris-HCl (final 50 mM) dazugeben
 8,7 g NaCl (final 150 mM) dazugeben
 0,75 g KCl (final 10 mM) dazugeben
 Auf 100 ml auffüllen und autoklavieren

Blocking Lösung (für ISH):
 10ml 0,1% PBS-T
 200 μ l Schaafs Serum (final 2%)
 330 μ l BSA (final 1%)

Antikörper Verdünnungslösung (für ISH):
 5 ml PBS
 5 ml 0,1% PBS-T (final 0.05%)
 100 μ l Schaf Serum (final 1%)
 330 μ l BSA (final 1%)

AP-Substrat Lösung (für ISH):
 1 NBT-BCIP Tablette in 10 ml Wasser lösen
 20 μ l Levamisol dazugeben (final 0.2 mM)

1% Eosin Stocklösung (für ISH):
 1 g Eosin
 1000 ml H_2O

0,01% Eosin (für ISH):
 2 ml 1% Eosin Stocklösung
 Auf 200 ml auffüllen
 Zugabe einiger Tropfen 99% Essigsäure

2.1.7 qRT-PCR Assays, Oligonukleotide und miRNA-DIG Sonden

Die verwendeten Kontrollgene für die qRT-PCR im Gewebe sind in Tab. 4 gelistet. In Tab. 5 und 7 sind die verwendeten Primer Sets zusammengefasst, d.h. Assays von Exiqon (EXQ) basierend auf der SyberGreen und von Applied Biosystems (ABI) basierend auf der TaqMan® Technologie (TQM) zur qRT-PCR-Messung von miRNAs. Entsprechend der Sequenz wurden entsalzene und HPLC-aufgereinigte synthetische Oligonukleotide für die Herstellung von Standards bei Sigma-Aldrich (Deutschland) bestellt.

Die miRNA-DIG Sonden für die *in situ* Hybridisierung wurden von Exiqon bezogen und sind Doppel-DIG markiert (Tab. 6).

Tabelle 4 PCR-Assays für Housekeeping-Gene im Gewebe von ABI. (TaqMan® Technologie)

RNA	Spezies	TQM Assay	TQM Assay ID
U6	hsa, mmu, rno	U6 snRNA	001973
18S rRNA	hsa, mmu, rno	18S	Hs99999901_s1

Tabelle 5 miRNA PCR-Assays von Exiqon.

miRNA	Spezies	Sequenz	EXQ Assay	EXQ Assay ID
miR-10b-5p	rno	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGU	rno-miR-10b-5p	205499
miR-26a-5p	hsa, mmu, rno	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	hsa-miR-26a-5p	205905
miR-100-5p	hsa, mmu, rno	AACCCGUAGAUCGAAUUGUG	hsa-miR-100-5p	205689
miR-486-5p	hsa, mmu	UCCUGUACUGAGCUGCCCGAG	hsa-miR-486-5p	204001

Tabelle 6 miRNA DIG-Sonden für *in situ* Hybridisierung von Exiqon.

RNA-Sonde	Sonden Sequenz (5'-3')	Endkonzentration	RNA Tm	EXQ Assay ID
U6	CACGAATTTGCGTGTCATCCTT	1 nM	84 °C	90005 (Kit 5)
scrambled	GTGTAACACGTCTATACGCCCA	40 nM	87°C	90005 (Kit 5)
miR-126	AGCATTACTACTCACGGTACG	40 nM	85°C	90005 (Kit 5)
miR-10b	ACACAAATTCGGTTCTACAGGG	100 nM	82°C	41015-15
miR-100	CACAAGTTCGGATCTACGGGTT	100 nM	83°C	18009-15
miR-26a	AGCCTATCCTGGATTACTTGAA	100 nM	85°C	38463-15
miR-192	GGCTGTCAATTCATAGGTCAG	80 nM	83°C	custom design
pre-miR-26a	GGACCTGCACAGCCT	100 nM	88°C	custom design
pre-miR-192	CCAGAGGCGAGATCAGAGTACT	80 nM	83°C	custom design

Tabelle 7 miRNA PCR-Assays von Applied Biosystems. (TaqMan® Technologie)

miRNA	Spezies	Sequenz	TQM Assay	TQM Assay ID
ath-miR159a	<i>A. thaliana</i>	UUUGGAUUUAAGGGAGCUCUA	ath-miR159a	000338
cel-miR-39	<i>C. elegans</i>	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	cel-miR-39	000200
cel-miR-54	<i>C. elegans</i>	UACCCGUAAUCUUAUAAUCCGAG	cel-miR-54	001361
let-7c-5p	hsa, mmu, rno	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	hsa-let-7c	000379
let-7d-5p	hsa, mmu, rno	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	hsa-let-7d	002283
miR-100-5p	hsa, mmu, rno	AACCCGUAGAUCGAAUUGUG	hsa-miR-100	000437
miR-10a-5p	hsa, mmu, rno	UACCCGUAGAUCGAAUUGUG	hsa-miR-10a	000387
miR-10b-5p	rno	CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGU	mmu-miR-10b	001181
miR-122-5p	hsa, mmu, rno	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	hsa-miR-122	002245

miR-133a -3p	hsa, mmu, rno	UUUGGUCCCUUCAACCAGCUG	hsa-miR-133a	002246
mir-134-5p	hsa, mmu, rno	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	mmu-miR-134	001186
miR-1-3p	rno	UGGAAUGUAAAGAAGUGUGUAU	rno-miR-1	002064
miR-141-3p	hsa, mmu, rno	UAACACUGUCUGGUAAGAUGG	hsa-miR-141	000463
miR-146a-5p	hsa, mmu, rno	UGAGAACUGAAUUCUAUGGGUU	hsa-miR-146a	000468
miR-147-3p	hsa, mmu, rno	GUGUGCGGAAAUGCUUCUGCUA	hsa-miR-147b	002262
miR-15b-5p	hsa, mmu, rno	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	hsa-miR-15b	000390
miR-16-5p	hsa, mmu, rno	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	hsa-miR-16	000391
miR-184-3p	hsa, mmu, rno	UGGACGGAGAACUGAUAAAGGGU	hsa-miR-184	000485
miR-185-5p	hsa, mmu, rno	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	hsa-miR-185	002271
miR-192-5p	hsa, mmu, rno	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	hsa-miR-192	000491
miR-193-3p	hsa, mmu, rno	AACUGGCCUACAAGUCCAGU	hsa-miR-193a-3p	002250
miR-196b-5p	hsa, mmu, rno	UAGGUAGUUCCUGUUGUUGGG	hsa-miR-196b	002215
miR-196c-5p	rno	UAGGUAGUUUCGUGUUGUUGGG	rno-miR-196c	002049
miR-197-3p	hsa	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	hsa-miR-197	000497
miR-200a-3p	hsa, mmu, rno	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	hsa-miR-200a	000502
miR-200b-3p	rno	UAAUACUGCCUGGUAUAUGAC	hsa-miR-200b	001800
mir-200b-5p	hsa,rno,mmu	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	hsa-miR-200b*	002274
miR-200c-3p	hsa, mmu	UAAUACUGCCGGGUAUAUGGA	hsa-miR-200c	002300
miR-200c-3p	rno	UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUG	rno-miR-200c	463287_mat
mir-208	rno	AUAAGACGAGCAAAAAGC	rno-miR-208	463567_mat
miR-20a	hsa, mmu, rno	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	hsa-miR-20a	000580
miR-20b-5p	hsa, mmu, rno	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	hsa-miR-20b	001014
miR-21	hsa, mmu, rno	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	hsa-miR-21	000397
miR-210	hsa, mmu, rno	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	hsa-miR-210	000512
miR-211-5p	mmu, rno	UUCUUUUUGUCAUCCUUUGCCU	mmu-miR-211	001199
miR-223	hsa, mmu, rno	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC	hsa-miR-223	000526
miR-23b	hsa, mmu, rno	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	hsa-miR-23b	000400
miR-26a-5p	hsa, mmu, rno	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	hsa-miR-26a	000405
mir-27b	hsa, mmu, rno	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	hsa-miR-27b	000409
mir-29b	hsa, mmu, rno	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	hsa-miR-29b	000413
miR-31	mmu, rno	AGGCAAGAUUGCUGGCAUAGCUG	mmu-miR-31	000185
miR-324	rno	CCACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	rno-miR-324-3	000579
miR-327	rno	CCUUGAGGGGCAUGAGGU	rno-miR-327	001328
miR-339-3p	rno	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCA	rno-miR-339-3p	002059
miR-339-5p	hsa, mmu, rno	UCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	hsa-miR-339-5p	002257
miR-347	rno	UGUCCUCUGGGUCGCCCA	rno-miR-347	001334
miR-34a	hsa, mmu, rno	UGGCAGUGUCUAGCUGGUUGU	hsa-miR-34a	000426
miR-34b-3p	mmu, rno	AAUCACUAACUCCACUGCCAUC	mmu-miR-34b-3p	002618
miR-351-3p	rno	UCCUGAGGAGCCUUUGAGCCUGA	rno-miR-351	002063
miR-381-3p	rno	UAUACAAGGGCAAGCUCU	rno-miR-381	464043_mat
miR-409a-3p	rno	AAUGUUGCUCGGUGAACCCC	rno-miR-409a-3p	002679
miR-429	mmu, rno	UAAUACUGUCUGGUAUUGCCGU	mmu-miR-429	001077
miR-434-3p	mmu, rno	UUUGAACCAUCACUCGACUCCU	mmu-miR-434-3p	002604
miR-486-5p	hsa, mmu	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	hsa-miR-486	001278
miR-499	hsa, mmu, rno	UUAAGACUUGCAGUGAUGUUU	mmu-miR-499	001352
miR-802-5p	rno	UCAGUAACAAAGAUUCAUCCU	rno-miR-802	464572_mat
miR-92a	mmu, rno	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUG	mmu-miR-92	000430

2.1.8 Versuchstiere und Zelllinien

Versuchstiere: Für die Cisplatin- und Methapyrilen-Studien wurden männliche Wistar Ratten (CrI:WI (Han)) verwendet, für die Glomerulonephritis-Studie männliche Wistar Kyoto (WKY/NCrI) und Sprague Dawley® (CrI:SD) Ratten. Alle Ratten wurden von Charles River Laboratories International, Inc. (Deutschland) bezogen. Die Tiere wurden unter optimierten hygienischen Bedingungen in Makrolon® Typ III Käfigen mit Einstreu gehalten. Zugang zu Trinkwasser und Futter wurde *ad libitum* gewährt. Alle Maßnahmen im Zusammenhang mit Bestellung, Haltung, Versorgung und Einsatz der Tiere wurden nach derzeit geltenden Tierschutz Richtlinien und Verordnungen durchgeführt und kontrolliert.

2 Material und Methoden

Zelllinie: Für die *in vitro* Versuche wurden NRK-52e Zellen (*normal rat kidney*; AC 199) verwendet. Dabei handelt es sich um tubulus-epithelial ähnliche Zellen aus der Rattenniere, d.h. sie stammen von Epithelzellen des proximalen Tubulus aus Rattennieren ab (de Larco and Todaro, 1978).

2.2 Methoden

2.2.1 *in vivo* Studien

Die Tierstudien wurden unter der Leitung von Herrn Dr. Björn Riefke (TOX-ITOX-Metabolic Profiling and Clinical Pathology) und Frau Dr. Ina Gröticke (CMR-IE-Laboratory 1) und ihren Mitarbeitern bei der Bayer Pharma AG in Berlin durchgeführt.

2.2.1.1 Studiendesign: Cisplatin-induzierte Nephrotoxizität

Nach einwöchiger Akklimatisierung wurden die, zu dem Zeitpunkt acht Wochen alten, Wistar-Ratten in Gruppen unterteilt und einmalig intraperitoneal mit Cisplatin (Cp) behandelt. Kontrollgruppen erhielten das Cp-Vehikel, physiologische Kochsalzlösung, niedrig Dosis-Gruppen 1 mg/ kg und hoch Dosis-Gruppen 3 mg/ kg Körpergewicht Cp. Vier Tage vor und 3, 5, 8, 15 und 26 Tage nach der Verabreichung wurden Urin und Blut gesammelt (Abb. 8A). Das Blut wurde über die Vena cava entnommen und es wurden sowohl Serum als auch EDTA-Plasma gewonnen. An den Tagen 3, 5, 8, und 26 nach der Behandlung wurde jeweils eine Dosis-Gruppe nekropsiert und die Leber und Nieren entnommen.

2.2.1.2 Studiendesign: Experimentelle Glomerulonephritis

Nach entsprechender Akklimatisierung wurden Wistar Kyoto (WKY) und Sprague Dawley (SD) Ratten in Gruppen unterteilt. Diese erhielten einmalig intravenös eine Dosis nephrotoxisches Serum (NTS, Sheep Anti-Rat Glomeruli Serum von Probetex). Den Tieren der Kontrollgruppen wurden eine entsprechende Menge physiologischer Kochsalzlösung verabreicht. Die WKY Ratten wurden in drei Dosis-Gruppen von je 1/ 2,5 und 5 ml/kg Körpergewicht NTS und die SD Ratten in zwei Dosis-Gruppen von je 1,5 und 5 ml/kg NTS Körpergewicht (Abb. 8B) unterteilt. Sowohl acht Tage als auch 14 Tage nach der Verabreichung wurde Urin gesammelt. Am Tag 14 wurde den Tieren nach Nekropsie Blut und die Nieren entnommen.

2.2.1.3 Studiendesign: Methapyrilen-induzierte Hepatotoxizität

Nach einwöchiger Akklimatisierung wurden die acht Wochen alten Wistar-Ratten in Gruppen unterteilt und 15 Tage lang täglich per Schlund-Sonde mit Methapyrilen (MPy) behandelt. Kontrollgruppen erhielten das MPy-Vehikel, Carboxymethylcellulose, niedrig Dosis-Gruppen 30 mg/ kg und hoch Dosis-Gruppen 80 mg/ kg Körpergewicht MPy. 4, 8, 15 Tage während und 10 Tage nach (entspricht Tag 24) der Behandlung wurden Urin und Blut gesammelt (Abb. 8C). Das Blut wurde über die Vena cava entnommen und es wurden sowohl Serum als auch EDTA-

Plasma gewonnen. An den Tagen 4, 8, 15 und 24 nach der Behandlung wurde jeweils eine Dosis-Gruppe nekropsiert und die Leber und Nieren entnommen.

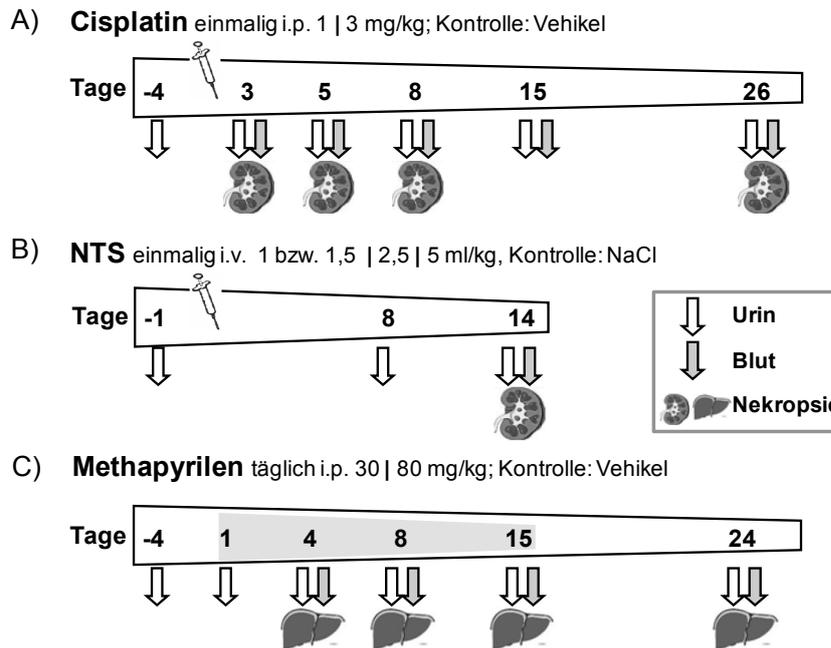


Abbildung 8 Schematische Darstellung des Ablaufs der verschiedenen Studien. Nach A) Cisplatin, B) nephrotoxischem Serum (NTS) und C) Methapyrilen Gabe

2.2.1.4 Harn- und Organaufarbeitung

Für die Harnsammlung wurden die Tiere in allen Studien über Nacht in metabolische Käfige überführt und der Harn wurde währenddessen (18-20h) in ca. 4°C temperierten Sammelgefäßen aufgefangen. Ein Teil des Urins wurde für die miRNA- und Biomarker-Messungen entnommen und für 10 min bei 4°C und 1.600xg zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde anschließend für 10 min bei 4°C und 16.000xg abzentrifugiert und bei -80°C gelagert. Der restliche Urin wurde für die DipStick- und Osmolalitätsanalyse sowie für die quantitative Bestimmung verwendet.

Jeweils eine Niere (vorher 24h in Davidson-Lösung fixiert) und entsprechend Studie auch ein Teil der Leber wurden für histopathologische Untersuchungen in 10%-igem Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die andere Niere sowie die restliche Leber wurden mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren und bis zur RNA-Isolierung bei -80°C gelagert. In der Cp-Studie wurde die andere Niere längs halbiert und einen Tag lang bei 4°C in RNAlater aufbewahrt. Das so stabilisierte Gewebe wurde anschließend ebenfalls bei -80°C gelagert.

2.2.1.5 Histologische Untersuchungen

Die histologischen Untersuchungen wurden von Frau Dr. Katrin Gutberlet (Cp- und MPy-Studie) und Frau Dr. Anna-Lena Frisk (NTS-Studie) und ihren Mitarbeitern in der Pathologie Abteilung der Toxikologie bei Bayer Pharma AG in Berlin durchgeführt.

Von dem, in Formalin fixiertem und in Paraffin eingebettetem, Gewebe wurden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt, welche mit Haematoxylin und Eosin gefärbt wurden. Die beobachteten

2 Material und Methoden

Gewebeschäden wurden benannt und wie folgt klassifiziert: Grad 1 - minimal, Grad 2 - leicht, Grad 3 - moderat, Grad 4 - ausgeprägt, Grad 5 - massiv.

2.2.2 *in vitro* Studie

Für die *in vitro* Studie wurden NRK-52e Zellen eingesetzt, die mit Cp behandelt wurden. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-Medium mit 10% FCS und 1% P/S bei 5% CO₂ und 37°C. Für die Experimente wurden nur die Passagen 4-20 verwendet.

2.2.2.1 Auftauen und Passagieren von Zellen

Die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellstock-Kryoröhrchen wurden im Brutschrank aufgetaut. Kurz vor dem vollständigen Auftauen wurden die Zellen in 10 ml des vorgewärmten Mediums überführt und 8 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 20 ml Medium aufgenommen und in eine T-75 Flasche überführt. Am darauf folgenden Tag wurde der Zellrasen mit 1x PBS gewaschen und anschließend frisches Medium hinzugegeben. Zwei Tage später konnten die Zellen passagiert werden. Bei den NRK-52e Zellen erfolgte dies zweimal wöchentlich. Dazu wurde das alte Medium verworfen und der Zellrasen mit 10 ml 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 5 ml Accutase bei 37°C für 15 min gelöst und in 20 ml Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 8 min bei 300xg und 4°C zentrifugiert und das resultierende Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert. Für die Bestimmung der Zellzahl mittels des Cell Counter CASY wurden 10 µl der Zellsuspension in 10 ml Casyton-Puffer gelöst und die Zellkonzentration gemessen. Die berechnete Menge an Zellsuspension für 0,5-1x10⁶ Zellen wurde in eine T-75 Flasche mit vorgelegtem Medium gegeben.

2.2.2.2 Behandlung von NRK-52e Zellen mit Cisplatin

Das Cp-Pulver wurde für jeden Versuch frisch am Versuchstag in DMSO lichtgeschützt und bei RT gelöst und entsprechend verdünnt. Zu den am vorherigen Tag ausgesäten NRK-52e Zellen (96-Well Platten: 0,5x10⁴ Zellen/Well; 6-Well Platten: 1,5x10⁴ Zellen/Well) wurde das gleiche Volumen einer entsprechenden Cp-Verdünnung dazugegeben. Kontrollzellen wurden mit DMSO-haltigem Medium inkubiert. Cp wurde in den Konzentration von 10 bis 500 µM eingesetzt, wobei die Endkonzentration von DMSO im Well immer unter 0,1% lag. Nach 24 stündiger Cp-Inkubation wurde die Viabilität der Zellen (s.2.2.2.3) bestimmt oder die Zellen wurden für die miRNA-Isolation (s. 2.2.4.2) lysiert. Das Medium wurde für 10 min bei 1600xg und 4°C und der resultierende Überstand für 10 min bei 16000xg und 4°C zentrifugiert. Sowohl die Zelllysate als auch das zentrifugierte Medium wurden bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Bestimmung der Zellviabilität

MTT-Test: Als Maß für die Zellviabilität dient hier die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen, die das gelbliche Salz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-Diphenyl Tetrazoliumbromid) zu blauen, unlöslichen Formazan-Kristallen reduziert. Mittels DMSO werden die Zellen lysiert

und das Formazan freigesetzt, welches photometrisch gemessen werden kann. Die MTT-Stock Lösung (5 mg/ml) wurde 24h nach Cp-Zugabe zur Arbeitslösung (0,45 mg/ml) mit Medium verdünnt und auf die Zellen gegeben. Nach 2h bei 37°C wurde das MTT-haltige Medium durch DMSO ersetzt. Nach kurzen Schütteln und 10 min Inkubation bei RT wurde die Absorption bei 550 nm im Photometer gemessen.

ATP-Test: Mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Kit kann die Menge an ATP (Adenosintriphosphat) gemessen werden, welches als Maß für die metabolische Aktivität von Zellen dient und somit indirekt für die Viabilität. Die Messung beruht auf der ATP-abhängigen Umsetzung von Luziferin zu Oxyluziferin durch eine rekombinante Luziferase. Die dabei entstehende Lumineszenz kann im Luminometer gemessen werden. Das CellTiter-Glo[®] Substrat und der Puffer wurden gemischt und 30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen nach 24-stündiger Cp-Behandlung ebenfalls auf RT gebracht. Die Hälfte des Mediums wurde abgenommen und das gleichen Volumen an CellTiter-Glo[®] Lösung dazugegeben. Nach 2 min Schütteln und 10 min Inkubation bei RT wurde die Lumineszenz gemessen.

2.2.3 Messung von Proteinbiomarkern im Urin

Neue Proteinbiomarker für die Detektion von Nephrotoxizität in Ratten wurden mit zwei verschiedenen Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)-Varianten gemessen: dem elektrochemilumineszenz-basierten System von MesoScale Discovery (MSD) (siehe 2.2.3.1) und dem Bead-basierten System mit Luminex-Technologie (LMX) (siehe 2.2.3.2). Beide Plattformen sind bezüglich ihrer bioanalytischen Charakteristika, wie Linearität, Spezifität, inter- und intra-Assay Präzision von den Herstellern validiert und für die Messung von Urinproben ausgelegt.

Die Korrelation der gemessenen absoluten Konzentrationen der zwei Plattformen wurde mittels einer Korrelationsgeraden (X-Achse: Urin-Creatinin normalisierte MSD-Konzentrationen; Y-Achse: Urni-Creatinin normalisierte LMX-Konzentrationen) und dem daraus resultierenden Korrelationskoeffizienten (R^2) verglichen. Ein R^2 von 1 stellt dabei eine ideale Korrelation dar.

Die Übereinstimmungsgrenzen (limits of agreement, LoA) der jeweiligen Konzentrationen wurden mittels Bland-Altman Diagrammen aufgestellt. Sie wurden in GraphPad Prism 6 mit Creatinin normalisierte MSD- und LMX Konzentrationen erstellt, indem für jeden Probe die Differenz (LMX Wert – MSD Wert) und der Mittelwert $((\text{LMX Wert} + \text{MSD Wert})/2)$ berechnet wurden. Ein LoA von 0 stellt gleiche Konzentrationen dar, während positive bzw. negative LoA Wert für systematisch höhere LMX bzw. MSD Konzentrationen stehen.

2.2.3.1 MesoScale Discovery Plattform

Das Messprinzip der MesoScale Discovery Plattform beruht auf Elektrochemilumineszenz und ermöglicht die Messung von einzelnen (singleplex), aber auch gleichzeitig von mehreren (multiplex) Biomarkern. Dafür werden Urinproben in spezielle 96-Well Platten mit pro Well eingebau-

2 Material und Methoden

ten Elektroden und immobilisierten Antikörpern gegeben. Diese Antikörper sind spezifisch für die jeweiligen Biomarker, sodass diese daran binden. Dem Sandwich-Prinzip entsprechend werden die gebundenen Biomarker mit anderen, markierten Antikörpern erkannt. Die Markierung ist hier ein Rutheniumkomplex mit vier Sulfonatresten (Ruthenium(III)-tris-bipyridin-(4-methylsulfonat)-N-hydroxysuccinimidester; SULFO-TAG™). Bei der finalen Detektion wird Spannung an die Elektroden angelegt, was zu einer Oxidierung des Rutheniumkomplexes und des im Detektionspuffer enthaltenen Tripropylamin (TPA) führt. Das dadurch entstandene TPA•+ Radikal spaltet spontan ein Proton ab und wirkt darauf als starkes Reduktionsmittel für den Rutheniumkomplex. Letzteres geht in einen elektronisch angeregten Zustand über, emittiert Licht, welches bei 620 nm gemessen wird, und geht dann wieder in seinen Grundzustand zurück.

Die Biomarker Albumin (ALB), Lipocalin-2 (*Neutrophil gelatinase associated lipocalin*, NGAL), Osteopontin (OPN) und *Kidney injury molecule 1* (KIM-) wurden mit dem Kidney Injury Panel 1 (rat) Assay gemessen; Glutathiontransferasen α und γ (α GST und GSTYb1) und *Renal papillary antigen 1* (RPA-1) mit dem Argutus AKI Test (rat) Assay. Mit dem RAT Clusterin Assay wurde Clusterin (CLU) und mit dem Rat B2M Assay β -2-Microglobulin (β 2M) gemessen. Die Messungen erfolgten nach Angaben des Herstellers und verliefen bei allen vier Assays vergleichbar; daher folgt eine kurze und allgemeine Zusammenfassung des Ablaufes.

Zunächst wurden die Platten 1h mit einer Blockerlösung bei RT inkubiert. Die Urinproben wurden 1:10 oder 1:100 verdünnt und mit der seriellen Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standardgemisches auf die geblockte Platte gegeben. Nach einer 2h Inkubation bei RT wurden die Platten mit PBS-T gewaschen. Die folgende Inkubation mit dem Detektions-Antikörper erfolgte bei RT für 2h. Nach erneutem Waschen mit PBS-T wurde der Detektionspuffer aufgetragen und die Platte sofort im MSD Sector gemessen. Mit der MSD Discovery Workbench® Analysis Software wurden die Messergebnisse ausgewertet.

2.2.3.2 Luminex Plattform

Die Grundlage der Luminex Technologie bildet die Bead-basierte Durchflusszytometrie, welche ebenfalls eine parallele Messung von mehreren Biomarkern ermöglicht (multiplex).

Auf den Beads befinden sich immobilisierte *capture* Antikörper. Entsprechend der Antikörper sind die Beads mit einem eindeutigen und individuellen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Werden der Beads-Mix und die Probe vermischt, binden die jeweiligen Analyten, hier Biomarker, in der Probe an die *capture* Antikörper. Biotinylierte Detektions-Antikörper und SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin) dienen zur Erkennung der gebundenen Biomarker. Im Durchflusszytometer werden dann die Beads an sich und parallel dazu auch die eventuell gebundenen Biomarker durch die PE Fluoreszenz am Detektions-Antikörper detektiert.

Mit dem WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 1 wurden β 2M, α GST, KIM-1, *Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1* (TIMP-1) und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) und mit

dem WideScreen™ Rat Kidney Toxicity Panel 2 Calbindin (CALB), CLU, Cystatin C (CysC) NGAL und OPN gemessen.

Die Luminex-Messungen wurden von Mitarbeitern der Bayer Pharma AG im Labor von Herrn Dr. Björn Riefke (TOX – ITOX – Metabolic Profiling and Clinical Pathology) in Berlin durchgeführt.

2.2.4 RNA Isolation, Quantifizierung und Qualitätskontrolle

2.2.4.1 Gesamt-RNA Isolation aus Gewebelysaten

Für die Isolation der Gesamt-RNA aus Leber oder Niere wurden ca. 70 mg des jeweiligen Gewebes benötigt. Das zuvor mittels Flüssigstickstoff schockgefrorene Leber- und Nierengewebe, wurde auf Trockeneis zerkleinert. Anschließend wurde die eingewogene Menge mit 1000 µl Lyse-Puffer versetzt. Bei dem Nierengewebe, das in RNAlater gelagert wurde, wurde nach dem Auftauen Medulla und Cortex getrennt und die entsprechende Menge an Nierencortex Gewebe mit 1000 µl Lyse-Puffer versetzt. Das Gewebe im Lyse-Puffer wurde mit Hilfe einer 7 mm Edelstahlkugel in der Schwingmühle zerkleinert und anschließend 5 min bei 16000xg zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde zehnmal mittels Spritze und 21G Kanüle geschert. Ein entsprechendes Volumen des Lysates (7 mg Leber, 30 mg Niere) wurde entnommen und auf 350 µl mit Lyse-Puffer aufgefüllt. Nach der Zugabe von 350 µl 70%igen Ethanol wurde das ganze Gemisch auf eine Silica-Säule gegeben (RNeasy Kit).

Das weitere Vorgehen richtet sich überwiegend nach dem des RNeasy Mini Kit Protokolls. Kurz zusammengefasst wurde die RNA, die an die Silica-Membran bindet, mehrfach gewaschen, mit DNase behandelt und in 60 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Das RNA-Eluat wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 microRNA Isolation aus Gewebe- oder Zellysaten

Das miRNeasy Kit basiert auf dem RNeasy Kit, ermöglicht aber durch eine andere Ethanol-Prozentigkeit und andere Salzkonzentrationen der Wasch-Puffer die Isolation der gesamten RNA inklusive kleiner (< 200 nt) RNAs, zu denen die microRNAs gehören.

Für die Isolation der Gesamt-RNA inkl. kleiner RNA-Spezies wie microRNAs (miRNAs) wurden wie oben beschrieben ebenfalls ca. 70 mg des jeweiligen Gewebes benötigt, welches hier jedoch mit 700 µl QIAzol versetzt wurde. QIAzol ist ein Phenol/Guanidin-basiertes Lyse-Reagenz. Nach dem Zerkleinern in der Schwingmühle und einer Zentrifugation (16000xg, 1 min), wurde ein entsprechendes Volumen des Lysates (10 mg Leber, 20 mg Niere) entnommen und auf 700 µl mit QIAzol aufgefüllt. Nach 5 min bei RT wurde das Gemisch in Phase-Locked-Gel Reaktionsgefäße überführt und mit 140 µl Chloroform versetzt. Anschließend wurde alles für 15 sec gevortext, kurz bei RT inkubiert (ca. 3 min) und 15 min bei 4°C und 16000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und mit dem 1,5-fachen Volumen an 100%igen Ethanol gemischt. Die verbliebene Inter- und organische Phase, welche

2 Material und Methoden

die genomische DNA und Proteine enthält, wurde verworfen. Das Ethanol-Gemisch wurde auf eine Silica-Säule gegeben.

Für die Isolation der Gesamt-RNA inkl. kleiner RNA-Spezies aus NRK-52e Zellen wurden 1.5×10^5 Zellen pro Well auf 6-Well-Platten ausgesät. Zum entsprechenden Zeitpunkt wurde das Medium entfernt, der Zellrasen mit 1xPBS gewaschen und je 700 μ l Qiazol pro Well dazugegeben. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT und anschließendem Vortexen, wurden 140 μ l an Chloroform dazu gegeben. Anschließend wurde alles für 15 sec gevortext, kurz bei RT inkubiert und 15 min bei 4°C und 16000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde mit dem 1,5-fachen Volumen an 100%igen Ethanol gemischt. Das Ethanol-Gemisch wurde auf eine Silica-Säule gegeben.

Sind die Proben-Ethanol-Gemische auf der Silica-Säule, ist das weitere Vorgehen für Gewebe- und Zelllysate gleich und richtet sich überwiegend nach dem miRNeasy Mini Kit Protokoll. Kurz zusammengefasst wurde die RNA inkl. kleiner RNA Spezies, die an die Silica-Membran binden, mehrfach gewaschen, mit DNase behandelt und in 40-60 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Das RNA-Eluat wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4.3 microRNA Isolation aus Urin, Plasma oder Zellkultivierungsmedium

Die Isolation von Gesamt-RNA inkl. kleiner RNA-Spezies aus Urin und Plasma oder aus dem Zellkultivierungsmedium erfolgte mit Hilfe des miRNeasy Mini Kits. Es wurde jeweils 200 μ l der Flüssigkeit eingesetzt und mit dem 3,5-fachen Volumen (700 μ l) an QIAzol gemischt. Nach einer 5 min Inkubation bei RT wurde in jede Probe 2,5 fmol ath-miR-159a (Spike-in, synthetischer nicht-endogener miRNA Oligo aus *A. thaliana*) gegeben. Nach einer weiteren 5 min Inkubation bei RT und energischem Vortexen, wurden 140 μ l Chloroform hinzu gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend der miRNA-Isolation aus Gewebe (vergl. 2.2.4.2). Die DNase-Behandlung wurde ausgelassen, da sie sich auf die RNA-Ausbeute aus Flüssigkeiten negativ auswirkt. Die Gesamt-RNA inkl. kleiner RNA Spezies wurde in 40 μ l RNase-freiem Wasser eluiert. Das RNA-Eluat wurde bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.4.4 RNA Quantifizierung

Die Quantität der aus Gewebe isolierten RNA (mit und ohne kleine RNA-Spezies) erfolgte photometrisch. Dafür wurde die optische Dichte (OD) bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 40 μ g/ml RNA.

Die Quantifizierung der RNA inkl. kleiner RNA-Spezies aus Urin und Plasma oder Zellkultivierungsmedium ist sehr schwierig, da nur sehr geringe Mengen vorhanden sind. Anstelle der photometrischen wurde eine sensitivere fluorimetrische Methode mittels eines RNA-interkalierenden Farbstoffes (RiboGreen™) verwendet. Da sich die errechnete RNA-Konzentration der Proben meist am unteren Detektionsbereich befand, wurden diese nicht für folgende Experimente herangezogen.

2.2.4.5 RNA Qualitätskontrolle

Die Qualität der isolierten Gesamt-RNA aus Gewebe wurde einerseits durch die Berechnung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} bestimmt. Mit der OD_{280} können aromatische Aminosäuren und damit indirekt Proteine gemessen werden. Ein Quotient zwischen 1,8 und 2 zeigt eine qualitativ gute RNA-Probe, die nur wenig bis kaum mit Proteinen kontaminiert ist, an. Zusätzlich wurden mittels des Gelelektrophorese-basierter RNA Nano Kits das Verhältnis von 28S zu 18S rRNA und die RNA Integrity Number (RIN) bestimmt. Das Verhältnis sollte bei mindestens 1,8 liegen und die RIN zwischen 9 und 10, welches kaum degradiertes bis vollkommen intakter RNA entspricht.

2.2.5 Quantitative real-time PCR

Mit Hilfe der quantitativen real-time PCR (qRT-PCR) wurden spezifische miRNAs quantifiziert. Dafür muss die RNA zunächst durch reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) überführt werden (siehe 2.2.5.1). Während der darauffolgenden PCR wird die Menge einer bestimmten cDNA pro Zyklus verdoppelt, indem die Sequenz durch spezifische Primer Polymerase-abhängig amplifiziert wird. Entsprechend der RNA-Ausgangsmenge wird eine Detektionsgrenze in einem bestimmten PCR-Zyklus überschritten; diese Zykluszahl wird als *cycle threshold* (Ct)-Wert angegeben. Die Detektion erfolgt über die Messung der Fluoreszenz, die proportional zur Menge des PCR-Produkts zunimmt und hier entweder von TaqMan® (TQM) Sonden (Applied Biosystems, ABI) oder vom Farbstoff SYBR® Green (Exiqon, EXQ) stammt (s. Abb. 9).

Eine TaqMan® Sonde ist komplementär zur Sequenz des bestimmten Genes und besitzt folgende drei Charakteristika: 1) einen Reporter-Farbstoff am 5'-Ende, hier FAM (6-Carboxyfluorescein); 2) einen Quencher-Farbstoff am 3'-Ende, hier TAMRA (6-Carboxytetramethyl-rhodamin); 3) ein -OH blockierendes Phosphat am 3'-Ende, um eine Extension des 3'-Endes während der PCR zu vermeiden. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde in der Extensions-Phase der PCR hydrolysiert und die Farbstoffe getrennt, sodass der Reporter-Farbstoff fluoreszieren kann (Extinktion 492 nm, Emission 517 nm). SYBR® Green ist ein DNA interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich während der Extensions-Phase der PCR in die neu entstehende doppelsträngige DNA einlagert. Im Komplex wird SYBR® Green bei 497 nm angeregt und emittiert Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm.

Hervorzuheben sind zwei weitere Unterschiede der qRT-PCR Systeme von miRNAs zwischen ABI und EXQ. Während bei der ABI reversen Transkription (RevT) bereits spezifische stem-looped Primer verwendet werden, ist die EXQ RevT durch vorherige Poly-Adenylierung und Poly-dT-Primer universell. Der andere Unterschied ist die Preamplifikation von RevT-Produkten bei ABI. Das ABI qRT-PCR System wurde hier überwiegend eingesetzt und EXQ wurde nur bei mangelnder Sensitivität im Einzelfall verwendet.

2 Material und Methoden

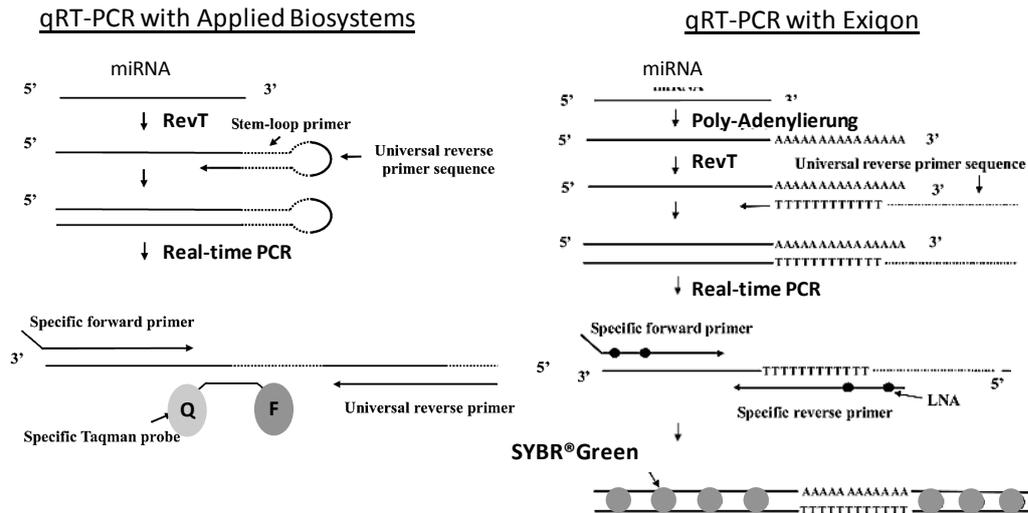


Abbildung 9 Schematische Darstellung der zwei PCR Varianten. Applied Biosystems (ABI) mittels TaqMan Sonde und Exiqon (EXQ) mittels universellem Ansatz und SYBER Green

2.2.5.1 Reverse Transkription von miRNAs (ABI)

Mit Hilfe des TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kits von ABI können spezifische miRNAs aus Gewebe oder Körperflüssigkeiten in cDNA überführt werden. Je nach Ansatz können nur eine oder mehrere miRNAs gleichzeitig umgeschrieben werden: *Megaplex*, gleichzeitige cDNA-Synthese von 380 miRNAs; *5plex*, gleichzeitige cDNA-Synthese von fünf miRNAs; *Singleplex*, cDNA-Synthese einer miRNA.

Tabelle 8 Verwendete RNA Volumina bzw. Mengen in qRT-PCR

RNA Input in RT	Megaplex	5plex	Singleplex
RNA aus Flüssigkeiten	3 µl Eluat	5 µl Eluat	5 µl Eluat
RNA aus Gewebe	1000 ng	10 ng	10 ng

Entsprechend Tab. 8 wurde RNA zum RevT Master Mix gegeben, dessen Zusammensetzung in Tab. 9 zu sehen ist. Da die Quantifizierung der RNA aus Urin, Plasma oder Zellkultur-Medium nicht verlässlich war, wurden statt einer bestimmten RNA Menge, ein bestimmtes Volumen des RNA-Eluates in die RevT eingesetzt. Die thermalen Bedingungen der RevT-Läufe sind in der Tab. 10 aufgezeigt.

Tabelle 9 Zusammensetzung Reverse Transkription von Applied Biosystems (TQM)

Komponenten RevT	Stock Konz.	Megaplex [μ l]	5plex [μ]	Singleplex [μ]
dNTPs (mit dTTP)	100 mM	0,2	0,15	0,15
Reverse Transkriptase	50 U/ μ l	1,5	1	1
RevT-Puffer	10x	0,8	1,5	1,5
RNase-Inhibitor	20 U/ μ l	0,1	0,19	0,19
RevT primer	5x		je 1,43	3
Megaplex RevT Primer Mix	10x	0,8		
MgCl ₂	25 mM	0,9		
H ₂ O		0,2		4,16
Total Master Mix		4,5	10	10
Total RevT		7,5	15	15

Tabelle 10 Ablauf der Reverse Transkription: Megaplex mit 40 Zyklen (A) und 5- bzw. Singleplex ohne Zyklen (B)

A)			B)	
Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit		Temp. [$^{\circ}$ C]	Zeit
16	2 min	40	16	2 min
42	1 min	Zyklen	42	1 min
50	1 sec		85	5 min
85	5 min		4	∞
4	∞			

2.2.5.2 Preamplifikation von miRNAs (ABI)

Die Menge des RevT-Produktes (cDNA), konnte mithilfe der Preamplifikation (PreAmp) vor der eigentlichen real-time PCR erhöht werden. Dieses war vor allem bei den RNA-Proben aus Urin, Plasma oder Zellkultur-Medium notwendig, um die Anzahl der detektierbaren miRNAs zu erhöhen. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die thermalen Bedingungen sind in Tab. 11 und 12 dargestellt. Das Pre-Amp Produkt wurde 20-fach mit TE-Puffer verdünnt.

Tabelle 11 Zusammensetzung PreAmplifikation von Applied Biosystems (TQM)

Komponenten PreAmp	Stock Konz.	Megaplex [μ l]	5plex [μ]	Singleplex [μ]
PreAmp Puffer	2x	12,5	6,25	6,25
Megaplex™ PreAmp Primer Mix	10x	2,5		
TM primer	0.2x		je 0,63	3,15
H ₂ O		7,5	1,85	1,85
Total Master Mix		22,5	11,25	11,25
cDNA		2,5	1,25	1,25
Total PreAmp		25	12,5	

2 Material und Methoden

Tabelle 12 Ablauf der PreAmplifikation: Megaplex mit 12 Zyklen (A) und 5- bzw. Singleplex mit 14 Zyklen (B)

A)		B)	
Temp. [°C]	Zeit	Temp. [°C]	Zeit
95	10 min	95	10 min
55	2 min	95	15 sec
72	2 min	60	4 min
95	15 sec	99,9	10 min
60	4 min	4	∞
99,9	10 min		
4	∞		

2.2.5.3 TaqMan® real-time PCR von miRNAs (ABI)

Die eigentliche Messung der cDNA erfolgte in der real-time PCR. Entsprechend Tab. 13 wurde der Master Mix vorbereitet und für die 5plex und Singleplex Ansätze in 384-Well Platten vorgelegt. Hier ist zu erwähnen, dass die PCR eines multiplex Ansatzes für jede miRNA einzeln durchgeführt wird. Die Proben wurden in Triplikaten im real-time PCR Gerät HT7900 oder ViiA7 gemessen (Tab. 14). Für die Messung der Megaplex-Ansätze wurden TaqMan® MicroRNA Reagent Arrays (TaqMan Cards) A verwendet. Diese sind spezielle 384-Well Platten, die bereits entsprechende Primer und die Sonde enthalten. Pro Well wird dabei eine andere RNA gemessen, bei den A Cards sind es 375 einzelne miRNA Assays; zusätzlich gibt es fünf unterschiedliche small RNA Assays. Jede Probe wurde einzeln auf einer TaqMan Card im HT7900 oder ViiA7 gemessen. Die Baseline- und Threshold-Setzung zur Ct-Wert Bestimmung wurde automatisch von der Software durchgeführt; SDS beim HT7900 oder ViiA7 RUO Software beim ViiA7.

Tabelle 13 Zusammensetzung real time PCR von Applied Biosystems (TQM)

Komponenten PCR	Stock Konz.	Megaplex [µl]	5plex [µ]	Singleplex [µ]
Universal PCR Master Mix	2x	450	5	5
TM primer	20x	in card	0,5	0,5
H ₂ O		441		
verdünntes PreAmp Produkt		9	4,5	
cDNA				4,5
Total PCR		2	10	10

Tabelle 14 Ablauf der PCR (TQM)

Temp. [°C]	Zeit
95	10 min
95	15 sec
60	1 min

2.2.5.4 Universelle Reverse Transkription von microRNAs (EXQ)

Mit dem First-strand cDNA synthesis Kit von EXQ kann die gesamte miRNA in einer Probe revers transkribiert werden. Es wurden je 2 µl RNA-Eluat aus Urin verwendet. Die Zusammensetzung des RevT-Ansatzes und die thermalen Bedingungen sind in Tab. 15A und B zu sehen.

Tabelle 15 Zusammensetzung (A) und Ablauf (B) Reverse Transkription von Exiqon

A)		B)	
Komponenten RevT	Univ. Ansatz [µl]	Temp. [°C]	Zeit
5x Reaktionspuffer	2	42	60 min
Enzym Mix	1	95	5 min
Synth RNA spike	0,5	4	∞
H ₂ O	4,5		
Total Master Mix	8		
RNA-Eluat	2		
Total RevT	10		

2.2.5.5 Syber®Green real-time PCR von miRNAs (EXQ)

Jede miRNA PCR nach EXQ hat ihr eigenes spezifisches Primer-Paar, in welche neben einfachen Nukleotiden auch LNAs™ (*locked nucleic acid*) eingebaut sind. Diese sind modifizierte RNA-Nukleotide, bei denen die Ribose mit einer zusätzlichen Brücke zwischen dem 2'-Sauerstoff und 4'-Kohlenstoff verknüpft ist. Die LNAs™ sind dadurch in der 3'-endo Konformation fixiert und strukturell unflexibel, was ihre Hybridisierungseigenschaften und Affinitäten zur Basenstapelung erhöht. Für die PCR wurde das RevT-Produkt 1:40 mit Wasser verdünnt. Der Ansatz (Tab. 16A) wird in 384-Well-Platten zusammen pipettiert und durchläuft im ViiA7 die in Tab. 16B dargestellten thermalen Bedingungen. Nach Ablauf wurde eine Schmelzkurven Analyse durchgeführt, um eventuell aufgetretene Primer-Dimere nachweisen zu können.

Tabelle 16 Zusammensetzung (A) und Ablauf (B) qPCR von Exiqon

A)		B)	
Komponenten PCR	Ansatz [µl]	Temp. [°C]	Zeit
PCR Master Mix	5	95	10 min
PCR Primer Mix	1	95	10 sec 40
Total Master Mix	6	60	1 min Zyklen
RNA-Eluat	4		
Total PCR	10		

2.2.5.6 PCR Auswertung

2.2.5.6.1 Absolute Quantifizierung von miRNAs mittels Standard Kurve

Die qRT-PCR im 5-, Singleplex oder universellem Ansatz ermöglicht eine parallele Messung von Standardkurven (Std-Kurven), über welche sich die gemessenen miRNAs absolut quantifizieren lassen. Eine miRNA Std-Kurve bestehen aus einer seriellen Verdünnungsreihe ausgehend von einer miRNA Stock Lösung mit bekannter Konzentration. Dazu wurden synthetische

2 Material und Methoden

miRNA Oligonukleotide mit entsprechender Sequenz genutzt. Diese wurden in einer MS2 RNA haltigen Lösung (0,5 ng/μl) verdünnt, welche die Stabilität erhöhen und das natürliche RNA Gemisch in Proben simulieren sollte. Ausgehend von einer Konzentration von 8,19 amol/μl wurde über 10 Verdünnungsschritte die niedrigste Konzentration von $1,25 \times 10^{-4}$ amol/μl erreicht. Mittels des Molekulargewichts der miRNAs konnte auch die Kopienzahl pro μl ermittelt werden: $4,92 \times 10^6 - 75$ Kopien/μl. Da sich die miRNAs in ihrer Länge und Zusammensetzung oft sehr wenig unterscheiden, wurden die Kopienzahlen für alle gemessenen miRNAs verwendet. Jeder einzelne Verdünnungsschritt wurde parallel zu den Proben revers transkribiert, pre-amplifiziert und in der PCR gemessen. Die eigentliche Std-Kurve resultierte aus der graphischen Darstellung der Ct-Werte gegen die bekannte Konzentration bzw. Kopienzahl. Mittels der Geradengleichung wurde die Konzentration bzw. Kopienzahl in den Proben berechnet. Zusätzlich konnte mit der Steigung der Geraden die PCR-Effizienz errechnet werden, die idealerweise zwischen 90-110% liegen sollte. Dieses konnte in manchen Fällen nur durch das Ausschließen entsprechender Std Kurven Punkte erreicht werden. In Tab. 17 sind die Stufen der Std-Kurve dargestellt. Der Ablauf der absoluten Quantifizierung ist als Flußdiagramm in Abb. 23 dargestellt.

Tabelle 17 Serielle Verdünnungsreihe zur Herstellung der Standardkurve

Verdünnungsschritt	Konz. [amol/μl]	Kopien/μl	Verdünnung
1	8.2	4920000.0	
2	2.05	1230000.0	1:4
3	0.5125	307500.0	1:4
4	0.128125	76875.0	1:4
5	0.03203125	19218.8	1:4
6	0.008007813	4804.7	1:4
7	0.002001953	1201.2	1:4
8	0.000500488	300.3	1:4
9	0.000250244	150.1	1:2
10	0.000125122	75.1	1:2

2.2.5.6.2 Relative Quantifizierung von miRNAs aus Gewebe

Grundlage der relativen Quantifizierung ist das Verhältnis von Zielmolekülen zur Anzahl von endogenen Referenztranskripten, welche in allen Proben und unter allen Bedingungen gleichermaßen enthalten sein sollten (Jansohn and Rothhämel, 2012). Üblicherweise werden als endogene Referenzen die so genannten *Housekeeping*-Gene (z.B. 18S rRNA) herangezogen. Bei der miRNA Analyse im Gewebe hat sich die small RNA U6 bewährt. Dieses Prinzip der Quantifizierung wird auch $\Delta\Delta Ct$ -Methode genannt. Für jede Probe und jede miRNA wurden die Ct-Werte der Triplikate gemittelt und folgende Differenzen gebildet:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandelt}} - \Delta Ct_{\text{Kontrolle}} = (Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}})_{\text{Behandelt}} - (Ct_{\text{miRNA}} - Ct_{\text{U6}})_{\text{Kontrolle}}$$

Aus der Berechnung von $2^{-\Delta\Delta Ct}$ resultiert das Verhältnis (*relative quantity* RQ, relative Menge) zwischen Behandelt und Kontrolle: >1 entspricht einer größeren Menge und <1 entspricht einer

kleineren Menge. Die relative Menge wurden dann für die statistische Analysen (T-Test, ANOVA; siehe 2.2.6.2.2) verwendet.

2.2.5.6.3 Relative Quantifizierung von miRNAs aus Urin und Plasma

Für die relative Quantifizierung von miRNAs aus Körperflüssigkeiten gibt es zurzeit kein etabliertes Verfahren. Daher werden im Folgenden unterschiedliche Methoden beschrieben die getestet wurden; alle stellen Modifikationen der oben beschriebenen $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode dar.

Relative Quantifizierung mittels invarianter miRNA: Basierend auf der Idee eines endogenen, invarianten Referenzgens, wurde im gesamt Ergebnispool eine invariante miRNA gesucht. Dieses geschieht mit einer Varianz-Analyse der Ct-Werte oder der delogarithmierten Ct-Werte. Die miRNA oder auch miRNA-Gruppe, die folgende Kriterien erfüllte wurde als endogene KontrollmiRNA für die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Berechnung eingesetzt: niedrige Varianz, keine Behandlungs- oder Zeitabhängigen Veränderungen, in allen Proben nicht am Detektionslimit detektierbar.

Relative Quantifizierung mittels Spike-in Kontrolle ath-miR-159a: Wie in Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben, wurden alle Urin- oder Plasmaproben während der Isolation mit einer nicht-endogenen miRNA, ath-miR-159a, versetzt (Spike-in Kontrolle). Diese kann als ReferenzmiRNA für eine ΔCt -Berechnung verwendet werden. Die logarithmischen Ct-Werte wurden in lineare Werte transformiert mit der Berechnung: $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct [Probe]} - \text{Ct [ath-miR-159a]})}$. Urinproben wurden zusätzlich mit der entsprechenden Creatinin-Konzentration der Probe (urinary creatinine, uCrea) normalisiert: $2^{-(\text{Ct [Probe]} - \text{Ct [ath-miR-159a]})} / \text{uCrea}$. Die relativen Mengen wurden für jede Probe mit dem geometrischen Mittelwert der dazugehörigen Kontrollgruppe berechnet und für die statistischen Analysen (T-Test, ANOVA; siehe 2.2.6.2.2) verwendet.

Relative Quantifizierung mittels festgesetzten Ct-Grenzwerts (modifizierte ΔCt Methode): Eine von invarianten Suche oder Spike-in unabhängige Möglichkeit für die ΔCt -Berechnung ist der Gebrauch eines festgesetzten Ct-Wertes. Dieser wird anhand der vorliegenden Daten ermittelt und stellt das obere Detektionslimit dar; in dieser Arbeit wurde wegen der durchgeführten Preamplifikation bei TaqMan qRT-PCRs eine Grenze von Ct 30 festgesetzt. Alle nicht-messbaren oder Ct-Werte über 30 wurden auf 30 gesetzt, um alle miRNAs in die Quantifizierung einzubeziehen. Darauf wurde $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct}-30)} = 2^{30-\text{Ct}}$ berechnet. Dieses transformiert die logarithmischen Ct-Werte in lineare Werte. Bei Urinproben ermöglicht dies eine zusätzliche Normalisierung auf den Creatiningehalt in Urin: $2^{30-\text{Ct}}/\text{uCrea}$. Bei Plasmaproben wurden diese linearen ΔCt Werte auf keinen endogenen Faktor normalisiert. Ferner wurden mit den linearen Werten statistische Analysen (T-Test, ANOVA; siehe 2.2.6.2.2) durchgeführt. Ein Flussdiagramm der Quantifizierung ist in Abb. 21 dargestellt. Die relativen Mengen (Verhältnis zur Kontrolle) wurden für jede Probe durch Division durch den geometrischen Mittelwert der dazugehörigen Kontrollgruppen berechnet.

2 Material und Methoden

2.2.5.6.4 Selektion veränderter miRNA (TaqMan Card Profiling)

Das Ziel war es miRNAs zu identifizieren, deren Menge signifikant im Urin und Plasma durch die Behandlung beeinflusst ist. Dafür wurden von den auf der TaqMan Card enthaltenen miRNAs, diejenigen ausgeschlossen, die in mehr als 50% der Proben pro Zeitpunkt nicht detektierbar waren, d.h. diejenigen die nicht mindestens in entweder der Kontroll- oder Behandlungsgruppe präsent waren. Nachdem die übrigen Ct-Werte entsprechend prozessiert wurden (nicht detektierbar und >30 auf Ct 30 gesetzt), wurden alle miRNAs ausgeschlossen, welche sowohl in Kontroll- als auch Behandlungsgruppe Ct-Werte von 30 enthielten, da diese nach dem festgesetzten Detektionslimit von 30 nicht zuverlässig messbar oder nicht von der Behandlung betroffen sind. Mit der Gruppe der verbliebenen miRNAs und den transformierten Δ Ct-Werten (bei Urinproben zusätzlich auf den Urin Creatiningehalt normalisiert, s. 2.2.5.6.3) wurden statistische Tests (T-Test, ANOVA; siehe 2.2.6.2.2) durchgeführt. Weiterhin wurden für die Biomarker Selektion die finalen Gruppen bezüglich ihres Vorhersagepotentials und der -spezifität sowie Sensitivität untersucht.

Ranking: Mit Hilfe des, in der Analyst Software (Genedata) implementierten, Classification Rankings konnten potentielle miRNA Biomarker aus Körperflüssigkeiten, entsprechend ihrer Vorhersage für einen bestimmten Zustand, untersucht werden. Dabei wird ein Algorithmus des überwachten Lernens ausgesucht, hier *Support Vector Machine* (Klassifikator) mit *Recursive Feature Elimination* (Methode), der ausgehend von den Regeln eines Trainingset, hier histopathologische Scores für tubuläre Nekrose, an einem Testset, relative Menge potentieller miRNA Biomarker, die Hypothese d.h. die miRNA findet, die eine möglichst zielsichere Voraussage ermöglicht (Tang et al., 2007).

Receiver Operating Characteristic (ROC) – Analysen: Um die Sensitivität und Spezifität unterschiedlicher Biomarker für einen bestimmten Zustand graphisch darzustellen und zu vergleichen, werden ROC-Analysen durchgeführt. Dabei ist die Sensitivität bzgl. eines Zustandes, das Verhältnis der Anzahl der richtig positiven zu der Anzahl aller richtig positiven und falsch negativen. Die Spezifität bzgl. eines Zustandes ist das Verhältnis der Anzahl der richtig negativen zu der Anzahl aller richtig negativen und falsch positiven. Für jeden möglichen Biomarkerwert wurde die resultierende relative Häufigkeitsverteilung in Form von einer richtig-positiv-Rate (Sensitivität) und einer Falsch-Positiv-Rate (100%-Spezifität) ermittelt. Die Zuordnung der positiv/negativ gruppen erfolgte mittels Histopathologischer Befunde. Die Häufigkeitsverteilungen wurden in einem Diagramm aufgetragen, mit der Sensitivität auf der Ordinate (y-Achse) und 100%-Spezifität auf der Abzisse (x-Achse) (Zweig and Campbell, 1993). Darauf wurde die Fläche unter der Kurve berechnet, die ein Maß für die Güte des Biomarkers ist und kann Werte ≤ 1 annehmen kann. Je höher der Wert ist, desto sensitiver und empfindlicher ist der jeweilige Biomarker. Alle ROC Kurven wurden mit der Software GraphPad Prism erstellt.

2.2.6 Microarray Analysen

Microarrays ermöglichen die Messung der gesamten Geneexpression, d.h. der Menge an m- oder miRNA, welche von den entsprechenden Genen transkribiert wurde. Die Affymetrix Technologie basiert auf einer photolithographischen Synthese von Oligonukleotiden auf der Array Oberfläche, welche komplementär zu bestimmten Abschnitten der zu untersuchenden RNA sind. Ein Array kann dabei aus bis zu 1,5 Mio *features* (*spots*) bestehen, die sich wiederum aus vielen identischen 25 Nukleotide langen Oligonukleotiden zusammensetzen und je ein Gen repräsentieren. Die m- oder miRNA aus der Probe hybridisieren an diese und können somit detektiert werden.

2.2.6.1 Genexpression im Gewebe

Die RAE230_2.0 GeneChips® Microarrays (Affymetrix; Abb. 10) enthalten über 28000 annotierte Ratten Gene. Damit die isolierte mRNA mittels Microarrays gemessen werden kann, muss sie zunächst eine reverse Transkription durchlaufen, bei der eine cDNA synthetisiert und ein T7-Promotor eingebaut wird (s. 2.2.6.1.1). Letzterer ermöglicht anschließend eine *in vitro* Transkription (IVT), welche die Biotin-markierte aRNA (amplifizierte RNA) hervorbringt (s. 2.2.6.1.2). Nach der Aufreinigung und Fragmentierung der aRNA wird diese auf einen Microarray aufgetragen, wo sie mit den entsprechenden Oligonukleotide hybridisiert. Die Hybridisierung wird mittels Phycoerythrin-gekoppelten Streptavidin Antikörper-Färbung und Fluoreszenzlasermessung nachgewiesen (s. 2.2.6.1.3 und 2.2.6.1.4).

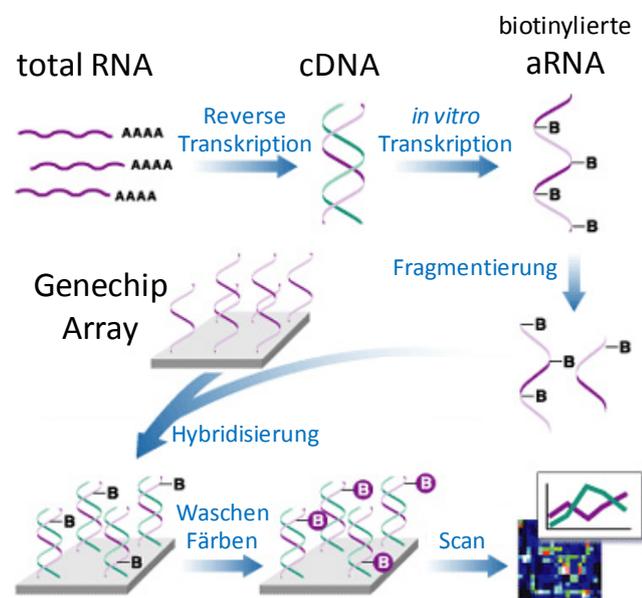


Abbildung 10 Grundprinzip der Microarray Technologie. modifiziert nach Affymetrix

2.2.6.1.1 Reverse Transkription (GeneChip® 3 IVT Express Kit)

Für die reverse Transkription wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Diese wurden kurz bei -80°C eingefroren, für 20 min lyophilisiert und in 3 μl RNase freiem Wasser aufgenommen. Anschließend wurden 2 μl einer Poly-A-RNA-Kontrolle zugegeben. Die eingesetzte Poly-A-RNA-

2 Material und Methoden

Kontrolle ist eine 1:100000 Verdünnung der Poly-A-Kontroll Stammlösung, die über mehrere Verdünnungsschritte (1:20, 1:50, 1:50 und 1:2) immer frisch hergestellt wurde; sie dient als Labeling Kontrolle. Die Einzelstrangsynthese (Tab. 18) lief 2h bei 42°C, gefolgt von der Doppelstrangsynthese (Tab. 19), die 1h bei 16°C und 10 min bei 68°C ablief.

Tabelle 18 Einzelstrangsynthese der RevT vor IVT

Komponenten Einzelstrangsynthese	Ansatz [µl]
„1st Strand“ Puffer-Mix	4
„1st Strand“ Enzym-Mix	1
Poly-A-RNA-Kontrolle (1:100000)	2
500 ng RNA	3
Total	10

Tabelle 19 Doppelstrangsynthese der RevT vor IVT

Komponenten Doppelstrangsynthese	Ansatz [µl]
„2nd Strand“ Puffer-Mix	5
„2nd Strand“ Enzym-Mix	2
H ₂ O	13
Einzelstrangsynthese Produkt	10
Total	10

2.2.6.1.2 *in vitro* Transkription (GeneChip® 3 IVT Express Kit)

Der Ansatz für die *in vitro* Transkription wurde entsprechend Tab. 20 bei RT hergestellt und bei 40°C 4h inkubiert. In dieser Zeit findet der Einbau biotinmarkierter Nukleotide durch die T7-Polymerase statt. Anschließend wurde die synthetisierte aRNA aufgereinigt (Tab. 21), um Enzyme, Salze, nicht-eingebaute Nukleotide und anorganische Phosphate zu entfernen. Dies wurde mit Hilfe Streptavidin-markierter magnetischer *beads* und eines Magnet-Standes erzielt. Nach mehreren Waschschritten wurde die aRNA in 50 µl vorgewärmter (50-60°C) Elutionslösung eluiert und Quantität sowie Qualität der aRNA bestimmt (siehe 2.2.4.4 und 2.2.4.5).

Tabelle 20 *in vitro* Transkription

Komponenten IVT	Ansatz [µl]
IVT Biotin Label	4
IVT Labeling Puffer	20
IVT Enzym Mix	6
Doppelstrangsynthese Produkt	30
Total	60

Tabelle 21 aRNA Aufreinigung

Komponenten Aufreinigung	Ansatz [µl]
aRNA Binding Beads	10
aRNA Binding Puffer	50
aRNA Probe	60
Total	120

2.2.6.1.3 Hybridisierung der RAE230_2.0 Arrays

Vor der Hybridisierung wurde die Biotin-gelabelte aRNA fragmentiert, um die Effektivität der Hybridisierung an die immobilisierten Oligonukleotide zu erhöhen. Dafür wurden jeweils 15 µg der aRNA (in 32 µl RNase freiem Wasser) mit 8 µl Fragmentierungspuffer versetzt und für 35 min bei 94°C inkubiert. Der Erfolg der Fragmentierung wurde mittels Bioanalyzer geprüft (s. 2.2.4.5).

Für die Hybridisierung auf je einem Genchips wurde die aRNA entsprechend Tab. 22 angesetzt, für 5 min bei 99°C und anschließend für 5 min bei 45°C inkubiert. Parallel dazu wurden die Genchips mit 200 µl Prä-Hybridisierungspuffer (MES-Puffer) befüllt und für mindestens 10 min bei 45°C mit 60 rpm im Hybridisierungssofen prähybridisiert.

Tabelle 22 Hybridisierung von RAE230_2.0 Arrays

Komponenten Hybridisierung	Ansatz [µl]	
H ₂ O	50	} vorher 5 min bei 65°C erwärmt
3 nM B2 Kontroll-Oligo	4,2	
20x Hybridisierungs Kontrolle	12,5	
2x Hybridisierungs Mix	125	
DMSO	25	
Fragmentierte aRNA (12,5 µg)	33,3	
Total	250	

Nach der Prä-Hybridisierung wurde der MES-Puffer gegen 200 µl des Hybridisierungsansatzes ausgetauscht und die beladenen Genchips wurden über Nacht (16h) im Hybridisierungssofen bei 45°C mit 60 rpm hybridisiert. Die 20xHybridisierungs-Kontrolle dient als Kontrolle für die Hybridisierungs-, Wasch- und Färbeschritte, während das B2 Kontroll-Oligo ein Anordnungs-Signal für die spätere Bildanalyse nach dem Scannen darstellt. Am nächsten Tag wurde der Hybridisierungsansatz entfernt und die Genchips wurden mit 250 µl Waschpuffer A befüllt.

2.2.6.1.4 Färben und Scannen der RAE230_2.0 Arrays

Die Wasch- und Färbeschritte der GeneChips® wurden mit einer GeneChip® Fluidics Station 450 nach dem Protokoll Prime_450 durchgeführt. Der Zeitraum zwischen Hybridisierung und Färbevorgang darf maximal 5h betragen. Gefärbt wurde mit Streptavidin, welches an das zuvor eingebaute Biotin an den Nukleotiden bindet. Ein Antikörperfärbepuffer (enthält biotinylierte Antikörper gegen Streptavidin) führt zu einer Signalverstärkung. Im GeneChip® Scanner 3000 wird mittels eines Argonlasers der Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE; SA-PE), der an das Streptavidin gebunden ist, angeregt, sodass seine Emission bei 570 nm gemessen wird.

2 Material und Methoden

2.2.6.2 Auswertung der Genexpressionsdaten

2.2.6.2.1 Qualitätskontrolle und Kondensierung der RAE230_2.0 Arrays

Jedes Gen bzw. „Probe Set“ wird auf dem RAE230_2.0 GeneChip® durch 11 Paare von 15mer-Oligonukleotiden repräsentiert. Ein Paar setzt sich aus einem zur aRNA-Targetsequenz 100%ig komplementären „*perfect match* Oligo“ (PM) und einem teilweise komplementären „*mismatch* Oligo“ (MM) zusammen. Das MM, in dessen Mitte eine ausgetauschte Base vorliegt, dient als Kontrolle für die Hintergrundhybridisierung. Das Verhältnis zwischen PM- und MM-Signalen stellt somit die Hybridisierungsspezifität dar. Zur Beurteilung der Microarray-Qualität, wurden die CEL-Dateien in die Software GeneData Expressionist® Pro Refiner geladen. Dort werden Gradienten und nicht lineare Signale, die durch lokale Artefakte auftreten können, für jeden Microarray erkannt und zu einem virtuell berechneten Referenzexperiment vergleichend korrigiert. Nur die GeneChips®, die in der Qualitätskontrolle als gut oder medium klassifiziert wurden, werden als erfolgreich hybridisiert angesehen. Zusätzlich sind Probe Sets für die 5'- und 3'-Enden sowie für die Mitte von *housekeeping*-Genen (z.B. Hexokinase, β -Actin) auf den GeneChips® vorhanden. Das 3'/5'-Verhältnis stellt die Vollständigkeit der cDNA-Synthese vom 3'- zum 5'-Ende eines Gens dar und sollten zwischen 1 (optimaler Wert) und 2,5 liegen.

Die Kondensierung der Daten erfolgt durch das Zusammenfassen aller PM- und MM-Oligos nach dem statistischen MAS5-Algorithmus zu einem Intensitätswert (ebenfalls in GeneData Expressionist® Pro Refiner). Aus dem berechneten Verhältnis resultiert ein p-Wert, der die Wahrscheinlichkeit anzeigt mit der die detektierten Transkripte als tatsächlich exprimiert betrachtet werden können. Ein p-Wert $\leq 0,04$ bedeutet, dass ein Gen wirklich exprimiert vorliegt. Ein p-Wert zwischen 0,04 und 0,06 stellt eine geringe Präsenz des Transkriptes dar und ein p-Wert $\geq 0,06$ ein komplettes Fehlen. Nach der Kondensierung wird der Median aller Intensitäten, nach Subtraktion der oberen und unteren zwei Prozent, auf einen Intensitätswert (Target Intensity, TGT) von 100 eingestellt, sodass eine Vergleichbarkeit zu anderen Genexpressionsdaten möglich ist.

2.2.6.2.2 Qualifizierung, statistische Analyse und Darstellung (RAE230_2.0 Arrays)

Die im Folgenden aufgeführten und beschriebenen Verfahren der Genexpressions Analyse wurden alle mit der Software Analyst von Genedata durchgeführt, ausgenommen der Receiver Operating Characteristic Kurven die mittels GraphPad Prism ermittelt wurden.

Box Plot Analyse: Die Box Plot Darstellung dient dem ersten und einfachen Überblick der absoluten Genexpressionsdaten und somit auch der Qualitätskontrolle. Die Box erfasst die mittleren 50% der Daten und in der Mitte der Box befindet sich der Median. Die unterste Linie der Box stellt das untere Quartil und die oberste Linie das obere Quartil dar. Die Höhe der Box repräsentiert den Interquartilsabstand (IQR), welcher Auskunft über die Datenstreuung gibt, sodass es möglich ist Ausreißer zu erkennen (Elmore and Peddada, 2009).

Hauptkomponentenanalyse (PCA, Principal Component Analysis): Eine PCA stellt die absoluten Genexpressionsdaten (n-dimensional) in einem 3D-Raum dar und ermöglicht so die Erkennung von Ausreißern, aber auch von konzentrations- oder zeitabhängigen Tendenzen (Raychaudhuri et al., 2000). Dafür erfolgt eine Reduktion der Daten-Dimensionalität (von n- auf dreidimensional) mit einer geringen Anzahl an Hauptkomponenten, sodass die Unterschiede bzw. Ähnlichkeiten zwischen Datensätzen deutlich werden. Je enger die Genexpressionsdaten beieinander liegen (*clustering*), desto ähnlicher sind diese.

Varianzanalyse (N-Way ANOVA): Die n-way ANOVA (*Analysis of Variance*) ist ein statistisches Verfahren, das untersucht ob die Unterschiede zwischen mehreren behandelten Gruppen, bezogen auf mehrere Parameter, signifikant sind. Es wird geprüft, ob zwischen den Gruppen eine größere Varianz vorliegt als innerhalb der einzelnen Gruppen. Je kleiner die resultierenden q-Werte (korrigierter p-Wert (Benjamini and Hochberg, 1995)) sind, desto höher ist die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen bezogen auf den jeweiligen Parameter (Pavlidis, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurden vorwiegend 2-way ANOVAs mit den Parametern „Behandlung“ und „Zeitpunkte“ verwendet.

T-Test: Der t-Test ist ebenfalls ein statistisches Verfahren, um die Signifikanz von Gruppenunterschieden zu evaluieren. Hierbei werden nur zwei Datengruppen miteinander verglichen. Beim ungepaarten t-Test werden unabhängige Gruppen verglichen, z.B. behandelte und unbehandelte Tiere. Beim gepaarten t-Test werden zwei voneinander abhängige Gruppen verglichen, z.B. dieselben Tiere vor und nach einer Behandlung. Voraussetzung bei beiden ist immer eine Normalverteilung der Daten.

Deregulations Analyse: Für die Bestimmung des Deregulation-Ausmaßes wird das Verhältnis zwischen den Mittelwerten zweier Datengruppen berechnet. Dieses diente hier der Auswahl von Genen, die im Vergleich zur Kontrollgruppe ein höheres Ausmaß an Deregulierung (hoch oder runter) aufzeigten: Quotient >1 stellen eine Hochregulation dar und Quotient <1 eine Runterregulation.

Filtern: Intensitätswerte die kleiner waren als 20, wurden als nicht verlässlich gemessene Gene definiert. Mit Hilfe der Funktion „Filtern nach *Threshold Proportions*“ und dem Setzen des Minimums auf 20, konnten Gene mit diesen kleinen Intensitätswerten gefunden und ausgeschlossen werden.

Relative Datennormalisierung: Bei dieser Art der Normalisierung wird auf eine bestimmte Gruppe, meist Kontrollgruppe normalisiert. Der Unterschied zum Deregulation-Ausmaß liegt hier bei der Berechnung des Verhältnisses für jede Probe. Der absolute Wert jeder Probe wird durch den arithmetischen Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe geteilt und dieses Verhältnis wird dann der Probe als relative Menge zugeordnet.

Hierarchical Clustering: Das eindimensionale, hierarchische *clustering* wird angewendet, um Ähnlichkeiten zwischen Expressionsdaten zu finden und die relative Menge graphisch in einer

2 Material und Methoden

heatmap darzustellen. Hierfür werden relative Daten verwendet: hochregulierte Gene werden in rot und runterregulierte in grün dargestellt. Das Clustering basiert auf einer Entfernungsmatrix für zwei sich am meisten ähnelnden Gene, denen dann alle weiteren Gene zugeordnet werden. Ähnliche Profile d.h. ähnliche relative Mengen befinden sich daher nahe beieinander (Quackenbush, 2001; Verducci et al., 2006). Hier wurde die Ähnlichkeit zwischen *clustern* mit euklidischer Entfernung (*Euclidean distance metric*) und der Einstellung einer kompletten Verknüpfung berechnet.

2.2.6.2.3 Interpretation der Genexpressionsdaten (RAE230_2.0 Arrays)

Statistisch analysierte und gefilterte Gengruppen können mit Hilfe des Signalweg-Programmes IPA (Ingenuity Systems) bezüglich ihrer biologischen Funktion untersucht und dargestellt werden. Dazu wurden die Mittelwerte der Relativdaten eingelesen und einer Core Analysis unterzogen, bei der Gene entsprechend Datenbankinformationen Signalwegen und biologischen Funktionen zugeordnet werden. Eine Überrepräsentation von Genen in einer funktionellen Gruppe, berechnet als p-Wert, wurde als Balkendiagramm dargestellt (-logP). Zusätzlich wurden auf der Ingenuity Datenbank basierend verschiedene Netzwerke kalkuliert und die eingeladenen Gene miteinander entsprechend verknüpft. Durch die Betrachtung der berechneten Verknüpfungen kann eine subjektive Kategorisierung der Daten ausgeschlossen werden.

2.2.6.3 miRNA Expression im Gewebe

Zur Bestimmung der miRNA Expression in Gewebe können ebenfalls Arrays verwendet werden. Das Prinzip der miRNA Arrays der Firma Affymetrix beruht auf einer Polyadenylierung gefolgt von einer Ligation mit einem biotinyliertem Signalmolekül (FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit) (s. 2.2.6.3.1 und 2.2.6.3.2). Die Polyadenylierung ist unspezifisch, d.h. an alle RNA-Moleküle der Probe wird ein Poly-A-Schwanz angehängt. An diesen kann dann ein Poly-T-Primer binden, der die Ligation mit dem Signalmolekül ermöglicht. Das Signalmolekül, 3DNA® Dendrimer, ist eine verzweigte Struktur aus einzel- und doppelsträngiger DNA. Durch die Biotin-Markierung kann es nach Bindung an die *probe sets* auf dem Array SA-PE (Streptavidin-Phycoerythrin) abhängig detektiert werden. Der hier verwendete miRNA 3.0 Array deckt die miRBse v17 vollständig ab, d.h. auf ihm befinden ca. 20000 *probe sets* für miRNAs von 153 Organismen; davon sind 680 spezifisch für Ratten miRNAs und 486 für Ratten pre-miRNAs. Jede miRNA wird durch ein 100%ig komplementäres „perfect match“ Oligonukleotid *probe set* repräsentiert. Die Oligonukleotide sind in der Regel 25 Nukleotide lang, bei kürzeren miRNAs entsprechend kürzer.

2.2.6.3.1 Polyadenylierung

Für die Polyadenylierung wurden 500 ng total RNA eingesetzt. Die 500 ng RNA wurden auf ein Volumen von 8 µl eingestellt und mit 2 µl RNA Spike Control Oligos sowie 5 µl Master Mix (Tab. 23) gemischt. Der gesamte Ansatz von 15 µl wurde für 15 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 23 Polyadenylierung

Komponenten Polyadenylierung	Ansatz [μ l]
10x Reaktions-Puffer	1,5
25 mM MnCl ₂	1,5
1:500 verdünnter ATP Mix	1,0
PAP Enzym	1,0
gesamt	5

2.2.6.3.2 Ligation mit dem Signalmolekül

Für die Ligation wird kein Master Mix angesetzt, um eine Autoligation zu vermeiden. Zu dem 15 μ l Polyadenylations-Ansatz wurden zunächst je 4 μ l des FlashTag Biotin HSR Ligations Mixes gegeben, gefolgt von 2 μ l der T4 DNA-Ligase. Nach einer Inkubation von 30 min bei 25°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 μ l HSR Stop Solution gestoppt. Von dem finalen Volumen von 23,5 μ l wurden 2 μ l zur Kontrolle der gesamten Markierungsprozedur verwendet, während die restlichen 21,5 μ l bis zur Hybridisierung bei -20°C gelagert wurden.

2.2.6.3.3 Qualitätskontrolle mittels ELOSA

Zur Überprüfung einer erfolgreichen Biotin-Markierung, d.h. Polyadenylierung und Ligation wurde ein ELOSA (*Enzyme Linked Oligosorbent Assay*) durchgeführt. Kolorimetrisch nachgewiesen werden dabei erfolgreich markierte RNA Spike Control Oligos (in der Polyadenylierung dazugegeben), die an komplementäre immobilisierte Oligonukleotide binden.

Zunächst wurden in 8-well Streifen die Spotting Oligos immobilisiert. Für 3 Wells wurden 4,5 μ l Spotting Oligos mit 1xPBS gemischt und pro Well mit je 75 μ l über Nacht bei 2-8°C inkubiert. Die Wells wurden anschließend zweimal mit 0,02% PBS-T gewaschen und getrocknet. Mit 150 μ l 5% BSA pro Well wurde 1h bei RT geblockt. Der Hybridisierungsansatz setzte sich aus 48 μ l 5xSSC mit 0,05% SDS, 0,005% BSA und 2,5 μ l 25% Dextran Sulfat sowie 2 μ l der Probe zusammen. Zusätzlich wurde auch je eine positiv und negativ Kontrolle mitgeführt. Nach Entfernen des Block-Puffers, wurden pro Well die 52,5 μ l des Hybridisierungsansatzes dazugegeben und 1h bei RT inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschrte mit 0,02% PBS-T und die Zugaben von 75 μ l einer 1:4000 verdünnten Streptavidin-Horseradish Peroxidase Lösung. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurde erneut dreimal gewaschen und anschließend 100 μ l Substrat-Lösung dazugegeben (Tetramethylbenzidin). Die Reaktion fand lichtgeschützt und bei RT statt. Nach 5-30 min war eine blaue Färbung erkennbar und die Reaktion konnte durch Zugabe von 100 μ l Stopp-Lösung beendet werden; das Abstoppen führte zu einem Farbumschlag zu gelb. Die Absorption bei 450 nm wurde gemessen und OD-Werte zwischen 0,15-1 wurden als positiv gewertet d.h. die Biotin Markierung war erfolgreich.

2 Material und Methoden

2.2.6.3.4 Hybridisierung der miRNA 3.0 Arrays

Für die Hybridisierung wurden zunächst alle Komponenten sowie die restlichen 21,5 µl des Ligations-Ansatzes auf RT gebracht. Die 20xHybridisierungs-Kontrolle (Mix aus bioB, bioC, bioD und cre) wurden 5 min bei 65°C erhitzt. Der fertige Hybridisierungs-Ansatz (Tab. 24) wurde bei 99°C und bei 45°C jeweils 5 min inkubiert und danach in den miRNA 3.0 Array gefüllt (je 130 µl). Die Hybridisierung lief im Hybridisierungs-Ofen bei 48°C und 60 rpm 16-18 h lang.

Tabelle 24 Hybridisierung von miRNA 3.0 Arrays

Komponenten Hybridisierung	Ansatz [µl]	
2x Hyabridisierungs Mix	66	
27,5% Formamid	19,2	
DMSO	12,8	
20x Hybridisierungs-Kontrolle	6,6	} vorher 5 min bei 65°C er-
3 nM B2 Kontroll-Oligo	2,2	
H ₂ O	3,7	
Biotin-markierte Probe	21,5	
gesamt	132	

2.2.6.3.5 Färben und Scannen der miRNA 3.0 Arrays

Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungs-Ansatz durch Array Holding Puffer (RT) ersetzt. Die Wasch- und Färbeschritte der Arrays wurden mit einer GeneChip® Fluidics Station 450 nach dem Protokoll FS450_0002 durchgeführt. Die Arrays wurden mit SA-PE gefärbt und im GeneChip® Scanner 3000 gescannt (siehe 2.2.6.1.4).

2.2.6.4 Auswertung der miRNA-Expressionsdaten

2.2.6.4.1 Qualitätskontrolle und Kondensierung der miRNA 3.0 Arrays

Zur Beurteilung der Array-Qualität, wurden die entstandenen CEL-Dateien in die Software Expression Console geladen. Mit Hilfe dieser wurden die *probe set* Signale nach durchlaufen eines RMA Algorithmus zusammengefasst, der Hintergrund normalisiert und die Qualität an Hand der spike-in Kontrollen beurteilt. Die Zusammenfassung und Normalisierung bezog sich dabei nur auf die Ratten-spezifischen miRNAs. Die resultierenden CHP-Dateien enthielten die normalisierten miRNA Intensitäten, welche logarithmische Daten waren.

2.2.6.4.2 Qualifizierung, statistische Analyse und Darstellung (miRNA 3.0 Array)

Die miRNA-Expressionsanalyse wurden alle mit Hilfe der Software Analyst von Genedata durchgeführt. Dazu wurden die logarithmischen Daten nach der Prozessierung in der Expression Console entsprechend der in Abschnitt 2.2.6.2.2 beschriebenen Methoden analysiert. Hervorzuheben ist, da es sich um logarithmische Werte handelt, dass bei der Berechnung des De-regulations-Ausmaßes und bei der relativen Normalisierung nicht der Quotienten sondern die Differenz der Mittelwerte zweier Gruppen gebildet wurde.

2.2.6.5 miRNA Analyse im Gewebe

Statistische analysierte und gefilterte Gen- und miRNA-Gruppen können mit Hilfe des Signalweg-Programmes IPA (Ingenuity Systems) bezüglich ihrer biologischen Interaktion untersucht und dargestellt werden. Finale Gen- und miRNA-Gruppen wurden in IPA geladen und mit Datenbankinformationen verglichen; konkret wurden von der miRNAs-Gruppe experimentell bestätigte oder auf Vorhersagemodellen basierte *targets* in der geladenen mRNA-Gruppe gesucht. Weitere Kriterien bei der Suche waren eine hohe bis moderate Wahrscheinlichkeit bei den Vorhersagemodellen, eine entgegengesetzte Regulierungsrichtung und eine beschriebene Expression in Niere oder Leber. Gefundene Interaktionen und entsprechende relative Mengen wurden in einem Netzwerk graphisch dargestellt.

2.2.7 *in situ* Hybridisierung

Die *in situ* Hybridisierung ist eine Methode zur Visualisierung der Genexpression, hier miRNA-Expression, und Lokalisierung im Gewebe oder in spezifischen Gewebekompartimenten. Das Prinzip ist in Abb. 11 dargestellt: an die miRNAs im FFPE Schnitt binden komplementär miRNA-Sonden. Die Sonden sind Digoxigenin (DIG) markiert, welches von Detektions-Antikörpern erkannt werden kann. Die finale Detektion läuft kolorimetrisch ab, über die Umwandlung des Substrates in ein blaues Präzipitat durch die am Detektionsantikörper gebundene Alkalische Phosphatase (AP). Die AP spaltet vom farblosen 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) die Phosphatgruppe ab und das instabile Zwischenprodukt dimerisiert unter Abgabe von Wasserstoff-Ionen. Das Diemer fällt als blaues Dehydroindigo-Präzipitat aus. Zur Signalverstärkung führt diese Oxidation zur Reduktion des gelblichen Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in ein ebenfalls blaues Diformazan Präzipitat.

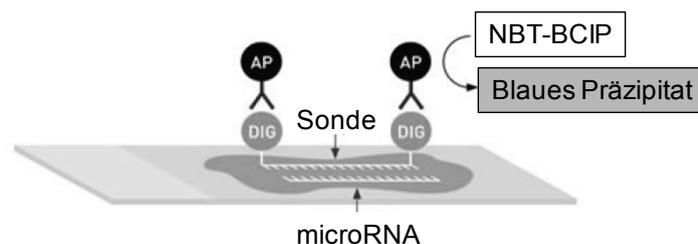


Abbildung 11 Schematische Darstellung der *in situ* Hybridisierung. modifiziert nach Exiqon Protokoll

2.2.7.1 Ganzkörper-Perfusion und Organaufarbeitung

Die Perfusion und die darauf folgende Organaufarbeitung wurden von Bayer Pharma AG Mitarbeitern der Pathologie Abteilung (Leitung Herrn Dr. Matthias Rinke) durchgeführt.

Zur Perfusion wurde eine fest installierte Anlage verwendet. Die narkotisierte Ratte wurde über eine Injektionskanüle in der linken Herzkammer angeschlossen, zuerst mit einem Puffer gespült und dann mit der Fixierungs-Lösung fixiert. Der Flüssigkeitsabfluss wurde durch einen Schnitt im rechten Vorhof gewährleistet. Anschließend wurden Leber und Niere entnommen und in

2 Material und Methoden

Formalin- bzw. Davidson-Lösung weiter fixiert. Nach automatisierter Vakuum-Infiltration (Entwässerung mittels aufsteigender Ethanolreihe, Xylol- und Paraffin-Inkubation) wurden die Organe in Paraffin eingebettet (geblockt). Von den fertigen FFPE-Gewebe Blöcken wurden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt und auf Objektträger gezogen. Nach dem Trocknen bei RT wurden das Paraffin der FFPE-Gewebeschnitte 45 min bei 60°C geschmolzen. Die Schnitte wurden dann maximal zwei Wochen bei 4°C gelagert.

2.2.7.2 Ablauf der *in situ* Hybridisierung

Das Protokoll der *in situ* Hybridisierung basiert auf dem Protokoll von Exiqon zum miCURY LNA™ microRNA ISH Optimisierung Kit, welches neben einigen Kontrollen auch den Hybridisierungs-Puffer enthält. Alle übrigen Sonden wurden ebenfalls von Exiqon synthetisiert und sind wie die Kontroll-Sonden doppelt DIG-markiert (Tab. 6).

Zuerst wurden die FFPE-Schnitte auf RT gebracht und deparaffiniert. Dazu wurden sie dreimal je 5 min lang in Xylol inkubiert, gefolgt von einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 96% und 70%) mit ebenfalls je 5 min pro Konzentration. Während die Schnitte daraufhin 5 min in 1xPBS inkubierten, wurde eine Proteinase-K Lösung (25 µg/ml) hergestellt. Je 100 µl der Proteinase-K Lösung wurden auf jeden Schnitt gegeben und der Verdau fand 10 min bei 37°C in einer feuchten Kammer statt. Nach zwei Waschschritten mit 1xPBS wurden die Schnitte mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96% und 100%, je 1 min) dehydriert. Optional wurde eine Inkubation mit 0,3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂ in Methanol) durchgeführt, um die endogene AP-Aktivität zu senken. Anschließend wurden die Schnitte ca. 15 min bei RT getrocknet und mindestens 30 min bei 55°C prä-hybridisiert; als Prä-Hybridisierungs-Puffer wurde der 1xHybridisierung-Puffer mit 4,3% Lachshoden-DNA verwendet. Für die Hybridisierung der DIG-Sonden wurden diese bei 94°C denaturiert und die Konzentration entsprechend Tab. 6 mit 1x Hybridisierungs-Puffer eingestellt. Je 100 µl des Puffers mit Sonde wurden auf den Schnitt gegeben und 1h hybridisiert. Die optimale Hybridisierungs-Temperatur liegt 30°C unter der jeweiligen spezifischen RNA-Schmelztemperatur (RNA-T_m). Anschließend wurden die Schnitte mit einer absteigenden Konzentrationsreihe von SSC bei 55°C gewaschen (je 5 min zweimal 1xSSC, zweimal 0,2xSSC und dreimal 0,1xSSC); der letzte Waschschrift erfolgte bei RT. Danach wurden die Schnitte mit 1xPBT gewaschen und 30 min bei RT in einer feuchten Kammer geblockt. Die folgende Antikörper-Inkubation mit der Anti-DIG-Alkalischen Phosphatase erfolgte ebenfalls in einer feuchten Kammer bei RT für 1h. Vor der Inkubation in der NBT-BCIP Substartlösung wurden die Schnitte dreimal 3 min mit 1xPBS-T gewaschen.

Die Detektion wurde bei RT lichtgeschützt durchgeführt und dauerte 2-14h. Die Reaktion wurde zunächst mit KTBT-Puffer und anschließend mit kaltem Wasser gestoppt. Als positiv Kontrollen dienten U6 und miR-126 und als negativ Kontrollen die *scrambled*-Sonde sowie das Weglassen von Sonde oder Antikörper.

2.2.7.3 Gegenfärbung und Auswertung

Zur besseren Darstellung der Gewebekompartimente und Differenzierung zwischen Signal und Hintergrund wurden die Schnitte mit 0,01% Eosin gegengefärbt. Dazu wurden die vorher in Wasser befindlichen Schnitte ca. 1 min in 0,01% Eosin inkubiert, mit einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (70%, 90% und 100%) und zuletzt in Xylol fixiert. Die Schnitte auf den Objektträgern wurden darauf mit Eukitt eigedeckelt und getrocknet. Die Auswertung erfolgte am Mikroskop und anhand eingescannter Bilder durch den MIRAX Scanner. Die histologischen Befunde wurden mit Hilfe der Pathologen Frau Dr. Ute Bach und Herrn Dr. Matthias Rinke erhoben.

3 Ergebnisse

3.1 Pathologische und klinisch-chemische Befunde

Die histopathologischen Befunde wurden von Frau Dr. Katrin Gutberlet und von Frau Dr. Anna-Lena Frisk (Tox-Pathologie, Bayer Pharma AG) erhoben. Die Messung der Blut- und Harnparameter erfolgte durch die Mitarbeiter der Bayer Pharma AG im Labor Metabolic Profiling and Clinical Pathology von Herrn Dr. Björn Riefke.

3.1.1 Cisplatin Studie

Han Wistar Ratten wurden einmalig mit 0 (Kontrolle), 1 mg/kg oder 3 mg/kg Cisplatin (Cp) behandelt und nach 3, 5, 8 und 26 Tagen seziiert. Histopathologisch konnten wie erwartet Degeneration, Nekrose und Regeneration der proximalen Nierentubuli gesehen werden.

Frühe, dosisabhängige degenerative Veränderungen (kondensiertes Zytoplasma und tubuläre Vakuolisierung) traten im Bereich der proximalen Tubuli am Tag 3 auf (Abb. 12B). Am Tag 5 war in diesem Bereich eine minimale bis moderate Nekrose in beiden Dosis-Gruppen festzustellen. Die Nekrose war maximal am Tag 8 (Abb. 12C), an dem in den hoch dosierten Tieren massive Nekrose und granuliert Harnzylinder auftraten; 26 Tage nach der Cp-Behandlung waren keine nekrotischen Veränderungen sichtbar. Die Regeneration setzte ab Tag 5 ein, war am Tag 8 am stärksten und am Tag 26 moderat; parallel dazu waren auch hyaline Harnzylinder sichtbar. Eine dosisabhängige, minimal bis moderate Inflammation war ab Tag 5 zu sehen, zu der, am Tag 26, in den hoch dosierten Tieren moderate Zeichen einer chronischen Inflammation hinzukamen. Alle histologischen Befunde sind in der Anhang-Tab. 1 zusammengefasst.

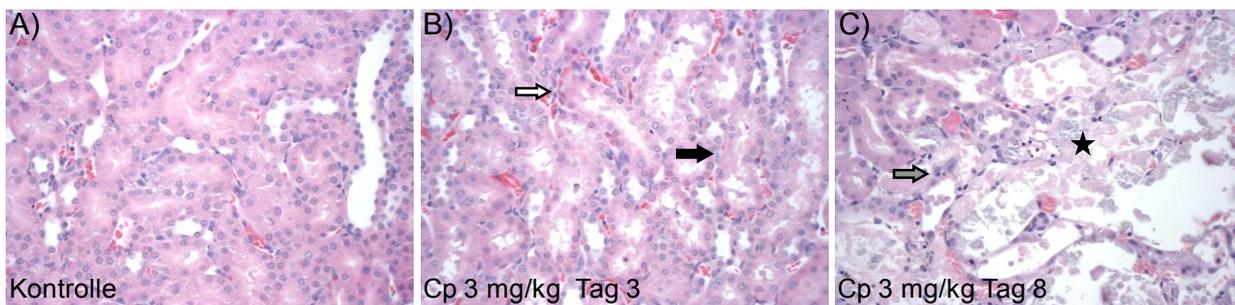


Abbildung 12 Histopathologische Ergebnisse der Nieren nach Cisplatin Verabreichung. Repräsentative H&E gefärbte FFPE Nierenschnitte von Kontrollratten (A), von Ratten 3 Tage (B) und 8 Tage (C) nach einer Injektion von 3 mg/kg Cp. Vergrößerung: 20x. Weißer Pfeil: leichte tubuläre Degeneration, schwarzer Pfeil: minimale tubuläre Nekrose, grauer Pfeil: leichte Regeneration; Stern: ausgeprägte Mineralisation

Weiterhin werden hier vier etablierte Nierenfunktionsparameter repräsentativ dargestellt: Stickstoffgehalt im Blut (blood urea nitrogen, BUN), Serum Creatinin (sCrea), Urin Glukose (uGlu) und Urin Gesamt Protein (*urinary total trotein*, uTP). Messungen im Blut und im Urin wurden an einem zusätzlichen Zeitpunkt (Tag 15), zu dem es keine korrespondierenden histopathologischen Befunde gibt, durchgeführt. Im Folgenden wird das Verhältnis des Parameters zur jewei-

ligen entsprechenden Kontrollgruppe pro Zeitpunkt beschrieben. Keiner der vier Parameter zeigte nach der 1 mg/kg Cp Behandlung einen Anstieg an. Im Serum von Ratten die mit 3 mg/kg Cp behandelt wurden, waren BUN und sCrea am Tag 5 leicht (2- und 1,6-fach) und, dem Nekrose-Maximum entsprechend, am Tag 8 (8,4- und 3,9-fach) stärker erhöht.

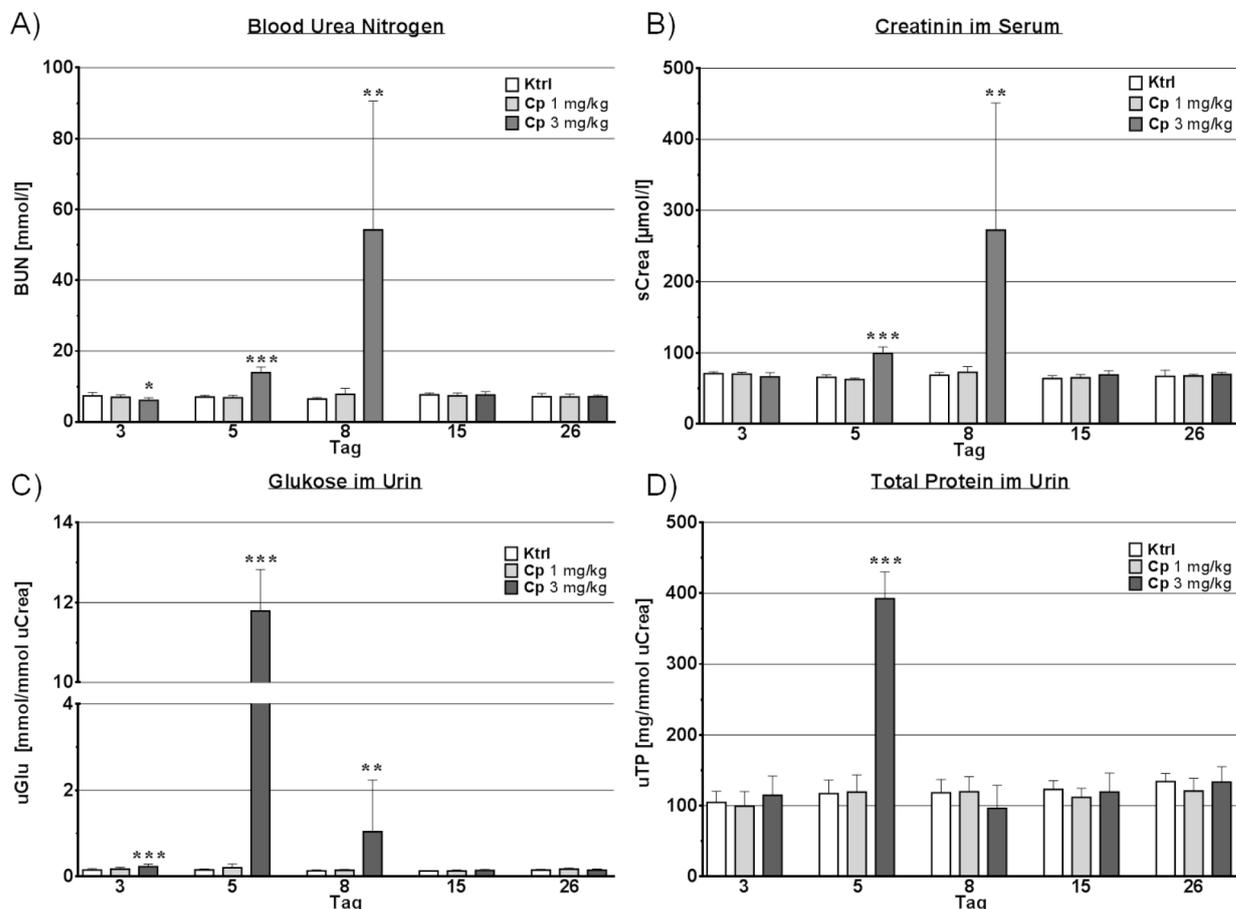


Abbildung 13 Ergebnisse etablierter Nephrotoxizitäts Biomarker nach Cisplatin Verabreichung. Blut-Harnstoff-Stickstoff, BUN (A) und Serum Creatinin, sCrea (B) wurden im Blut und Glukose (C) und die Gesamt-Proteinmenge, uTP (D) im Urin gemessen. Urinparameter wurden mit dem Creatiningehalt im Urin (uCrea) normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (n=6-12) mit Standardabweichung pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließend Dunnett's Test, bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe, pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle.

An den Tagen 15 und 26 war kein Unterschied zu den Kontrollen feststellbar (Abb. 13A und B). Die Glukose Menge im Urin stieg am Tag 3 leicht an (1,5-fach), war am Tag 5 maximal (76,6-fach) und sank am Tag 8 (2,7-fach), sodass am Tag 15 und 26 Kontrolllevel erreicht wurden (Abb. 13C). uTP stieg am Tag 5 3,3-fach an, während an allen anderen Tagen die Menge gleich der Menge im Urin von Kontrollratten war (Abb. 13D).

3.1.2 Glomerulonephritis Studie

Wistar Kyoto (WKY) und Sprague Dawley (SD) Ratten wurden einmalig mit unterschiedlichen Dosen an nephrotoxischem Serum (NTS) behandelt und nach 14 Tagen wurden die Nieren histopathologisch untersucht. Bei allen Tieren wurde histologisch eine Glomerulonephritis diagnostiziert.

3 Ergebnisse

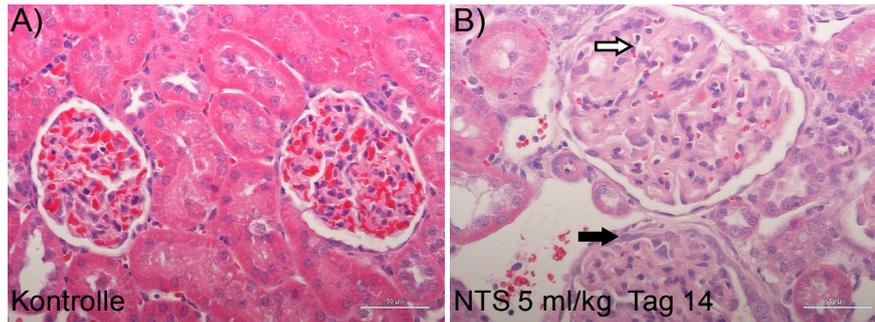


Abbildung 14 Histopathologische Ergebnisse der Nieren nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). Repräsentative H&E gefärbte FFPE Nierenschnitte von Wistar Kyoto Ratten. **A)** Kontrolle, **B)** 14 Tage nach Injektion von 5 ml/kg NTS. Maßstabsleiste, 50 µm. Weißer Pfeil: erhöhte Menge eosinophiler glomerulärer Matrix, schwarzer Pfeil: Hyperplasie der Bowman Kapsel

Nach NTS-Behandlung zeigten alle WKY Ratten Zeichen der Glomerulonephritis: eine erhöhte Anzahl an Zellen im Glomerulus, Anstieg der Menge an extrazellulärer Matrix und Hyperplasien des Bowman'schen Kapelsepithels (Abb. 14B); bei allen Befunden erhöhte sich der Schweregrad dosisabhängig, von minimal bis moderat. Zusätzlich konnte eine minimale bis moderate Degeneration und Regeneration der Tubuli festgestellt werden. Bei Tieren mit minimalen bis leichten tubulären Veränderungen trat der Schaden im gewundenen Segment 2 sowie im geraden Segment 3 (pars recta) der proximalen Tubuli auf; bei höher gradigen Schäden war eine Differenzierung der geschädigten Tubuli nicht mehr möglich. Die SD Ratten zeigten vergleichbare Befunde, jedoch war der glomeruläre Schaden durchschnittlich schwächer, während der tubuläre Schaden und die Varianz in den Dosisgruppen höher waren.

In keinem Tier wurden die Glomerulonephritis-typischen Halbmondformationen gesehen. Eine tabellarische Zusammenfassung der histologischen Befunde ist im Anhang zu finden (Anhang-Tab. 2).

Die etablierten Biomarker BUN und sCrea waren weder in WKY noch in SD Ratten nach NTS Behandlung erhöht (Abb. 15A und B). Die WKY Ratten zeigten im Urin einen minimalen Anstieg von Glukose nach Behandlung mit 5 ml/kg NTS (2,4-fach am Tag 8 und 1,7-fach am Tag 14), während bei den SD Ratten am Tag 8 ein signifikanter 1,8-facher Anstieg gemessen wurde (Abb. 15C). Im Vergleich zur Cp-Behandlung war der Anstieg des Glukoselevels deutlich geringer. Die Gesamt-Proteinmenge im Urin war in beiden Rattenstämmen nach NTS-Gabe stark erhöht. Der Anstieg von uTP war dosisabhängig, 8 Tage nach Behandlung jeweils höher als nach 14 Tagen, durchschnittlich höher bei den WKY als bei den SD Ratten und insgesamt höher als bei der Cp-Behandlung (Abb. 15D).

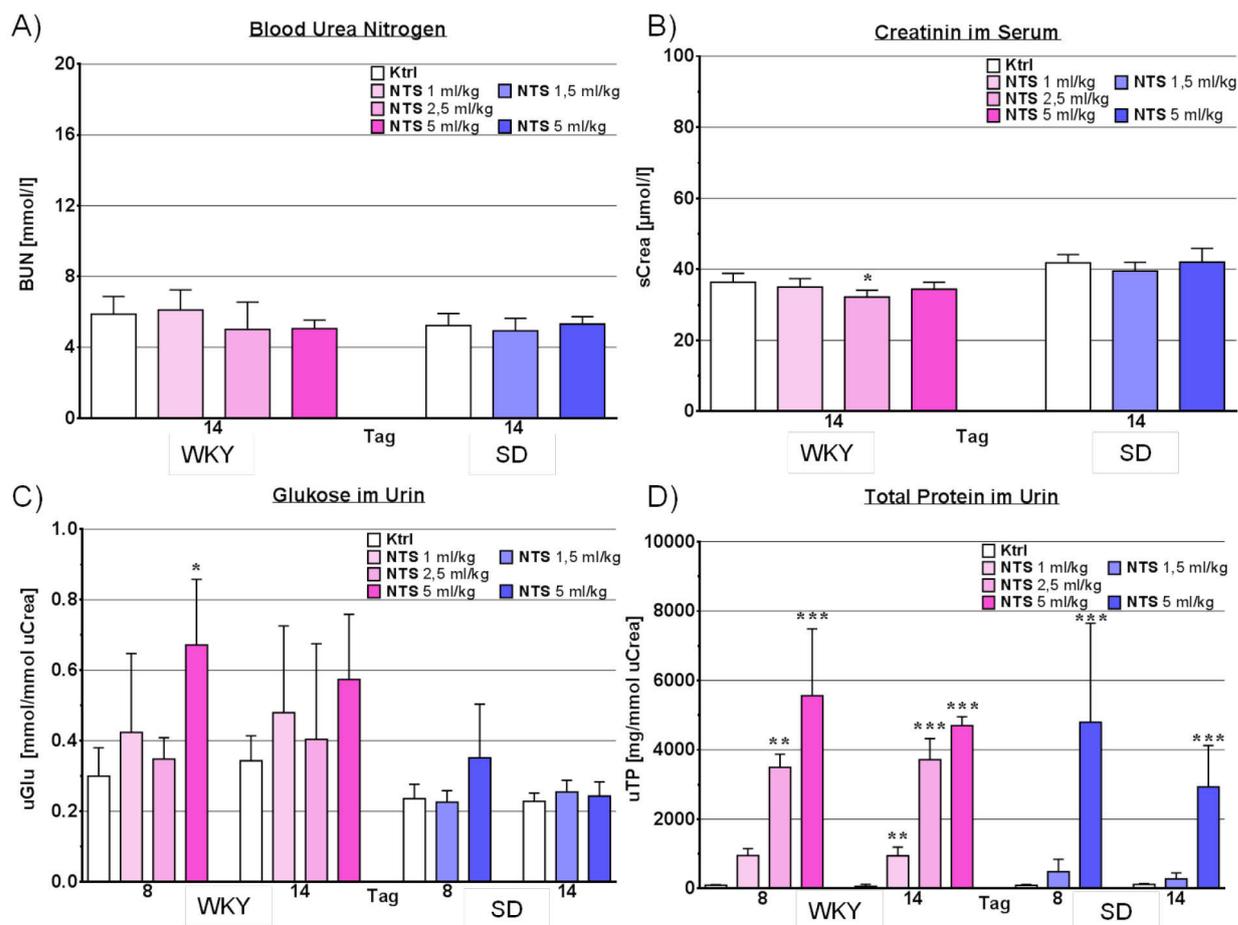


Abbildung 15 Ergebnisse etablierter Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). Blut-Harnstoff-Stickstoff, BUN (A) und Serum Creatinin, sCrea (B) wurden im Blut und Glukose (C) und die Gesamt- Proteinmenge, uTP (D) wurden im Urin gemessen. Urinparameter wurden mit dem Creatiningehalt im Urin normalisiert. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (WKY n=3-5, SD n=6) mit Standardabweichung pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließend Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle; WKY: Wistar Kyoto Ratten; SD: Sprague Dawley Ratten.

3.1.3 Methapyrilen Studie

Han Wistar Ratten wurden zwei Wochen täglich mit 0 (Kontrolle), 30 mg/kg oder 80 mg/kg Methapyrilen (MPy) behandelt und nach 4, 8, und 15 Tagen seziiert. Zusätzlich wurde eine Gruppe 10 Tage nach Behandlungsende (entspricht Tag 24) seziiert. Histologisch konnten die MPy-typische hepatozelluläre Nekrose und eine erhöhte Anzahl an Mitosen beobachtet werden.

Die Nekrose im periportalen Bereich war in den niedrig dosierten Ratten nach 4 und 8 Tagen jeweils minimal in einem von 6 Tieren, und nach 15 Tagen in 5 von 6 Tieren; am Tag 24 war keine mehr zu sehen. Alle mit 80 mg/kg MPy behandelten Ratten zeigten nach 4 Tagen minimale bis leichte Nekrose, die nach zweiwöchiger Behandlung maximal war (Tag 15, leicht bis moderat). Diese war nach zehntägiger behandlungsfreier Phase, entspricht Tag 24, nur noch in einem Tier als minimal detektierbar. Ein vergleichbarer zeitlicher und dosisabhängiger Verlauf wurde für die histopathologischen Befunde Vakuolisierung im periportalen Bereich, portale mononukleäre Inflammation und Gallengangs-Hyperplasie festgestellt. Letztere war im Zusammen-

3 Ergebnisse

hang mit portalen Pigmentablagerungen nach der behandlungsfreien Phase in allen 30 mg/kg MPy dosierten Tieren minimal und in allen 80 mg/kg MPy dosierten Tieren minimal bis leicht sichtbar. Eine erhöhte Anzahl an mitotischen Zellen konnten in den niedrig dosierten Ratten nach viertägiger Behandlung in einem Tier festgestellt werden. In den höher dosierten Gruppen nahm die Anzahl der Tiere mit erhöhten Mitosen über die Zeit zu; am Tag 15 war in allen Tieren eine minimal bis moderat erhöhte Mitoseanzahl vorhanden. Am Tag 24 wurde nur noch in einem Tier eine minimal erhöhte Anzahl an Mitosen gefunden (Anhang-Tab. 3). In der Niere traten keine behandlungsabhängigen Veränderungen auf.

Die Aktivitätsmessungen von in der Leber exprimierten Transaminasen im Serum (Alaninaminotransferase, ALT; Aspartataminotransferase, AST) sind etablierte Hepatotoxizitäts-Parameter. Beide waren im Serum von 30 mg/kg MPy-behandelten Ratten kaum verändert. In den höher dosierten Ratten wurde ein signifikanter Anstieg an den Tagen 4, 8 und 15 gemessen (maximal am Tag 4: 2,7-fach ALT und 2,4-fach AST). Nach der behandlungsfreien Phase war kein Unterschied zu den Kontrollratten zu sehen (Abb. 16A und B).

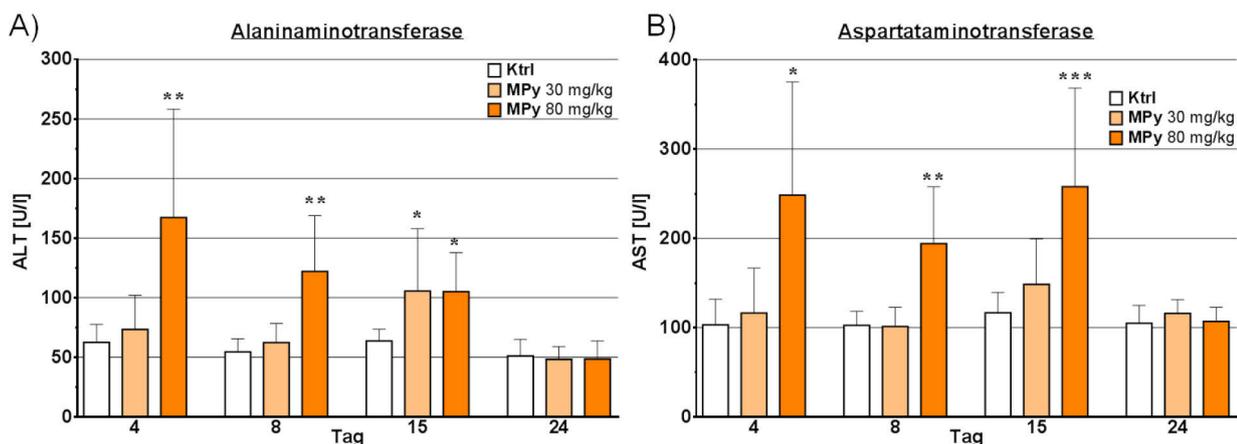


Abbildung 16 Ergebnisse etablierter Hepatotoxizitäts Biomarker nach Methapyrilen (MPy) Verabreichung. Alaninaminotransferase, ALT (A) und Aspartataminotransferase, AST (B) wurden im Serum gemessen. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert (n=6-12) mit Standardabweichung pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließendem Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle

3.2 Neue Proteinbiomarker für Nephrotoxizität

Neben den oben beschriebenen etablierten toxikologischen Endpunkten gibt es in neuester Zeit charakterisierte Biomarker (BM) im Urin zur Bestimmung der Nierenschädigung in Ratten. Diese werden häufig mit einer der folgenden zwei Plattformen gemessen: der elektrochemilumineszenz-basierten Plattform von Mesoscale Discovery (MSD) oder der *bead*- bzw. Durchflusszytometrie-basierten Plattform von Luminex (LMX). Die MSD und LMX Plattformen ermöglichen beide die Messung bereits qualifizierter, wie auch explorativer BM. Da beide Plattformen parallel genutzt werden, und eine Übereinstimmung der Ergebnisse sowie plattform-

unabhängige Basallevel noch nicht untersucht wurden, werden im Folgenden, zusätzlich zu der Beschreibung der jeweiligen Messergebnisse, auch die Plattformen verglichen.

Die Messungen mit LMX wurden von Mitarbeitern der Bayer Pharma AG im Labor von Herrn Dr. Björn Riefke durchgeführt.

3.2.1 Messung neuer Proteinbiomarker für Nephrotoxizität inklusive Methodenvergleich

Die Übersicht aller gemessenen BM ist in Tab. 25 abgebildet. Aus dieser geht hervor, dass drei BM, *Kidney injury molecule 1* (KIM-1), *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (NGAL) und Osteopontin (OPN), mit beiden Plattformen und in beiden Nephrotoxizitäts-Studien (Cp und NTS) gemessen wurden; diese bilden deshalb die Grundlage des direkten Vergleichs. Ergänzend wurden die Ergebnisse von Clusterin (CLU), Glutathion-S-Transferase α (α GST) und β -2-Microglobulin (β 2M) verglichen, welche mit beiden Plattformen in jeweils nur einer der Studien gemessen wurden. Die übrigen BM Ergebnisse werden ebenfalls kurz beschrieben.

Zwischen den Plattformen werden die gemessenen Konzentrationen und die behandlungsbedingten Veränderungen (Anstieg bzw. Abnahme im Verhältnis zur Kontrolle) sowie Korrelation und Übereinstimmung zwischen den Konzentrationen verglichen. Die Korrelation wurde mittels Korrelationsgerade und Korrelationskoeffizient (R^2) gemessen, wobei ein R^2 von 1 eine 100%ige Korrelation darstellt. Die Übereinstimmungsgrenzen (*limits of agreement*, LoA) wurden mit Hilfe von Bland-Altman-Diagrammen bestimmt, dabei stellt ein LoA-Wert von Null eine 100%ige Übereinstimmung dar.

Tabelle 25 Übersicht der gemessenen Biomarker pro Plattform und Studie. # qualifiziert für den Einsatz in präklinischen Rattenstudien zur Nephrotoxizitäts-Bestimmung; a) nur mit einer Plattform gemessen; b) mit beiden Plattformen nur in der jeweiligen Studie gemessen; alphabetische Reihenfolge; MSD: Mesoscale, LMX: Luminex, Cp: Cisplatin Studie, NTS: Studie mit nephrotoxischem Serum.

	ALB [#]	CALB	CLU [#]	CysC [#]	GST-Y	KIM-1 [#]	NGAL	OPN	RPA-1 [#]	TIMP-1	VEGF	α GST	β 2M [#]
MSD	✓		✓		✓	✓	✓	✓	✓			✓	✓
LMX		✓	✓	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Cp	✓	✓	✓ ^b	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓ ^b	✓ ^a
NTS	✓	✓	✓ ^a	✓		✓	✓	✓		✓	✓	✓ ^a	✓ ^b

Die KIM-1 Ergebnisse beider Plattformen zeigten eine starke Korrelation (R^2 0,83) und einen sehr kleinen LoA-Wert von 0,06 (Tab. 26). Die gemessenen Konzentrationen waren nahezu gleich. Im Urin von Wistar Ratten, denen Cp verabreicht wurde, wurde ein signifikanter KIM-1 Anstieg 3, 5 und 8 Tage nach der Verabreichung von 1 oder 3 mg/kg Cp gemessen. Nach 15 und 26 Tagen war zwar ein signifikanter, jedoch nur noch sehr kleiner Anstieg messbar (Abb. 17A und B). Im Urin von WKY und SD Ratten, denen NTS verabreicht wurde, war KIM-1 8 und 14 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS erhöht. Die Behandlung mit kleineren NTS-Dosen führte zu keinem signifikanten Anstieg (Abb. 18A und B). Beim Vergleich der beiden Studien wurden ca. 6-fach höhere KIM-1 Konzentrationen im Urin von NTS-behandelten Ratten

3 Ergebnisse

gemessen als im Urin von Cp-behandelten. Der relative Anstieg, d.h. das Verhältnis zwischen einer Behandlungsgruppe zur jeweiligen Kontrollgruppe pro Zeitpunkt, war ebenfalls höher (Tab. 27 und 28).

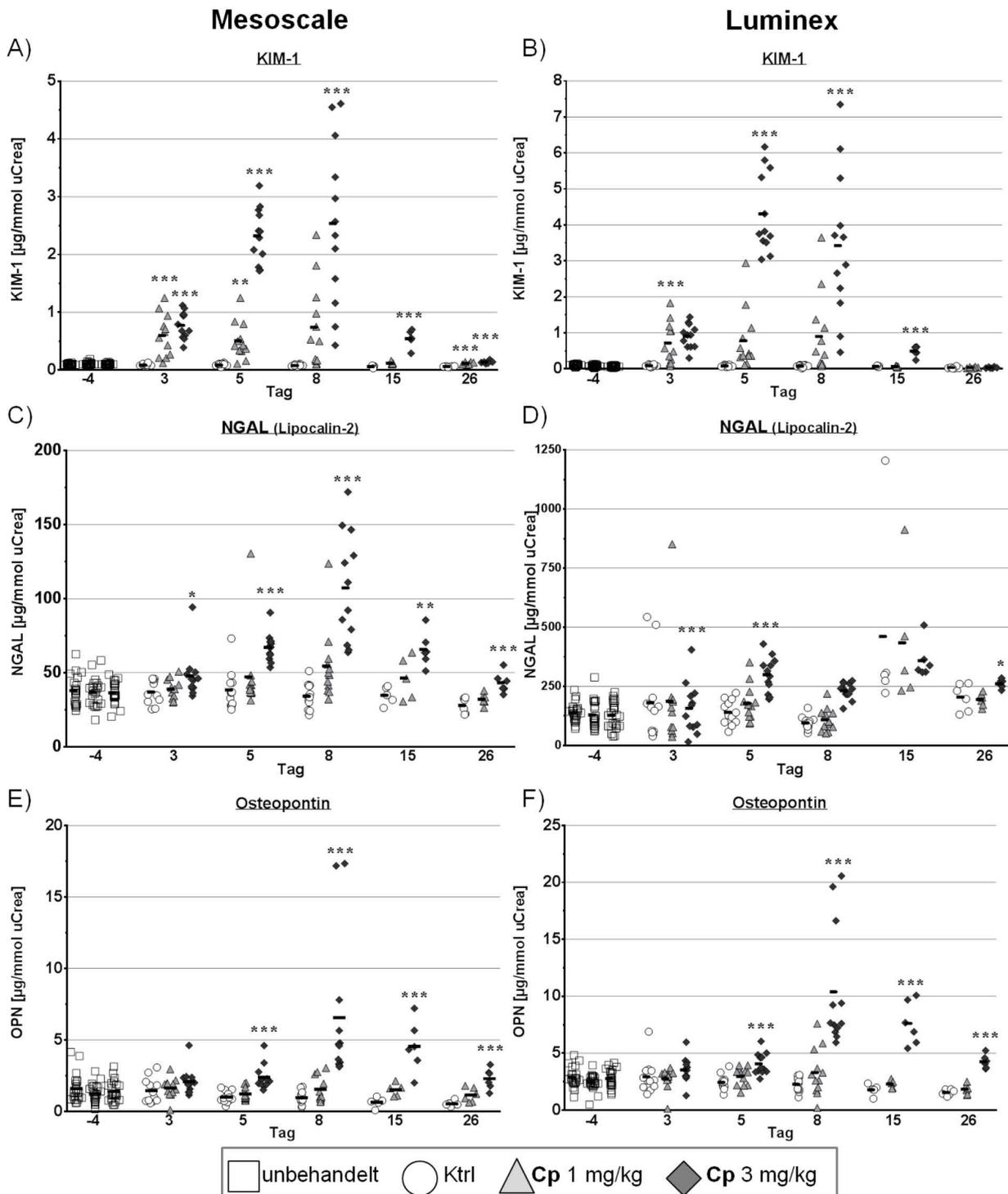


Abbildung 17 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Cisplatin (Cp) Verabreichung, gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen. KIM-1 (A, B), NGAL (C, D) und OPN (E, F) wurden im Urin gemessen und auf den Creatiningehalt im Urin normiert. Dargestellt ist der Messwert jedes Tieres (Zuordnung der Formen s. Legende) mit dem arithmetischen Mittelwert (Querstrich, n=6-12) pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließendem Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle.

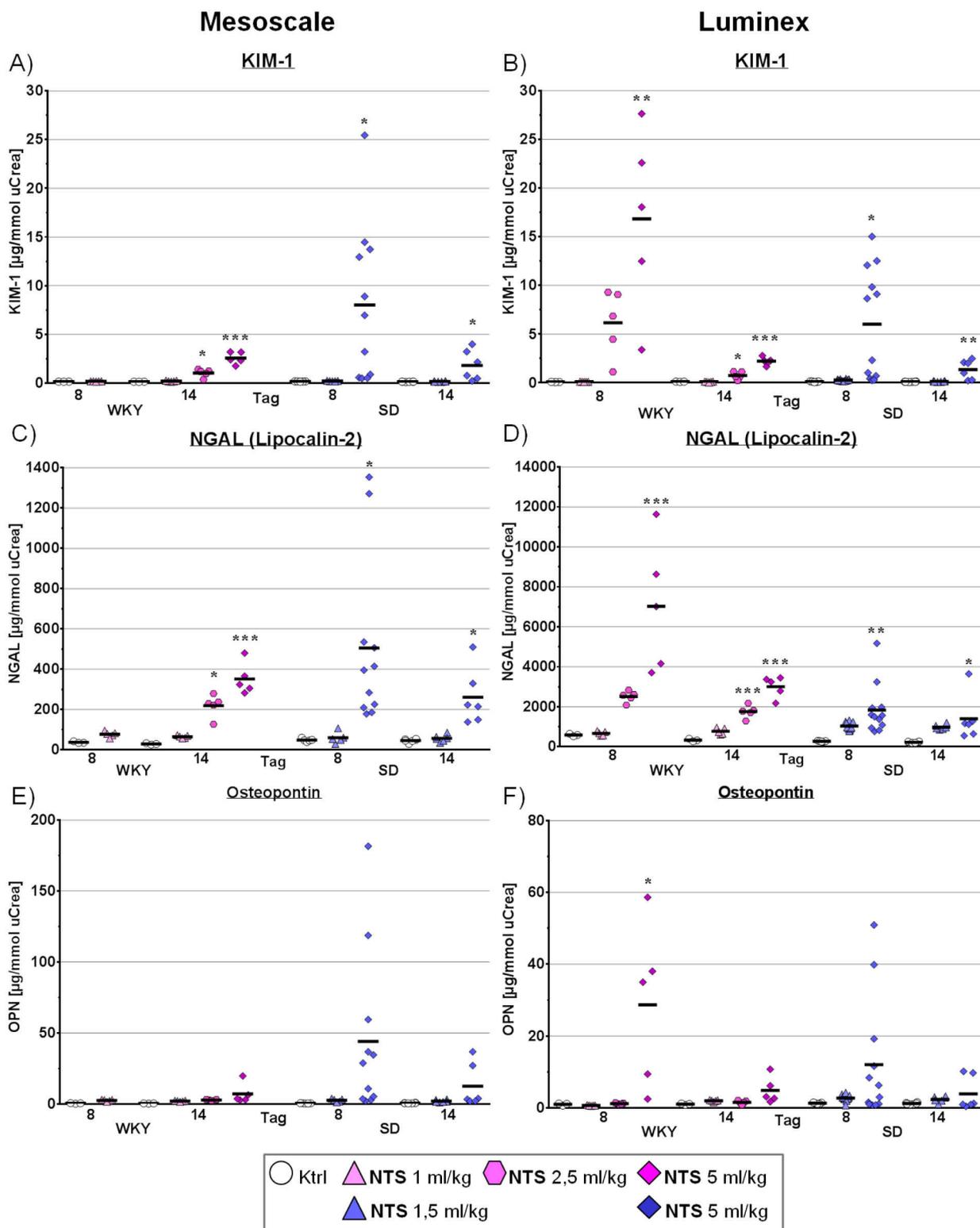


Abbildung 18 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS), gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen. KIM-1 (A, B), NGAL (C, D) und OPN (E, F) wurden im Urin gemessen und auf den Creatiningehalt im Urin normiert. Dargestellt ist der Messwert jedes Tieres (Zuordnung der Formen s. Legende) mit dem arithmetischen Mittelwert (Querstrich, WKY n=3-5, SD n=6-12) pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließend dem Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle, WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

3 Ergebnisse

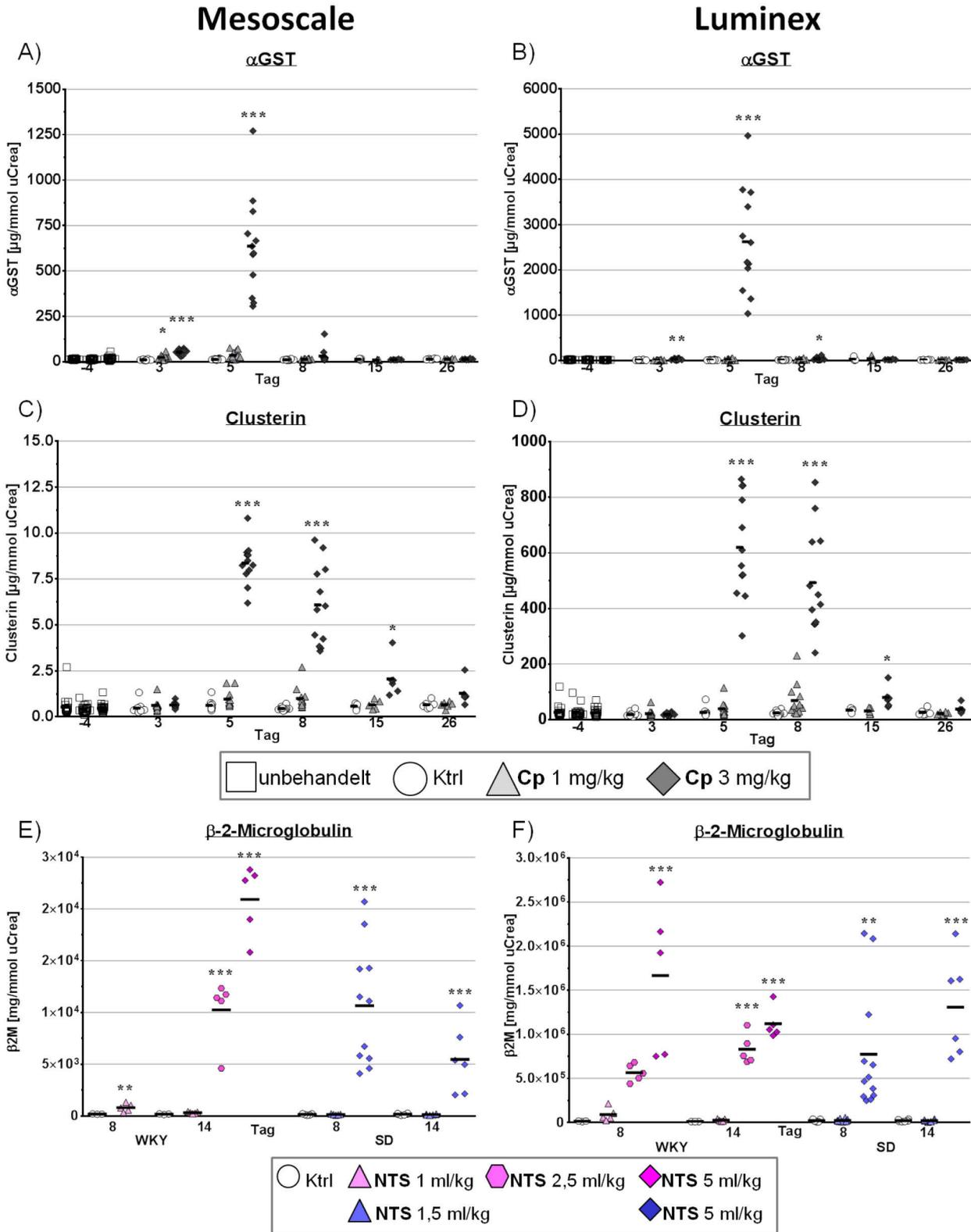


Abbildung 19 Ergebnisse drei neuer Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von Cisplatin (Cp) oder nephrotoxischem Serum (NTS), jeweils gemessen mit zwei unabhängigen Plattformen. α GST (A, B), CLU (C, D) aus der Cp Studie und β 2M (E, F) aus der NTS Studie wurden im Urin gemessen und auf den Creatiningehalt im Urin normiert. Dargestellt ist der Messwert jedes Tieres (Zuordnung der Formen s. Legende) mit dem arithmetischen Mittelwert (Querstrich, Cp n=6-12, NTS WKY n=3-5, NTS SD n=6-12) pro Dosisgruppe und Zeitpunkt. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA und anschließend dem Dunnett's Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe pro Zeitpunkt ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Ktrl: Kontrolle, WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

Die NGAL Messung mit den zwei Plattformen lieferte relativ unterschiedliche Ergebnisse bzgl. der absoluten Konzentration, mit einer mittleren Korrelation von nur R^2 0,67 und einem entsprechend großen LoA-Wert (338) (Tab. 26). Mit der LMX-Plattform waren die gemessenen Konzentrationen 6-10x höher und zeigten mehrere Ausreißer in der Cp Studie (Abb. 17C und D). Der relative Anstieg war jedoch vergleichbar. Mittels MSD Plattform wurde ein signifikanter NGAL Anstieg im Urin 3, 5, 8, 15 und 26 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp gemessen, der maximal war am Tag 8 (3-fach). Die niedrigere Dosis von 1 mg/kg Cp führte zu keinem signifikanten Anstieg. Die Verabreichung von 5 ml/kg NTS führte 8 und 14 Tage später bei WKY und SD Ratten zu einem signifikanten NGAL-Anstieg im Urin, der mittels beider Plattformen die gleiche relative Höhe hatte (Abb. 18C und D). Dieser war maximal am Tag 8 (Tab. 28) und bei WKY Ratten auch nach einer Verabreichung von 2,5 ml/kg NTS zu sehen. Niedrigere NTS Dosen führten zu keinem NGAL-Anstieg. Neben dem höheren Anstieg am Tag 8, zeigten Ratten, denen NTS verabreicht wurde, höhere NGAL Konzentrationen im Vergleich zu Ratten, denen Cp verabreicht wurde.

Bei der OPN Messungen war die Korrelation zwischen der MSD und LMX Plattform (R^2 0,52) gering. Die Konzentrationen und der, aus den jeweiligen Plattformergebnissen errechnete, relative Anstieg waren bei der Cp Studie vergleichbar, bei der NTS Studie hingegen nicht (Tab. 27 und 28). OPN stieg 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp im Urin signifikant an, war 8 Tage später maximal und 15 und 26 Tage später immer noch signifikant erhöht (Abb. 17E und F). Die Verabreichung von 1 mg/kg Cp führte zu keinem signifikanten OPN-Anstieg im Urin. 8 und 14 Tage nach der Verabreichung vom 5 ml/kg NTS wurde im Urin von WKY und SD Ratten ein OPN-Anstieg gemessen. Dieser war bei WKY im Vergleich zu SD Ratten am Tag 8 höher und nur bei WKY Ratten signifikant (Tab. 28). Ein Vergleich der NTS- mit den Cp-behandelten Ratten ließ einen höheren relativen Anstieg am Tag 8 und insgesamt höhere OPN Konzentrationen in den NTS-behandelten Ratten erkennen.

Tabelle 26 Statistischer Vergleich der Messmethoden. Die Übereinstimmung der absoluten Proteinbiomarker Konzentrationen gemessen mit beiden Plattformen (MesoScale Discovery und Luminex) wurde mittels Korrelation (Korrelationskoeffizient R^2) und Bland-Altman-Methode (Übereinstimmungsgrenzen, *limits of agreement*, LoA) bestimmt. b) mit beiden Plattformen in jeweils nur einer Studie gemessen

BM	KIM-1	NGAL	OPN	CLU ^b	α GST ^b	β 2M ^b
R^2	0,83	0,67	0,52	0,86	0,83	0,61
LoA	0,06	338	-0,28	89,8	111	405994

Die α GST Ergebnisse beider Plattformen, wie oben beschrieben nur auf der Cp Studie basierend, zeigten eine starke Korrelation (R^2 0,83) und einen großen LoA-Wert von 111 (Tab. 26). Die gemessenen Konzentrationen waren ca. 4-fach höher mit LMX, die errechneten Verhältnisse zu den Kontrollen jedoch relativ vergleichbar. Ein signifikanter α GST Anstieg im Urin wurde 3 und 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp gemessen. Am Tag 5 war der Anstieg ma-

3 Ergebnisse

ximal (50- MSD, 290-fach LMX), am folgenden Zeitpunkt, Tag 8, jedoch wesentlich kleiner (Tab. 27) und an den Tagen 15 und 26 sowie im Urin Cp niedrig dosierter Ratten nicht nachweisbar (Abb. 19A und B). Die LMX Messung von α GST im Urin aus der GN Studie zeigte einen Anstieg 8 und 14 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS an WKY Ratten, bei SD Ratten aber nur am Tag 8 (Tab. 28).

Tabelle 27 Neue Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Cisplatin (Cp) Verabreichung. Proteinbiomarker wurden mittels der Mesoscale Discovery (MSD) oder Luminex (LMX) Plattform 3, 5, 8, 15 und 26 Tage nach einmaliger Verabreichung von 0 (Kontrolle), 1 und 3 mg/kg Cp im Urin von Wistar Ratten gemessen. Die Konzentrationen wurden auf den Urin Creatiningehalt normalisiert. Pro Dosis- und Zeitpunktgruppe wurde der arithmetische Mittelwert gebildet (n=6) und das Verhältnis zwischen Behandelte und Kontrolle pro Zeitpunkt berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch ANOVA und anschließendem Dunnett's Test ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	Tag	Cp: 1 mg/kg					Cp: 3 mg/kg				
		3	5	8	15	26	3	5	8	15	26
αGST	MSD	2,2*	2,7	1,2	-1,4	-1,1	4,8***	49,3***	2,8	-1,2	-1,1
	LMX	-1,1	1,9	1,6	1,4	-1,1	3,1**	294,2***	2,9***	-1,5	1,03
Clu	MSD	1,3	1,9	3,1	1,1	1,0	1,2	13,4***	15,4***	3,6**	1,9*
	LMX	1,1	1,5	2,8	-1,1	-1,2	1,0	23,3***	19,8***	2,3*	1,4
KIM-1	MSD	7,0***	5,9**	9,6	1,9	1,9***	9,1***	26,7***	32,8***	9,1***	2,2***
	LMX	8,4***	9,5	11,9	-1,0	1,1	10,6***	52,2***	45,0***	7,5***	1,1
NGAL	MSD	1,1	1,2	1,6	1,3	1,2	1,3*	1,8***	3,1***	1,9**	1,6***
	LMX	1,0	1,3	1,1	-1,1	-1,1	-1,2	2,1***	2,4***	-1,3	1,3*
OPN	MSD	1,1	1,2	1,6	2,4	2,2	1,4	2,4*	6,8***	7,2***	4,3***
	LMX	-1,1	1,2	1,5	1,3	1,2	1,2	1,7*	4,6***	4,3***	2,8***
ALB	MSD	1,3	1,7	1,5	2,0***	1,6	1,9***	62,7***	6,4***	1,6**	-1,2
GST-Y	MSD	1,2	1,6	2,8	-1,5	1,3	1,5	2,1**	2,4	-1,3	-1,2
RPA-1	MSD	-1,7*	1,3	1,6	-1,3	-1,2	-1,2	3,4***	4,7***	2,0***	1,6**
β2M	LMX	1,1	-1,2	1,1	-1,3	-1,5	1,0	1,9**	1,2	1,5	1,5
CALB	LMX	-1,2	-1,2*	1,0	0,9	1,0	-1,1	-1,4***	-1,7**	1,3	1,3
CysC	LMX	1,0	1,0	1,2	1,0	-1,2	1,3	2,4***	1,8***	1,2	1,0
TIMP-1	LMX	1,6	2,1	2,5	1,8	-2,0	-1,3	30,8***	17**	1,7	-1,3
VEGF	LMX	1,0	1,3	1,2	-1,1	-1,7	1,3*	2,3***	1,7*	-1,3	-1,7

Die Messergebnisse beider Plattformen für CLU, ebenfalls nur auf den Proben der Cp Studie basierend, weisen eine starke Korrelation (R^2 0,86) und einen hohen LoA-Wert (89,8) auf (Tab. 26). Die mittels LMX gemessenen Konzentrationen waren ca. 60-fach höher als die mit MSD, während der jeweilige relative Anstieg vergleichbar war. Nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp wurde nach 5, 8 und 15 Tagen ein signifikanter CLU Anstieg gemessen (Abb. 19 C und D). Nach 26 Tagen war nur ein geringer Anstieg detektierbar. Die niedrigere Cp Dosis von 1 mg/kg führte zu keinem CLU Anstieg im Urin. Die CLU Messung mittels LMX im Urin von NTS behandelten Ratten ergab einen dosisabhängigen Anstieg nach 8 und 14 Tagen, der nur in der höchsten Dosisgruppe von 5 ml/kg NTS in WKY Ratten signifikant war (Tab. 28: 1.230-fach am Tag 8 und 349-fach am Tag 14). Der CLU Anstieg im Urin nach NTS Verabreichung war somit höher als nach Cp Verabreichung.

Der Plattformvergleich für β 2M basierte auf Daten, die aus der NTS Studie gewonnen wurden. Die MSD und LMX Messergebnisse hatten eine mittlere Korrelation (R^2 0,61) und einen extrem groß LoA-Wert (405994). Mit LMX wurden 12.000-fach höhere absolute Konzentrationen gemessen als mit MSD. Der relative Anstieg, der sich aus diesen unterschiedlichen MSD und LMX Konzentrationen errechnete, war jedoch vergleichbar. In WKY Ratten führte die Verabreichung von NTS zu einem dosisabhängigen β 2M Anstieg im Urin (Abb. 19E und F). Dieser war maximal und signifikant 8 sowie 14 Tage nach der Gabe der höchsten Dosis von 5 ml/kg NTS (Tab. 28: ca. 120-fach). Bei SD Ratten wurde 8 oder 14 Tage nach der Verabreichung von 1 ml/kg NTS kein β 2M Anstieg im Urin gemessen, während 5 ml/kg NTS zu einem deutlichen und signifikanten Anstieg führten. Die Messung mittels MSD war am Tag 8 maximal und mittels LMX am Tag 14 (Tab. 28, SD). Im Urin von Cp behandelten Ratten konnte nur 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp ein signifikanter 1,9-facher Anstieg mittels MSD gemessen werden.

Tabelle 28 Neue Nephrotoxizitäts-Biomarker nach Verabreichung von nephrotoxischen Serum (NTS). Proteinbiomarker wurden mittels Mesoscale Discovery (MSD) oder Luminex (LMX) Plattform 4 und 8 Tage nach einmaliger Verabreichung von 0 (Kontrolle), 1 bzw. 1,5, 2,5 und 5 ml/kg NTS im Urin von WKY und SD Ratten gemessen. Die Konzentrationen wurden auf den Urin Creatiningehalt normalisiert. Pro Dosis- und Zeitpunktgruppe wurde der arithmetische Mittelwert gebildet (WKY n=3-5, SD n=6) und das Verhältnis zwischen Behandelte und Kontrolle pro Zeitpunkt berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch ANOVA und anschließend Dunnett's Test oder t-Test (t) ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Fehlende Werte mangels nicht mehr vorhandenem Probenmaterial sind mit -/ gekennzeichnet. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

	NTS: Tag	WKY						SD			
		1ml/kg		2.5ml/kg		5ml/kg		1.5ml/kg		5ml/kg	
		8	14	8	14	8	14	8	14	8	14
KIM-1	MSD	1,2*†	1,5	-/-	8,1**	-/-	20,3***	1,3	1,2	51*	14**
	LMX	1,2	0,9	73	6,6*	200**	19,6***	2,4	1,3	50,9*	12,5**
NGAL	MSD	2,1***†	2,2	-/-	7,6***	-/-	12,2***	1,2	1,3	10,6***	5,6***
	LMX	1,1	2,4	4,3	5,3***	12***	9,2***	3,8	4,4	6,7**	6,3*
OPN	MSD	5,7***†	5	-/-	6,9	-/-	17,5	5,4	3,3	90,7**	20,4*
	LMX	0,7	1,9	1,2	1,5	29,7*	4,8	2,1	2	9,5	3,3
β 2M	MSD	4,5*†	1,8	-/-	58,9***	-/-	120***	-1,1	-1,3	72,7***	32,6***
	LMX	6,5	2,7	41	88,1***	121***	119***	1,1	1	38,4**	65,5***
ALB	MSD	353***†	201	-/-	4204**	-/-	2836*	99,8	105	3216***†	-/-
CLU	LMX	1,5	2	237	55,4	1230***	349**	2	1,5	472	136
CysC	LMX	1,2	1,3	15**	5,6***	31,4***	8,2***	1,4	1,2	9,9***	4,3**
α GST	LMX	1,7	1	4,6	1,9	19,2***	3,8***	3,7	1,9	8,3*	0,7
TIMP-1	LMX	2,3	1,5	111	46,1	549**	58,1	3,2	1,2	34,3*	2,8
VEGF	LMX	1,8	1,1	4,4***	2,1	8,3***	3,5**	2,1	1,3	3,7**	1,5*
CALB	LMX	0,8	1,2	0,9	1	1,1	1,4	1,3	1,3	0,8	1,2

Im Folgenden werden die Ergebnisse für Albumin (ALB), Calbindin (CALB), Cystatin C (CysC), *Tissue inhibitor of metalloproteinases 1* (TIMP-1) und *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) beschrieben (s. Tab. 27 und 28). Diese BM wurden mit je nur einer der Plattformen, aber in beiden Studien gemessen, d.h. sie ermöglichen keinen Plattformvergleich, sondern nur einen Vergleich zwischen den zwei Nephrotoxizitäts Modellen.

3 Ergebnisse

Der ALB Anstieg im Urin nach Cp Gabe war dosisabhängig, jedoch nur nach der höchsten Dosis von 3 mg/kg Cp deutlich. Das Maximum stellt der 62,7-fache Anstieg am Tag 5 dar. Im Urin von Ratten 8 oder 14 Tage nach NTS Gabe war ALB in so großen Mengen vorhanden, dass es mittels LMX nicht gemessen werden konnte. Mittels MSD konnte in den restlichen Proben ein extremer, über 1.000-facher Anstieg detektiert werden.

Die CALB Menge im Urin von Cp-behandelten Ratten war leicht verringert. Nach NTS Gabe wurden keine CALB Unterschiede zum Kontrollurin gemessen.

CysC war nur nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp am Tag 5 und 8 leicht erhöht. Nach NTS-Verabreichung konnte ein dosisabhängiger CysC Anstieg im Urin gemessen werden. Nach 8 Tagen war dieser höher als nach 14 Tagen und maximal bei den WKY Ratten.

Ein nicht signifikanter Anstieg von TIMP-1 wurde im Urin von Ratten nach der Verabreichung von 1 mg/kg Cp gemessen. 5 und 8 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp war der Anstieg deutlich und signifikant. Ein dosisabhängiger TIMP-1 Anstieg im Urin nach NTS Verabreichung wurde an beiden Zeitpunkten gemessen; dieser war 8 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS maximal und höher bei WKY als bei SD Ratten.

Ein ca. 2-facher VEGF Anstieg im Urin wurde nur 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp gemessen, während der VEGF Anstieg nach NTS etwas höher und dosisabhängig war.

Glutathion-S-Transferase Y1 (GSTY1) und *Renal papillary antigen 1* (RPA-1) wurden nur in der Cp Studie gemessen. Ein leichter GSTY1 Anstieg wurde 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp detektiert. RPA-1 war ebenso nur nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp im Urin leicht erhöht (Tab. 27).

Zusammenfassend zeigte der Plattformvergleich zwischen MSD und LMX für die sechs Proteinbiomarker eine durchschnittlich mittlere Korrelation bezüglich der gemessenen absoluten Konzentrationen. Außer für KIM-1 und OPN war die Übereinstimmung sehr gering, d.h. der LoA-Wert deutlich größer Null. Des Weiteren, KIM-1 und OPN ausgenommen, detektierte die LMX Plattform stets höhere Konzentrationen als MSD. Trotz der zum Teil geringen Korrelationen zwischen den absolut gemessenen Konzentrationen konnten beide Plattformen vergleichbar erhöhte relative Mengen der BM im Urin nach Nierenschädigung messen.

Mit der Messung dieser neueren BM konnte eine Cp-induzierte Nierenschädigung schon nach 1 mg/kg Cp durch einen KIM-1 Anstieg im Urin nachgewiesen werden. Nach Behandlung mit 3 mg/kg Cp ergab sich die frühest-mögliche Detektion, d.h. am Tag 3, durch α GST und KIM-1. Der maximale Anstieg wurde für die restlichen BM 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp gemessen. NTS-induzierte Nierenschädigung führte zum drastischen ALB Anstieg im Urin. Außer CALB waren alle Biomarker nach NTS Verabreichung erhöht und das häufig stärker in WKY als in SD Ratten sowie stärker als am gleichen Zeitpunkt nach Cp Verabreichung. Das Verhältnis der relativen Mengen zwischen KIM-1 und ALB nach den unterschiedlichen Nieren-

schädigungen, proximaler Tubulus durch Cp und primär der Glomerulus nach NTS-Gabe, lies einen möglichen Unterschied zwischen diesen beiden Typen der Nephrotoxizität erkennen.

3.2.2 Spezifitätsprüfung neuer Proteinbiomarker für Nephrotoxizität

Die oben beschriebenen Proteinbiomarker wurden für die Vorhersage von Nephrotoxizität in Ratten entweder schon qualifiziert oder zumindest dafür vorgeschlagen. Um ihre Spezifität für Nephrotoxizität zu prüfen, sollten ihre Konzentrationen im Urin aus einer Hepatotoxizitäts Studie ermittelt werden. Dazu wurden Ratten 4 oder 15 Tage lang täglich das Lebertoxin Methapyrilen (MPy) verabreicht. Von den Proteinbiomarkern wurden ALB, NGAL, KIM-1 und α GST als repräsentativ ausgesucht, da sie in beiden Nephrotoxizitäts Studien eindeutig und signifikant im Urin der behandelten Tiere angestiegen waren.

Die Mengen vom KIM-1 und α GST zeigten keine wesentliche Veränderung im Urin durch die MPy Verabreichung im Vergleich zum Urin von Kontrollratten (Tab. 29). ALB war 1,7-fach verringert nach 4 tägiger und NGAL war 1,3-fach erhöht nach 15 tägiger MPy Verabreichung.

Tabelle 29 Spezifität neuer Nephrotoxizitäts Biomarker. Proteinbiomarker wurden mit der Mesoscale Discovery (MSD) Plattform 4 und 15 Tage nach täglicher Verabreichung von 0 (Kontrolle) und 80 mg/kg des Lebertoxins Methapyrilen (MPy) im Urin von Wistar Ratten gemessen. Die Konzentrationen wurden auf den Creatiningehalt normalisiert. Pro Dosis- und Zeitpunktgruppe wurde der arithmetische Mittelwert gebildet (n=6) und das Verhältnis zwischen Behandelt und Kontrolle pro Zeitpunkt berechnet. Die statistische Signifikanz wurde durch ANOVA und anschließendem Dunnett's Test ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

	MPy: 80 mg/kg	
	Tag	
	4	15
ALB	MSD -1,7**	1,4
NGAL	MSD 1,1	1,3**
KIM-1	MSD 1,1	1,0
αGST	MSD 1,2	1,1

3.3 Messung von microRNAs im Urin

Diverse Molekülklassen können als BM eingesetzt werden. Neben den im vorherigen Abschnitt 3.2 untersuchten Protein-BM stellen microRNAs (miRNAs) eine relative neue Klasse dar. Diese kleinen, nur ca. 22 Nukleotide langen Nukleinsäuren sind zwischen verschiedenen Spezies konserviert, stabil in diversen Körperflüssigkeiten und bereits als vielversprechende BM für diverse Erkrankungen beschrieben. In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob miRNAs im Urin potentielle neue BM für Substanz-induzierte Nierenschädigung in Ratten sein könnten.

3.3.1 microRNA Profil im Urin nach Cisplatin Verabreichung

Aus dem Urin von Kontroll- und Cp-behandelten Ratten wurde die Gesamt-RNA isoliert und die Menge der darin enthaltenen miRNAs wurde mittels quantitativer PCR (*quantitative real time PCR*, qRT-PCR) auf TaqMan Cards gemessen.

Für die Normalisierung und Analyse von Urin miRNA PCR-Daten existiert zurzeit keine allgemeingültige und etablierte Methode. Einige Ansätze dazu ließen sich jedoch von bereits be-

3 Ergebnisse

kannten Daten über miRNAs im Gewebe oder im Plasma und von der etablierten Normalisierung von mRNA Daten ableiten.

Eine Möglichkeit wäre die Verwendung einer oder mehrerer invarianter miRNAs aus dem Datenpool als endogene Referenz für die, in der mRNA-Analyse gebräuchliche, $\Delta\Delta$ cycle threshold (Ct)-Berechnung zu nutzen (s. 2.2.5.6.3). Wie in Abb. 20 zu sehen ist, führte die Verabreichung von 3 mg/kg Cp jedoch zu einem starken Anstieg von miRNAs im Urin, repräsentiert durch die niedrigen Ct Werte am Tag 5. Nach 8 Tagen waren viele der miRNAs im Urin verringert, d.h. die Ct Werte waren sehr hoch und im wenig verlässlichen Detektionsbereich für TaqMan Card Daten von Ct 30-35. Somit konnten weder empirisch noch mittels Varianzanalyse invariante miRNAs identifiziert werden.

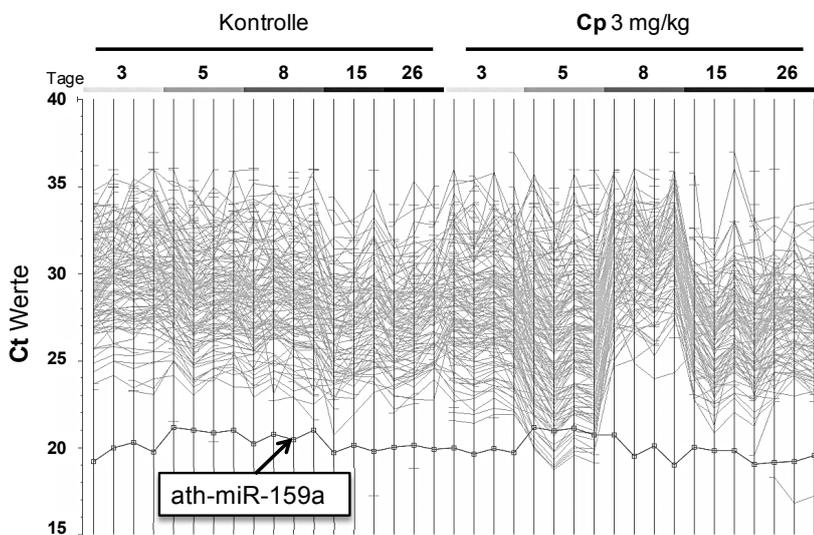


Abbildung 20 Urinprofil von 375 miRNAs von Kontrollratten und Cisplatin (Cp) behandelten Ratten über die Zeit. Nach der Isoalation von Gesamt-RNA aus dem Urin, wurden miRNAs mittels qRT-PCR auf TaqMan A Cards gemessen. Cycle threshold (Ct) Werte wurden hier unverändert aufgetragen. Die Ct-Werte des spike-ins ath-miR-159a, d.h. der exogenen miRNA die während der Isolation dazugegeben wurde, sind hervorgehoben.

Neben invarianten miRNAs können auch Spike-ins, also exogene miRNAs, die zu Beginn der RNA Isolation hinzugegeben, zur Normalisierung eingesetzt werden (s. 2.2.5.6.3). Die hier verwendete ath-miR-159a zeigte eine relativ geringe Varianz zwischen den Proben (Abb. 20), was auf eine geringe technische Varianz im Isolations- und PCR-Prozess hinweist. Eine $\Delta\Delta$ Ct Berechnung mit ath-miR-159a als Referenz miRNA und die folgenden statistische Analyse lieferten 128 Cp-abhängig veränderte miRNAs im Urin. Da diese Methode jedoch nur die technische Varianz und nicht die endogene biologische berücksichtigt, wurde sie nicht weiter verwendet.

Um unabhängig von invarianten und Spike-in miRNAs zu sein und um gleichzeitig die endogene Varianz zu berücksichtigen, wurde eine eigene Normalisierungs- und Analyseverfahren für Urin miRNA PCR-Daten, die modifizierte Δ Ct Methode, entwickelt (Abb. 21). Diese basiert auf einem fixen Ct von 30 für die Δ Ct Berechnung und einer Normalisierung auf den Urin Creatinengehalt, wie es auch für Proteinbiomarker üblich ist (siehe 2.2.5.6.3).

Mit Hilfe dieser Methode war es möglich 136 signifikant Cp-abhängig veränderte miRNAs im Urin zu finden. Für die Selektion signifikant veränderter miRNAs wurde für ANOVA ein q-Wert $<0,05$ und für den t-Test bei p-Wert $<0,01$ festgelegt. Ein weiteres Kriterium war eine

mindestens zwei-fache Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Eine große Menge dieser miRNAs wurde auch mit der ath-miR-159a Normalisierung gefunden (Abb. 22A). Die Principal Component Analyse zeigte, dass sich das Urinprofil dieser 136 miRNAs entsprechend der verschiedenen Dosisgruppen gruppierte. Die 136 miRNAs erlaubten eine Unterscheidung zwischen Kontrollratten und Cp-behandelten Ratten und zeigten eine eindeutige Richtung des Behandlungseffektes (Abb. 22B).

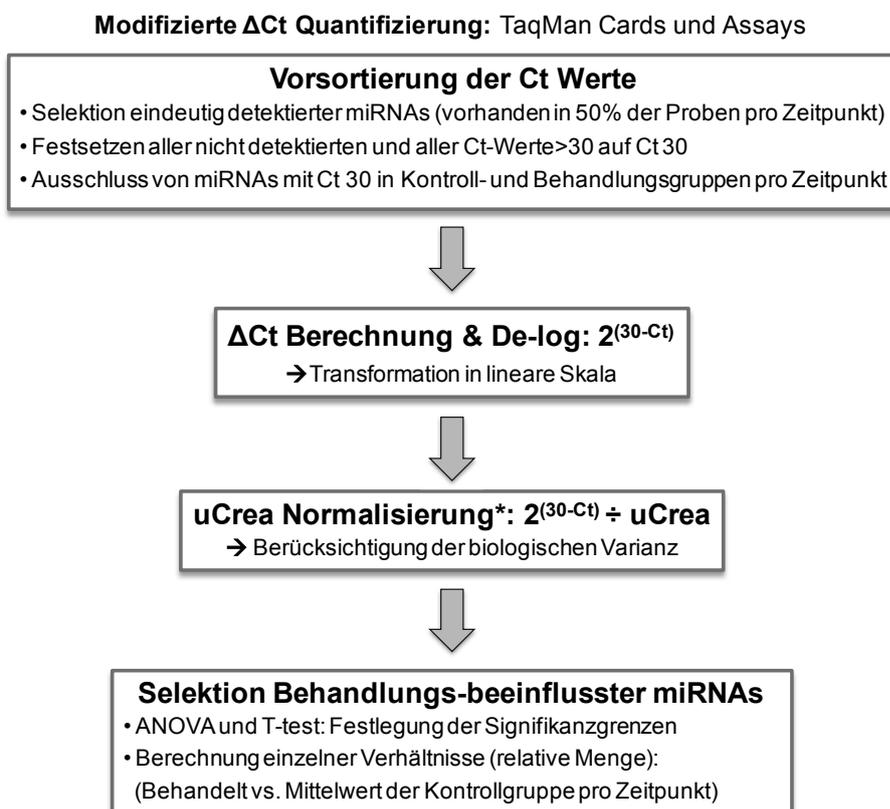


Abbildung 21 Schematischer Ablauf der Normalisierung und Analyse von miRNA PCR-Profilierungsdaten. Urin Creatinin (uCrea) Normalisierung nur für Urin miRNA PCR Daten(*)

Für das Hierarchical Clustering wurde die relative Menge, im folgenden auch als Verhältnis oder Quotient bezeichnet, berechnet. Diese wurde errechnet, indem pro miRNA für jede Probe eines Cp-behandelten Tieres das Verhältnis zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe des gleichen Zeitpunkts gebildet wird. Dafür wurden die PCR Daten, die nach der modifizierten Δ Ct Methode prozessiert wurden und somit eine lineare Datenmenge ohne Einheit darstellten, verwendet. Die Verhältnisse geben einen relativen Anstieg oder eine relative Abnahme einer bestimmten miRNA nach Cp Verabreichung an und können nach dem Hierarchical Clustering in einer Heatmap visualisiert werden: jede waagerechte Linie entspricht einer miRNA und jede senkrechte Linie einer bestimmten Urinprobe. Rot steht für Verhältnisse größer 2, also für einen 2- und mehrfachen Anstieg; schwarz steht für ein Verhältnis um 1, also für keinen Anstieg; und grün steht für Verhältnisse kleiner 0,5 also für eine 2- und mehrfache Abnahme, jeweils im Vergleich zur Kontrollgruppe vom gleichen Zeitpunkt.

3 Ergebnisse

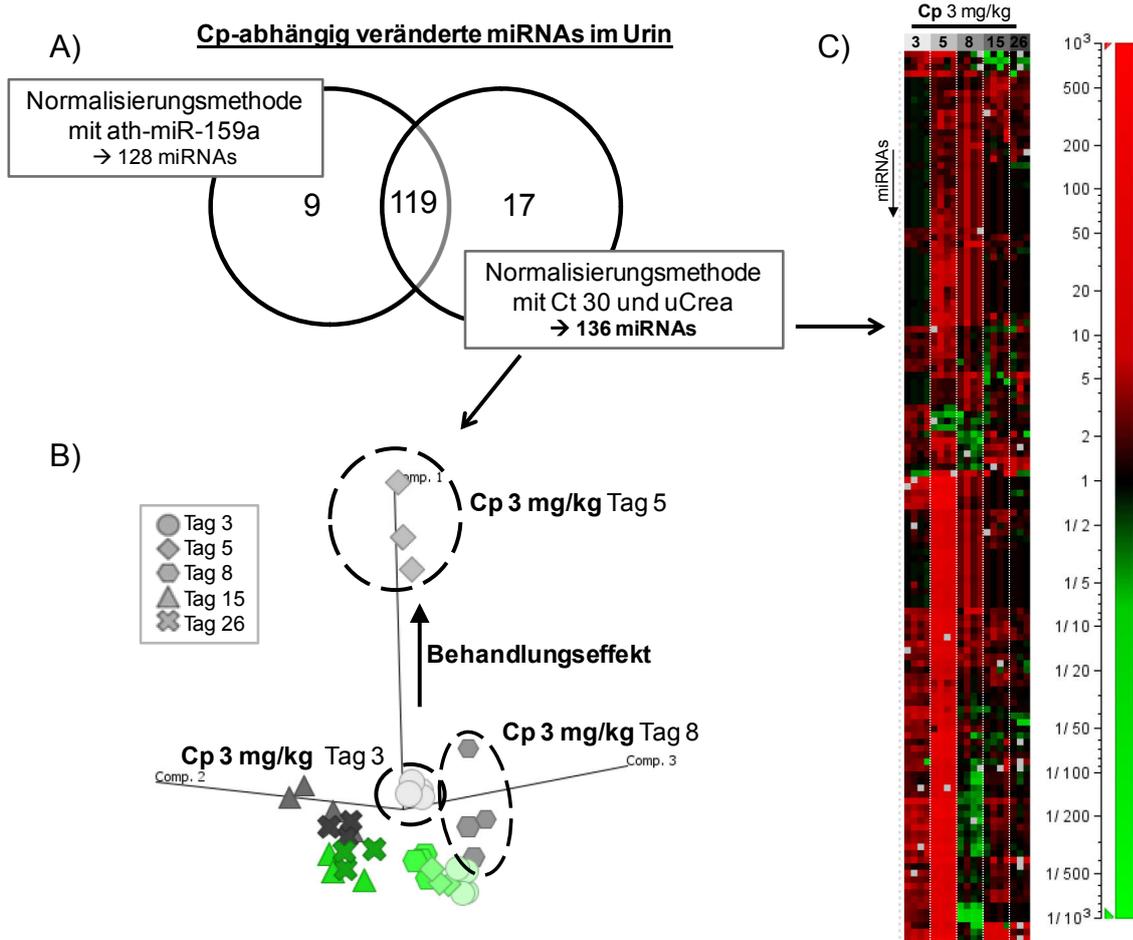


Abbildung 22 Signifikant veränderte miRNAs im Urin nach Cisplatin (Cp) Verabreichung. A) Mittels Venn Diagramm wurden die finalen miRNA Gruppen nach zwei Normalisierungsmethoden verglichen. B) Eine Principal Component Analyse wurde mit den TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden, und der finalen Gruppe von 136 miRNAs als Variablen durchgeführt. Der Pfeil zeigt die behandlungsabhängige Veränderung der miRNA Level im Urin an. Grüne Formen stellen die Kontroll- und graue Formen die Cp behandelten Proben dar. Die unterschiedlichen Formen entsprechen den Zeitpunkten. C) Das Hierarchical Clustering wurde als Heatmap dargestellt, in der für jede der 136 miRNAs (waagerecht) das jeweilige Verhältnis der miRNA-Menge nach Behandlung relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe pro Zeitpunkt (senkrecht) zu sehen ist. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden.

Das Hierarchical Clustering der finalen Gruppe von 136 Cp-abhängig veränderten miRNAs im Urin zeigt, dass die Hälfte der miRNAs schon 3 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp erhöhte Level aufweisen. 5 Tage später ist von fast allen 136 miRNAs eine erhöhte Menge im Urin behandelter Ratten nachgewiesen worden (Abb. 22C). Über Tag 8, 15 und 26 sinken die miRNA Mengen im Urin allmählich zum Kontrolllevel.

Von diesen 136 miRNAs wurden 18 anhand ihres Profils über die Zeit, ihrer absoluten Menge im Urin und Literaturinformationen über eine mögliche Expression in der Niere selektiert. Letzteres führte zur möglichen Zuordnung von miRNAs im Urin zu einer Quelle, hier Niere, um so ihr Potential als BM für Schädigungen der Niere zu untersuchen. Die 18 selektierten miRNAs sind in Tab. 30 gelistet. Für 15 konnten Expressionsdaten bzw. Assoziationen mit Nierenerkrankungen in der Literatur gefunden werden, zu denen auch die stark in der Niere exprimierte miR-192 gehörte. 12 miRNAs waren zum frühesten Zeitpunkt (Tag 3) nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp im Urin mindestens um das 2-fache erhöht (Anhang Tab. 4).

Einerseits zur Prüfung der modifizierten Δ Ct Methode und andererseits zur Verifizierung der miRNA Urinprofile, wurden die selektierten 18 miRNAs mit einzelnen TaqMan Assays nachgemessen. Bei der erneuten qRT-PCR Messung wurden für die jeweilige miRNA eine spezifische Standardkurve parallel mitgemessen. Diese ermöglichte eine absolute Quantifizierung der miRNAs, d.h. die genaue Bestimmung der Kopienzahl pro Urinvolumen, in den Urinproben, welche dann auf Urin Creatinin normalisiert werden konnten (Abb. 23).

Tabelle 30 Selektion von 18 miRNAs mit verändertem Urinprofil nach Verabreichung von Cisplatin. r: ratten-spezifisch, assoz.: assoziiert.

miRNA / Tag	Literaturinformationen bzgl. Nierenexpression
miR-15b	U.a. exprimiert in der Niere; im Cluster mit miR-16
miR-16	U.a. exprimiert in der Niere; im Cluster mit miR-15b
miR-20a	Assoz. mit Nierenzellkarzinomen; im miR-17-92 Cluster
miR-20b	/
miR-21	U.a. exprimiert in der Niere; dereguliert in vielen Karzinomen
miR-34a	U.a. exprimiert in der Niere; p53 Zielgen
miR-141	U.a. exprimiert in der Niere
miR-146a	U.a. exprimiert in der Niere; assoz. mit chronischer Nephritis
miR-184	U.a. exprimiert in der Niere; assoz. mit Nierenzellkarzinomen
miR-185	U.a. exprimiert in der Niere; assoz. mit Nierenzellkarzinomen
miR-192	U.a. exprimiert in der Niere
miR-193	U.a. exprimiert in der Niere
miR-196c^r	U.a. exprimiert in der Niere
miR-200b	U.a. exprimiert in der Niere; im miR-200bc-429 Cluster
miR-210	Assoz. mit Nierenzellkarzinomen und Nierenschäden
miR-223	Assoz. mit chronischen Nierenerkrankungen
miR-327^r	/
miR-339-3p^r	/

Wie in Abb. 24A zu sehen ist, führte die erneute Messung der selektierten miRNAs mit einzelnen TaqMan Assays und die anschließende Quantifizierung dieser, sowohl mittels der eigens entwickelten modifizierten Δ Ct Methode als auch mittels einer Standardkurve, zu ähnlichen Profilen. Dabei bezieht sich die Ähnlichkeit der miRNA Profile auf eine gleiche Cp-abhängige Richtungsänderung (Anstieg bzw. Abnahme im Urin) und auf eine gleiche Zeitabhängigkeit.

3 Ergebnisse

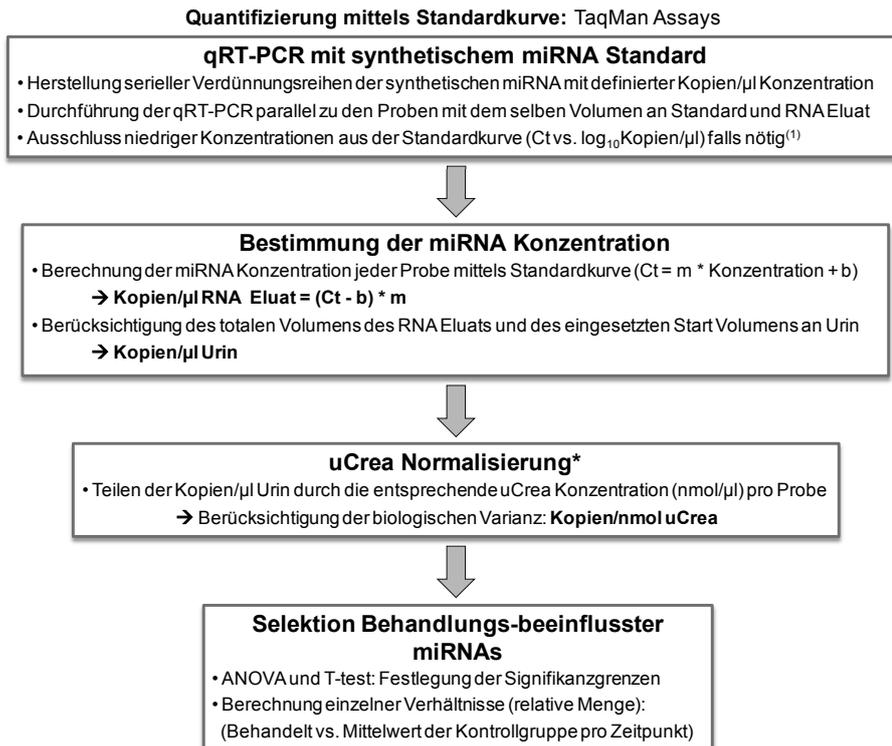


Abbildung 23 Schematischer Ablauf der Quantifizierung mittels Standardkurve und Analyse von miRNA PCR-Daten. Urin Creatinin (uCrea) Normalisierung nur für Urin miRNA PCR Daten(*).

Für 8 der 18 miRNAs wurde aus den TaqMan Card und TaqMan Assay Daten, jeweils mittels der modifizierten ΔCt Methode quantifiziert, eine starke Korrelation ($R^2 > 0,9$) zwischen den Verhältniszahlen errechnet. Eine ebenso deutliche Korrelation ($R^2 > 0,9$) zeigten die Verhältniszahlen für 11 der 18 miRNAs, wenn sie aus den TaqMan Assay Daten mittels der modifizierten ΔCt Methode oder mittels Standardkurve berechnet wurden. Somit konnten der neu entwickelte Analyseansatz für Urin miRNAs und das Profil der selektierten miRNAs durch eine absolute Quantifizierung verifiziert werden.

Da gezeigt wurde, dass die Mengen der selektierten miRNAs im Urin von Ratten nach einer Verabreichung von 3 mg/kg Cp bereits nach 3 Tagen anstiegen, sollte weiterhin geprüft werden, ob diese sich auch bei der kleineren Dosis von 1 mg/kg Cp veränderten.

Die niedrigere Dosis von Cp verursachte in der Rattenniere eine moderate Nekrose und eine moderate Erhöhung des Proteinbiomarkers KIM-1 (Abb. 24B, Histo-Scores und uKIM-1). Für 10 der 18 selektierten miRNAs konnte ein Anstieg im Urin nach 3 und für 6 nach 3 und 5 Tagen gemessen werden (Abb. 24B). miR-15, -21, -192, -210 und miR-34a waren entsprechend des *Classification Rankings*, die Top fünf miRNAs, deren Urinprofile der tubulären Nekrose am meisten entsprachen. Jener ist ein Algorithmus, der, ausgehend von dem histopathologischen Grad für tubuläre Nekrose, anhand der relative Mengen potentieller miRNA BM die miRNAs mit einer möglichst zielsicheren Voraussagen für tubuläre Nekrose sucht.

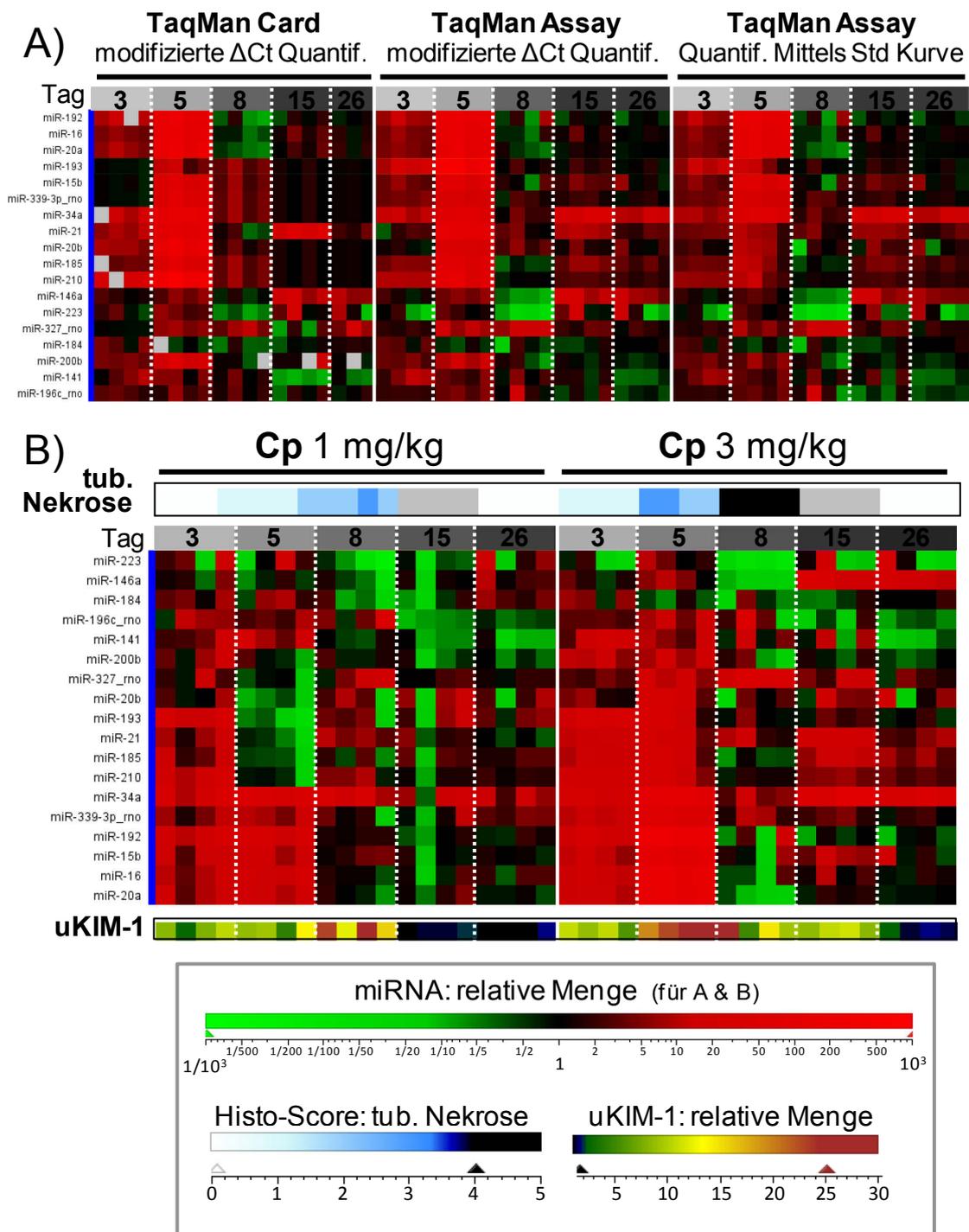


Abbildung 24 Verifizierung der Urinprofile der 18 selektierten miRNAs. A) Heatmap der 18 miRNAs über die Zeit, gemessen im Urin von Ratten nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp. Vergleichend dargestellt sind die relativen Mengen (Verhältnis: Behandlung vs. Kontrolle) nach TaqMan Card vs. TaqMan Assay Messung kombiniert mit Quantifizierung mittels modifizierter Δ Ct Methode oder Quantifizierung mittels Standardkurve. B) Heatmap der 18 miRNAs über die Zeit, gemessen im Urin von Ratten nach der Verabreichung von 1 oder 3 mg/kg Cp. Die Quotienten (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) basieren auf der TaqMan Assay Messung und Quantifizierung mittels Standardkurve. Die histopathologischen Klassifizierung des Grades der tubulären Nekrose in der Niere (Histo-Score) ist über der Heatmap in blau dargestellt, dabei steht 0 für keinen Befund und 5 für eine massive tubuläre Nekrose. Der relative KIM-1 Anstieg (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) ist unter der Heatmap bunt dargestellt. Std: Standard, uKIM-1: *Kidney injury molecule-1* im Urin, rno: rattenspezifische miRNAs.

3 Ergebnisse

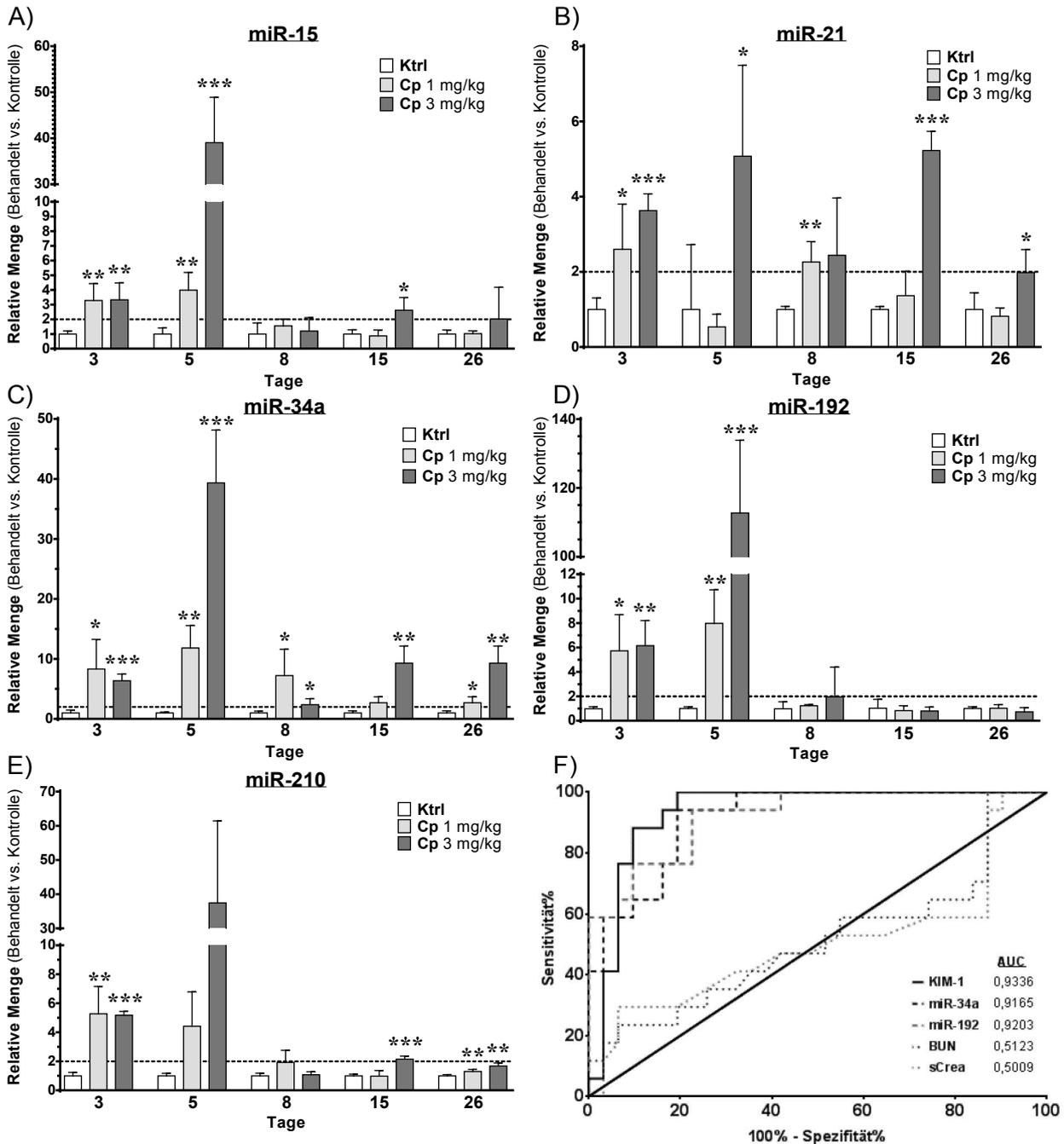


Abbildung 25 Die Top fünf miRNAs, deren Urinprofil am besten mit Auftreten und Stärke der tubulären Nekrose korrelierten. A)-E) Relative Mengen der miRNAs (Verhältnis: Behandlung vs. Kontrolle) berechnet aus TaqMan Assay Daten, die mittels Standardkurve quantifiziert und auf Urin Creatinin normalisiert wurden, indem pro miRNA für jede Probe eines Cisplatin behandelten Tieres das Verhältnis zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe gebildet wurde. Hier dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung (n=4) pro Dosis- und Zeitgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die zugehörige Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. F) Receiver Operating Characteristic Kurve mit berechneter Fläche unterhalb der Kurven (*area under curve*, AUC) stellen die Sensitivität und Spezifität von KIM-1, miR-34a und -192, im Urin sowie der etablierten Nierenbiomarker Blut-Harnstoff-Stickstoff (BUN) und Serum Creatinin (sCrea), in Vergleich zum Goldstandard Histopathologie bezüglich tubulärer Nekrose dar. Aufteilung der Proben mit dazugehörigen Messwerten für die Marker: Nekrosegrad 0, negativ; Nekrosegrad 1-5, positiv.

Für die fünf miRNAs konnte ein signifikanter und deutlicher, d.h. mindestens 2-facher, Anstieg im Urin nach der Verabreichung der niedrigeren Cp Dosis gemessen werden (Abb. 25A-E).

Sensitivität und Spezifität des Proteinbiomarkers KIM-1, der potentiellen Urin miRNA BM miR-34a und -192 und der etablierten Nierenmarker BUN und Serum Creatinin, bezogen auf den Goldstandard Histopathologie, wurden mit Hilfe von *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurven und der dazugehörigen Flächenberechnung unterhalb der Kurve (*area under curve*, AUC) bestimmt. Basierend auf den histopathologischen Befunden für Cp-induzierte tubuläre Nekrose wurden die Proben, und damit die entsprechenden Markermesswerte, in zwei Gruppen geteilt: Nekrosegrad 0 in die Negativ- und Nekrosegrad 1-5 in die Positivgruppe. Je höher der AUC Wert ist (0-1), desto sensitiver und spezifischer ist der jeweilige BM. Die Nierenmarker BUN und Serum Creatinin zeigten eine nahezu diagonal verlaufende ROC Kurve und entsprechende AUC Werte um 0,5 (Abb. 25F). KIM-1 sowie miR-34a und -192 wiesen eine höhere Sensitivität und Spezifität auf, mit AUCs die größer als 0,9 waren (Abb. 25F).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass miRNAs aus Urin isoliert und mit qRT-PCR quantifiziert werden können. Viele miRNAs hatten erhöhte Level im Urin von Ratten mit Cp-induzierter Nierenschädigung. Das Urinprofil bestimmter miRNAs korrelierte stark mit den histopathologischen Befunden für tubuläre Nekrose.

3.3.2 microRNA Profil im Urin nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum

Das nephrotoxische Serum (NTS) löst in Ratten eine Glomerulonephritis (GN) aus, welches eine andere Art von Nierenschädigung im Vergleich zur Cp-induzierten tubulären Schädigung darstellt. Durch die Untersuchung der Urin miRNA Profile in diesem anderen Nierentoxizitätsmodell sollten miRNAs als BM weitergehend evaluiert werden. Parallel dazu sollten auch die Reaktionen zweier Rattenstämme, WKY und SD, verglichen werden. Aus dem Urin von Kontrollratten und Ratten, denen NTS verabreicht wurde, wurde die totale RNA isoliert und die darin enthaltenen miRNAs mittels qRT-PCR auf TaqMan Cards gemessen.

Die Normalisierung und Analyse der TaqMan Card Daten entsprechend der modifizierten ΔCt Methode (Abb. 3.10) zeigte, dass eine Verabreichung von 5 ml/kg NTS an WKY Ratten zu 72 und an SD Ratten zu 30 signifikant veränderten miRNAs im Urin führte. Für die Selektion signifikant veränderter miRNAs wurde für ANOVA ein q-Wert $<0,05$ und für den t-Test ein p-Wert $<0,05$ festgelegt. Ein weiteres Kriterium war eine mindestens zwei-fache Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Fast alle der im SD Urin veränderten miRNAs waren identisch mit denen im Urin von WKY Ratten (Abb. 26A). Die PCA der Vereinigungsmenge, 74 miRNAs, zeigte einen Behandlungseffekt in beiden Rattenstämmen. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlung war bei den WKY Ratten ausgeprägter (Abb. 26B). In der Heatmap Darstellung wird sichtbar, dass alle 74 miRNAs im Urin von WKY Ratten 8 und 14 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS anstiegen. Für die meisten dieser miRNAs ließ sich auch ein Anstieg im Urin von SD Ratten nach der NTS Verabreichung messen, dieser war jedoch

3 Ergebnisse

deutlich schwächer und zeigte eine höhere Varianz innerhalb der Behandlungsgruppe (Abb. 26C und Anhang-Tab. 5).

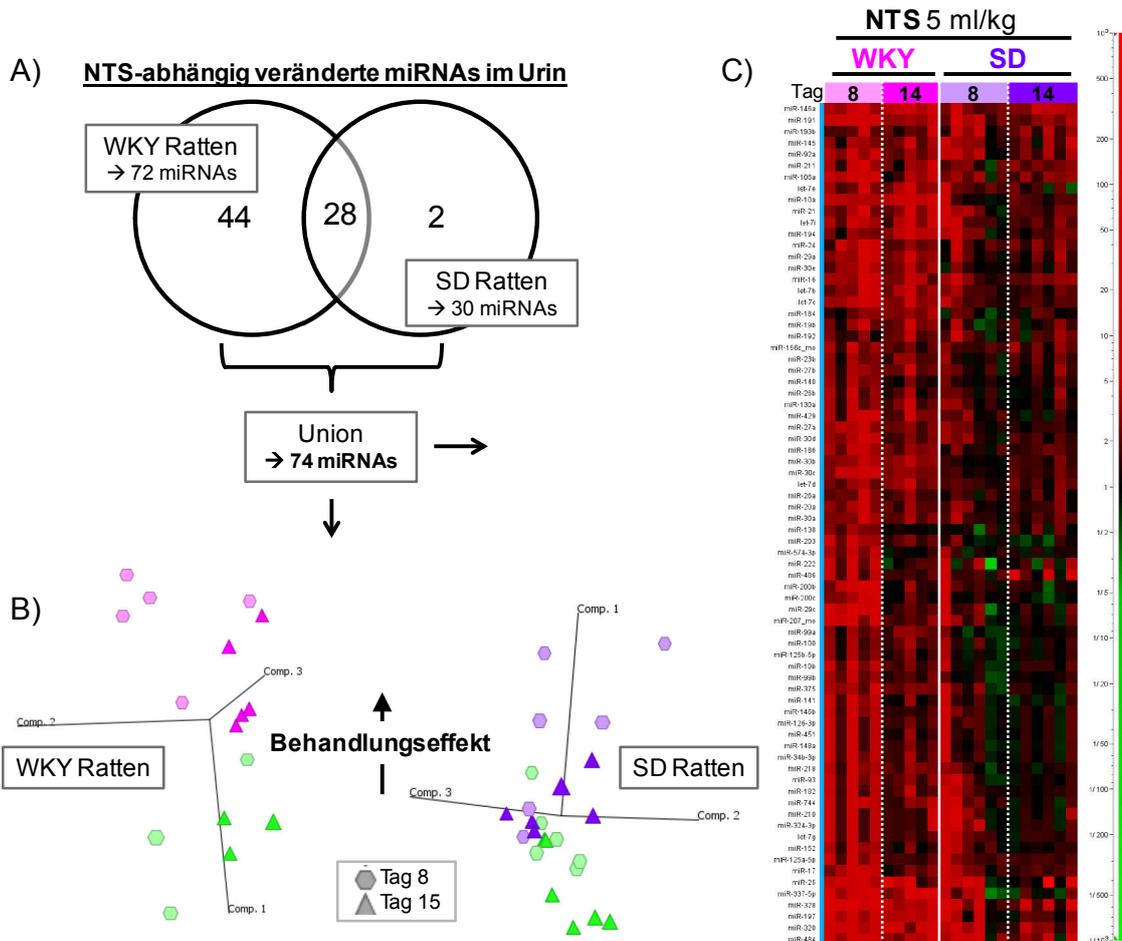


Abbildung 26 Signifikant veränderte miRNAs im Urin nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). A) Mittels Venn Diagramm wurden die finalen miRNA Gruppen der zwei Rattenstämme verglichen. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sparague Dawley B) Eine Principal Component Analyse wurde mit den TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden, und Union der der finalen Gruppe von 74 miRNAs als Variablen durchgeführt. Der Pfeil zeigt die behandlungsabhängige Veränderung der miRNA Level im Urin. Grüne Formen stellen Kontroll- und farbige Formen die NTS behandelten Datensätze dar. Die unterschiedlichen Formen entsprechen den Zeitpunkten. C) Das Hierarchical Clustering wurde als Heatmap dargestellt, in der für jede der 74 miRNAs (waagrecht) das jeweilige Verhältnis zur entsprechenden Kontrollgruppe pro Zeitpunkt (senkrecht) zu sehen ist. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden.

Eine Gruppe miRNAs wurde anhand ihres Profils, vorhandener Literaturdaten bezüglich Nierenexpression und ihrer Präsenz bzw. nicht Präsenz im Urin nach Cp sowie NTS Verabreichung, für weitere Messungen ausgesucht. Das Urinprofil dieser Selektion sollte mittels der Quantifizierung mit Standardkurve verifiziert werden (Tab. 31).

Fünf der 12 NTS-selektierten miRNAs, miR-10a, -10b, -100, -211 und -486, waren nicht Teil der 136 signifikant veränderten miRNAs im Urin nach Cp Verabreichung. Für vier weitere miRNAs dieser 12er Selektion, miR-21, -34a, -184 und -192, war der Cp-abhängige Anstieg im Urin mit paralleler Standardkurvenmessung verifiziert worden.

Tabelle 31 Selektion von 12 miRNAs mit verändertem Urinprofil nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum. Assoz.: assoziiert.

miRNA	Literaturinformationen bzgl. Nierenexpression
miR-10a	U.a. exprimiert in der Niere
miR-10b	U.a. exprimiert in der Niere; assoz. mit Nierenzellkarzinomen
miR-21	s. Tab. 3.6 :selektierten miRNAs im Urin nach Cisplatin Verabreichung
miR-26a	Exprimiert in Nierenglomeruli
miR-34a	s. Tab. 3.6 :selektierten miRNAs im Urin nach Cisplatin Verabreichung
miR-34b	Assoz. mit Nierenzellkarzinomen
miR-100	Assoz. mit Nierenzellkarzinomen
miR-184	s. Tab. 3.6 :selektierten miRNAs im Urin nach Cisplatin Verabreichung
miR-192	s. Tab. 3.6 :selektierten miRNAs im Urin nach Cisplatin Verabreichung
miR-197	/
miR-211	assoz. mit Nierentransplantat Dysfunktion
miR-486	assoz. mit Chronischem Nierenversagen

Der Anstieg im Urin von WKY Ratten nach Verabreichung von 5 ml/kg NTS konnte für 8 der 12 NTS-selektierten miRNAs mittels TaqMan Assays und Standardkurven Quantifizierung verifiziert werden (Abb. 23). Für die restlichen vier miRNAs, miR-10b, -26a, -100 und -486, konnten mit TaqMan Assays keine klaren Standardkurven gemessen werden, daher wurden diese miRNAs mit einem SyberGreen basierten PCR Assays von Exiqon gemessen (Beschreibung der unterschiedliche PCR Systeme siehe Abschnitt 2.2.5 und Abb. 9). Der mit TaqMan Card gemessene Anstieg von miR-10b, -100 und -486 8 Tage nach NTS Verabreichung konnte auf diese Weise verifiziert werden, nicht aber derjenige nach 14 Tagen. Behandlungsbedingt leicht erhöhte Level von miR-26a wurden mit dem qRT-PCR System von Exiqon 14 Tage nach, jedoch nicht 8 Tagen nach der NTS Verabreichung detektiert (Abb. 3.16).

Der geringere und variabelere Anstieg im Urin von SD Ratten nach Verabreichung von 5 ml/kg NTS konnte für 8 von 12 miRNAs mittels TaqMan Assays und Standardkurven Quantifizierung verifiziert werden (Abb. 27).

Zur Untersuchung der Sensitivität möglicher miRNA BM im Urin, wurde die Menge der NTS-abhängig angestiegenen 12 miRNAs auch im Urin von WKY und SD Ratten gemessen, die niedrigere NTS Dosen erhalten hatten. Einige miRNAs, wie miR-10b, -34a/b, -100, -184 und -192, waren im Urin von WKY Ratten 8 und 14 Tage nach Verabreichung von 1 oder 2,5 ml/kg NTS erhöht, jedoch häufig mit großer Variabilität in der Replikatgruppe (Tab. 32).

3 Ergebnisse

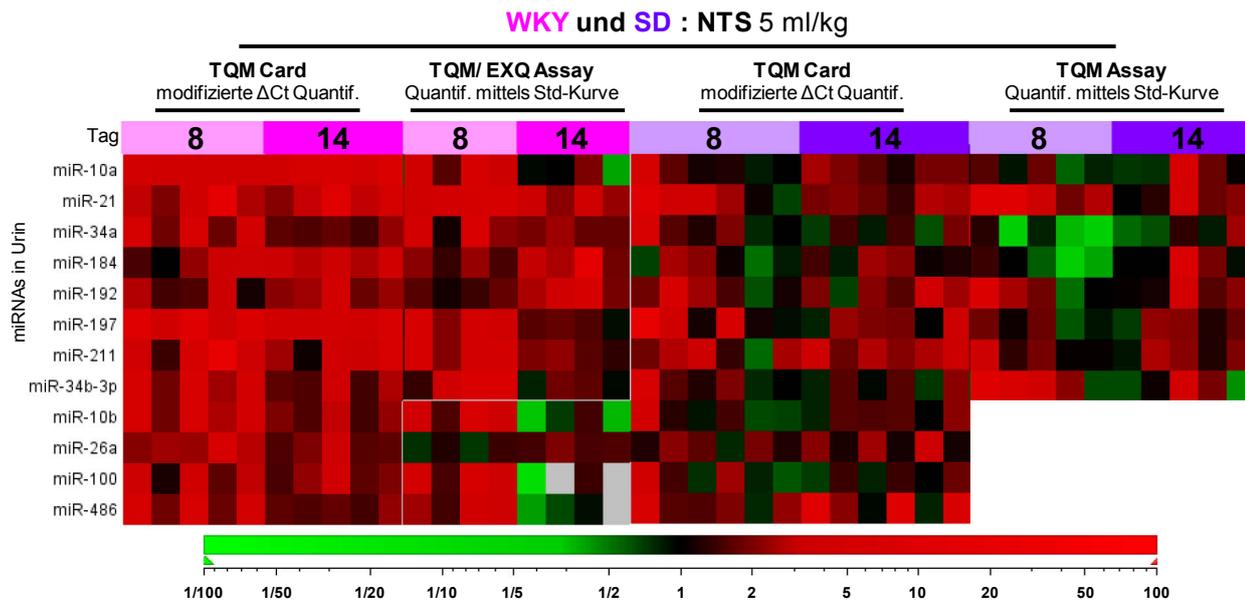


Abbildung 27 Urinprofil der 12 selektierten miRNAs über die Zeit nach der Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). Als Heatmap vergleichend dargestellt sind unterschiedlichen relative Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) nach TaqMan Card vs. TaqMan/Exiqon Assay Messung und der angegebenen Quantifizierungsmethode. TQM: TaqMan PCR, EXQ: SyberGreen basierte Exiqon PCR, WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

Acht Tage nach der Verabreichung von 1 ml/kg NTS war miR-21 im Urin 2-fach erhöht und nach der Verabreichung von 2,5 ml/kg NTS signifikant 4,6-fach erhöht. Nach 14 Tagen war der Anstieg jeweils kleiner. Von den fünf miRNAs, die nur nach NTS und nicht nach Cp Verabreichung erhöht waren, waren vier, miR-10b, -100, -211 und -486, schon 14 Tage nach Verabreichung der niedrigsten und mittleren NTS Dosis erhöht (Tab. 32). Im Urin von SD Ratten, denen als eine niedrigere Dosis von 1,5 ml/kg NTS verabreicht wurden, wurde eine leichte Abnahme der gemessenen acht miRNA Mengen beobachtet. Für miR-184 und -192 war diese signifikant (Tab. 33).

Tabelle 32 Urinprofile der 12 selektierten miRNAs von Wistar Kyoto (WKY) Ratten nach Verabreichung unterschiedlicher nephrotoxischer Serum (NTS) Dosen. Relative Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) berechnet aus den mit Standardkurve quantifizierten PCR Daten, indem pro miRNA für jede Probe eines NTS behandelten Tieres der Quotient zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe gebildet wurde. Hier dargestellt ist der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung (n=4) pro Dosis- und Zeitgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die zugehörige Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

WKY	NTS: 1 ml/kg		NTS: 2,5 ml/kg		NTS: 5 ml/kg	
	Tag 8	Tag 14	Tag 8	Tag 14	Tag 8	Tag 14
miR-10a	0,6 \pm 0,1*	0,3 \pm 0,1	1,4 \pm 0,6*	1,1 \pm 0,7	3,5 \pm 2,4*	1,1 \pm 0,7
miR-21	2,2 \pm 1,5	1,1 \pm 0,7	4,6 \pm 4,7*	1,2 \pm 0,5	4,2 \pm 1,1*	2,8 \pm 0,6**
miR-34a	4,5 \pm 3,3	5,4 \pm 3,9	1,1 \pm 1,1	2,0 \pm 2,8	4,0 \pm 2,6	2,0 \pm 0,3
miR-184	1,9 \pm 1,6	5,8 \pm 5,1	1,0 \pm 1,0	2,8 \pm 2,7	2,7 \pm 1,5	6,0 \pm 7,0
miR-192	1,6 \pm 1,4	2,3 \pm 2,0	1,9 \pm 1,7	1,8 \pm 0,5	1,7 \pm 0,6	3,9 \pm 2,1*
miR-197	1,3 \pm 0,2	1,9 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2*	3,0 \pm 4,5	4,9 \pm 2,0**	1,5 \pm 0,4
miR-211	1,4 \pm 0,3	1,6 \pm 0,4	1,0 \pm 0,4*	2,6 \pm 3,0	4,8 \pm 1,8**	1,8 \pm 0,4*
miR-34b	5,3 \pm 7,3	2,5 \pm 3,4	2,8 \pm 3,6	0,5 \pm 0,2	4,2 \pm 2,6	1,3 \pm 0,5
miR-10b	1,0 \pm 0,3	63,9 \pm 16,8*	0,0 \pm 0,0	66,1 \pm 129,4	63,4 \pm 118,4*	0,7 \pm 0,5
miR-26a	1,5 \pm 0,5	1,3 \pm 0,4	1,9 \pm 0,7	1,2 \pm 0,7	1,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,2**
miR-100	0,9 \pm 0,3	37,6 \pm 12,9	0,0 \pm 0,0	102,5 \pm 143,0	38,5 \pm 68,7*	0,8 \pm 0,9
miR-486	0,8 \pm 0,2	12,4 \pm 3,2	0,0 \pm 0,0	9,7 \pm 18,2	15,4 \pm 25,3*	0,7 \pm 0,2

Tabelle 33 Urinprofil selektierter miRNAs von Sprague Dawley (SD) Ratten nach Verabreichung unterschiedlicher nephrotoxischer Serum (NTS) Dosen. Relative Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) berechnet aus den mit Standardkurve quantifizierten PCR Daten, indem pro miRNA für jede Probe eines NTS behandelten Tieres der Quotient zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe gebildet wird. Hier dargestellt ist der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung (n=5) pro Dosis- und Zeitgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die zugehörige Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

SD	NTS: 1,5 ml/kg		NTS: 5 ml/kg	
	Tag 8	Tag 14	Tag 8	Tag 14
miR-10a	0,78 \pm 0,73	0,89 \pm 0,28	1,15 \pm 0,55	2,02 \pm 2,12
miR-21	0,78 \pm 0,25	1,02 \pm 0,41	5,81 \pm 4,40**	2,26 \pm 1,64
miR-34a	0,58 \pm 0,37	1,37 \pm 0,81	0,59 \pm 0,46	1,16 \pm 0,79
miR-184	0,21 \pm 0,13**	0,60 \pm 0,32	0,73 \pm 0,48	2,52 \pm 2,96
miR-192	0,31 \pm 0,18**	0,84 \pm 0,59	2,80 \pm 3,04	2,12 \pm 1,46
miR-197	0,73 \pm 0,05	1,55 \pm 1,63	1,25 \pm 0,57	1,60 \pm 0,64
miR-211	0,88 \pm 0,09	1,94 \pm 2,86	1,76 \pm 1,01	1,80 \pm 0,73*
miR-34b	0,43 \pm 0,52	0,94 \pm 0,61	4,75 \pm 3,69	1,78 \pm 1,76

Insgesamt konnten wie nach Cp-induzierter auch nach NTS-induzierter Nierenschädigung erhöhte Mengen bestimmter miRNAs im Urin gemessen werden. Der Anstieg war am Tag 8, dem frühesten gemessenen Zeitpunkt, detektierbar und für einige miRNAs auch nach niedrigeren NTS-Dosen. Die NTS-abhängige Zunahme von miRNAs im Urin war in WKY Ratten größer und hatte eine kleinere Varianz in den Replikatgruppe im Vergleich zu den SD Ratten.

3.3.3 Vergleich der microRNA Profile im Urin nach Verabreichung von Cisplatin oder nephrotoxischem Serum

Die zwei Gruppen der signifikant veränderten miRNAs im Urin nach Cp bzw. NTS Verabreichung wurden, auch im Hinblick auf die Identifikation lokalisationspezifischer BM, bezüglich ihrer Spezifität für die jeweilige Nierenschädigung verglichen.

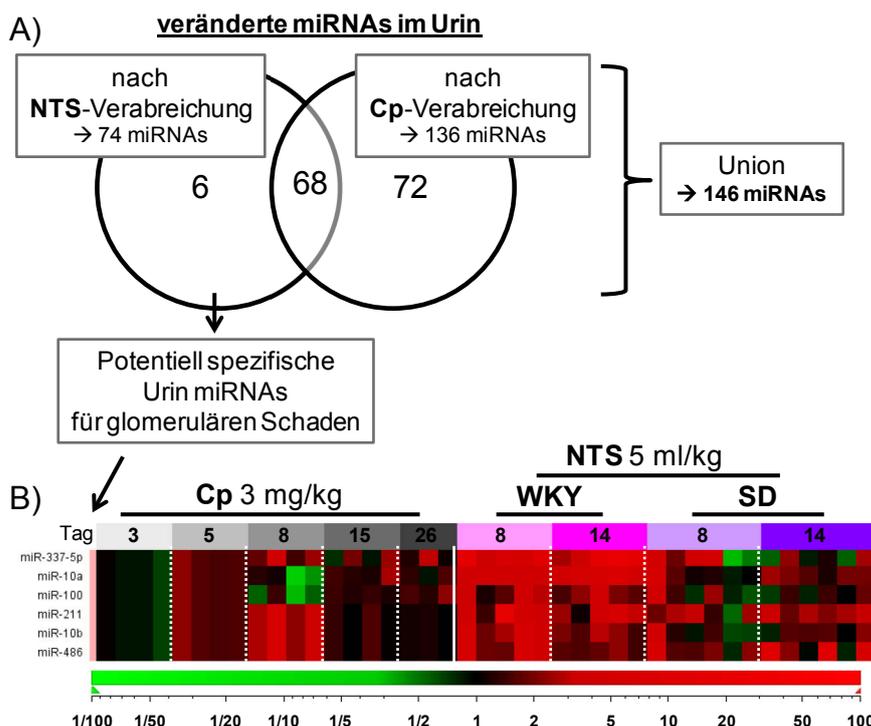


Abbildung 28 Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Urin nach Verabreichung von Cisplatin (Cp) oder nephrotoxischem Serum (NTS). A) Mittels Venn Diagramm wurden die finalen miRNA Gruppen der Nephro-toxizitätsstudien verglichen B) Heatmap spezifischer miRNAs im Urin nach NTS Verabreichung, d.h. potentieller Biomarker für glomeruläre Nierenschädigung. Die relativen Mengen (Verhältnis: Behandlung vs. Kontroll pro Zeitpunkt) basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten Δ Ct Methode prozessiert wurden. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

3 Ergebnisse

Von den 74 nach NTS und den 136 nach Cp veränderten miRNAs waren 68 identisch (Abb. 28A). 72 potentiell Cp spezifische miRNAs wiesen im Urin von NTS behandelten Ratten ein z.T. vergleichbares Profil auf, jedoch mit geringen Unterschieden der miRNAs Mengen zwischen Proben behandelter und Kontrollratten; sowie in manchen Fällen variablen oder sogar inkonsistenten Profilen. Sechs potentiell NTS spezifische miRNAs waren vor allem im Urin der WKY Ratten an beiden Zeitpunkten erhöht und für fünf wurde der Anstieg mittels Standardkurven Quantifizierung verifiziert. Alle sechs miRNAs waren im Urin nach Cp Verabreichung nicht erhöht und drei, miR-10b, -211 und -486, wurden bei der Cp Analyse als nicht-detektierbar bewertet (Abb. 28B).

Insgesamt war die Mehrheit der identifizierten miRNAs, die nach Nierentoxinverabreichung im Urin anstiegen, nicht spezifisch für eine der unterschiedlichen Nierenschädigungen. Jedoch wurde eine Gruppe von sechs miRNAs gefunden, die potentiell spezifisch im Urin nach NTS-induzierter glomerulärer Nierenschädigung ansteigen.

3.3.4 microRNA Profil im Urin nach Verabreichung von Methapyrilen

Nach Behandlung mit den Nierentoxinen Cp und NTS konnten miRNAs identifiziert werden, die nach der Nierenschädigung im Urin anstiegen und somit potentielle BM darstellen. Einige miRNAs im Urin sind bereits als potentielle BM für Hepatotoxizität beschrieben. Um für die identifizierten miRNAs die Spezifität für Nephrotoxizität im Vergleich zu z.B. Hepatotoxizität zu prüfen, wurden einige miRNAs auch im Urin von Ratten gemessen, denen das Lebertoxin MPy verabreicht wurde. Diese zeigten nach viertägiger täglicher MPy Verabreichung Leber- aber keine Nierenschädigungen (Vergl. Abschnitt 3.1.3).

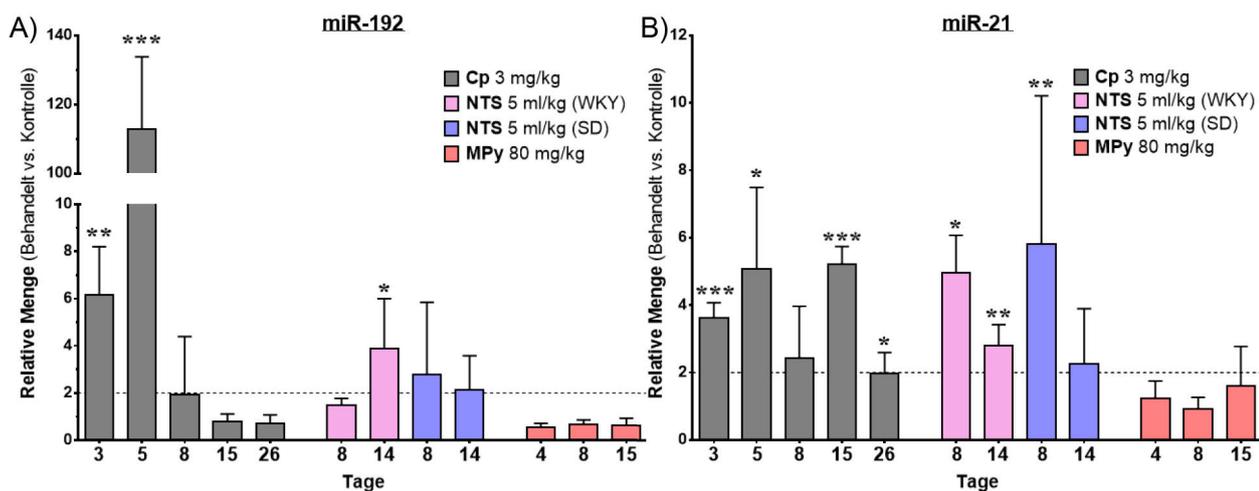


Abbildung 29 Spezifische miRNAs im Urin nach Verabreichung von der Nierentoxine Cisplatin (Cp) und nephrotoxisches Serum (NTS) oder des Lebertoxins Methapyrilen (MPy). A) Relative Menge an miR-192 im Urin B) Relative Menge an miR-21 im Urin. Die relativen Mengen der miRNAs (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) wurden aus TaqMan Assay Daten mittels Standardkurven Quantifizierung und Urin Creatinin Normalisierung berechnet, indem pro miRNA für jede Probe eines behandelten Tieres der Quotient zum Mittelwert der entsprechenden Kontrollgruppe gebildet wurde. Hier dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung (Cp: n=4, NTS: n=4-5, MPy: n=5) pro Dosis- und Zeitgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die jeweilige Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sparague Dawley.

Die gemessenen sieben miRNAs, miR-21, -31, -34a, -192, -200a, -210 und let-7c, gehören zu den finalen Gruppen der veränderten Urin miRNAs nach Verabreichung von Cp und/oder NTS. Während sie dementsprechend im Urin der Ratten mit Nierenschädigung anstiegen, konnte nach MPy-induzierter Leberschädigung kein Anstieg detektiert werden. In Abb. 29 sind zwei miRNA, miR-192 und -21, exemplarisch dargestellt. Beide zeigten einen über 2-fachen Anstieg im Urin der Nephrotoxizitäts-Studien, jedoch keinen Unterschied zu Kontrollratten in der Hepatotoxizitäts-Studie.

3.3.5 microRNA Profil in einem *in vitro* Modell

Die Untersuchung von Urinprofilen, welche aus zwei unterschiedlichen *in vivo* Nierentoxizitäts-Modellen gewonnen wurden, identifizierte miRNAs im Urin als mögliche spezifische BM für Nierentoxizität. Zur Prüfung, ob auch *in vitro* nach Zellschädigung erhöhte Mengen von miRNAs im Überstand detektiert werden können, wurden kultivierte Nierenzellen mit Cp behandelt. Anschließend wurden miRNA Levels in und außerhalb der Zellen gemessen. Als Zellmodell wurden NRK-52e Zellen verwendet, die aus der Rattenniere stammen und von den Epithelzellen der proximalen Tubuli abgeleitet werden.

Zunächst wurde die Viabilität der Zellen nach 24 stündiger Cp Behandlung mittels der Endpunkte ATP-Level und metabolische Aktivität (MTT-Zytotoxizitätsassay) bestimmt. Beide Tests zeigten, dass die niedrigste Dosis von 10 μM Cp zu einer leichten Abnahme der Viabilität führte, während die Behandlung mit 30 μM Cp zu einer Viabilitätsabnahme von 20-30% führte (Abb. 30). Der interpolierte EC_{50} -Wert, also die Konzentration, bei der ein gemessener Endpunkt nur noch 50% des Kontrolllevel zeigt, lag bei 54-74 μM Cp. Bei der Behandlung mit höheren Konzentrationen lag die Viabilität deutlich unter 50%, meist sogar unter 20%.

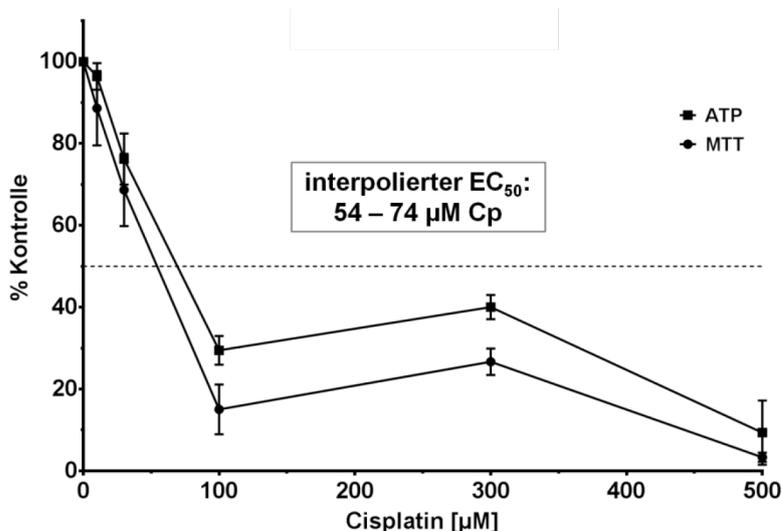


Abbildung 30 Viabilitätskurven für Cisplatin (Cp) behandelte NRK-52e Zellen. Es wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen pro 96-Well ausgesät und 24h später mit Cp behandelt (10, 30, 100, 300 und 500 μM). Nach weiteren 24 h wurden ATP Menge und metabolische Aktivität (MTT-test) als Viabilitätsendpunkte bestimmt. Die prozentuale Viabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ist als Mittelwert mit Standardabweichung ($n=3$) pro Konzentration dargestellt. Der EC_{50} -Wert wurde durch Interpolation der Kurven bestimmt.

Entsprechend dieser Messungen wurden für die Untersuchung der miRNAs die Konzentrationen 10, 30, 50 und 100 μM Cp ausgewählt. Ebenfalls nach 24 stündiger Behandlung mit Cp wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen sowie aus dem entsprechenden Kultivierungsmedium

3 Ergebnisse

isoliert und bestimmte miRNAs wurden mittels qRT-PCR gemessen. Die selektierten miRNAs waren alle im Urin von Ratten erhöht, denen Cp verabreicht wurde, und teilweise auch im Urin von Ratten, denen NTS verabreicht wurde: miR-15, -34a, -184, -200b, -20a, -21, -29b, -192, -210.

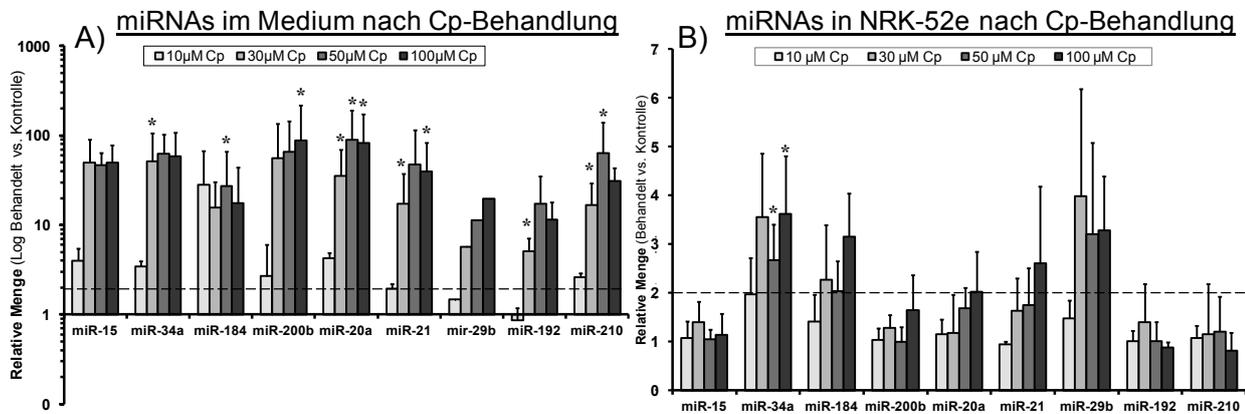


Abbildung 31 Einfluss der Cisplatin (Cp) Behandlung auf das miRNA Profil *in vitro*. A) miRNA Profil in Kultivierungsmedium von NRK-52e Zellen nach 24 stündiger Cp Behandlung. B) miRNA Profil in NRK-52e Zellen nach 24 stündiger Cp Behandlung. Die relativen Mengen der miRNAs (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) wurden aus TaqMan Assay Daten mittels Standardkurven Quantifizierung berechnet, indem pro miRNA für jede behandelte Probe der Quotient zum Mittelwert der Kontrollgruppe gebildet wurde. Hier dargestellt ist der arithmetische Mittelwert mit Standardabweichung (n=3; außer miR-29b im Medium n=2) pro Dosisgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Im Medium von Cp-behandelten NRK-52e Zellen wurde ein starker Anstieg aller gemessenen miRNAs, im Vergleich zum Medium unbehandelter Zellen, detektiert. In der niedrigsten Dosis waren die Mengen von miR-15, -34,a -184 und 20a erhöht, während die Behandlung von 30, 50 und 100 µM Cp zu einem großen und meist signifikanten Anstieg aller neun miRNAs führte (Abb. 31A). In den NRK-52e Zellen war die Expression der miR-34a nach Cp-Behandlung signifikant erhöht. Die Expression von miR-184, -20a, -21 und -29b war in den höheren Dosisgruppen nicht signifikant erhöht (Abb. 31B).

Der Anstieg der gemessenen miRNAs im Kultivierungsmedium von Cp-behandelten NRK-52e zeigte somit, dass miRNAs auch *in vitro* nach Zellschädigung im entsprechenden umgebenden „Medium“ erhöht sind. Die erhöhte Expression bestimmter miRNAs durch Cp-Behandlung *in vitro* zeigte außerdem Ähnlichkeiten zu mechanistischen Aspekten, die auch *in vivo* beobachtet wurden (s. Abschnitt 3.6)

3.4 Messung von microRNAs im Plasma

MiRNAs sind, wie bereits beschrieben, sehr stabil in diversen Körperflüssigkeiten und neben Urin stellen Serum und Plasma gängige BM Quellen dar. Ob miRNAs im Plasma ein Potential haben, als BM für Substanz-induzierte Nierenschädigung in Ratten eingesetzt zu werden, soll im Folgenden untersucht werden. Da erhöhte Mengen bestimmter miRNAs im Plasma nach Leberschädigung z.T. schon beschrieben wurden, wurden miRNAs im Plasma auch in einem Hepatotoxizitätsmodell evaluiert.

3.4.1 microRNA Profil im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum

Wie oben beschrieben, konnten nach NTS-induzierter glomerulärer Nierenschädigung im Urin ein Anstieg potentieller miRNA Biomarker gemessen werden. Da der glomeruläre Filtrationsapparat direkten Kontakt mit Blut hat, sollte untersucht werden, ob sich ein glomerulärer Schaden auch auf die miRNA Profile im Plasma auswirkt. Parallel dazu sollten auch hier die Reaktion der zwei verwendeten Rattenstämme verglichen werden. Aus dem Plasma von Kontrollratten und Ratten, denen NTS verabreicht wurde, wurde die Gesamt-RNA isoliert und die darin enthaltenen miRNAs wurden mittels qRT-PCR auf TaqMan Cards gemessen.

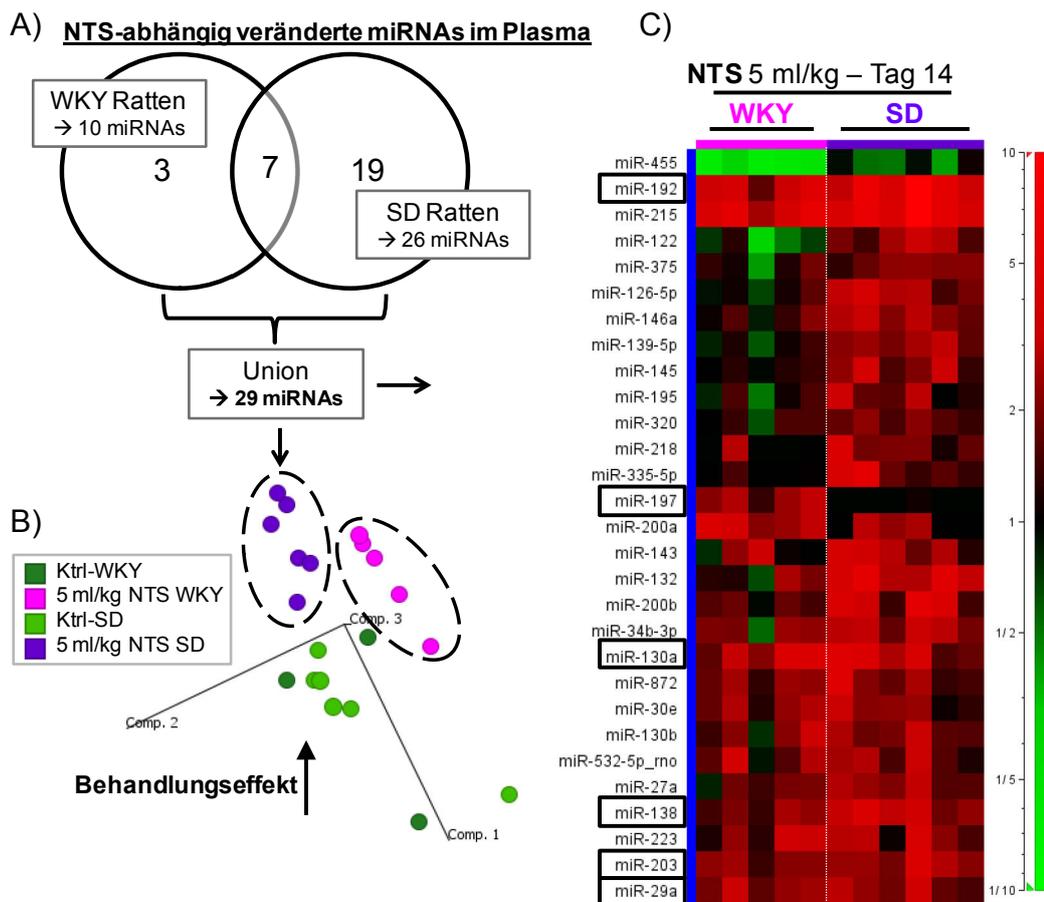


Abbildung 32 Signifikant veränderte miRNAs im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). A) Mittels Venn Diagramm wurden die finalen miRNA Gruppen der zwei Rattenstämme verglichen. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley B) Eine Principal Component Analyse wurde mit den TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔC_t Methode für Plasma prozessiert wurden, und der Union der finalen Gruppen von 29 miRNAs als Variablen durchgeführt. Der Pfeil zeigt die behandlungsabhängige Veränderung der miRNA Level im Plasma an. Grüne Formen stellen Kontroll- und farbige Formen die NTS behandelten Datensätze dar. C) Das Hierarchical Clustering wurde als Heatmap dargestellt, in der für jede der 29 miRNAs (waagrecht) die jeweilige relative Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) pro Zeitpunkt (senkrecht) zu sehen ist. Die relativen Mengen basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔC_t Methode prozessiert wurden. Schwarz eingerahmte miRNAs sind auch im Urin erhöht.

Eine Verabreichung von 5 ml/kg NTS führte in WKY Ratten zu 10 und in SD Ratten zu 26 signifikant veränderten miRNAs im Plasma (Abb. 32A). Für die Selektion signifikant und klar veränderter miRNAs wurde für ANOVA ein q-Wert $<0,05$ und für den t-Test ein p-Wert $<0,05$ festgelegt. Ein weiteres Kriterium war eine mindestens zweifache Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Die PCA der Vereinigungsmenge von 29 miRNAs zeigte eine

3 Ergebnisse

ähnliche Richtung des Behandlungseffektes in beiden Rattenstämmen und ein Gruppieren der NTS Proben je nach Rattenstamm (Abb. 32B). In der Heatmap Darstellung wird sichtbar, dass über die Hälfte der 29 miRNAs im Plasma von WKY Ratten 14 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS anstieg. Im Plasma von SD Ratten wiesen 27 von 29 miRNAs nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS erhöhte Level auf (Abb. 32C und Anhang-Tab. 6). Die Menge einer miRNA, miR-455, nahm nach NTS Verabreichung im Plasma ab. Zehn miRNAs, wie z.B. miR-122, -146a und -195, zeigten qualitativ gegensätzliche Profile: sie waren nach NTS-Behandlung in WKY Plasma kaum verändert, aber erhöht im Plasma von SD Ratten. Zu den 29 NTS-abhängig veränderten miRNAs im Plasma gehörten auch 6 miRNAs, miR-192, -197, -130a, -138, -203 und -29a (markiert in Abb. 32C), die im Urin derselben Ratten ebenfalls erhöht waren.

3.4.2 microRNA Profil im Plasma nach Verabreichung von Methapyrilen

MPy ist in Ratten lebertoxisch. Durch die Untersuchung von Plasma miRNAs sollten bereits in der Literatur beschriebene miRNA BM im Plasma re-evaluiert und potentiell neue identifiziert werden. Aus dem Plasma von Kontrollratten und Ratten, denen täglich MPy verabreicht wurde, wurde die Gesamt-RNA isoliert und die darin enthaltenen miRNAs mittels qRT-PCR auf Taq-Man Cards gemessen.

Eine tägliche Verabreichung von 80 mg/kg MPy führte in Ratten zu 97 signifikant veränderten miRNA Leveln im Plasma. Für die Selektion signifikant und klar veränderter miRNAs wurde für ANOVA ein q-Wert $<0,05$ und für den t-Test ein p-Wert $<0,05$ festgelegt. Ein weiteres Kriterium war eine mindestens zwei-fache Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Die PCA dieser miRNAs, zeigte einen klaren Behandlungseffekt, insbesondere setzten sich die MPy Proben von Tag 4 als Gruppe von den restlichen Datensätzen ab (Abb. 33A). In der Heatmap wurde entsprechend sichtbar, dass fast alle 97 miRNAs im Plasma nach viertägiger MPy Verabreichung anstiegen (Abb. 33B und Anhang-Tab. 7). Zu diesen gehörte auch die leberspezifische miR-122. Nach 8- und 15-tägiger MPy Verabreichung sanken die meisten miRNAs wieder auf Kontrolllevel ab. Zehn Tage nach Ende der 15-tägigen Verabreichung (Tag 24) von 80 mg/kg MPy war für einige miRNAs kein Unterschied mehr zum Plasma von Kontrolltieren zu detektieren, während für die Mehrheit zumindest eine relative Abnahme im Vergleich zu Tag 4 sichtbar war.

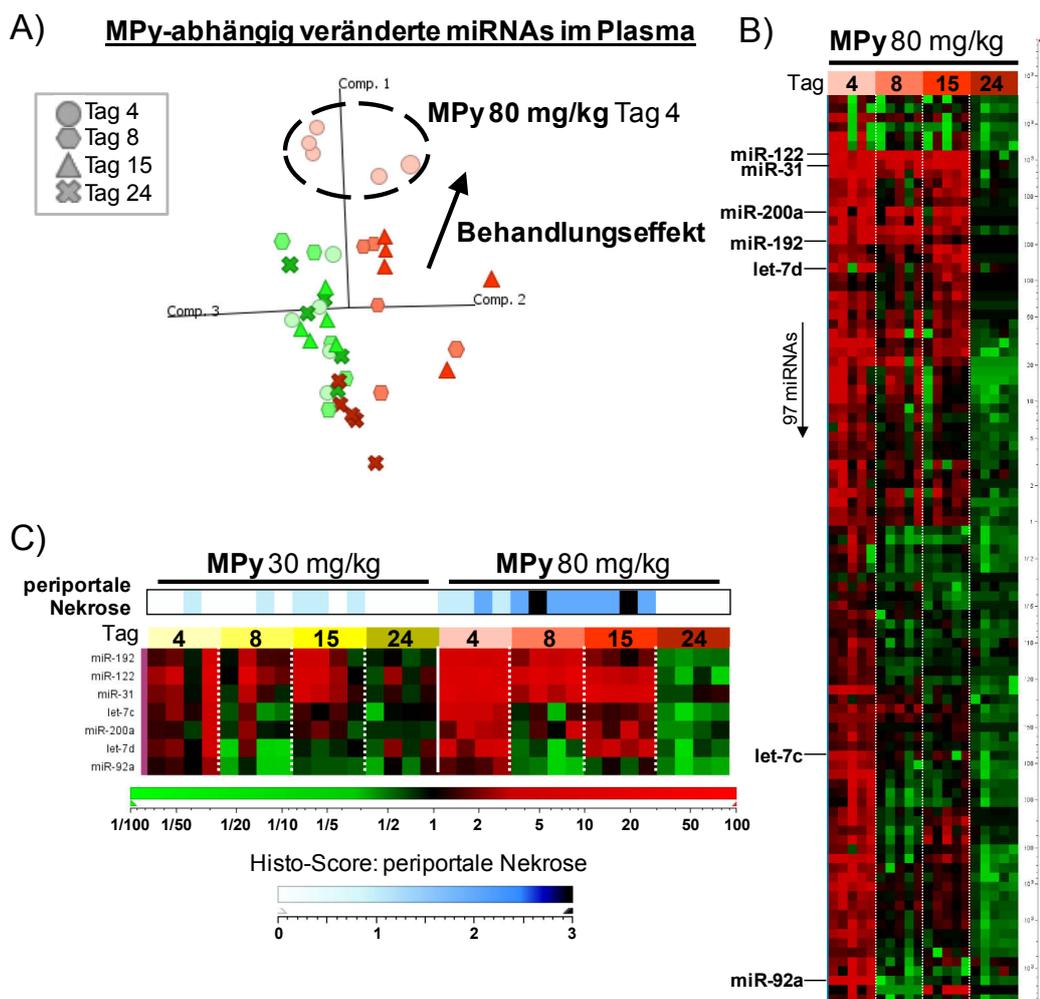


Abbildung 33 Signifikant veränderte miRNAs im Plasma nach Verabreichung von Methapyrilen (MPy). A) Eine Principal Component Analyse wurde mit den TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten Δ Ct Methode für Plasma, und der Union der finalen Gruppen von 97 miRNAs als Variablen durchgeführt. Der Pfeil zeigt die behandlungsabhängige Veränderung der miRNA Level im Plasma an. Grüne Formen stellen Kontroll- und farbige Formen die MPy behandelten Datensätze dar. B) Das Hierarchical Clustering wurde als Heatmap dargestellt, in der für jede der 97 miRNAs (waagerecht) die jeweilige relative Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) pro Zeitpunkt (senkrecht) zu sehen ist. Die relativen Mengen basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten Δ Ct Methode prozessiert wurden. C) Heatmap der selektierten miRNAs über die Zeit, gemessen im Plasma von Ratten nach der Verabreichung von 30 oder 80 mg/kg MPy. Die relativen Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle), basieren auf mittels Standardkurven quantifizierten TaqMan Assay Daten. Die histopathologische Klassifizierung des Grades der periportalen Nekrose in der Leber (Histo-Score) ist unter der Heatmap in blau dargestellt, dabei steht 0 für keinen Befund und 5 für eine massive Nekrose.

Sieben miRNAs wurden, basierend auf ihrem Plasmaprofil und bekannter Expression in der Leber, zur Verifizierung mittels Standardkurven Quantifizierung und zur Messung im Plasma nach Behandlung mit der niedrigeren Dosis von 30 mg/kg MPy selektiert. Diese sieben waren: miR-192, -122, -31, -200a, -92a, let7c und d. Eine Expression in der Leber ist z.B für miR-192, -122, und -200a beschrieben. Das mit TaqMan Crad gemessene Profil im Plasma nach MPy Verabreichung konnte für alle sieben miRNAs verifiziert werden (Abb. 33C). Der maximale Anstieg im Plasma war nach viertägiger Behandlung mit 80 mg/kg MPy zu sehen, während periportale Nekrose in der Leber nach 8 und 15 tägiger Behandlung maximal war. Die Verabreichung der niedrigeren MPy Dosis von 30 mg/kg hatte in der Leber vereinzelt zur

3 Ergebnisse

minimalen periportalen Nekrose geführt. Die Mengen der sieben miRNAs im Plasma stiegen nach der niedrigeren MPy Dosis vor allem am Tag 4 leicht an, auch in Proben von Ratten bei denen keine Nekrose diagnostiziert wurde.

3.4.3 Vergleich der microRNA Profile im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum oder Methapyridin

Wie oben beschrieben, konnten im Plasma signifikant veränderten miRNAs sowohl nach NTS als auch nach MPy Verabreichung identifiziert werden. Daher sollten diese zwei Gruppen von miRNAs, im Hinblick auf die Identifikation organspezifischer BM im Plasma, bezüglich ihrer Spezifität für die jeweilige Behandlung, d.h. für die jeweilige Organschädigung verglichen werden.

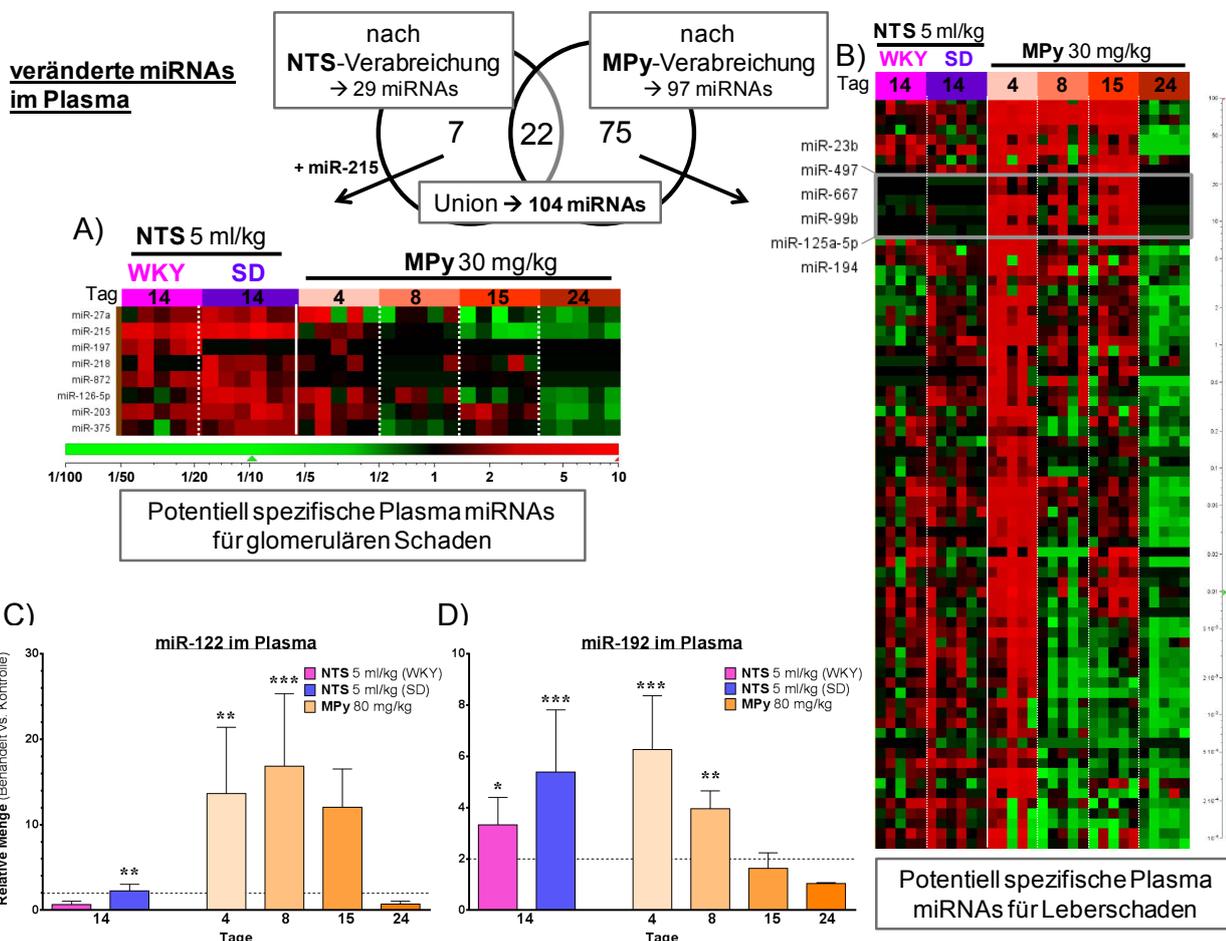


Abbildung 34 Vergleich signifikant veränderter miRNAs im Plasma nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS) oder Methapyridin (MPy). Mittels Venn Diagramm wurden die finalen miRNA Gruppen der Toxizitäts Studien verglichen A) Hierarchical Clustering potentiell spezifischer miRNAs in Plasma nach NTS Verabreichung, d.h. potentieller Biomarker für glomeruläre Nierenschädigung. B) Hierarchical Clustering potentiell spezifischer miRNA in Plasma nach MPy Verabreichung, d.h. potentieller Biomarker für Leberschädigung. Direkter Vergleich der Menge von C) miR-122 und D) miR-192 im Plasma nach Verabreichung von NTS oder MPy. Dargestellt ist der arithmetische Mittelwert der relativen Menge (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) mit Standardabweichung (NTS: n=4-5, MPy: n=5) pro Dosis- und Zeitgruppe. Die statistische Signifikanz wurde mittels t-Test bezogen auf die zugehörige Kontrollgruppe ermittelt: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. Alle dargestellten relativen Mengen (Verhältnis Behandlung vs. Kontrolle) stammen von TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten $\Delta\Delta C_t$ Methode prozessiert wurden. WKY: Wistar Kyoto, SD: Sprague Dawley.

Von den 29 nach NTS und den 97 nach MPy veränderten miRNAs waren 22 identisch (Abb. 34). Mit Hilfe eines Venn Diagramms und einer Profilanalyse wurden insgesamt acht potentiell NTS-spezifische miRNAs identifiziert. Diese waren im Plasma der NTS-behandelten WKY und SD Ratten erhöht, wohingegen nach MPy-Behandlung kein eindeutiger Anstieg detektierbar war (Abb. 34A). Die Mehrheit der nach Venn Diagramm selektierten 75 potentiell MPy-spezifischen miRNAs im Plasma zeigte ein qualitativ ähnliches Profil auch im Plasma von NTS behandelten Ratten, obgleich dieses weniger stark und sehr inkonsistent war. Für sechs miRNAs war ein Anstieg nur im Plasma MPy behandelter Ratten zu sehen (Abb. 34B, Kasten). Die leberspezifische miR-122 war im Plasma nach mehrtägiger MPy Verabreichung signifikant erhöht. Nach NTS Verabreichung war miR-122 im Plasma von WKY nicht und im Plasma von SD Ratten nur leicht erhöht (Abb. 34C). Für die in beiden Organen exprimierte miR-192 wurde im Plasma ein signifikanter Anstieg nach Nieren- und Leberschädigung gemessen (Abb. 34D). Insgesamt wurde beobachtet, dass viele der miRNAs, die nach Nieren- oder Lebertoxinverabreichung im Plasma als erhöht identifiziert wurden, keine Unterscheidung zwischen Leber- und Nierenschädigung ermöglichten. Eine Gruppe von sieben bzw. sechs miRNAs schien jedoch potentiell spezifisch nach NTS-induzierter Nierenschädigung bzw. MPy-induzierter Leberschädigung im Plasma anzusteigen.

3.5 Genexpression im Gewebe nach Substanz-induzierter Schädigung

Neben der Evaluation von miRNAs im Urin oder Plasma als BM für Substanz-induzierte Nieren- oder Leberschädigung, wurde die Genexpression in den jeweiligen Organen analysiert. Dieses wurde durchgeführt, um einerseits die verwendeten Toxizitätsmodelle auf Genexpressionsebene weitergehend bzw. neu in mechanistischer Hinsicht zu charakterisieren und um andererseits, nach anschließender miRNA Messung im Gewebe, Interaktionen von miRNAs und ihren Ziel-mRNA zu untersuchen. Letzteres wird im Abschnitt 3.6 beschrieben.

3.5.1 Genexpression in der Niere nach Cisplatin Verabreichung

Für die Genexpressionsanalyse wurde die Gesamt-RNA aus der Niere von Kontrollratten und von Ratten, je 3, 5, 8 und 26 Tage nach der Verabreichung von 1 oder 3 mg/kg Cp, isoliert und mittels Affymetrix GeneChips® Microarrays gemessen. Diese Arrays ermöglichen die Messung der relativen Menge verschiedener Gene, präziser ihrer Transkripte, z.B. in Proben von behandelten im Vergleich zu Kontrolltieren. Da nur die proteinkodierenden Gene analysiert wurden, werden im Folgenden zur Vereinfachung mRNAs mit veränderten Mengen als deregulierte Gene bezeichnet.

3 Ergebnisse

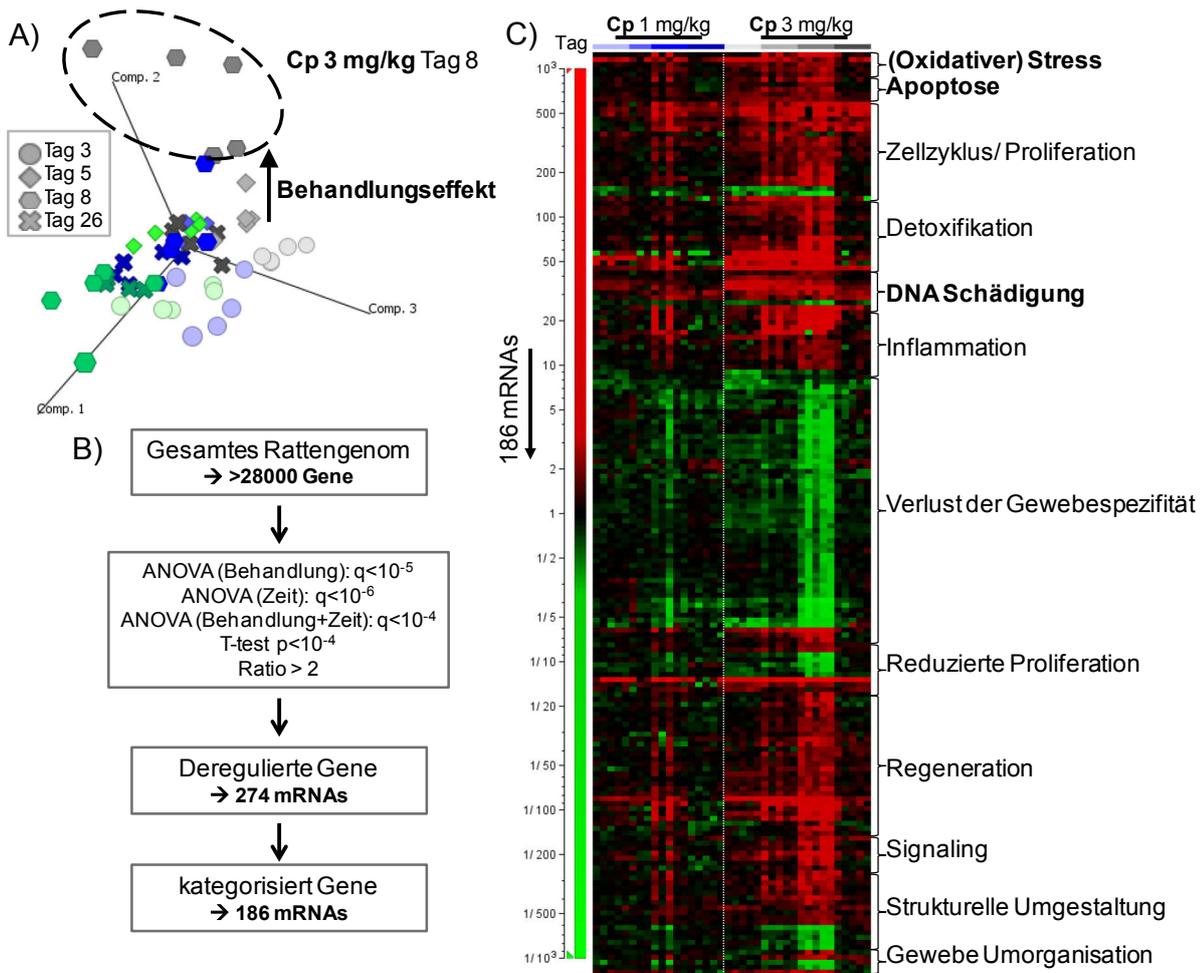


Abbildung 35 Genexpressionsanalyse in der Niere nach Cisplatin-induzierter Schädigung. A) Eine Principal Component Analyse wurde mit allen Proben und Intensitätswerten aller Gene als Variablen durchgeführt. Grüne, blaue und graue Formen stellen Proben von Kontroll-, 1 mg/kg und 3 mg/kg Cp behandelten Ratten dar. B) Schematischer Ablauf der Genexpressionsanalyse mit den gesetzten Signifikanzgrenzen und den daraus resultierenden Gengruppen. C) Heatmap der 186 signifikant deregulierten und kategorisierten Gene in der Niere nach Cp Verabreichung. Die Färbung gibt das Verhältnis nach Behandlung relativ zum Mittelwert der entsprechenden Zeitpunkt-Kontrollgruppe für jede mRNA (waagrecht) pro Probe behandelter Tiere (senkrecht) entsprechend der Farbskala an.

Die PCA aller gemessenen Gene zeigte einen Behandlungseffekt in den Genexpressionsprofilen, durch den sich vor allem das Profil der Nieren 8 Tag nach Verabreichung von 3 mg/kg Cp deutlich von dem der Kontrollnieren unterschied (Abb. 35A). Nach der statistischen Analyse wurden 274 signifikant deregulierte Gene identifiziert. Bezogen auf die Proteine, für die sie kodieren, wurden 186 bzgl. ihrer biochemischen/ zellbiologischen Funktion kategorisiert (Abb. 35B und Anhang-Tab. 8). Bei den restlichen Genen fehlten eindeutige Annotationsinformationen.

Für die mechanistische Analyse der deregulierten Gene, wurden diese zunächst zu Gruppen, sogenannten toxikologischen Kategorien, zusammengefasst. Die Kategorisierung der deregulierten Gene erfolgte nach der biochemischen Funktion der von den Genen kodierten Proteine und nach der Richtung der Expressions-Deregulation, d.h. Hoch- oder Herunterregulation. Fast alle Gene konnten den in Tab. 34 gelisteten Kategorien zugeordnet werden.

Tabelle 34 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse Cisplatin-induzierter Nephrotoxizität. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation.

Tox Kategorie	Beschreibung	Beispiele
Apoptose	Hochregulation pro-apoptotischer und Herunterregulation anti-apoptotischer Gene	Bcl3↑, Bbc3↑, Bex1↑
Zellzyklus/ Proliferation	Hochregulation von Genen kodierend für: Wachstumsfaktoren, Proteine mit anti-apoptotischer Funktion, <i>Insulin-like growth factors</i> (IGF)- Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Proteinkinase B (PKB) Signalweg Komponenten; Herunterregulation von pro-apoptotischen Genen und Tumorsuppressorgenen; Hochregulation von Genen für: Cycline, Cyclin-abhängige Kinasen, Proteine der DNA Replikation/ Reparatur/Transkription, Komponenten des mitotischen Spindelapparat/ Zytokinese und der Nukleosom Bildung	Myc↑, Egr2↑, Igfbp1↑
Detoxifikation	Hochregulation von Genen für Enzyme der Biotransformation und Transmembran-Transporter	Cyp1b1↑, Ephx1,↑ Gpx2↑
DNA Schädigung	Hochregulation von p53 Zielgenen und Genen die für DNA Reparaturenzyme kodieren	Mdm2↑, Ccng1↑, p21↑, Enc1↑
Inflammation	Hochregulation von Genen für inflammatorische Proteine und Proteine, die in die Antigenpräsentation involviert sind	Lcn2↑, Fga↑, Tnfrsf1a↑
Metabolismus & Lipidmetabolismus	Hochregulation von Genen kodierend für Komponenten des Zucker- und Energiemetabolismus, für Fettsäuren Oxidationsenzyme, Syntheseenzyme und Transporterproteine	Ehhadh↑, Ch25h↑
(Oxidativer) Stress	Hochregulation von <i>Antioxidant/electrophile response element</i> (ARE/EpRE) <i>binding protein</i> Zielgenen und Genen assoziiert mit oxidativem Stress, <i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i> (NFkB) Zielgene, Hitzeschockproteine (Chaperone, Antwort auf Proteinschädigung); und Genen assoziiert mit frühen Stressantworten	Sbno2↑, Clu↑, Egr1↑
Regeneration	Hochregulation von Genen involviert in die Aminosäuren Synthese, Translation (ribosomale Proteine), Protein Transport, Zelladhäsion	Fn1↑, Gda↑, Rps27↑, Kim-1↑
Strukturelle Umgestaltung	Hochregulation von Genen kodierend für Zytoskelett Komponenten	Tubb6↑, Myo1g↑, Krt18↑
Reduzierte Proliferation	Herunterregulation von Genen involviert in DNA Synthese, Replikation, Proliferation; Hochregulation von Genen involviert in Wachstumsinhibition, Proliferationsinhibitoren und Tumorsuppressorgenen	Egf↓, Fhit↓, Nrep↓
Signaling	Hochregulation von Genen die für Komponenten des G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR)-Signalwegs, Hormonsignaling und Ca ²⁺ -Signaling kodieren	Calb3↑, Trpv6↑, Rgs16↑
Gewebe Umorganisation	Herunterregulation von Genen kodierend für Zytoskelett Komponenten, sogenannten <i>tight junctions</i> und allgemein Degradation von diversen Molekülen	Capn6↑, Dkgk↑, Neb↑
Verlust der Gewebespezifität	Reduzierte Signaling-Kompetenz, Degradation; Herunterregulation von Genen kodierend für Detoxifikations-Enzyme, Signaling-Komponenten, Metabolismus und Transportproteine; Dedifferenzierung	Tgm2↓, Kcnj1↓, Mme↓

3 Ergebnisse

Da Cp ein DNA-alkylierende Substanz ist und reaktive Metaboliten entstehen, wurden in der Niere, wie erwartet, Gene hochreguliert, die zu den Kategorien Apoptose, (oxidativer) Stress und DNA Schädigung gehören (Abb. 35C). Die Hochregulation der Gene war insgesamt zeit- und dosisabhängig und maximal 8 Tage nach der Cp Verabreichung. Manche der Gene zeigten auch schon am Tag 3 eine erhöhte oder verringerte Expression. Ein vergleichbares Profil war auch für die Gene der Kategorien Zellzyklus/Proliferation, Detoxifikation sowie Inflammation zu sehen. Mit der Schädigung einhergehend wurde eine, ebenfalls dosisabhängige und am Tag 8 maximale, Herunterregulation von gewebespezifischen Genen gemessen sowie parallel eine Hochregulation von Regenerationsgenen. Zu Letzterem gehörte auch Kim-1, welches an allen Tagen in beiden Dosisgruppen hochreguliert war und sogar das am höchsten hochregulierte Gen darstellte (>200-fach Tag 8, 3 mg/kg Cp). 26 Tage nach der Cp Verabreichung war die Expression mehrheitlich wieder auf Kontrolllevel. Weitere Gene der jeweiligen Kategorien sind in Tab. 34 und in der Anhang-Tab. 8 aufgeführt.

3.5.2 Genexpression in der Niere nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum

Für die Genexpressionsanalyse wurde hier die Gesamt-RNA aus der Niere von Kontrollratten und von Ratten 14 Tage nach der Verabreichung von 1 bzw. 1,5, 2,5 oder 5 ml/kg NTS, isoliert und mittels Affymetrix GeneChips® Microarrays gemessen.

Die PCA aller gemessenen Gene zeigte einen deutlichen Unterschied in den Genexpressionsprofilen zwischen den Rattenstämmen sowohl in den Datensätzen von Promen von Kontroll- als auch von behandelten Ratten. Jedoch konnte auch ein dosisabhängiger Behandlungseffekt festgestellt werden, der in beiden Rattenstämmen in die gleiche Richtung wies (Abb. 36A). Nach der statistischen Analyse wurden 439 signifikant deregulierte Gene identifiziert, 428 in WKY und 40 in SD Ratten, von denen 253 kategorisiert wurden (Abb. 36B und Anhang-Tab. 9). Trotz einer deutlich geringeren Anzahl statistisch signifikant deregulierter Gene in SD Ratten, wird in der Heatmap deutlich, dass das Profil der 253 Gene in beiden Stämmen qualitativ vergleichbar war: in der niedrigsten Dosis wurden nur sehr wenige Gene dereguliert, hingegen war nach der Behandlung mit der höheren Dosis eine klare Hoch- bzw. Herunterregulation zu erkennen (Abb. 36C). Den einzigen Unterschied bildete die Gene RT1 class II, locus Ba (Rt1-Bb) und Complement component 6 (C6) der Kategorie Inflammation, welche eine Rolle bei der Antigenpräsentation bzw. Komplement-Kaskade spielen und die nach NTS Verabreichung in SD Ratten herunter- und in WKY Ratten hochreguliert waren.

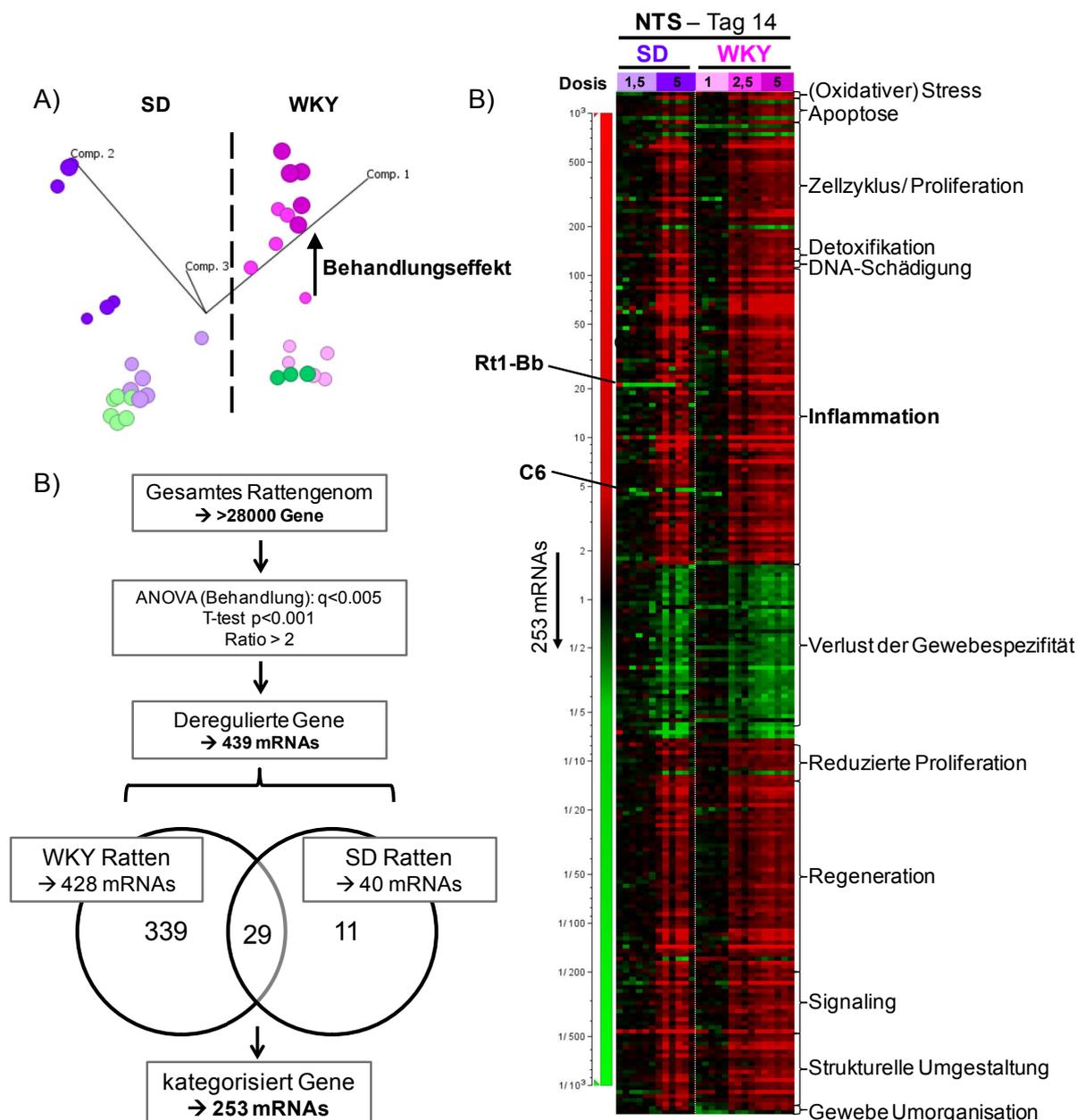


Abbildung 36 Genexpressionsanalyse in der Niere nach Schädigung induziert durch nephrotoxisches Serum (NTS). A) Eine Principal Component Analysis wurde mit den Datensätzen aller Proben und Intensitätswerten aller Gene als Variablen durchgeführt. Grüne und farbige Formen stellen Proben von Kontroll- und NTS behandelten Tieren dar. B) Schematischer Ablauf der Genexpressionsanalyse mit den gesetzten Signifikanzgrenzen und den daraus resultierenden Genengruppen. C) Heatmap der 253 signifikant deregulierten und kategorisierten Gene in der Niere nach NTS Verabreichung. Die Färbung gibt das Verhältnis nach Behandlung relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe für jede mRNA (waagrecht) pro Probe behandelter Tiere (senkrecht) entsprechend der Farbskala an.

Die Kategorisierung erfolgte nach dem gleichen Prinzip, wie vorher beschrieben. Die zwei größten Kategorien hochregulierter Gene sind Inflammation und Regeneration. Die „inflammatorischen“ Gene kodierten für diverse Komponenten des Immunsystems, wie Interleukin-24 (IL24), IL7 oder Cd53 (Tab. 35). Die Mehrheit der „regenerativen“ Gene kodierte für Proteine der extrazellulären Matrix, wie z.B. unterschiedliche Collagen-Typen (Col1a1, Col1a2). Kim-1 war auch Teil der Kategorie Regeneration und war in allen Dosisgruppen hochreguliert; es war, wie nach

3 Ergebnisse

Cp Behandlung, das am höchsten hochregulierte Gen: >50-fach am Tag 14 nach 5 ml/kg NTS. Eine weitere große Gruppe stellten die hochregulierten Zellzyklus- und Proliferationsgene dar.

Tabelle 35 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse der Nephrotoxizität induziert durch nephrotoxisches Serum. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation.

Tox Kategorie	Beispiele
Apoptose	Bcl3↑, Casp4↑, Fhl2↑
Zellzyklus/Proliferation	Myc↑, Egr2↑, Cdk1↑
Detoxifikation	Cyp1b1↑, Slc25a24↑
DNA-Schädigung	Phlda3↑, Rprm↑
Inflammation	Lcn2↑, Fga↑, Ephb6↑, Il24↑, CD53↑, C2↑, Lcp2↑
Metabolismus & Lipidmetabolismus	Apob↑, Lrat↑
(Oxidativer) Stress	Egr1↑, Clu↑
Regeneration	Cd44↑, Col1a1/2↑, Efemp2↑, Kim-1↑
Strukturelle Umgestaltung	Tubb6↑, Actn1↑, Dnm3↑
Reduzierte Proliferation	Cdkn3↑, Inhbb↑
Signaling	Pthlh↑, Adra1d↑
Gewebe Umorganisation	Ctsk↑
Verlust der Gewebespezifität	Gsta2↓, Nlrp6↓

3.5.3 Vergleich der Genexpression in der Niere nach Verabreichung von Cisplatin oder nephrotoxischem Serum

Zur mechanistischen Analyse der zwei unterschiedlichen Nierenschädigungen, der Cp-induzierten Schädigung in proximalen Tubuli und der NTS-induzierten Glomerulonephritis, wurden die jeweiligen Genexpressionsprofile basierend auf den, durch deregulierte Gene repräsentierten, toxikologischen Kategorien miteinander verglichen.

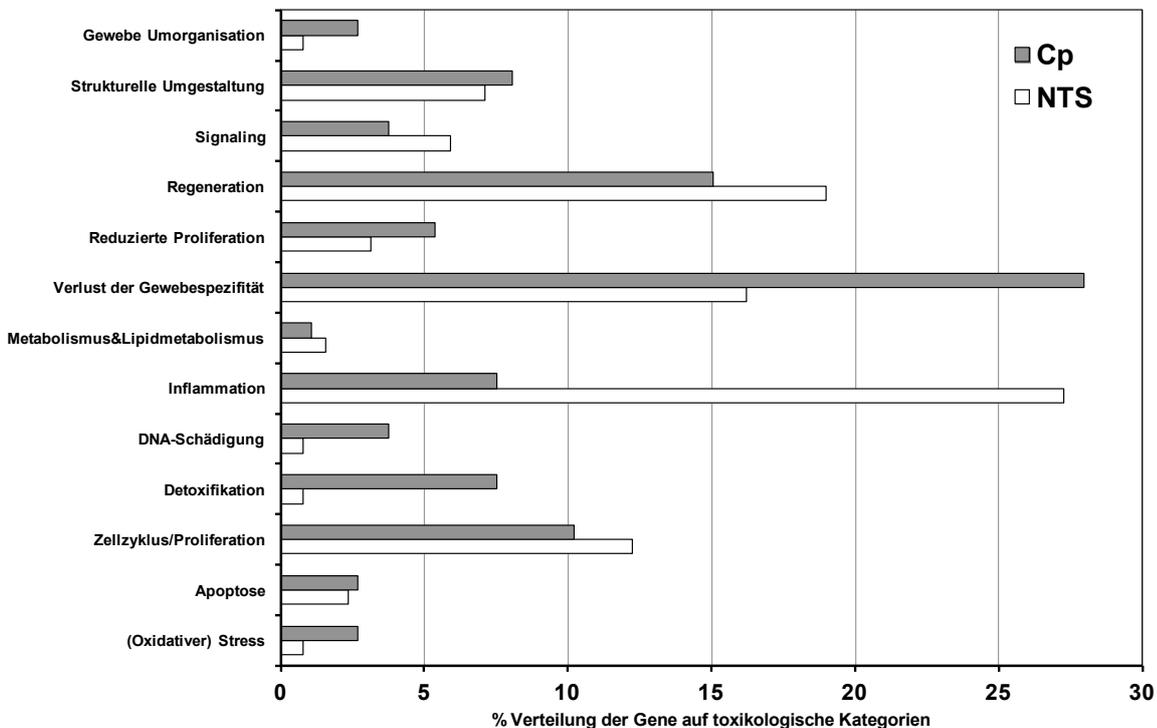


Abbildung 37 Vergleich der Genverteilung auf toxikologische Kategorien nach Cisplatin (Cp) induzierter Nierenschädigung oder nach Schädigung durch nephrotoxisches Serum (NTS). Die prozentuale Verteilung wurde mit der Genanzahl pro Kategorie in Bezug auf die Anzahl aller kategorisierten Gene (Cp: 274, NTS:439) berechnet.

3 Ergebnisse

und zeigten überwiegend ein qualitativ vergleichbares Profil nach Cp- sowie nach NTS-induzierter Schädigung.

Dennoch konnte jeweils eine Gruppe an Genen identifiziert werden, die differenziell dereguliert waren. Cp spezifisch deregulierte Gene kodierten für detoxifizierende Enzyme und für die zwei DNA *damage response* (DNA-Schädigung) assoziierte Proteine: Cyclin G1 (Ccng1) und Mouse double minute 2 homolog (Mdm2). Beide sind Teil des p53 Netzwerks, welches nach DNA-Schädigung aktiviert wird (Abb. 38A). NTS spezifisch deregulierte Gene waren mehrheitlich mit Inflammation und Regeneration assoziiert. Das Letztere war durch Collagengene (Col1a2, Col4a2, Col6a1) und Gene, die für Zelladhäsionsproteine kodieren, (Mfap4, Lgals2) gekennzeichnet (Abb. 38B).

3.5.4 Genexpression in der Leber nach Methapyrilen Verabreichung

Für die Genexpressionsanalyse im Hepatotoxizitätsmodell wurde die Gesamt-RNA aus der Leber von Kontrollratten und von Ratten, nach 4-, 8- und 15-tägiger Verabreichung von 30 oder 80 mg/kg MPy sowie 10 Tage nach Verabreichungsende (Tag 24) isoliert und mittels Affymetrix GeneChips® Microarrays gemessen.

Die PCA aller gemessenen Gene zeigte für die Zeitpunkte 4, 8 und 15 Tage einen dosisabhängigen und über die Zeit zunehmenden Behandlungseffekt (Abb. 39A). Dabei waren die Leber Expressionsprofilen von Ratten, denen 15 Tage lang 80 mg/kg MPy verabreicht wurde, am weitesten von den Kontrollen entfernt d.h. die Genexpressionsprofile unterschieden sich am stärksten. Am Tag 24, also nach zehn tägiger behandlungsfreier Phase, waren die Genexpressionsprofile der Lebern sowohl von Kontroll- als auch von behandelten Ratten deutlich von den übrigen getrennt; möglicherweise aufgrund des Absetzens der Behandlung per se, da die Tiere am Tag 24 weder mit Vehikel noch mit Substanz weiterbehandelt wurden. Leber Expressionsprofile von Ratten, denen vorher die höchste MPy Dosis verabreicht wurden, setzten sich am Tag 24 aber immer noch in Behandlungsrichtung von den Übrigen ab.

Nach der statistischen Analyse wurden 1127 signifikant deregulierte Gene identifiziert, von denen 494 kategorisiert wurden (Abb. 39B und Anhang-Tab. 10). In der Heatmap wird ebenfalls deutlich, dass das Profil dieser 494 Gene dosis- und behandlungsdauerabhängig dereguliert ist (Abb. 39C). Entsprechend Tab. 36 wurden die Gene, aufgrund der Funktion der von ihnen kodierten Proteine, verschiedenen toxikologischen Kategorien zugeordnet. Die Kategorien unterscheiden sich geringfügig von den oben beschriebenen, indem, entsprechend des anderen Gewebes und des anderen Mechanismus, entweder eine Kategorie in zwei eigenständige unterteilt wurde (Zellzyklus/Proliferation in Zellzyklus Progression und Proliferation) oder neue Kategorien nötig waren (mitochondriale Schädigung, Tumorgenese).

Neben der Induktion von Apoptose, gekennzeichnet durch z.B. die Hochregulation von Caspasegenen (Casp4, Casp12), und Detoxifikation, gekennzeichnet z.B. durch die am stärksten hochregulierten Gene *Multidrug resistance protein 1a* (Mdr1a) und Cytochrom P450 4b (Cyp4b), waren durch MPy viele Gene in der Leber hochreguliert, die mit der Zellzyklus Progression, Proliferation und damit einhergehend mit der Regeneration assoziiert sind. Dies korreliert wahrscheinlich mit der nach MPy-induziertem Zellschaden ausgelösten regenerativen Hyperplasie, die vermutlich eine Rolle bei der kanzerogenen Wirkung von MPy spielt. Obwohl MPy nicht direkt als genotoxisch gilt, wurden auch p53 Zielgene, wie p21 und Ccng1, und Tumorgenese-assoziierte Gene, wie *DNA-binding protein inhibitor 1* (Id-1) und *Regulator of G-protein signaling 5* (Rgs5), als hochreguliert gefunden. Die Mehrheit der herunterregulierten Gene war mit dem Verlust der Gewebespezifität verbunden, wie z.B. Gene für CYP Enzyme (Cyp2a1) oder hepatische Lipasen (Lipc) (Anhang-Tab. 10).

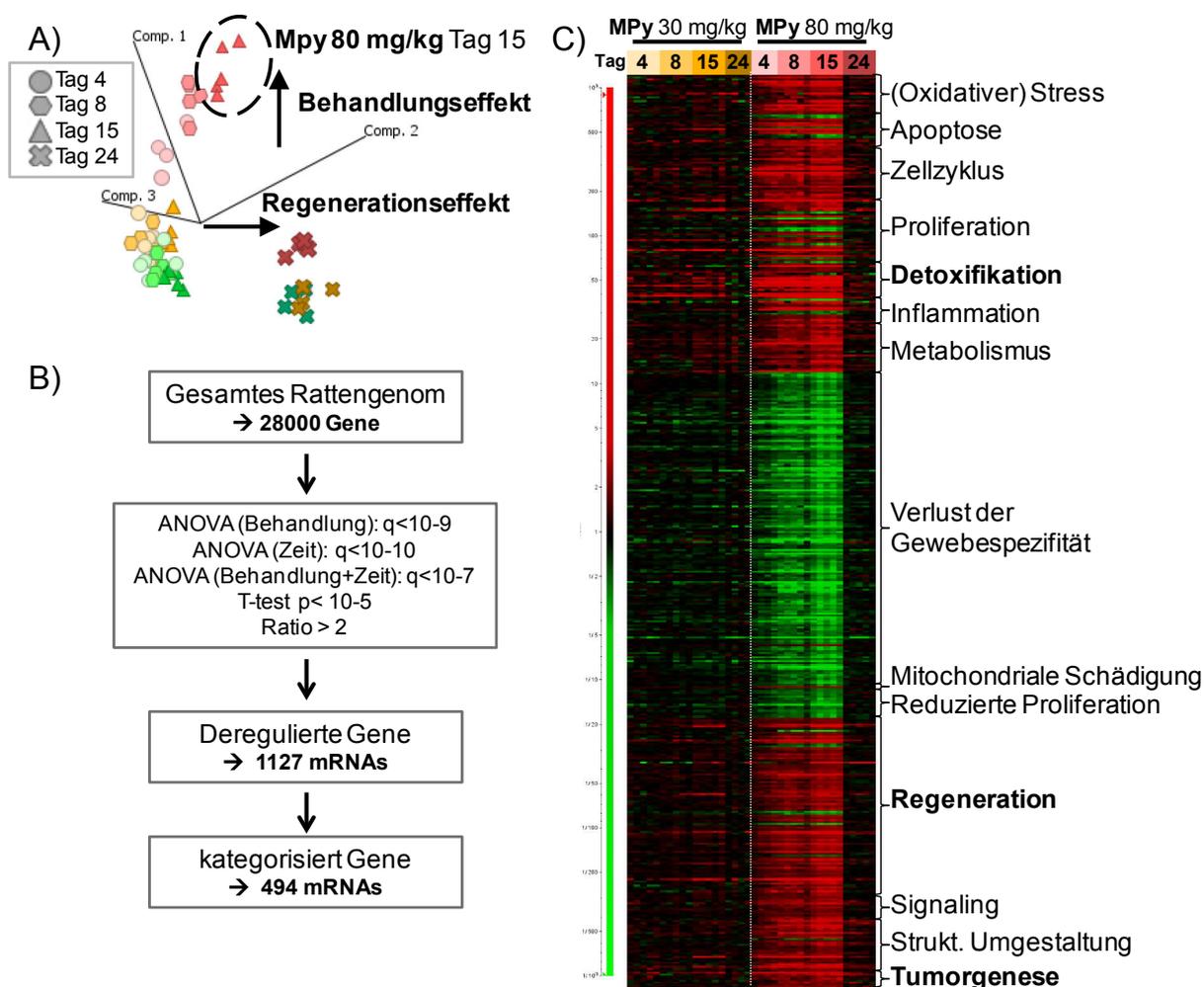


Abbildung 39 Genexpressionsanalyse in der Leber nach Methapyrilen-induzierter Schädigung. A) Eine Principal Component Analyse wurde mit den Datensätzen aller Proben und Intensitätswerten aller Gene als Variablen durchgeführt. Grüne, gelbe und orange Formen stellen Kontroll-, 30 mg/kg und 80 mg/kg MPy behandelten Proben dar. B) Schematischer Ablauf der Genexpressionsanalyse mit den gesetzten Signifikanzgrenzen und den daraus resultierenden Gengruppen. C) Heatmap der 186 signifikant deregulierten und kategorisierten Gene in der Leber nach MPy Verabreichung. Die Färbung gibt das Verhältnis nach Behandlung relativ zum Mittelwert der Kontrollgruppe für jede mRNA (waagrecht) pro Probe behandelter Tiere (senkrecht) entsprechend der Farbskala an.

Tabelle 36 Toxikologische (Tox) Kategorien für die Genexpressionsanalyse Methapyrilen-induzierter Hepato-toxizität. ↑ Hochregulation, ↓ Herunterregulation.

Tox Kategorie	Beschreibung	Beispiele
Apoptose	Hochregulation pro-apoptotischer und Herunterregulation anti-apoptotischen Gene	Bax1↑, Casp4/12↑, Ddit3↑
Proliferation	Hochregulation von Genen kodierend für: Wachstumsfaktoren, Proteine mit anti-apoptotischer Funktion, (IGF)-PI3K-PKB Signalweg Komponenten; Herunterregulation von pro-apoptotischen und Tumorsuppressorgenen	Igf1p2↑, Nrg1↑, Bmf↓
Zellzyklus Progression	Hochregulation von Genen für: CDKs/Cycline, Proteine der DNA-Replikation, -Reparatur, -Transkription, Komponenten des mitotischen Spindelapparat, Zytokinese und der Nukleosom Bildung	Ccnd1↑, Smc2↑, Cks2↑
Detoxifikation	Hochregulation von Genen kodierend für Enzyme der Biotransformation und transmembran Transporter	Cyp4b1↑, Gstp1/a2↑, Mdr1a↑
Inflammation	Hochregulation von Genen für inflammatorische Proteine und Proteine assoziiert mit Antigenpräsentation	Fetub↑,
Metabolismus & Lipidmetabolismus	Hochregulation von Genen kodierend für Komponenten des Zucker- und Energiemetabolismus, für Fettsäuren Oxidationsenzyme, Syntheseenzyme und Transporter	Hsd12↑, Adfp↑, Gpd2↑, Pck2↑
Mitochondriale Schädigung	Hochregulation von Genen kodierend für ATPase Inhibitoren; Herunterregulation Mitochondrien assoziierter Gene	Bdh↓, Atpif1↑, Ppa2↓
(Oxidativer) Stress	Hochregulation von ARE Zielgenen und Genen assoziiert mit oxidativem Stress, NFκB-Zielgene, HSPs (Chaperone, Antwort auf Proteinschädigung); Gene assoziiert mit früher Stressantwort; Hochregulation von p53 Zielgenen und Genen kodierend für DNA Reparaturenzyme (DNA Schädigung)	Ccng1↑, p21↑, Hspa9↑, Ddit3↑
Regeneration	Hochregulation von Genen kodierend für Komponenten der Aminosäuresynthese, der Translation (ribosomale Proteine), des Proteintransports und der Zelladhäsion	Asns↑, LamR1↑, Elf4b↑, Ica1↑, Csrp2↑
Strukt. Umgestaltung	Hochregulation von Genen kodierend für Zytoskelett Komponenten	Myo1g↑, Jub↑
Reduzierte Proliferation	Herunterregulation von Genen involviert in DNA Synthese, Replikation, Proliferation; Hochregulation von Genen involviert in Wachstumsinhibition, Proliferationsinhibitoren und Tumorsuppressorgenen	Egf↓, Igfals↓
Verlust der Gewebespezifität	reduzierte Signaling-Kompetenz, Degradation; Herunterregulation von Genen kodierend für Detox-Enzyme, Signalingkomponenten, Metabolismus- und Transportproteine; Dedifferenzierung	Cyp2a1↓, Sult1c1↓, Lipc↓, Lrp5↓
Signaling	Hochregulation von Genen kodierend für Komponenten des GPCR Signalwegs, Hormon- und Ca ²⁺ -Signaling	Gnb1↑, Anxa7↑
Tumorgenese	Gene deren spezifische Deregulation mit Tumorgenese assoziiert ist	Id1↑, Rgs5↑

3.6 microRNA Expression im Gewebe mit Ziel-mRNA Identifikation

Die Messung der miRNA Expression im Gewebe sollte, wie oben erwähnt, Aufschluss über die Beteiligung der miRNAs an den jeweiligen Abläufen nach Toxinverabreichung liefern. Mittels Datenbankeninformationen und etablierten Vorhersagemodellen, beides im Ingenuity Pathway Analysis Programm implementiert, sollten für die gemessenen Gewebe miRNAs im Pool der deregulierten Gene (im vorherigen Abschnitt 3.5 beschrieben) passende Ziel-mRNA gesucht und Netzwerke gebildet werden. Passende Ziel-mRNAs sind in diesem Zusammenhang mRNAs für welche bekannt oder aufgrund ihrer Sequenz vorhergesagt ist, dass sie durch miRNAs auf posttranskriptioneller Ebene reguliert werden. Da miRNAs vorwiegend negative Regulatoren sind, wurde die Expressionsrichtung der identifizierten mRNAs mit berücksichtigt.

3.6.1 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Niere nach Cisplatin Verabreichung

Für die miRNA Expressionsanalyse wurde die Gesamt-RNA aus der Niere von Kontrollratten und von Ratten, 3 und 5 Tage nach der Verabreichung von 3 mg/kg Cp, isoliert. Das miRNA Expressionsprofil wurden mittels Affymetrix microRNA Arrays® gemessen.

Von den 680 rattenspezifischen miRNAs auf dem Array, waren 54 signifikant (t-Test $p < 0,05$) und mindestens 1,5-fach dereguliert nach Cp Verabreichung in der Niere (Anhang-Tab. 11). Von diesen war für 5 miRNAs ein Cp-abhängiger Anstieg im Urin gemessen worden, während im Gewebe zwei, miR-210 und -399-3p, herunter- und drei, miR-21, -34a und -184, hochreguliert waren.

Für 18 der 54 miRNAs konnten miRNAs 27 passende ebenfalls Cp-abhängig deregulierte mRNAs identifiziert werden (Abb. 40A). Die Paarungen waren experimentell bestätigt oder mindestens mit hoher Wahrscheinlichkeit vorhergesagt, zeigten mehrheitlich ein gegensätzliches Expressionsprofil und waren als u.a. in der Niere exprimiert beschrieben. Einige der identifizierten potentiell miRNA-regulierten mRNAs gehörten zu den Cp charakteristischen Kategorien DNA-Schädigung, Detoxifikation und Verlust der Gewebespezifität. DNA-Schädigung führt bekannterweise zur P53 Aktivierung, die nicht mit einer erhöhten Expression assoziiert ist. Das zusätzliche Einfügen von P53 in das Netzwerk zeigt, dass es als zentraler Schalter sowohl die Expression vieler miRNAs wie auch mRNAs reguliert. Beispielsweise scheint die hochregulierte miR-34a, selbst ein P53 Zielgen, an der Herunterregulation (hier präziser: Verringerung der mRNA Menge) von Calbindin (Calb1) und Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (Dpyd) und somit am Verlust der Gewebespezifität beteiligt zu sein (Abb. 40B).

3 Ergebnisse

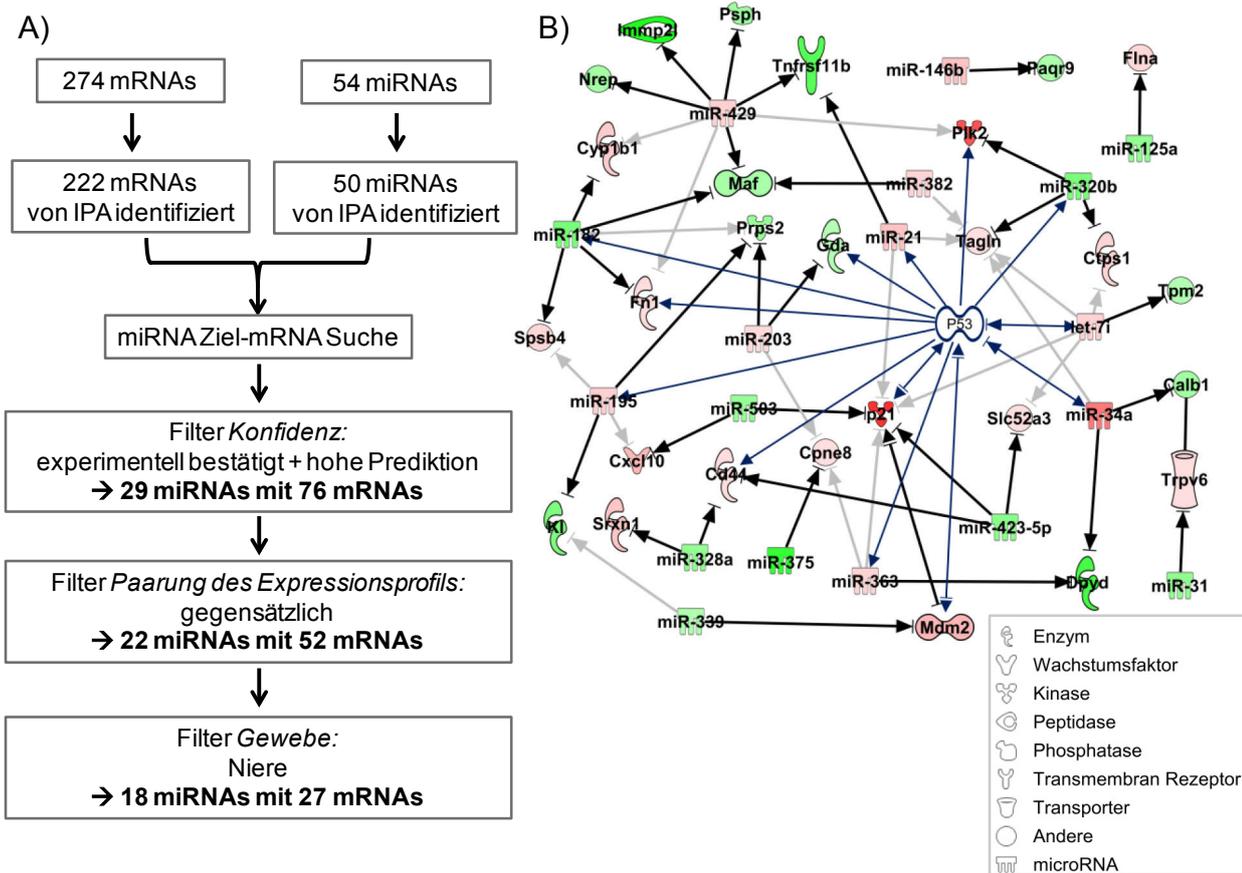


Abbildung 40 microRNA und mRNA Interaktionen in der Niere nach Cisplatin Schädigung. A) Schematische Darstellung von Ablauf, Filterkriterien und Teilergebnissen für die Identifikation von potentiell miRNA-regulierten mRNAs mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA). 274 mRNAs bzw. Gene und 54 miRNAs wurden vorher als Cisplatin abhängig dereguliert identifiziert. B) Netzwerk der final identifizierten miRNA und mRNA Paarungen. Zusätzlich wurde P53 aus Hauptregulator eingefügt. Die Färbung entspricht der Cisplatin induzierten Hoch- (rot) und Herunter- (Grün) regulation in der Niere am Tag 3. Schwarze bzw. graue Pfeile stellen eine inverse bzw. nicht inverse Expression von miRNA und mRNA dar. Blaue Pfeile stellen P53 Interaktionen dar.

3.6.2 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Niere nach Verabreichung von nephrotoxischem Serum

Für die miRNA Expressionsanalyse wurde die Gesamt-RNA aus der Niere von Kontrollratten und von Ratten, 14 Tage nach der Verabreichung von 5 ml/kg NTS, isoliert und miRNA Expressionslevel wurden mittels TaqMan Cards gemessen. Da die NTS Effekte bei WKY Ratten höher und eindeutiger waren, werden im Folgenden nur diese Ergebnisse berücksichtigt.

Von den ca. 280 gemessenen miRNA waren 80 signifikant (t-Test $p < 0,05$) und mindestens 1,5-fach in der Niere von WKY Ratten nach NTS Verabreichung dereguliert (Anhang-Tab. 12). Einige der hochregulierten miRNAs in der Niere, wie miR-21, -34b, -146b und -197, stiegen auch im Urin an. Andere der im Urin erhöhten miRNAs waren in der Niere NTS-abhängig herunterreguliert, wie z.B. miR-192 und -193b. Ausgehend von einer experimentellen Bestätigung bzw. einer hohen Vorhersagewahrscheinlichkeit, einem gegensätzlichen Expressionsprofil und einer beschriebenen Expression in der Niere, wurden von diesen 80 miRNAs für 44 miRNAs 69 ebenfalls NTS-anhängig deregulierte mRNAs identifiziert (Abb. 41A). Die identifizierten mRNAs ko-

dierten für Proteine, die u.a. mit Fibrose assoziiert waren und die zugehörigen miRNAs zeigten mehrheitlich eine gegensätzliche Expression (Abb. 41B). So war z.B. miR-197 hochreguliert, was zur Herunterregulation von *Insulin-like growth factor-binding protein 3* (Igfbp3) passte. Des Weiteren konnte unter den potentiell miRNA-regulierten mRNAs eine Assoziation mit dem TGF β -Signalweg gefunden werden: während *Transforming growth factor-beta 2* (Tgf- β 2) NTS-abhängig hochreguliert war, waren fünf entsprechende miRNAs, u.a. miR-193a, herunterreguliert (Abb. 41C).

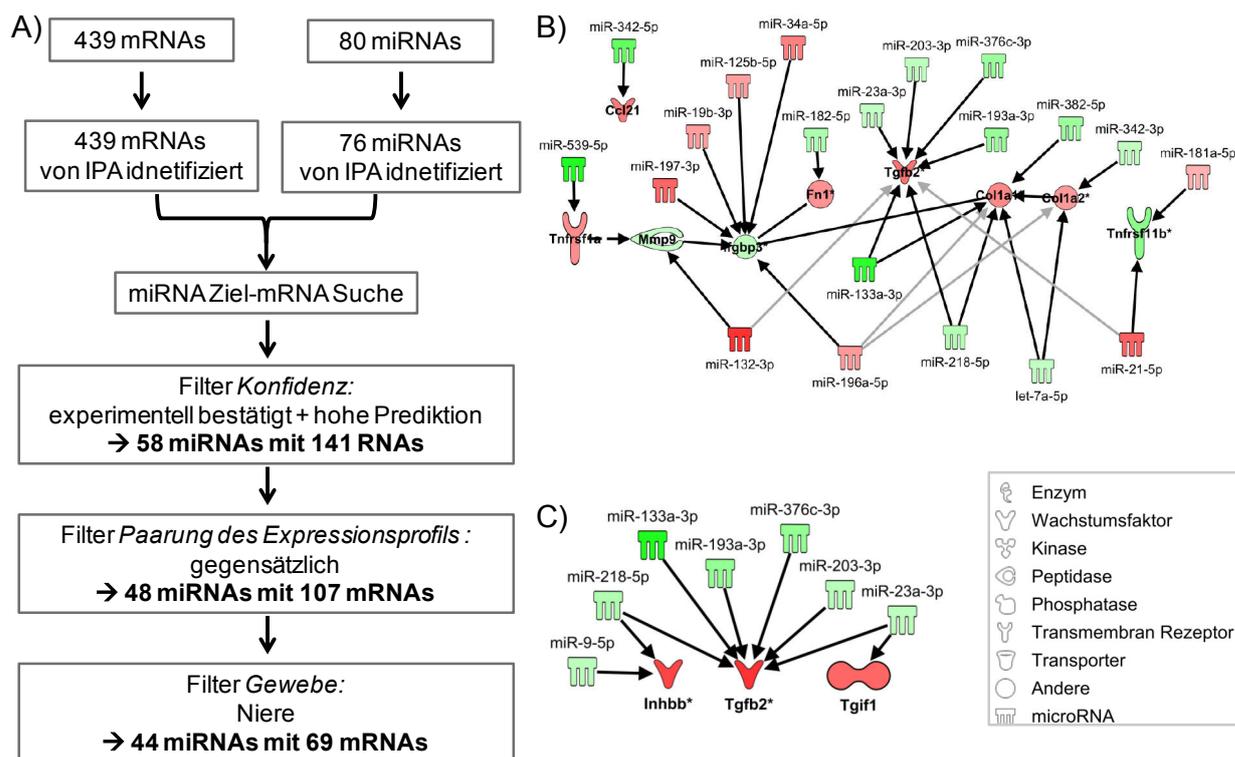


Abbildung 41 microRNA und mRNA Interaktionen in der Niere nach Schädigung durch nephrotoxisches Serum. A) Schematische Darstellung von Ablauf, Filterkriterien und Teilergebnissen für die Identifikation von potentiell miRNA-regulierten mRNAs mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA). 439 mRNAs bzw. Gene und 80 miRNAs wurden vorher als dereguliert identifiziert. B) Netzwerk der final identifizierten miRNA und mRNA Paarungen, die mit Fibrose assoziiert sind. C) Netzwerk der final identifizierten miRNA und mRNA Paarungen, die mit dem TGF β -Signalweg assoziiert sind. Die Färbung beider Netzwerke entspricht der Hoch- (rot) und Herunter- (Grün) Regulation in der Niere, 14 Tage nach der Verabreichung von nephrotoxischem Serum. Schwarze bzw. graue Pfeile stellen eine inverse bzw. nicht inverse Expression von miRNA und mRNA dar.

3.6.3 microRNA Expression mit Ziel-mRNA Identifikation in der Leber nach Methapyrilen Verabreichung

Für die miRNA Expressionsanalyse im Hepatotoxizitäts Modell wurde die Gesamt-RNA aus der Leber von Kontrollratten und von Ratten, 4, 8 und 15 Tage nach der täglichen Verabreichung von 80 mg/kg MPy sowie 10 Tage nach Verabreichungsende (Tag 24), isoliert und 9 selektierte miRNAs wurden mittels TaqMan Assay gemessen.

Ausgehend von einer experimentellen Bestätigung bzw. einer hohen Vorhersagewahrscheinlichkeit, einem gegensätzlichen Expressionsprofil und einer beschriebenen Leber Expression,

3 Ergebnisse

konnten für 7 von 9 miRNAs 30 ebenfalls Mpy-abhängig deregulierte mRNAs identifiziert werden (Abb. 42A). Die leberspezifische miR-122 ist MPy-abhängig herunterreguliert, welches zur Hochregulation vom Stress-assoziierten Ccng1 passt (Abb. 42B). Ein bekanntes miRNAs P53 Zielgen, miR-34a, ist in der Leber nach MPy hochreguliert. Dies entspricht wiederum der Herunterregulation von *Tumor protein p53 inducible nuclear protein 2* (Trp53inp2). Stress kann auch zur DNA-Schädigung führen, was bekannterweise zur P53 Aktivierung führt. Das zusätzliche Einfügen von P53 in das Netzwerk zeigt, dass es sowohl die miRNA- wie auch die mRNA-Expression reguliert.

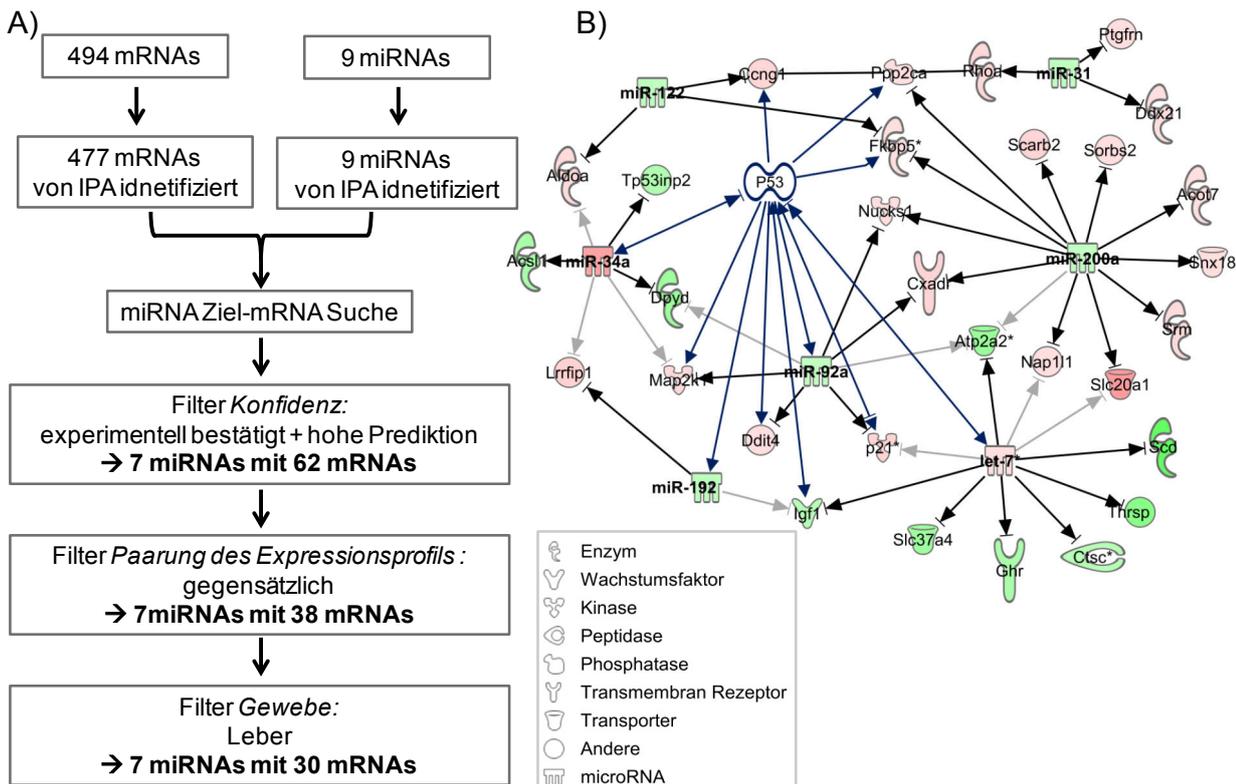


Abbildung 42 microRNA und mRNA Interaktionen in der Leber nach Methapyrilen induzierter Schädigung. A) Schematische Darstellung von Ablauf, Filterkriterien und Teilergebnissen für die Identifikation von potentiell miRNA-regulierten mRNAs mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA). 494 mRNAs bzw. Gene wurden vorher als dereguliert identifiziert. B) Netzwerk aller final identifizierten miRNA und mRNA Paarungen. Zusätzlich wurde P53 eingefügt. Die Färbung entspricht der Hoch- (rot) und Herunter- (Grün) Regulation in der Leber nach 4-tägiger Methapyrilen Verabreichung. Schwarze bzw. graue Pfeile stellen eine inverse bzw. nicht inverse Expression von miRNA und mRNA dar. Blaue Pfeile stellen P53 Interaktionen dar.

3.7 microRNA Lokalisation im Gewebe

Durch den Vergleich der Urinprofile nach Cp bzw. NTS Verabreichung konnten einige potentiell Nierenschaden-spezifische miRNAs identifiziert werden, da jeweils unterschiedliche Nierenregionen betroffen waren: tubulärer Schaden nach Cp und vornehmlich glomerulärer nach NTS-Behandlung. Um ein möglicherweise entsprechende kompartimentspezifische Lokalisation dieser miRNAs in der Niere zu erkennen, wurde die Lokalisation einiger dieser miRNAs in der Rattenniere mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Parallel dazu wurde auch die Rattenleber untersucht. Die histologischen Befunde wurden mit Hilfe der Pathologen Frau Dr. Ute Bach und Herrn Dr. Matthias Rinke erhoben.

Als Kontrollen wurden die ubiquitär und nukleär exprimierte small RNA U6 und die in Endothelzellen exprimierte miR-126 ausgewählt. Wie erwartet konnte für U6 ein positives Signal in allen Zellkernen der Niere und Leber nachgewiesen werden, das hier aufgrund der angewendeten Färbemethodik blau erscheint (Abb. 43A und B). Ebenso zeigten die Endothelzellen der Blutgefäße mit der miR-126 Sonde ein positives Signal in beiden Geweben (Abb. 43C und D). In der Niere war auch das glomeruläre Kapillarknäuel positiv.

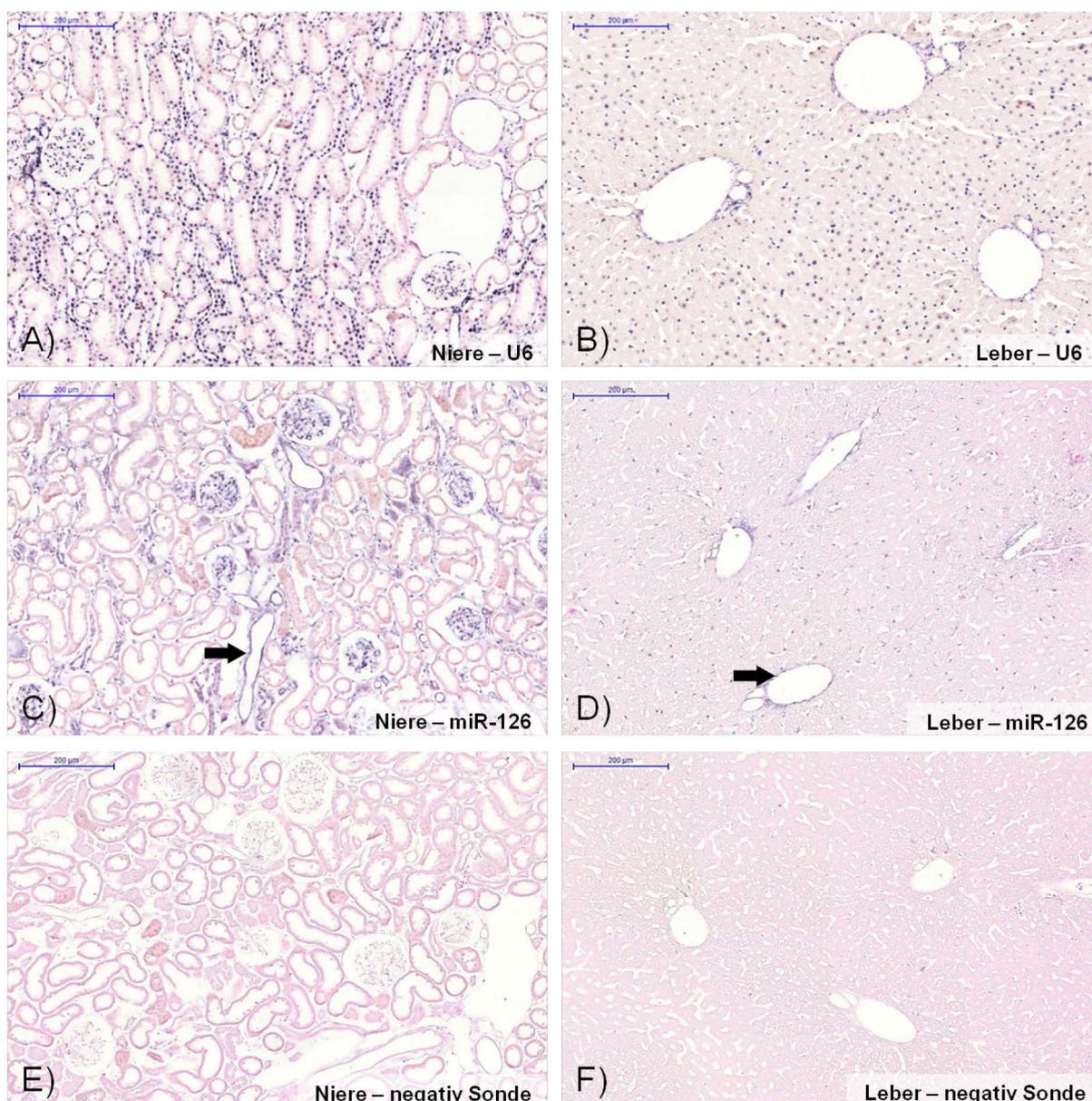


Abbildung 43 Positiv und negativ *in situ* Hybridisierungs-Kontrollen in Niere und Leber. A) und B) Ubiquitär-nukleär exprimierte Positiv Kontrolle U6. C) und D) Endothelzell-spezifische Positiv Kontrolle miR-126. E) und F) Hybridisierung mit Negativ Sonde d.h. einer Nukleinsäure mit Zufallssequenz. Dargestellt sind repräsentative Bilder mehrerer Experimente. Leber und Niere entstammen einer unbehandelten Ratte, wurden perfundiert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Blau: positives Sondensignal. Rosa: Eosin Gegenfärbung. Schwarzer Pfeil: Endothelzellen. Die Maßstableiste entspricht 200 µm.

Die Negativ Sonde, eine kurze Nukleinsäure mit zufälliger, nicht zu einer bekannten miRNA komplementären Sequenz, führte zu keinem Signal (Abb. 43E und F). Somit wurde sicherge-

3 Ergebnisse

stellt, mit dem getesteten Protokoll auch die Lokalisation von miRNAs zu untersuchen, für die eine Expression in bestimmten Organregionen/-kompartimenten noch nicht bekannt war. Für diese miRNAs wurden jeweils Sonden für die reife und die Vorläufer Form (pre-miRNA) eingesetzt. Die letztere sollte im Kern lokalisiert sein, was zu einem stärkeren oder eindeutigeren Signal führen müsste.

Als nächstes wurde die Lokalisation von miR-192 untersucht, deren Expression mittels PCR in beiden Organen vorher nachgewiesen wurde. Die pre-miR-192, der nukleäre Vorläufer, wurde in der Niere in den Zellkernen der Glomeruli, proximalen Tubuli und auch anderen Tubulschnitten im Nierenkortex nachgewiesen (Abb. 44A). In der Leber war die pre-miR-192 in den Zellkernen im Glisson'schen Dreieck zu sehen (Abb. 44B). Die reife miR-192 wurde als diffuses Kern- und Zytosolsignal ebenfalls im Nierenkortex (Abb. 44C) und in der Leber im Glisson'schen Dreieck und in Kupferzellen nachgewiesen (Abb. 44D).

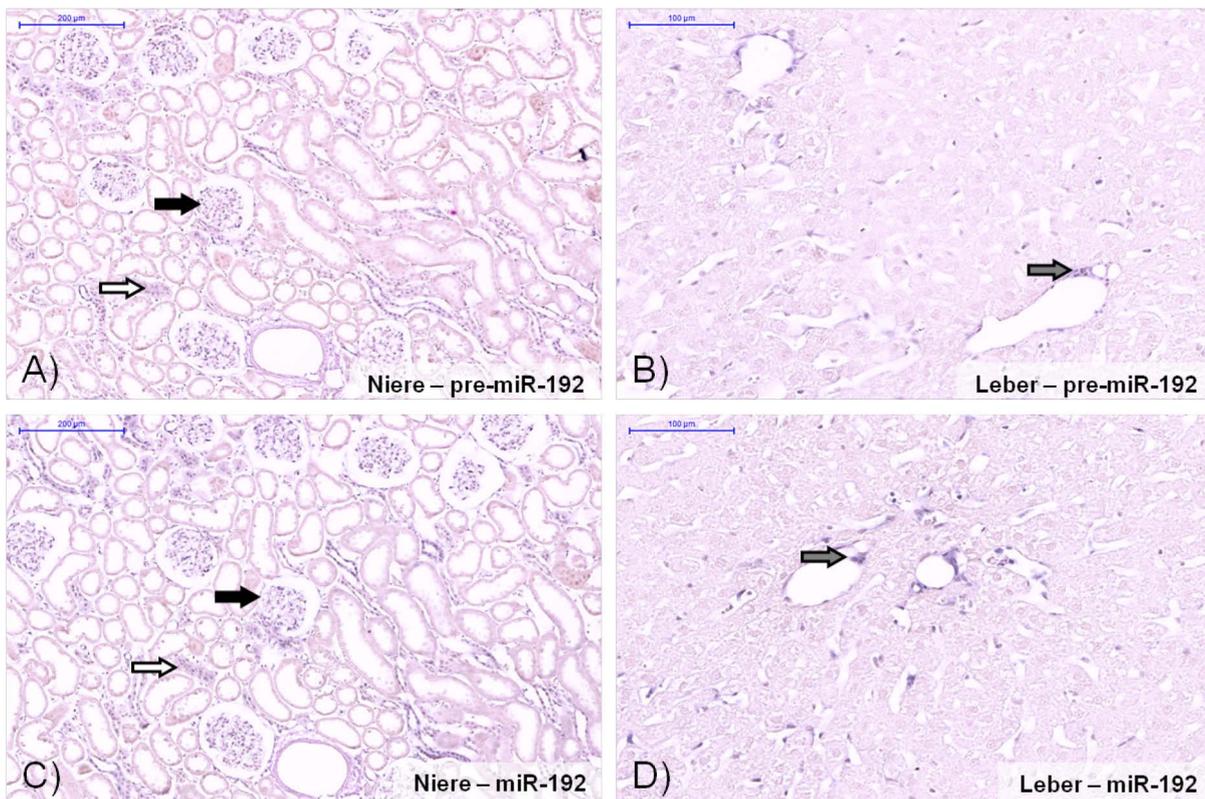


Abbildung 44 Vorläufer (pre-) und reife miR-192 in Niere und Leber. A) und B) Vorläufer pre-miR-192. C) und D) Reife miR-192. Dargestellt sind repräsentative Bilder mehrerer Experimente. Leber und Niere entstammen einer unbehandelten Ratte, wurden perfundiert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Blau: positives Sondensignal. Rosa: Eosin Gegenfärbung. Schwarzer Pfeil: Glomerulus, weißer Pfeil: proximaler Tubulus, grauer Pfeil: Glisson'sches Dreieck. Die Maßstableiste entspricht 200 µm bei Nieren- und 100 µm bei Leberaufnahmen.

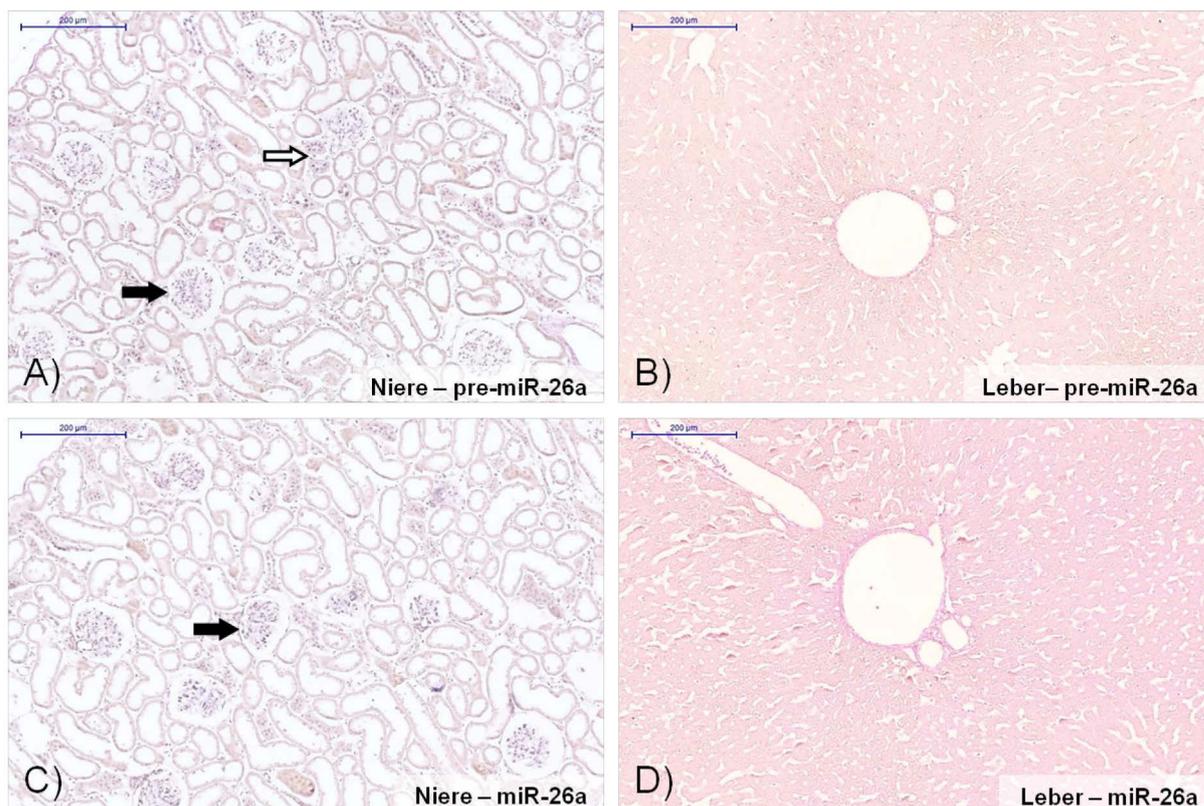


Abbildung 45 Vorläufer (pre-) und reife miR-26a in Niere und Leber. A) und B) Vorläufer pre-miR-26a. C) und D) Reife miR-26a. Dargestellt sind repräsentative Bilder mehrerer Experimente. Leber und Niere entstammen einer unbehandelten Ratte, wurden perfundiert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Blau: positives Sondensignal. Rosa: Eosin Gegenfärbung. Schwarzer Pfeil: Glomerulus, weißer Pfeil: proximaler Tubulus. Die Maßstabelleiste entspricht 200 µm.

miR-26a war als glomeruläre miRNA beschrieben worden. Ihr Vorläufer, pre-miR-26a, war schwach in der Niere in den glomerulären und tubulären Zellkernen nachweisbar, während die reife miR-26a vermehrt in den Glomeruli zu sehen war (Abb. 45A und C). In der Leber wurden weder pre-miR-26a noch miR-26a nachgewiesen (Abb. 45B und D).

Für miR-10b und -100, welche im Urin nach NTS-induzierter Glomerulonephritis als spezifisch erhöht identifiziert wurden im Vergleich zu Cp-induzierter Schädigung des proximalen Tubulus, war eine Expression in den Glomeruli nicht erkennbar. Jedoch war für beide ein Kernsignal u.a. in distalen Tubuli zu sehen (Abb. 46 A/C und B/D). Als miR-10b und -100 positiv wurden der distale absteigende dünne Ast der Henle'schen Schleife, der gewundene distale Tubulusabschnitt, der Verbindungstubulus und der kortikale Teil des Sammelrohres gewertet. In der Leber konnte keine der beiden miRNAs nachgewiesen werden (Abbb. 46E und F).

3 Ergebnisse

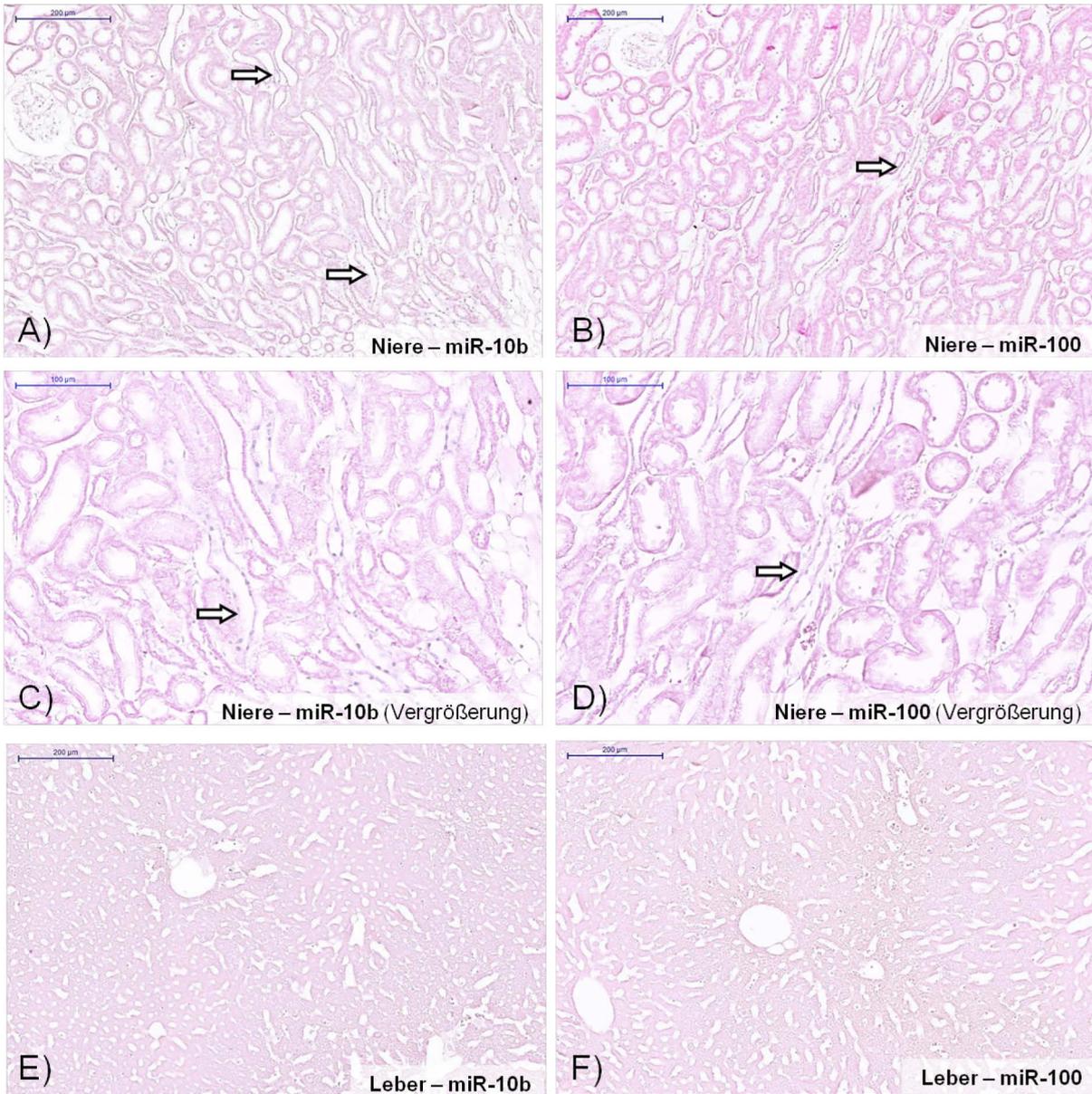


Abbildung 46 Reife miR-10b und -100 in Niere und Leber. A) und C) miR-10b in der Niere. B) und D) miR-100 in der Niere. E) und F) miR-10b und -100 in der Leber. Dargestellt sind repräsentative Bilder mehrerer Experimente. Leber und Niere entstammen einer unbehandelten Ratte, wurden perfundiert, in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Blau: positives Sondensignal. Rosa: Eosin Gegenfärbung. Weißer Pfeil: distaler Tubulus. Die Maßstabelle entspricht 200 μm.

4 Diskussion

In der zeit- und kostenintensiven Arzneimittelentwicklung führt, neben fehlender Wirksamkeit und erst in klinischen Entwicklungsphasen auftretenden Nebenwirkungen, vor allem die Organ-toxizität in der präklinischen Entwicklung zur Einstellung von Projekten. Statistisch werden ca. 45% der Arzneimittelkandidaten aufgrund von Organtoxizität in präklinischen Versuchstieren verworfen (Suter et al., 2004). In der präklinischen Entwicklung werden nach erstem Screening in *in vitro* Testsystemen, *in vivo* Studien mit zunehmender Dauer durchgeführt. Histologische Untersuchungen und Messung traditioneller, d.h. etablierter, Biomarker (BM) werden dabei zur Bewertung potentieller Organtoxizität herangezogen. Nachteile dieser Methoden sind die maximale Invasivität der histologischen Untersuchungen per se und die geringe Sensitivität und teilweise fehlenden Organspezifität der traditionellen BM. Somit ist der Bedarf an nicht-invasiven, sensitiveren und spezifischeren BM groß.

Da in Niere und Leber häufig Arzneimittel-induzierte Toxizität auftritt, wurden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von drei unterschiedlichen Ratten-Toxizitätsmodellen neue Protein-BM im Urin für Nephrotoxizität re-evaluiert. Zudem wurde das Potential einer neuen BM-Klasse, der microRNAs (miRNAs) im Urin und Plasma, für Nephro- sowie Hepatotoxizität evaluiert. Parallel dazu wurde die Genexpression (miRNA und mRNA) in den Zielorganen analysiert, um die molekularen Veränderungen und damit die Mechanismen der Substanz-induzierten Organtoxizität besser verstehen zu können.

4.1 Charakterisierungen der Toxizitätsmodelle durch Genexpression

Die Aufklärung der Wirkmechanismen von Toxinen auf Genexpressionsebene ist entscheidend für das Verständnis von toxikologischen Effekten und dadurch für die Entwicklung möglicher Vermeidungsstrategien, z.B. durch die Optimierung der chemischen Struktur von Arzneimittelkandidaten. Eine dafür hilfreiche Methode ist die Analyse der Toxin-induzierten Veränderungen der Genexpression, auch Toxicogenomics genannt, welche auch eine Identifikation neuer BM ermöglichen kann. Die hier verwendeten Toxizitätsmodelle, Cisplatin (Cp)-induzierte Schädigung der proximalen Nierentubuli, Glomerulonephritis Induktion durch die Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS) und Methapyrilen (MPy)-induzierte Leberschädigung, sind z.T. relativ gut untersucht. Dennoch, auch im Hinblick auf die Rolle von miRNAs, existieren noch viele Lücken im Verständnis der Wirkmechanismen.

Im Folgenden werden die drei unterschiedlichen Toxizitätsmodelle nacheinander diskutiert. Hierbei werden die jeweils spezifisch deregulierten Gene (mRNAs als auch miRNAs) in der Niere bei den beiden Nephrotoxizitätsmodellen vergleichend hervorgehoben. Einschränkend ist festzuhalten, dass die Genexpression hier indirekt über die Menge der mRNA bzw. miRNA im

Organ gemessen wurde, sodass die Hoch- bzw. Herunterregulation des Gens nicht direkt mit einer erhöhten bzw. verringerten Transkription des Gens assoziiert sein muss.

Zur Erläuterung: im weiteren Verlauf werden Gennamen mit großem Anfangsbuchstaben und die entsprechenden Proteinnamen komplett in Großbuchstaben geschrieben.

4.1.1 Nephrotoxizitätsmodelle

Cp-induzierter proximaler Nierentubulischaden

Die zytostatische Wirkung von Cp beruht auf der Bindung an die DNA und der darauf folgenden inter- und intrastrang Vernetzungen (Ciccarelli et al., 1985). Dies aktiviert die DNA-Reparatur Maschinerie und induziert einen Zellzyklus Arrest. In der Krebstherapie tritt u.a. als Nebenwirkung Nephrotoxizität auf, da Cp in Nierentubulizellen akkumuliert. Dort kommt es neben der DNA-Schädigung auch zur Bildung von reaktiven Metaboliten, welche auf verschiedene Weisen zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS) beitragen. DNA-Schädigung und ROS führen in den Nierentubulizellen zu Stress bzw. oxidativem Stress, der in apoptotischem oder nekrotischem Zelltod endet (Yao et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurden Han Wistar Ratten zwei unterschiedliche Dosen Cp, 1 und 3 mg/kg, einmalig verabreicht. Nach je 3, 5, 8 und 26 Tagen wurden die Nieren histologisch untersucht. Wie erwartet wurde eine tubuläre Nekrose diagnostiziert, hier nach 3, 5 und 8 Tagen in Ratten, denen die niedrige oder hohe Cp Dosis verabreicht wurde. Die Schädigung war 8 Tage nach der Verabreichung der höchsten Cp Dosis maximal. Mit Proben dieser Nieren wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt. Parallel zur Schädigung ist eine Deregulation der Gene zu sehen, die ebenfalls 8 Tage nach Verabreichung der höchsten Cp Dosis maximal war.

Zu den am frühesten, d.h. am Tag 3, hochregulierten Genen gehörten fast alle Gene der Kategorie DNA-Schädigung, von denen wiederum viele p53 Zielgene sind.

P53 ist einer der bekanntesten Tumorsuppressoren, der bei DNA-Schädigung stabilisiert wird und in nachgeschalteten Signalwegen zur Induktion von Zellzyklusarrest und DNA-Reparatur oder Apoptose führt. Die Rolle von p53 bei der Cp Zytotoxizität ist bereits bekannt (Wang and Lippard, 2005). Auch *in vivo* wurde eine Cp-induzierte Aktivierung von p53 in der Niere gezeigt, die als Protein stabilisierung und Phosphorylierung bekannt ist und als Anstieg des P53- und Phospho-P53 Signals gemessen wurde (Miyaji et al., 2001; Vickers et al., 2004), z.B. im Nierencortex und in der äußeren Nierenmedulla in Cp behandelten Mäusen, also genau in den geschädigten Bereichen (Wei et al., 2007b). Dazu passt, dass an isolierten proximalen Nierentubuli von Kaninchen gezeigt werden konnte, dass die Co-Inkubation mit Pifithrin- α , einem P53-Inhibitor, die Cp-induzierte Apoptose teilweise hemmt (Cummings and Schnellmann, 2002).

Eines der hochregulierten p53 Zielgene war hier der Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen *Cyclin dependent kinase 1* (Cdkn1a, auch p21, WAF1, CIP1), welcher auch nach der niedrigeren Cp

Dosis eindeutig hochreguliert war. Wie der Name schon verrät, inhibiert P21 CDKs wie z.B. CDK2, welche im Zellzyklus beim Übergang von der G1- zur S-Phase beteiligt ist und führt somit zur Induktion eines Zellzyklusarrests, während dem beispielsweise die geschädigte DNA repariert werden kann. In Mäusen wurde nach Cp Verabreichung ebenfalls ein p21 Anstieg in der Niere gemessen (Megyesi et al., 1998). In derselben Studie wurde nach Cp Behandlung von p21-defizienten Mäusen eine deutlich schwerere Schädigung als in Wildtyp Mäusen detektiert. Daher kann die Hochregulation von p21 als Schutzmechanismus verstanden werden. Vermutlich ist eine Balance zwischen P21-induziertem Zellzyklusarrest und CDK2-abhängigem Fortschreiten des Zellzyklus trotz DNA-Schädigung mitverantwortlich für die Entscheidung zwischen Rettung der Zelle oder Zelltod (Pabla and Dong, 2008). P21 steht im Zusammenhang mit post-transkriptioneller Regulation durch die miRNAs miR-503 und -423, zwei in dieser Studie als herunterreguliert gefundenen miRNAs. Dies könnte indirekt zur Induktion von p21 beitragen.

Passend zu p21 wurde im hier untersuchten Rattenmodell eine Hochregulation des p53-Zielgens *Cyclin G1* (Ccng1) festgestellt, welches ebenfalls mit Zellzyklusarrest nach DNA-Schädigung assoziiert wird (Kimura et al., 2001). Ein Cp vermittelter Ccng1 Anstieg wurde schon, sowohl für Sprague Dawley Ratten (Huang et al., 2001) als auch in Cp-behandelten NRK-52e Zellen (Huang et al., 2001) berichtet. Weiterhin gehört Ccng1 zu einer Gruppe von Genmarkern, die plattformunabhängig als spezifisch für Cp-induzierte Nephrotoxizität identifiziert wurden (Thompson et al., 2004). Diese Ccng1 Spezifität wurde auch in dieser Arbeit bestätigt, da im Vergleich zur Cp-induzierten Ccng1 Hochregulation in der Niere, keine Hochregulation in der Niere nach NTS-induzierter Glomerulonephritis stattfand. Dieses lässt sich aber auf die allgemeine DNA-schädigende Wirkung von Cp zurückzuführen.

Ein anderes p53-Zielgen, welches wie Ccng1 an der negativen Rückkopplungsschleife von p53 beteiligt ist (Ohtsuka et al., 2003), ist das *Murine double minute 2* (Mdm2), welches in der hier berichteten Studie nach Cp Behandlung hochreguliert war. In Mäusen gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von Mdm2 an der Inflammation und Wundheilung nach akuter Nierenschädigung (Mulay et al., 2012). Die nach Cp-Verabreichung beobachteten verringerten Nierenlevel von miR-399 könnten indirekt zur Hochregulation von Mdm2 beigetragen haben, da miR-399 als potentieller Regulator der Mdm2 mRNA identifiziert wurde.

Gene, die mit diversen Stress Reaktionen inklusive oxidativem Stress assoziiert werden, wurden ebenfalls früh nach Cp-Verabreichung hochreguliert. Dazu gehören Gene, die mit Hypoxie assoziiert sind, wie *6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3* (PFKFB3). Die PFKFB Genfamilie wird über den *Hypoxia-inducible factor 1* (HIF-1) Signalweg bei Hypoxie induziert, wodurch bei Sauerstoffmangel die Energiegewinnung zur Glykolyse hin verlagert wird (Minchenko et al., 2003). Eine Vasokonstriktion des renalen Gefäßgeflechtes wurde in der Chemotherapie mit Cp bei Menschen, aber auch bei Ratten beschrieben (Khan et al., 2007).

Dadurch wird die Durchblutung der Niere reduziert und könnte so zum Sauerstoffmangel, d.h. zur Hypoxie, und Stressentstehung beitragen.

Clusterin (Clu), ein anderes Gen dieser Gruppe, wird in vielen Geweben in Folge von zellulärem Stress induziert. Bei Nierenschädigungen ist der Anstieg seit langem bekannt und in unterschiedlichen Zusammenhängen beschrieben worden (Rosenberg and Silkensen, 1995). So wurde eine erhöhte Clu Genexpression und Proteinmenge in Ratten nach partieller Nephrektomie (Correa-Rotter et al., 1992), nach einseitiger Harnleiter Obstruktion (Ishii et al., 2007), nach Reperfusionsschaden (Yoshida et al., 2002) und Nephrotoxizität (Sieber et al., 2009; Silkensen et al., 1997) festgestellt. Da das CLU Protein nach Nierenschädigung auch im Urin ansteigt, wurde es als neuer und sensitiver BM qualifiziert (Dieterle et al., 2010a). Ein Anstieg im Urin nach Cp Verabreichung wurde in der vorliegenden Arbeit auch gemessen und wird im folgenden Abschnitt 4.2 diskutiert. Ein Anstieg der Clu Genexpression wurde nicht nur nach tubulärer sondern auch *in vitro* und *in vivo* nach glomerulärer Schädigung beobachtet (Yamada et al., 2001). Insgesamt scheint die Lokalisation von CLU nicht für ein bestimmtes Nephronsegment spezifisch zu sein (Harpur et al., 2011). Die Funktion des CLU Proteins erscheint zunächst widersprüchlich, ist aber in zwei unterschiedlichen Isoformen begründet, die durch alternatives Splicen entstehen; das glykosylierte sekretierte 75-80 kDa CLU und das nicht glykosylierte nukleäre 49 kDa CLU (Lakins et al., 1998). Während das sekretierte CLU Protein die Zellaggregation und somit Proliferation und Regeneration fördert sowie der Komplementsystem-abhängigen Zelllyse entgegenwirkt (Rosenberg and Silkensen, 1995; Yamada et al., 2001), induziert das nukleäre CLU Apoptose (Leskov et al., 2003). Anhand der in dieser Studie gemessenen Genexpressionsdaten, die nicht zwischen verschiedenen Splice-Formen unterscheiden, kann nicht festgestellt werden, welche Funktion das CLU hier hatte, zu vermuten sind aber beide Funktionen, je nach dem Schweregrad und Art der Schädigung in der jeweiligen Zelle.

Hinweise auf Apoptose lieferten sowohl die Gene, die mit DNA-Schädigung als auch mit Stress assoziiert sind. Eine extrinsische Aktivierung der Apoptose über den Tumornekrosefaktor α (TNF α) und die darauf folgende Caspase-8 vermittelten Caspasekaskade wird vermutet, da in Cp-behandelten Mäusen eine starke Tnf α Induktion (Ramesh and Reeves, 2002) und in Sprague Dawley Ratten fünf Tage nach der Verabreichung von 5 mg/kg Cp eine erhöhte Expression von Caspase-1, 3 und 8 gemessen wurde (Sheikh-Hamad et al., 2004). Eine Tnf α Induktion wurde in dieser Arbeit allerdings nicht detektiert, was aber auch auf die für Mäuse extrem hohe Dosis von 20 mg/kg Cp zurückgeführt werden könnte, die von Ramesh und Reeves verwendet wurde. Die mögliche intrinsische Aktivierung der Apoptose durch Cp, über die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom c und der Caspase-9 vermittelten Caspasekaskade, wurde in verschiedenen *in vitro* Experimenten nachgewiesen. Die in dieser Studie gemessene erhöhte Expression von *Bcl-2-associated X protein* (Bax), welches auch von Sheikh-Hamad et al. in der

oben erwähnten Rattenstudie gemessen wurde, könnte darauf hinweisen. BAX ist verantwortlich für die Porenbildung in der Mitochondrienmembran und die darauffolgende Cytochrom c Freisetzung (Lee et al., 2001; Park et al., 2002). Passend dazu zeigten Untersuchungen an Bax-defizienten Mäusen, dass diese resistenter gegenüber Cp-induzierter Nephrotoxizität waren (Wei et al., 2007a). Weiterhin wurde hier eine eindeutige Hochregulation von *P53 upregulated modulator of apoptosis* (PUMA), auch als *Bcl-2-binding component 3* (Bbc3) bekannt, gemessen. Eine Hochregulation von Bbc3, welches als BBC3 Protein in der äußeren Mitochondrienmembran akkumuliert, dort mit anti-apoptischen Proteinen interagiert und so BAX die Porenbildung ermöglicht, wurde nach Cp Behandlung ebenso in primären proximalen Tubuluszellen aus Rattennieren sowie in Mäuse- und Rattennieren aus *in vivo* Versuchen nachgewiesen (Jiang et al., 2006; Tsuruya et al., 2003).

Die Hochregulation von *Apoptosis enhancing nuclease* (Aen, Isg2011), ebenfalls ein p53 Zielgen und Marker bei genotoxischem Stress, lässt bei Cp-induzierter Nierenschädigung auch eine weitere Art der Apoptose vermuten, die Caspase-unabhängige Apoptose (Kawase et al., 2008; Watanabe et al., 2012). Das AEN Protein besitzt eine DNase Aktivität und co-lokalisiert im Kern mit anderen apoptotischen Nukleasen (Lee et al., 2005). Es konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von Caspase-Inhibitoren, die Cp-induzierte Apoptose in proximalen Tubuluszellen, die aus Kaninchennieren isoliert wurden, nicht vollständig verhindern kann (Cummings and Schnellmann, 2002). So wird als eine andere Caspase-unabhängige Zelltodart, an der AEN beteiligt sein könnte, die Autophagie im Zusammenhang mit Cp-induzierter Nephrotoxizität diskutiert (Cho et al., 2014; Eby et al., 2010; Periyasamy-Thandavan et al., 2008).

Stress und Apoptose bzw. Nekrose führen zu inflammatorischen Reaktionen im Gewebe. In der Niere wurden entsprechend nach Cp-induzierter Schädigung Gene hochreguliert, die mit Inflammation bzw. mit einer Immunantwort assoziiert sind. Dazu gehören Gene die für Akute-Phase Proteine wie Lipocalin-2 (LCN2, auch bekannt als *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*, NGAL) und Fibrinogen (Fibrinogen Ketten α und β , Fga und Fgb) kodieren. LCN2/NGAL wird von Neutrophilen und Epithelzellen als Antwort auf zellulären Stress gebildet und dient wahrscheinlich als Mediator des angeborenen Immunsystems (Flo et al., 2004). Wie in Mäusen mit Reperfusionsschäden war Lcn2 auch im vorliegenden Nephrotoxizitätsmodell eines der am stärksten hochregulierten Gene. Weiterhin wurde in derselben Mausstudie gezeigt, dass Lcn2 in gesunden Nieren kaum und nach Schädigung sehr stark in proximalen Tubuluszellen exprimiert wird (Mishra et al., 2003). Die genaue Funktion in der geschädigten Niere ist noch nicht eindeutig nachgewiesen, es werden sowohl schützende als auch pro-apoptische Eigenschaften für LCN2/NGAL beschrieben (An et al., 2013; Devireddy et al., 2005). Des Weiteren ist das LCN2/NGAL Protein ein vielversprechender BM, da nicht nur ein Anstieg in der Niere, sondern auch im Urin nach diversen Nierenschädigungen in präklinischen Versuchstierarten inklusive

4 Diskussion

der hier beschriebenen Studien (s. Abschnitt 4.2) und in Patienten gemessen wurde (Endre et al., 2011; Hoffmann et al., 2010a; Ozer et al., 2010a; Sieber et al., 2009; Steinbach et al., 2014). Fibrinogen ist ein Hexamer aus je zwei α , β und γ Ketten, welches an der Blutgerinnung und der ersten Immunantwort beteiligt ist (Schultz and Arnold, 1990; Weisel, 2005). Bei Ratten mit Reperfusionsschäden war Fgb das zweit stärkste hochregulierte Gen (Krishnamoorthy et al., 2011), so wie in den hier untersuchten Cp behandelten Ratten. Neuere Ergebnisse zeigen, dass das Fibrinogen Protein auch ein neuer translationaler BM sein könnte, da ein Anstieg der Expression in der Niere aber auch des Proteins im Urin von Ratten nach Cp Verabreichung und in Patienten mit akuten Nierenschäden gemessen wurde (Hoffmann et al., 2012). *Intercellular adhesion molecule-1* (*Icam1*), ein Adhäsionsprotein auf Endothelzellen und Ligand für Leukozyten, welches maßgeblich an der Cp-induzierten Inflammation beteiligt ist (Kelly et al., 1999; Ramesh and Reeves, 2004), wurde hier ebenfalls als hochreguliert identifiziert.

Nehmen die oben beschriebenen gewebeschädigenden Reaktionen zu, tritt Nekrose auf, so wie sie hier in den Untersuchungen histopathologisch diagnostiziert wurde. Dabei werden viele Gene herunterreguliert bzw. DNA und mRNAs werden degradiert. Ist der Schaden, wie in den vorliegenden Toxizitätsmodellen, organ- bzw. lokalisationsspezifisch, ist dies an der Herunterregulation von entsprechenden organ- bzw. lokalisationsspezifischen Genen zu sehen – es kommt zu Verlust der Gewebespezifität. Nach Cp-induzierter Schädigung gehörten dazu allgemein in der Niere exprimierte Gene, die mit der Ionenhomöostase, Zelladhäsion und Membrantransport assoziiert sind und/oder tubulusspezifisch exprimiert werden. Eines der Gene, *Ca²⁺-dependent activator for secretion protein 2* (*Cadps2*), war im Vergleich zur NTS-induzierten Glomerulonephritis spezifisch herunterreguliert; dies entspricht dessen Expression, die neben anderen Organen in der Niere nur in proximalen Tubuluszellen nachgewiesen wurde (Sadakata et al., 2007). Ein anderes für distale Nierentubuli spezifisches Gen, *Calbindin 1* (*Calb1*), war ebenfalls herunterreguliert. Dies könnte mit einer nicht exklusiven Schädigung der proximalen Nierentubuli durch Cp oder einer sekundären Schädigung der distalen Tubuli erklärt werden. In Mäusen und Chemotherapiepatienten wurde eine Schädigung der distalen Tubuli nach Cp-Behandlung festgestellt (Takashi et al., 1996; van Angelen et al., 2013). Weiterhin war *Calb1* in der Niere von Ratten nach einseitiger Ureterobstruktion oder induzierter Glomerulonephritis ebenfalls herunterreguliert (Iida et al., 2013).

Calb1 wurde im Zusammenhang mit posttranskriptioneller Regulation durch miRNAs als von miR-34a negativ regulierte mRNA identifiziert. Diese miRNA ist selbst ein bekanntes p53 Zielgen (Hermeking, 2012; Siemens et al., 2011) und passend dazu hier hochreguliert. Erhöhte miR-34a Level könnten zu verringerten *Calb1* mRNA Level beigetragen haben, assoziiert mit potentielltem Verlust der Gewebespezifität und der p53 vermittelten Apoptose. Eine Cp-abhängige miR-34a Hochregulation wurde auch im durchgeführten *in vitro* Experiment mit NRK-

52e Zellen nachgewiesen, was den Ergebnissen in isolierten proximalen Tubuluszellen aus Mäusen und in der Mäuseniere *in vivo* entspricht (Bhatt et al., 2010). Auch die Hochregulation von miR-429, einem Mitglied der miR-200 Familie und ebenfalls p53 Zielgen (Kim et al., 2011), war wahrscheinlich an verringerten mRNA Level weiterer gewebespezifischer Gene beteiligt, z.B. Phosphoserinphosphatase (Psp), welches mit der Aminosäuresynthese assoziiert ist. Es könnte dementsprechend vermutet werden, dass hier hochregulierte miRNAs in den Dedifferenzierungsprozess involviert sind, indem sie die Expression von mRNAs negativ regulieren, deren entsprechende Proteine für die Gewebekomöstase verantwortlich sind. Da aber Versuche mit miR-34a antisense Oligonukleotiden eine erhöhte Cp-induzierte Zytotoxizität zeigten, die ebenso für eine zytoprotektive Rolle von zumindest miR-34a sprechen würden, zeigen die identifizierten miRNA Ziel-mRNAs wahrscheinlich nur einen Ausschnitt der pleiotropen miRNA Effekte.

Parallel zur Schädigung wurden auch Gene hochreguliert, die mit Detoxifikation assoziiert sind, wodurch z.B. Cp eliminiert und die Schädigung aufgehoben bzw. regeneriert werden könnte. Wie anfangs dargelegt, trägt diese Metabolisierung auch zur Entstehung von reaktiven Metaboliten bei, welche dann kontraproduktiv im Sinne eines Regenerationsprozesses sind. Es wurden Gene hochreguliert, die für Enzyme der Phase I kodieren, wie z.B. das *Cytochrom P450 1B1* (Cyp1b1) und die *Epoxidhydrolase 1* (Ephx1, auch bekannt als mikrosomale Epoxidhydrolase, mEh). Diese zwei Enzyme könnten für den negativen Effekt der Cp-Metabolisierung mitverantwortlich sein. Bei einem anderen Mitglied der CYP-Familie, dem CYP2E1, wurde gezeigt, dass in einer proximalen Tubuluszelllinie aus Schweinenieren nach Cp Behandlung durch CYP-Inhibitoren weniger Wasserstoffperoxid gebildet wurde und die Cp-induzierte Zytotoxizität geringer war (Liu et al., 2002). Eine Inhibition der freien Epoxidhydrolase verringerte die Cp-induzierte Nierenschädigung in Mäusen (Parrish et al., 2009). In der Cyp1b1 mRNA wurden homologe Sequenzen zur herunterregulierten miR-182 identifiziert, was zur Hochregulation des Cyp1b1 beigetragen haben könnte. Cp induzierte auch die Expression von *Glutathion-S-transferase P1* (Gstp1), welches für ein Phase II Enzym kodiert. Erhöhte Expression von Gstp1 wurde in mehreren Zelllinien beobachtet, die eine Cp-Resistenz entwickelten (Kalinina et al., 2012). Weiterhin wurde die Gstp2 Isoform als hochregulierter Marker nach Cp-induzierter Nephrotoxizität identifiziert (Thompson et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen eine Detoxifizierungsfunktion der GSTPs vermuten. Andererseits wurde eine Bioaktivierung von Cp durch die GSTp Isoformen vermutet, da Mäuse, die defizient für beide Gstp Gene waren, weniger sensitiv gegenüber Cp-induzierter Nephrotoxizität waren als wildtypische Mäuse (Townsend et al., 2009). Wahrscheinlich treten beide Möglichkeiten auf und sind abhängig vom zellulären Kontext, z.B. der Menge an Cp in der Zelle und der Aktivität anderer metabolisierender Enzyme. Einen tatsächlich positiven Effekt im Sinne der Detoxifikation könnte die Hochregulation der Gene ha-

ben, die für unterschiedliche Efflux Proteine kodieren,. Eines der am frühesten hochregulierten Gene sogar nach Verabreichung der niedrigeren Cp Dosis, war das *Mutli drug resistance 1* (Mdr1b, Abcb1b). Gene der Abc-Familie sind häufig an der Resistenz von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika beteiligt, indem sie für Transporter kodieren, die die Substanz aus der Zelle „herauspumpen“ (Tan et al., 2000). Eine erhöhte Genexpression von Mdr1b wurde in Mäuse- und Rattennieren nach Cp-Verabreichung bereits beschrieben (Aleksunes et al., 2008; Huang et al., 2001). Parallel wurde in beiden Studien und in der eigenen Rattenstudie eine Herunterregulation des *Organic cation transporter 2* (Otc2) gemessen, der spezifisch in den proximalen Tubuli exprimiert wird, wobei das OCT2 Protein wahrscheinlich für die aktive Aufnahme von Cp verantwortlich ist (Ciarimboli et al., 2005; Yonezawa et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass vielleicht eine schützende Anpassung stattgefunden hat, indem die Cp-Aufnahme gesenkt und der Austransport erhöht wurde. Jedoch gibt es bisher keinen Nachweis für eine Interaktion von Cp mit diesen beiden Transportern und die Herunterregulation von Oct2 könnte auch auf den Verlust der Gewebespezifität zurückgeführt werden.

Sinngemäß der Detoxifikation folgend schließt sich die Regeneration an, die einerseits durch die Detoxifikation ermöglicht wird und andererseits auch parallel zur Schädigung induziert wird, wodurch geschädigtes Gewebe ersetzt werden kann. Indirekt dazu gehört auch die Kategorie der mit Proliferation assoziierten Gene. Die „regenerativen“ Gene kodieren für intrazelluläre Transportproteine, Komponenten des Protein Metabolismus und Zelladhäsionsproteine. Hier hervorzuheben ist das insgesamt am stärksten deregulierte Gen *Kidney injury molecule 1* (Kim-1, Havcr1), welches in den Nieren aller Cp behandelten Ratten zu jedem Untersuchungszeitpunkt sehr stark hochreguliert war. Ein Anstieg der Kim-1 Genexpression wurde erstmalig in post-ischämischen Rattennieren nachgewiesen (Ichimura et al., 1998). In derselben Studie wurde gezeigt, dass im gesunden Nierengewebe das KIM-1 Protein kaum vorhanden war und nach Schädigung im proximalen Tubuluszellen sowie im Urin anstieg. Diese Beobachtungen wurden darauf in vielen weiteren Studien für diverse Nierenpathologien in Tieren und im Menschen bestätigt (Chiusolo et al., 2010; McDuffie et al., 2010; Vaidya et al., 2008; van Timmeren et al., 2006; Zhou et al., 2008) und führten zur Qualifizierung von KIM-1 als sensitiver und spezifischer BM im Urin für Schädigungen der proximalen Nierentubuli (Vaidya et al., 2010). Die Funktion von KIM-1 ist noch nicht eindeutig geklärt. Eine Beteiligung an der Regeneration wird vermutet, da sich die KIM-1 Lokalisation in proximalen Tubuli mit der in dedifferenzierten regenerierenden Epithelzellen deckt und die abgespaltene extrazelluläre Domäne, die je eine Immunoglobulin- und Mucin-ähnliche Domäne enthält, Adhäsionsmolekülen ähnelt (Bailly et al., 2002; Ichimura et al., 1998). Zusätzlich wurde in Rattennieren, in primären Ratten Tubuluszellen sowie an Schweine und Kanninchen Epithelzelllinien gezeigt, dass Epithelzellen apoptotische Zellen phagozytieren, die sie mittels KIM-1 und dem auf apoptotischen Zellen exprimierten

Phosphatidylserin erkennen (Ichimura et al., 2008). Das heißt KIM-1 könnte Epithelzellen ermöglichen, im geschädigten Gewebe als semi-professionelle Phagozyten zu agieren. Dieses würde auch zu Genexpressionsdaten passen, die zeigen, dass nach Nephrotoxin-induzierter Schädigung und einer transienten Hochregulation von KIM-1, eine Kim-1 Herunterregulation parallel zu Rückkehr zur normalen Epithelzell Morphologie zu beobachten ist (Maguire et al., 2013).

NTS-induzierte Glomerulonephritis

Kim-1 war, wie nach Cp-Behandlung auch, das am stärksten hochregulierte Gen in Nieren von Ratten, denen NTS verabreicht und so eine Glomerulonephritis (GN) ausgelöst wurde. Bei diesem Modell wurden WKY und SD Ratten mit NTS aus Schafen, welches Antikörper (Ak) gegen die glomeruläre Basalmembran (GBM) enthält, behandelt. Nach 14 Tagen führte dies zu vergrößerten Glomeruli, mit mehr Zellen, mehr extrazellulärer Matrix (ECM) und einer Hyperplasie des Bowman'schen Kapselepipithels sowie vermutlich sekundär induzierten degenerativen bzw. regenerativen Veränderungen der Tubuli.

Da die geschädigten Glomeruli ihrer Filtrationsfunktion nicht mehr nachkommen können, ist der Primärharn mit diversen Plasmaproteinen überladen, die normalerweise nicht oder nur in sehr kleinen Mengen dort vorkommen, sodass der nachgeschaltete Tubulusapparat mit der Rückresorption überlastet wird. Andere GN Modelle führten zu ähnlichen Befunden (Togashi et al., 2013b). Aus *in vitro* Experimenten ist bekannt, dass sich Proteinurie negativ auf proximale Tubuluszellen auswirkt, da die Verabreichung von Plasmaproteinen, wie z.B. Albumin, die Expression proinflammatorischer und profibrotischer Mediatoren in jenen induziert (Drumm et al., 2002; Tang et al., 2003; Zoja et al., 1995). Dabei wird vermutet, dass nicht das Albumin an sich toxisch ist, sondern die daran gebundenen Fettsäuren, die dann in den Tubuluszellen metabolisiert werden (Arici et al., 2002; Kees-Folts et al., 1994). Diese Ergebnisse führen zu folgenden möglichen Interpretationen. Erstens scheint die tubuläre Schädigung eine Folge der glomerulären Schädigung zu sein. Zweites ließe sich die beobachtete tubuläre Degeneration auf den drastischen Anstieg der Proteinmenge im Urin zurückführen, der ebenfalls in Folge der NTS Verabreichung beobachtet wurde. Drittens sind die Hochregulation des Kim-1 Gens sowie der Anstieg des KIM-1 Proteins im Urin mit der Schädigung der proximalen Tubuli zu erklären, welche bei geringgradiger Schädigung histologisch eindeutig lokalisiert wurde. Hier ist jedoch einschränkend hervorzuheben, dass im Mausmodell für diabetische Glomerulopathie auch in den Glomeruli und in glomerulären Rattenepithelzellen *in vitro* nach Verabreichung von Albumin, ein Anstieg der Kim-1 mRNA und des Proteins nachgewiesen wurde (Zhao et al., 2011).

Proteinurie induziert in proximalen tubulären Zellen auch die Expression des *Transforming growth factor beta 1* (Tgfb1), wobei TGFβ1 zur Akkumulation von Transgelin (Tagln, auch bekannt als *smooth muscle protein 22 α*, SM22α) positiven Myofibroblasten und dadurch zur Fib-

rose führt (Abbate et al., 2002; Wolf et al., 2004). TGF β wurde wegen vielen ähnlichen Ergebnissen als das Hauptzytokin der Nierenfibrose beschrieben (Stahl and Felsen, 2001). Im untersuchten Modell der NTS-induzierten GN waren die Gene für Tgfb2, eine von drei Tgfb Isoformen, das Tagln sowie viele Collagengene spezifisch im Vergleich zur Cp-induzierten tubulären Schädigung hochreguliert, was histopathologisch als regenerative Veränderung der Tubuli gedeutet wurde und einer beginnenden Nierenfibrose entsprechen könnte.

Fibrotische Veränderungen sind ein allgemeines Merkmal der fortschreitenden GN und gekennzeichnet durch die Aktivierung von residenten Makrophagen nach dem initialen Signal, dem hier die fremden Ak gegen die GBM entsprechen. Daher sind sie nicht auf das tubuläre Interstitium beschränkt. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommt es zur Infiltration von Monozyten, welche wiederum weitere proinflammatorische und profibrotische Zytokine wie Tgfb freisetzen (Lan, 2011). Final werden von aktivierten Fibroblasten große Mengen an Proteinen der ECM gebildet, die den Aufbau und somit die Funktion der Niere negativ beeinflussen. Weitere Hinweise liefert der nachgewiesene Anstieg von Tgfb2 im Mesangium in einem anderen Rattenmodell für GN (Hartner et al., 2003) sowie epithelial-mesenchymale Transition (EMT), die sowohl proximale Tubulus- wie auch glomeruläre Epithelzellen TGF β -abhängig vollziehen können, und welche in der GN auch zur Entstehung von Fibroblasten beiträgt (Abbate et al., 2002; Marshall et al., 2011).

Bei diesen mit Fibrose assoziierten Veränderungen der Genexpression, scheinen miRNAs maßgeblich beteiligt zu sein. Die Mehrheit der miRNAs, die mRNAs für Tgfb2 oder Colagenketten in negativer Weise regulieren könnten, waren herunterreguliert, sodass sie vermutlich indirekt zu vermehrter ECM und fibrotischen Veränderungen beigetragen haben. Zusätzlich war 14 Tage nach der Verabreichung der höchsten NTS Dosis miR-132-3p hochreguliert, was wahrscheinlich zur Verringerung der, als NTS-spezifisch deregulierten, *Matrix metalloproteinase 9* (Mmp9) mRNA geführt haben könnte. MMPs sind die wichtigsten Regulatoren der ECM Degradation und in WKY Ratten konnte für die Mmp9 eine nahezu ausschließliche Expression in den Glomeruli nachgewiesen werden (Kuroda et al., 2004; Vu and Werb, 2000). Kuroda et al. konnten weiterhin zeigen, dass die Mmp9 Expression im Mesangium im Verlauf einer ebenfalls NTS-induzierten Glomerulonephritis anstieg, um dann am Tag 14 wieder zu sinken. Dieses entspricht überwiegend den Beobachtungen im vorliegenden Glomerulonephritismodell: am Tag 14 war die Mmp9 Expression in den niedrigen Dosen hochreguliert und in der höchsten Dosis herunterreguliert. Die Hochregulation ist wahrscheinlich eine Reaktion auf die ECM-Induktion, wodurch Auf- und Abbau im Gleichgewicht gehalten würden. Eine schützende Funktion gegen die Überproduktion der ECM während einer GN wurde in Mmp9-defizienten Mäusen postuliert, da diese nach Veranreichung von NTS schwerere glomeruläre Schäden aufwiesen als Wildtyp Mäuse (Lelongt et al., 2001). Ab einem bestimmten Punkt kippt vermutlich das Verhältnis hin zum alleinigen Aufbau von ECM: durch die in dieser Studie beobachtete Induktion des *Tissue inhibitor of*

metalloproteinase 1 (Timp1) könnte MMP9 inhibiert worden sein, während zusätzlich die Mmp9-Expression post-transkriptional durch miR-132-3p gehemmt wurde.

Die beobachtete erhöhte Expression von miR-21 im GN-Modell parallel zur Hochregulation bekannter Fibrose-assoziiierter Gene, wie Col1a1, Fn, Tgfb und Tagln, kann als weiterer Hinweis auf fibrotische Veränderungen interpretiert werden. MiR-21 wird in vielen Geweben exprimiert, ist aber in der Niere angereichert. Außerdem ist die miR-21 Sequenz zwischen Maus, Ratte und Mensch konserviert (Landgraf et al., 2007). Eine Rolle von miR-21 bei der Fibrose wurde zunächst in Zellen der glatten Muskulatur nachgewiesen, indem gezeigt wurde, dass TGFβ1 das Prozessieren der pre-miR-21 über die Induktion der RNase III Drosha fördert (Davis et al., 2008). Ein TGFβ-abhängiger Anstieg der miR-21 Expression konnte *in vitro* in Mesangial- und NRK-52e-Zellen von Ratten sowie *in vivo* in der Rattenniere nach der Induktion mesangialer GN oder nach einseitiger Ureterobstruktion nachgewiesen werden (Denby et al., 2011). In Mäusen mit diabetischer Nephropathie, welche ebenfalls durch eine starke ECM Akkumulation gekennzeichnet ist, konnte gezeigt werden, dass miR-21 im Vergleich zu normalen Mäusen deutlich höher in der Niere exprimiert war und dass die Expression positiv mit der von Timp-1 und Col4 und negativ mit der von Mmp9 korrelierte (Wang et al., 2013a). In Mäusen mit einseitiger Ureterobstruktion führte der miR-21 Anstieg zur Entwicklung von Nierenfibrose, wobei sich die Lokalisation der miR-21 in der Niere mit dem fibrotischen Gewebe deckte. Weiterhin führte eine Überexpression von miR-21 in primären Nierenfibroblasten zur erhöhten Tagln (SM22α) Expression, welche charakteristisch ist für Myofibroblasten (Chung et al., 2013; Glowacki et al., 2013).

Neben fibrotischen Veränderungen ist die GN vor allem durch eine starke Immunreaktion gekennzeichnet, welche wiederum auch maßgeblich an fibrotischen Veränderungen beteiligt ist. Wie in der Einleitung beschrieben, werden dabei Komponenten des angeborenen wie auch des adaptiven Immunsystems aktiv. Da es in der GN-Studie jedoch nur einen Nekropsiezeitpunkt gab, konnte der zeitliche Verlauf auf Genexpressionsebene leider nicht nachverfolgt werden.

Im Glomerulus kommt es nach der Injektion von NTS direkt zu Ablagerungen der heterologen anti-GBM Ak, wobei bereits nach kurzer Zeit eine Anhäufung von Thrombozyten und Komponenten des Komplementsystems sowie infiltrierte Leukozyten nachgewiesen werden konnten (Tam et al., 1999). Im vorliegenden GN-Modell waren auch noch nach 14 Tagen Gene des angeborenen Immunsystems in der Niere hochreguliert. Dazu gehörten die bereits bei der Cp-induzierten Nephrotoxizität beschriebenen Gene, die für Proteine der Akuten-Phase kodieren, wie LCN2 und FGα/β/γ, welche an der Blutgerinnung beteiligt sind, oder wie ICAM1, welches als Adhäsionsmolekül eine Rolle bei der Invasion von Leukozyten in das Gewebe spielt.

Eine Aktivierung des Komplementsystems, welches an der angeborenen wie auch adaptiven Immunantwort beteiligt ist, wurde durch die Hochregulation der Gene für C1q $\alpha/\beta/\gamma$, C2, C4 und C6 bestätigt, die bei der Cp-induzierten Schädigung nicht gesehen wurden. Diese Komplementkomponenten lassen den klassischen Weg der Komplement-Aktivierung vermuten, bei dem das C1q an Antigen-gebundene Ak bindet, die Komplementkaskade ausgelöst wird und weitere Leukozyten, insbesondere Makrophagen und Fibroblasten angezogen werden (Cunningham and Quigg, 2005). Mit Hilfe von C6-defizienten Ratten konnte gezeigt werden, dass die terminalen Produkte der Komplementkaskade eine wichtige Rolle bei NTS-induzierter GN spielen (Nangaku et al., 1997). Das Gen der C6 Komponente war in WKY hoch- und in SD Ratten herunterreguliert, was ursächlich zum Unterschied in der Ausprägung der GN zwischen den Rattenstämmen beigetragen haben könnte. Wie bereits bei der Cp-induzierten Stressantwort beschrieben, war das Clu Gen auch im hier untersuchten GN-Modell hochreguliert. Das CLU Protein ist u.a. als Gegenspieler des Komplementsystems beschrieben worden und hat vermutlich eine schützende Rolle bei der GN (Yamada et al., 2001).

Das Vorhandensein von *Cluster of Differentiation* (CD) 4+ und CD8+ T-Zellen im Leukozyteninfiltrat der Glomeruli und von autologen Ak stellen die adaptive Immunreaktion während der GN dar (Huang et al., 1997; Tam et al., 1999). Dafür muss eine vorangegangene Phagozytose der heterologen Ak durch dendritische Zellen (DZ, Makrophage aus infiltrierten Mononukleären Zellen entstanden) stattgefunden haben, die dann das prozessierte Antigen auf ihrem *Major Histocompatibility Complex* (MHC) II präsentieren. Damit können DZ als Antigen-präsentierende Zellen naive CD4+, d.h. T-Helfer (Th0) Zellen aktivieren, die dann als Th1-Zellen über diverse Zytokine weitere Makrophagen anlocken und ihre Phagozytenleistung sowie die Antigenpräsentation stimulieren, oder Th0 zur Differenzierung in Th2 Zellen treiben, die wiederum B-Zellen aktivieren und somit zu Herstellung der autologen Ak führen (Kahl et al., 2010). Der MHCII Komplex wird beim Menschen durch HLA Gene und bei Ratten durch die homologen Rt1 Gene kodiert. Eine unterschiedliche Anfälligkeit für GN wurde bei unterschiedlichen Ratten- und Mäusestämmen beobachtet sowie beim selben Rattenstamm mit unterschiedlichen Rt1 Haplotypen (Reynolds, 2011; Reynolds et al., 1998). Dies lässt vermuten, dass MHC II Moleküle eine wichtige Rolle bei der GN Entstehung spielen. In der vorliegenden Studie waren die WKY deutlich empfindlicher und zeigten eine einheitlichere Reaktion auf NTS Verabreichung als SD Ratten. Dies wurde auch bei früheren Studien mit SD, Lewis, F344, Wistar-King A, *spontaneously hypertensive* und WKY Ratten beobachtet (Kanno et al., 1998; Kawasaki et al., 1992). In der vorliegenden Genexpressionsanalyse zeigte sich für Rt1-Bb eine differenzielle Expression in WKY und SD Rattennieren. Das Rt1-Bb Gen kodiert für die β -Kette des MHC Klasse II RT1.B Moleküls und war in WKY deutlich hoch- und in SD Ratten herunterreguliert, sodass vielleicht eine

stärkere und anhaltende zelluläre Reaktion des adaptiven Immunsystems in WKY zu einer einheitlicheren und schwerwiegenderen GN geführt hat.

Zusammenfassend konnte die Genexpressionsanalyse der zwei Nephrotoxizitätsmodelle bereits beschriebene Mechanismen im Detail aufzeigen und die histopathologischen Befunde in einen molekularen Zusammenhang stellen. Bei der Cp-induzierten Nephrotoxizität stand die Reaktion auf Stress und DNA-Schädigung gefolgt vom Verlust der Gewebespezifität im Vordergrund. Parallel wurden die Gene der Detoxifikationsenzyme-kodierende Gene hochreguliert, welche dann nicht nur zur Eliminierung des Fremdstoffes, sondern, durch die Produktion von reaktiven Metaboliten, zur Stressesteigerung beitrugen. Im Vergleich dazu war das Genexpressionsprofil der Nieren nach NTS-induzierter Glomerulonephritis vor allem durch eine drastische Immunreaktion und durch Hinweise auf fibrotische Veränderungen gekennzeichnet. Dabei zeigte sich der einzige qualitative Unterschied zwischen dem WKY und SD Rattenstamm in der Expression des MHC II Gens, Rt1-Bb und des C6 Gens. Die große Anzahl gleichermaßen Cp- und NTS-abhängig deregulierter Gene lässt sich einerseits auf das gleiche Organ und andererseits auf die ebenfalls in der GN auftretende sekundäre tubuläre Schädigung zurückführen. Zu den jeweils deregulierten Genen wurden einige in der Gegenrichtung deregulierte miRNAs identifiziert. Entsprechend der von ihnen potentiell regulierten mRNAs und der Proteine für die sie kodieren, scheinen miRNAs an diversen Signalwegen aktiv beteiligt zu sein.

4.1.2 Hepatotoxizitätsmodell

Neben der Nieren-, stand auch die Lebertoxizität im Fokus dieser Arbeit. Für das Hepatotoxizitätsmodell wurden Han Wistar Ratten täglich mit zwei unterschiedlichen Dosen MPy, 30 und 80 mg/kg, behandelt. Nach 4, 8, und 15 Tagen sowie 10 Tage nach Behandlungsende (Tag 24) wurde die Leber histopathologisch untersucht. Wie erwartet wurden eine dosis- und zeitabhängige Nekrose, Inflammation, Gallengangs Hyperplasie und ein Anstieg der Zahl der mitotischen Zellen detektiert. Nach zehntägiger Regenerationsphase waren kaum mehr Veränderungen zu sehen. Vergleichbare histopathologische Befunde wurden bereits für Lebern von F344, SD und Wistar Ratten nach MPy Verabreichung beschrieben (Cunningham et al., 1995; Ellinger-Ziegelbauer et al., 2005; Hamadeh et al., 2002).

Wie in der Einleitung beschrieben, ist MPy ein nicht-genotoxisches Hepatokanzerogen in Ratten, dessen Wirksamkeit auf eine intensive Metabolisierung in der Rattenleber zurückzuführen ist. Gene für Detoxifikationsenzyme gehörten nach MPy-Verabreichung zu den frühesten und auch nach der niedrigen Dosis hochregulierten Genen. Phase I Enzyme, die z.B. von den Genen Cyp4b1 und Cyp2c12 kodiert werden, könnten u.a. für reaktive MPy-Metaboliten verantwortlich sein und wurden auch in anderen Genexpressionsanalysen als dereguliert identifiziert

(Craig et al., 2006; Hamadeh et al., 2002). Die reaktiven Metaboliten könnten zur Entstehung von oxidativen Stress geführt haben, gekennzeichnet durch den Anstieg von Genen deren Genprodukte mit oxidativem Stress assoziiert sind, wie z.B die Detoxifikationsenzyme *Aflatoxin B1 aldehyde reductase* (Akr7a3) und α GST2 sowie *Metallothionein 2* (Mt2) und *B-cell translocation gene 3* (Btg3). Auch p53 Zielgene, wie p21 und Ccng1, waren durch MPy hochreguliert. Dies könnte auf eine DNA Schädigung hinweisen, da vor allem die Hochregulation von p53 Zielgenen für genotoxische Substanzen typisch ist. Jedoch führte die MPy Behandlung auch zur Hochregulation des Gens *Apurinic/aprimidinic endonuclease 1* (Apex1), welches für ein Protein kodiert das an der Reparatur von oxidativen DNA Schäden beteiligt und charakteristisch bei nicht-genotoxischen Kanzerogenen hochreguliert ist (Ellinger-Ziegelbauer et al., 2005). Dies lässt vermuten, dass reaktive MPy-Metaboliten über oxidativen Stress zur DNA-Schädigung und so zur Aktivierung von p53, gefolgt von der Induktion von p53-Zielgenen, geführt haben. Ebenfalls Stress fördernd könnte auch eine Schädigung der Mitochondrien gewesen sein, hier repräsentiert durch die Herunterregulation von Genen, die für mitochondriale Proteine kodieren: *D-beta-hydroxybutyrate dehydrogenase* (Bdh) und *Pyrophosphatase 2* (Ppa2).

Die Schädigung führte zum einem zur Induktion pro-apoptotischer Gene, wie Bax und Casp4/12, und zum Verlust der Gewebespezifität durch Herunterregulation leberspezifischer Gene, wie *Hepatic lipase* (Lipc) und *Organic anion transporting polypeptide 4* (Oatp4), was letztlich in der histopathologisch gesehenen Nekrose mündete. Zum anderen führten Stress und geschädigtes Gewebe auch zur Inflammation, die histopathologisch durch infiltrierte Monozyten gekennzeichnet wurde. Dazu gehörten auf Genexpressionsebene Gene für Akute-Phase-Proteine, wie *Murinoglobulin 1* (Mug1, auch bekannt als *Alpha-1 proteinase inhibitor 3*) oder *Fetuin β* (Fetub) oder das *Chemokine (C-X-C motif) ligand 16* (Cxcl16), welches mit der Regulation der T-Lymphozyten Infiltrierung nach inflammatorischer Leberschädigung assoziiert wird (Xu et al., 2005).

Parallel scheinen regenerative Prozesse eingeleitet worden zu sein, da Zellzyklus assoziierte Gene, z.B. *Cyclin D1* (Ccnd1) und *Tubulin β 5* (Tubb5), und Proliferations-assoziierte Gene, wie *Fibroblast growth factor 21* (Fgf21) und *Galactose-specific lectin 3* (Lgals3), hochreguliert waren; histopathologisch war eine erhöhte Anzahl mitotischer Zellen beobachtet worden. Ebenso wurden Gene hochreguliert, die mit Regeneration und struktureller Umgestaltung assoziiert sind, die histopathologisch während der zweiwöchigen MPy Verabreichung zur Gallengangs Hyperplasie geführt haben könnten. Bei einer fortdauernden Verabreichung führt dies zur regenerativen Hyperplasie und sehr wahrscheinlich zum Hepatokarzinom. Von Ratten, die über ein Jahr täglich mit 20-30 mg MPy behandelt wurden, entwickelten fast alle Leber Neoplasien und zwar hauptsächlich Leberzell- (*hepatocellular carcinoma*, HCC) und Gallengangskarzinome (Lijinsky et al., 1980).

Im untersuchten Rattenmodell fanden sich auch bereits nach zweiwöchiger MPy-Verabreichung erste Hinweise auf Prozesse, die eine Tumorentwicklung unterstützen könnten. Ein Beispiel wären zwei Gene, die von Lebersternzellen exprimiert werden: *Cysteine-rich protein 2* (*Csrp2*, auch bekannt als *Smooth muscle cell LIM protein*) und *S100 calcium binding protein A11* (*S100a11*). Lebersternzellen sind im normalen Lebergewebe in ruhendem Zustand, werden dann aber nach Schädigung aktiviert. Sie proliferieren, differenzieren zu Myofibroblasten und bilden die Hauptquelle für ECM Proteine in der Leber. Weiterhin sezernieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren, die Proliferation und Regeneration von hepatischen Endothelzellen und Hepatozyten fördern (Yin et al., 2013). In der Leber wurde die Expression von *Csrp2* exklusiv in Lebersternzellen nachgewiesen, die durch Wachstumsfaktoren aktiviert wurden (Weiskirchen et al., 2001). Zudem wurde es in mehreren humanen HCC als spezifisch hochreguliertes Gen im Vergleich zu normalem Gewebe identifiziert (Midorikawa et al., 2002). Die Expression von *S100a11* wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in aktivierten Lebersternzellen nachgewiesen (Kristensen et al., 2000). Andere Beispiele wären Gene, die direkt mit Tumorgenese bzw. HCC assoziiert werden, wie *Bystin* (*Bysl*), *Coxsackie virus and adenovirus receptor* (*Cxadar*, *Car*) oder *Regulator of G-protein signaling 5* (*Rgs5*) (Chen et al., 2004; Wang et al., 2009a; Yamamoto et al., 2010).

In diesem Zusammenhang kann auch die Rolle von miR-122 betrachtet werden. MiR-122 ist in vielen Vertebratenspezies konserviert, leberspezifisch exprimiert und an der Leberentwicklung sowie –homöostase beteiligt (Chang et al., 2004; Filipowicz and Grosshans, 2011; Xu et al., 2010). Untersuchungen an humanen HCC Biopsien, humanen HCC Zelllinien und Ratten zeigten eine geringe miR-122 Expression im Vergleich zu entsprechenden Normalkontrollen (Burchard et al., 2010; Coulouarn et al., 2009; Kutay et al., 2006), so wie es hier nach MPy Behandlung beobachtet wurde. Entsprechend waren die bekanntermaßen von miR-122 regulierten mRNAs für *Ccng1* und *Aldolase a* (*Aldoa*) hochreguliert, die beide bereits mit HCC assoziiert werden. Die negative Regulation der *Ccng1* mRNA durch miR-122 wurde *in vitro* und in HCC Biopsien bestätigt (Fornari et al., 2009). Auf der Suche nach Glykolyse assoziierten Genen, deren erhöhte Expression ein Kennzeichen von Neoplasien darstellt, wurde *Aldoa* als verstärkt exprimiert in humanen HCC Biopsien gefunden (Hamaguchi et al., 2008). In F344 Ratten, die drei Monate lang mit einer sehr hohen MPy-Dosis behandelt wurden, war miR-122 keine der signifikant deregulierten miRNAs in der Leber (Koufaris et al., 2012). Dieses scheint widersprüchlich könnte jedoch daran liegen, dass die Herunterregulation im hier untersuchten Modell sehr gering war. Anhand der beschriebenen Untersuchungen, die eine verringerte miR-122 Expression mit HCC assoziieren, kann aber angenommen werden, dass auch eine geringe Deregulation dieser leberspezifischen miRNA zur Entartung führen könnte. Allerdings kann eine passive Verringerung der miR-122 Menge aufgrund der Schädigung des Gewebes, d.h. Degr-

dation, nicht ausgeschlossen werden. Ebenfalls die mit Tumorgenese assoziierte miR-34a war hier hochreguliert, wobei Koufaris et al. dies auf den persistenten oxidativen Stress und die damit verbundene p53-abhängige erhöhte Expression der miR-34a zurückführten. Durch die Beteiligung von miR-34a an der Induktion eines Zellzyklusarrests ist diese häufig in Karzinomen herunterreguliert (Hermeking, 2009). Die Hochregulation nach MPy Verabreichung könnte daher einen zumindest transienten schützenden Effekt haben. Jedoch wurden in der MPy-Studie keine herunterregulierten mRNAs identifiziert, die durch miR-34a reguliert werden und gleichzeitig Zellzyklusarrest-assoziiert sind.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Genexpressionsanalyse der Leber nach MPy Behandlung vielen bereits beschriebenen Mechanismen nicht-genotoxischer Hepatokanzern und den histopathologischen Befunden entsprach. Des Weiteren konnte auch ein potentiell Mitwirken von miRNAs bei MPy-abhängig veränderter Genexpression gezeigt werden.

4.2 Biomarker Evaluierung

Die Toxizitätsmodelle wurden, neben der Genexpressionsanalyse, die zum Verständnis der molekularen Abläufe bei Nieren- und Lebertoxizität beitragen sollte, primär für die Evaluierung von Biomarker (BM) eingesetzt. Im Folgenden werden zunächst bereits bekannte Harnprotein-BM für Nierenschädigung mittels der zwei Nephrotoxizitätsmodelle bewertet, einen Messmethodenvergleich miteinschließend, um darauf miRNAs im Urin und Plasma als neue BM zu evaluieren.

4.2.1 Re-Evaluierung von Nephrotoxizitäts-Proteinbiomarkern im Urin

Einige der gemessenen Protein-BM sind inzwischen für Nierenschäden qualifiziert, d.h. für den Einsatz in präklinischen Rattenstudien validiert und behördlich zugelassen; andere gelten noch als explorativ (vergl. Abschnitt 1.3). Bevor die Ergebnisse der Proteinbiomarker hinsichtlich ihrer Nephrotoxizitäts-Vorhersage bewertet werden, wird zunächst der Vergleich zwischen den zwei angewendeten Messmethoden diskutiert. Für die BM-Messung haben sich zwei Multiplexsysteme etabliert, das elektro-chemilumineszenz-basierte System von MesoScale Discovery (MSD) und das Bead-basierte System mit Luminex-Technologie (LMX) (vergl. Abschnitt 2.2.3). Für den Plattformvergleich wurden die Proteinbiomarker in den gleichen Harnproben mit beiden Methoden gemessen. Obwohl die jeweils gemessenen Konzentrationen eine meist starke Korrelation aufwiesen, der jeweilige relative Anstieg im Urin nach der Schädigung im Vergleich zur Kontrollgruppe qualitativ ähnlich war und insgesamt mittels beider Systeme die Nierenschädigung an sich detektiert werden konnte, waren die absoluten Konzentrationen, mit Ausnahme der KIM-1 und OPN Messungen, nicht vergleichbar. Für die restlichen mit beiden Plattformen ge-

messenen BM, NGAL, α GST, CLU und β 2M, lieferten die Messmethoden deutlich unterschiedliche absolute Konzentrationen im Urin. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass LMX systematisch höhere Konzentrationen misst als MSD. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch Proteinbiomarkermessungen mit beiden Plattformen in anderen Nephrotoxizitätsmodellen (John-Baptiste et al., 2012; Sasaki et al., 2011; Swain et al., 2011) und sogar Messungen von Zytokinen, einem völlig anderen Analyt (Chowdhury et al., 2009). Auch der direkte Vergleich der gemessenen absoluten Konzentrationen der jeweiligen Plattform mit publizierten Daten zeigte keine Übereinstimmung. Dies könnte an dem unterschiedlichen experimentellen Design und den unterschiedlichen Rattengeschlechtern und -stämmen liegen, für die Unterschiede in den Proteinbiomarkern beschrieben worden (Gautier et al., 2010; Harpur et al., 2011; Pinches et al., 2012). Ferner scheinen die an sich sehr unterschiedlichen Systeme auch sehr unterschiedliche Ak bzw. Standards zu verwenden, die eine Identifikation allgemeingültiger Basallevel zum jetzigen Zeitpunkt nicht ermöglichen.

Dennoch ermöglichten beide Plattformen, wie oben erwähnt, eine Identifikation der Nierenschädigung durch die Messung relativ zur Kontrolle erhöhter Mengen im Urin behandelter Ratten, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

Die Verabreichung von Cp und NTS führte in der Rattenniere auch bei den niedrigsten Dosen zu pathologischen Veränderungen. Die etablierten BM im Blut für Nierenschädigung, Blutharnstoff-Stickstoff (BUN) und Serum Creatinin (sCrea), waren nur nach der Verabreichung der höchsten Cp-Dosis leicht am Tag 5 und maximal am Tag 8 erhöht, also nur bei einer massiven Nekrose. Die NTS-induzierte GN zeigten sie überhaupt nicht an. Die Messung des Glukosegehalts im Urin lieferte ein ähnlich insensitive Profil, während die Messung der Gesamtproteinmenge im Urin zumindest nach der NTS Verabreichung einen eindeutigen und dosisabhängigen Anstieg zeigte. Dieses passt zur Qualifizierung der Gesamtproteinmenge im Urin als BM für Nierenschädigungen, insbesondere bei glomerulären Schäden (Dieterle et al., 2010a).

Im Gegensatz dazu konnten unter den neuen Protein-BM im Urin, welche mittels MSD oder LMX gemessen wurden, nach beiden Nierenschädigungen sensitive und frühe Anstiege gemessen werden. KIM-1 war bei der Cp-induzierten tubulären Nekrose der beste BM, da er am frühesten Zeitpunkt und auch nach der niedrigeren Cp Dosis anstieg. Insgesamt war KIM-1 der einzige BM der eindeutig in den niedrigen Cp Dosisgruppen erhöht war. Dieses entspricht den Erwartungen, da KIM-1 als BM für proximalen tubulären Schaden qualifiziert wurde (Vaidya et al., 2010) und da seine Sensitivität und Spezifität für proximal tubulären Schaden in vielen Studien an männlichen und weiblichen Ratten sowie unterschiedlichen Rattenstämmen nach der Verabreichung diverser Nierentoxine, wie z.B. Gentamicin, Quecksilber, Chrom, Ochratoxin A, Cp, u.v.m., gezeigt wurde (Hoffmann et al., 2010b; Sieber et al., 2009; Swain et al., 2012;

Swain et al., 2011; Wadey et al., 2013; Zhou et al., 2008). Die Sensitivität lässt sich auf die Induktion der Genexpression bei Schädigung zurückführen (Chiusolo et al., 2010), die ebenfalls in der Genexpressionsanalyse der untersuchten Nephrotoxizitätsmodelle gesehen wurde und die zur KIM-1 Produktion mit erhöhter Abspaltung seiner Ektodomäne in den Urin einhergeht. Die Spezifität für proximalen tubulären Schaden liegt an der Induktion der Expression von KIM-1, die bereits sehr früh, d.h. 72h nach der Cp Behandlung, in der Rattenniere nachgewiesen werden konnte (McDuffie et al., 2013). Nach Puromycin induzierter glomerulärer Schädigung (Tomomura et al., 2010) oder nach Toxin-induzierter Leberschädigung (Vaidya et al., 2010) war kein Anstieg im Urin detektierbar. Letzteres passt zu den unveränderten KIM-1 Urinmengen nach MPy-induzierter Leberschädigung, wie in dieser Arbeit gefunden. Die Ergebnisse von Tomomura et al. erscheinen zunächst widersprüchlich zum KIM-1 Anstieg im Urin nach NTS-induzierter GN. Dieses liegt hauptsächlich an der bereits oben in der Diskussion der Genexpressionsanalyse erwähnten tubulären Schädigung im GN-Modell, die vermutlich sekundär in Folge der Proteinüberladung auftrat. An beiden Zeitpunkten im GN-Modell, Tag 8 und 14, hatten sich schon tubuläre Schäden manifestiert. Tomomura et al. (2010) hatten einen sehr frühen Zeitpunkt, Tag 2, untersucht, an dem vermutlich noch kein tubulärer Schaden nach Puromycin-induzierter glomerulärer Schädigung vorhanden war, sodass kein KIM-1 Anstieg im Urin gemessen wurde. Auch an dieser Stelle, wie bereits bei der Genexpressionsanalyse, muss erwähnt werden, dass KIM-1 im Rattenmodell für diabetische Glomerulopathie nicht nur in proximalen Tubuli sondern auch in den Glomeruli nachgewiesen wurde (Zhao et al., 2011). Inwieweit dies auch im GN-Modell relevant ist für den Anstieg im Urin, müsste mittels Immunohistochemie geklärt werden. Dennoch ist KIM-1 ein sensibler und spezifischer Nierenbiomarker, der auch vielversprechende Ergebnisse in klinischen Untersuchungen liefert (Endre et al., 2011; Vaidya et al., 2008).

Bei α GST, einem explorativen BM, der spezifisch für die proximal tubuläre Schädigung zu sein scheint (Gautier et al., 2010), bei NGAL und OPN, beide ebenfalls explorativ und scheinbar spezifisch für proximal und distal tubuläre Schädigung (Sieber et al., 2009; Xie et al., 2001) sowie bei CLU, einem qualifizierten BM für proximal tubuläre Schädigung (Dieterle et al., 2010a), war wahrscheinlich ausschließlich die sekundäre tubuläre Schädigung für den Anstieg im GN-Modell verantwortlich. ALB, β 2M und CysC sind qualifizierte BM für proximal tubuläre und glomeruläre Nierenschädigung, da sie frei im Glomerulus gefiltert und von den proximalen Tubuli reabsorbiert werden oder, im Falle von ALB, größtenteils nicht frei gefiltert werden und nur ein kleiner Teil die Basalmembran passiert, der dann auch in den proximalen Tubuli reabsorbiert wird (Dieterle et al., 2010a; Yu et al., 2010). Dementsprechend waren diese, nach Cp und NTS-induzierter Schädigung, im Urin angestiegen, wobei der Anstieg von ALB und β 2M im GN-Modell drastisch war. ALB und β 2M erlaubten einzeln keine eindeutige Lokalisationszuordnung des Schadens. Jedoch war es möglich in Kombination zum proximal tubulär spezifischen KIM-1,

die Lokalisation des primären Schadens zuzuordnen, in dem das Verhältnis von z.B. ALB zu KIM-1 berechnet wurde, welches nach glomerulärem (und tubulärem) Schaden relativ größer war als nach rein tubulärem Schaden. Die TIMP-1 Proteinmenge im Urin sowie die Genexpression in der Niere stieg ebenfalls nach beiden Typen von Nierenschädigungen an, der Anstieg im Urin im GN Modell war jedoch deutlich höher. TIMP-1 ist, als spezifischer Inhibitor von Metallo-matrixproteasen, am Auf- und Abbau der ECM beteiligt (Kuroda et al., 2004). Der höhere Anstieg in der GN entspricht somit der starken Veränderung der ECM dort. GST γ und CALB sind explorative BM für Schädigungen der distalen Tubuli, während RPA-1 eine Schädigung des Sammelrohres anzeigt (Price et al., 2010; Rozell et al., 1993; Takashi et al., 1996). Sie waren nach Cp Verabreichung nur sehr wenig im Urin angestiegen, was zur primär proximal tubulären Schädigung passt. Nach NTS Verabreichung wurde von diesen drei nur CALB im Urin gemessen und zeigte keine Veränderung, obwohl ein distaler Tubulischaden histologisch nicht ausgeschlossen werden kann. Dieses könnte vielleicht an den späten Untersuchungszeitpunkten nach NTS-Gabe liegen.

Zusammenfassend konnte der Vorteil der qualifizierten BM (ALB, CLU, CysC, KIM-1, RPA-1, β 2M) und das Potential einiger explorativen BM (α GST, NGAL, OPN, TIMP-1) weiter bestätigt werden, indem: 1) ein spezifischer Anstieg im Urin nach Nierenschädigung und nicht nach Leberschädigung gemessen wurde, 2) der Anstieg im Urin bei allen deutlich vor der histologisch maximalen Schädigung der Niere stattfand und 3) diese BM die Nierentoxizität deutlich sensitiver darstellten als die etablierten BM BUN und sCrea. Zusätzlich scheint es möglich, durch Kombination mehrerer BM, deren parallele Messung in einer Probe mit beiden hier verglichenen multiplex Plattformen durchführbar ist, die Lokalisation des Schadens in der Niere einzugrenzen, z.B. durch Bestimmung der relativen Verhältnisse der behandlungsbedingten Anstiege der Protein-BM im Urin.

4.2.2 Evaluierung von microRNAs im Urin als Nephrotoxizitäts-Biomarker

Die für präklinische Rattenstudien qualifizierten Proteinbiomarker für Nephrotoxizität zeigen, wie oben diskutiert, eine wesentlich bessere Sensitivität als etablierte BM. Viele haben jedoch einen essentiellen Nachteil: eine limitierte Übertragbarkeit auf andere präklinische Spezies sowie auf den Menschen. Während nur für einige, wie KIM-1, eine sehr gute Übertragbarkeit auf Maus, Hund, Affe und sogar Mensch beschrieben wurde, ist dieses bei den restlichen BM z.T. noch nicht beschrieben (Muller and Dieterle, 2009). Die mangelnde oder limitierte Übertragbarkeit ist wahrscheinlich auf diverse speziesspezifische posttranskriptionelle Modifikationen und Aminosäurevariationen des jeweiligen Proteins zurückzuführen, die nur in manchen Fällen eine Kreuzreaktivität der Detektionsantikörper ermöglichen.

4 Diskussion

Dagegen sind miRNAs in ihrer Sequenz und oftmals auch in ihrer spezifischen Organexpression in Säugetieren sehr stark konserviert (Landgraf et al., 2007; Sun et al., 2004). Ferner weisen sie weitere BM-Charakteristika auf, wie die Präsenz und Stabilität in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten, dadurch eine wenig bis überhaupt nicht invasive Gewinnung, eine Assoziation mit pathologischen Zuständen und eine sensitive Messmethode, die PCR (Blondal et al., 2012; Kroh et al., 2010; McDonald et al., 2011).

Da Urin eine nicht invasive Quelle von BM ist, in direktem Zusammenhang mit der Niere steht und da bekannt ist, dass miRNAs auch im Urin detektierbar sind (Weber et al., 2010), wurden die Urinprofile von Kontrollratten und Ratten mit Cp- oder NTS-induzierter Nierenschädigung gemessen und verglichen. Die Urinprofile zwischen diesen zeigten eindeutige und signifikante Unterschiede, die mit einem behandlungsabhängigen Anstieg von miRNAs assoziiert waren.

Die Cp-Behandlung führte über die Zeit zu insgesamt 136 signifikant veränderten, meist erhöhten, miRNAs im Urin. Die Hälfte dieser miRNAs war bereits am Tag 3, dem frühesten Zeitpunkt, nach der höchsten Cp Dosis angestiegen, was bei den Protein-BM nur für KIM-1 und α GST beobachtet werden konnte. Ihr maximaler Anstieg lag bei Tag 5, also auch vor der histologisch diagnostizierten maximalen Nekrose am Tag 8. All dies würde für miRNAs als sensitive BM sprechen. Für über ein Drittel dieser 136 miRNAs ist eine Expression in der Niere von Maus, Ratte oder Mensch beschrieben (Landgraf et al., 2007; Saal and Harvey, 2009; Sun et al., 2004). Dazu gehörte auch die im Nierencortex angereicherte miR-192 (Tian et al., 2008), deren genaue Lokalisation im Cortex, d.h. in Glomeruli wie auch proximalen Tubuli der Rattenniere mittels *in situ* Hybridisierung nachgewiesen werden konnte. Expression bzw. Lokalisation lieferten demnach Hinweise für die geschädigte Niere als Quelle der angestiegenen miRNAs im Urin. Aus den 136 miRNA wurde eine Gruppe von 18 miRNAs selektiert, die weitergehend auf ihr BM Potential untersucht wurde. Dazu gehörten u.a. in der Niere exprimierte miRNAs, wie miR-15b, -16, -21, -141, -146a, -184, -192, -193, und -200b (Saal and Harvey, 2009; Sun et al., 2004) und für die Rattenniere spezifische miRNAs, wie miR-141, -196c und -200b (Linsen et al., 2010) sowie die in dieser Studie nur im Urin behandelte Ratten detektierbaren miRNAs, wie miR-15b, -210 und -339-3p. Zusätzlich wurde auch miR-34a für weitere Untersuchungen ausgewählt, da die Expression von P53 induziert wird und miR-34a entsprechend stark in der Niere durch die P53-Aktivierung infolge der Cp-abhängige DNA-Schädigung hochreguliert war. Für 10 dieser selektierten miRNAs war dann ein Anstieg im Urin auch nach der niedrigeren Cp Dosis am frühesten Zeitpunkt messbar, was ihre Eigenschaft als sensitive BM weiter bestärkte. Fünf davon, miR-15b, -21, -34a, -192 und -210, zeigten weiterhin eine hohe Vorhersagewahrscheinlichkeit für die histologisch diagnostizierte tubuläre Nekrose in einer ROC/AUC-Analyse. Diese Analyse zeigte, dass miR-34a und -192 als BM eine vergleichbar hohe Sensitivität und Spezifität für tubuläre Nierennekrose hatten wie KIM-1, während die etablierten Nieren-BM BUN und sCrea

kaum besser waren als eine zufällige Vorhersage. Histologisch konnte die tubuläre Nekrose am frühesten Zeitpunkt in den niedrig dosierten Ratten nur in einer der untersuchten Rattennieren nachgewiesen werden. Jedoch kann angenommen werden, dass in allen Rattennieren eine leichte Nekrose vorhanden war, da am Tag 3 bereits eine Vielzahl von Genen dereguliert war, wie z.B. Kim-1, welches nur bei Nierenschädigung hochreguliert wird, und da auch die Ektodomäne des KIM-1 Proteins im Urin nachgewiesen werden konnte. Ferner lieferte der *in vitro* Versuch mit Cp behandelten NRK-52e Zellen zusätzliche Hinweise für die Sensitivität von miR-15b, -21, -34a, -192 und -210 als BM. Alle fünf miRNAs stiegen nach Cp-Behandlung im Kultivierungsmedium an, auch nach der niedrigsten Dosis, welche nur einen kleinen Einfluss auf die Zellviabilität hatte; sodass zum einen die Expression der miRNAs in Tubuluszellen aus der Rattenniere und damit eine potentielle Spezifität und zum anderen durch den frühen Anstieg ihre Sensitivität bestätigt wurde. Zusammen mit den Ergebnisse der Cp-abhängigen miRNA Expression in der Niere lässt sich also annehmen, 1) dass miRNAs aus Cp-geschädigten Zellen „aus-treten“, 2) dass im Urin oder Kultivierungsmedium, welche unter normalen Bedingungen kaum miRNAs enthalten, auch wenige geschädigte Zellen das miRNA Profil verändern können, und 3) dass nach der ersten großen freigesetzten miRNA Menge die Level im Urin *in vivo* wieder zurückgehen, außer die Expression der miRNAs wird durch die Schädigung im Gewebe induziert, siehe miR-34a. Letzteres kann bei anhaltender Schädigung für einen BM vorteilhaft sein. Im Fall der miR-34a ist dies auf die P53-abhängige Induktion zurückzuführen, die somit keinen allgemeinen BM für Nierenschädigung, sondern für genotoxische Schädigung darstellen könnte.

Im Urin der NTS behandelten Ratten waren insgesamt 74 miRNA mit behandlungsabhängig erhöhten Mengen identifiziert worden, von denen ca. ein Drittel als in der Niere exprimiert beschrieben wurde, wie miR-15b, -21, -26a oder -192. Die Schnittmenge mit den Cp-abhängig veränderten miRNAs war groß. Sogar potentiell Cp-spezifische miRNAs, d.h. miRNAs, die nach der statistischen Analyse nur nach Cp Behandlung veränderte Urinmengen hatten, wiesen auch ein erhöhtes Profil im Urin NTS-behandelter Ratten auf. Dies lässt sich, wie bereits während bei der Genexpressionsanalyse und der Protein-BM Bewertung erläutert, durch die Schädigung der proximalen Tubuli in beiden Nephrotoxizitätsmodellen, aber auch durch viele in Glomeruli und Tubuli gleichermaßen exprimierte miRNAs erklären (Kriegel et al., 2013). Jedoch zeigte der Vergleich zum Urin von MPy behandelten Ratten, d.h. Ratten mit induzierter Leberschädigung, dass bestimmte miRNAs spezifisch für die Nierenschädigung per se zu sein scheinen oder zumindest für die Cp- bzw. NTS-induzierte Schädigung; was am Beispiel der miR-192 und -21 dargestellt wurde. MiR-192 ist neben der Niere auch in der Leber exprimiert (Baskerville and Bartel, 2005) und mittels *in situ* Hybridisierung konnte eine Lokalisation im Glisson'schen Dreieck in der Leber identifiziert werden. Ein Anstieg im Plasma wurde im untersuchten Hepatotoxizitätsmodell mit MPy detektiert, jedoch war der Anstieg im Urin hier nur mit der Cp- oder

NTS-induzierten Nierenschädigung assoziiert. Im Urin von Ratten mit Acetaminophen- oder Tetrachlorkohlenstoff-induzierter Leberschädigung wurde ebenfalls kein miR-192 Anstieg gemessen (Yang et al., 2012). Ähnlich war miR-21, welche, wie oben beschrieben, in vielen Nierenerkrankungen involviert ist, auch nur im Urin der Ratten mit Nieren- und nicht mit Leberschädigung erhöht. Ratten mit reperfusionsgeschädigten Nieren hatten erhöhte miR-21 Mengen im Urin (Saikumar et al., 2012). Passend dazu wurden auch erhöhte miR-21 Mengen im Urin von Patienten mit Nephrotischem Syndrom oder diabetischer Nephropathie (Konta et al., 2013) und im Urin von Patienten mit akuter Nierenschädigung detektiert (Ramachandran et al., 2013). Ferner entsprach das miRNA-Profil im Urin dem Unterschied zwischen den zwei Rattenstämmen bei der Empfindlichkeit gegenüber NTS-induzierter Glomerulonephritis. Übereinstimmend mit histopathologischen, Proteinbiomarker- und Genexpressions-Ergebnissen, die eine stärkere Reaktion der WKY Ratten auf NTS zeigten, waren mehr miRNAs im Urin von WKY konsistent und deutlich verändert als von SD Ratten.

MiRNAs, die spezifisch für den Schaden eines Gewebekompartiments, hier der proximalen Tubuli, sein könnten, konnten aufgrund der sekundären tubulären Schädigung im GN-Modell durch einen Vergleich der Urinprofile nicht identifiziert werden. Eine kleine Gruppe von sechs miRNAs schien spezifisch für NTS-induzierte Nierenschädigung zu sein und somit vielleicht auch potentiell spezifisch für eine glomeruläre Schädigung. Um die Lokalisation im Gewebe feststellen zu können, wurden einige miRNAs mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Für miR-26a, welche nicht zur NTS-spezifischen Gruppe gehört, aber in Mäusenieren als glomerulär exprimiert beschrieben wurde (Ho et al., 2008), konnte die Vorläufer Form pre-miR-26a wie auch die reife miR-26a in der Rattenniere in Zellkernen von Tubulus- und Glomeruluszellen nachgewiesen werden. Dieses würde den Anstieg im Urin nach beiden Schädigungen erklären. Von den potentiell Glomeruli-spezifischen miRNAs wurde die Lokalisation von miR-10b und -100 in der Rattenniere ebenfalls mittels *in situ* Hybridisierung untersucht. Diese waren nicht in den Glomeruli, sondern in dem distalen absteigenden dünnen Ast der Henle'schen Schleife, dem gewundene distale Tubulusabschnitt, dem Verbindungstubulus und dem kortikalen Teil des Sammelrohres lokalisiert. Diese unerwartete Lokalisation könnte mit einer sekundären Schädigung auch des distalen Tubulusapparates, infolge der Proteinüberladung des Primärharns nach NTS-induzierter Schädigung, erklärt werden. Histologisch konnte bei höhergradig diagnostizierter tubulärer Degeneration nicht mehr zwischen proximalen und distalen Tubuli differenziert werden, sodass eine Schädigung der distalen Tubuli nicht ausgeschlossen werden kann. Dieses müsste durch immunhistochemische Untersuchung mit dem Fokus auf die Tubuli-Differenzierung und weitere *in situ* Hybridisierungs-Experimente geklärt werden.

Insgesamt konnte durch die Messung der miRNAs im Urin gezeigt werden, dass sie Potential besitzen, um als sensitive und spezifische BM für Nephrotoxizität eingesetzt zu werden. Mit Hilfe des Cp Nephrotoxizitätsmodells konnten miRNAs im Urin als sensitive BM identifiziert werden, da der Anstieg im Urin 1) vor einem Anstieg etablierter BM, 2) vor einem Anstieg neuerer Proteinbiomarker, KIM-1 und α GST ausgenommen, 3) vor der maximal histopathologisch gesehenen Schädigung sowie 4) auch bei einer leichten Schädigung nach der Behandlung mit der niedrigen Cp Dosis festgestellt werden konnte. Diese Ergebnisse konnten mittels des NTS Nephrotoxizitätsmodells aus versuchstechnischen Gründen nicht direkt bestätigt werden, da zu beiden Zeitpunkten der glomeruläre und tubuläre Schaden bereits deutlich ausgeprägt war. Dennoch bekräftigte der deutliche Unterschied in Menge und Stärke der veränderten miRNAs im Urin zwischen den unterschiedlich NTS-empfindlichen Rattenstämmen die Sensitivität der miRNAs als BM. Auch im *in vitro* Modell wies ein Anstieg im Medium nach geringer Cp-Schädigung auf miRNAs als sensitive BM. Ein Vergleich mit publizierten Nieren miRNA Expressionsdaten lässt stark vermuten, dass die in dieser Studie identifizierten miRNAs im Urin beider *in vivo* Modelle spezifisch für die Niere sind. Dies wurde, soweit möglich, mit den Ergebnissen des in dieser Arbeit ebenfalls analysierten Modells mit MPy-induzierter Lebertoxizität bestätigt. Ferner wurde die Lokalisation einiger miRNAs in verschiedenen Organkompartimenten der Niere nachgewiesen, wobei miR-10b und -100, die potentiell für NTS-induzierte Glomerulonephritis spezifisch waren, u.a. in distalen Tubuloi exprimiert zu sein scheinen, was auf einen sekundär dort entstandenen Schaden hinweist. Insgesamt konnten zwei miRNAs aus allen Untersuchungen als potentielle sensitive und spezifische Nephrotoxizitäts-BM im Urin nominiert werden: miR-21 und -192.

In scheinbarem Widerspruch zu dem eben beschriebenen spezifischen miR-21-Anstieg im Urin nach Nierenschädigung stehen die Ergebnisse der Abnahme von miR-21 im Urin nach Gentamicin-induzierter Nierentoxizität in Ratten (Saikumar et al., 2012). Dies lässt sich vermutlich mit einem anderen Normalisierungsansatz der Urin-miRNA Daten erklären. Im Folgenden wird deshalb der Analysenweg für miRNAs im Urin, wie er in dieser Arbeit angewendet wurde, erläutert und mit anderen Methoden verglichen.

Wichtige, jedoch noch nicht allgemein geklärte, Fragen hinsichtlich des Einsatzes von miRNAs als Sicherheits-BM bestehen bezüglich der am besten geeigneten Messmethoden und der Quantifizierung inklusive Normalisierung. Am häufigsten werden miRNAs als Nukleinsäuren mittels PCR gemessen, sowohl über die Detektion mit spezifischen TaqMan Sonden als auch mit SyberGreen Färbung des während der PCR entstehenden doppelsträngigen DNA-Produktes (Benes and Castoldi, 2010; Chen et al., 2005; Raymond et al., 2005). Angelehnt an die Normalisierung von mRNA PCR-Daten mit endogenen *Housekeeping* Genen und der $\Delta\Delta$ cycle threshold (Ct) Berechnung, wurde auch für miRNAs im Gewebe Normalisierungsstrate-

gien mit endogenen miRNAs (z.B. miR-16) oder anderen kleinen nicht-kodierenden RNAs (z.B. U6) verwendet; dies basiert auf Daten, die relativ konstante Level dieser RNAs auch unter verschiedenen Bedingungen zeigten (Davoren et al., 2008; Peltier and Latham, 2008).

Nach der Entdeckung von extrazellulären miRNAs schienen diese endogenen „Kontroll“-miRNAs nicht anwendbar für die Normalisierung im neuen Kontext. Zu miRNAs im Plasma bzw. Serum sind relativ viele Untersuchungen bzgl. miRNAs mit relativ konstanten Level publiziert, welche im nächsten Abschnitt (4.2.3) diskutiert werden. Jedoch stellt das Blut als Körperflüssigkeit mit relativ konstanten Volumen einen ganz anderen Kontext dar als Urin. Das Urinvolumen, und somit dessen Zusammensetzung, kann zwischen verschiedenen Individuen dergleichen Spezies, z.B. auch Einzeltieren in einer Studie, sehr unterschiedlich sein. Das Wissen über miRNAs im Urin ist bisher sehr begrenzt und die wenigen publizierten Daten bieten eine große Vielfalt möglicher Normalisierungsstrategien für Urin miRNA PCR-Daten. Angefangen bei der Normalisierung mit synthetischen Spike-in miRNAs, die während der RNA-Isolation zur Probe gegeben werden (Argyropoulos et al., 2013), gefolgt von der Normalisierung mit kleinen nicht-kodierenden RNAs wie der RNU48 (Wang et al., 2012b), bis hin zur Normalisierung mit, im jeweiligen Datenpool identifizierten, invarianten d.h. in allen Proben mit konstanten Level vorhandenen miRNAs (Ramachandran et al., 2013; Yang et al., 2012). Auch das Weglassen einer Normalisierung durch den Einsatz gleicher RNA Mengen wurde vorgeschlagen (Saikumar et al., 2012). Die Normalisierung mit Spike-in miRNAs war in den untersuchten Modellen möglich und viele der stark behandlungsabhängig veränderten miRNAs konnten so auch identifiziert werden, jedoch wird damit nur die technische Variabilität und nicht die endogene berücksichtigt. Eine Identifikation und folglich der Einsatz von invarianten miRNAs oder anderen kleinen nicht-kodierenden RNAs ist nicht möglich, wenn z.B. die Behandlung mit einem Toxin alle (mi)RNA Profile im Urin verändert, so wie hier nach Cp Behandlung. Ferner berücksichtigt die Normalisierung mit vermeintlich invarianten (mi)RNAs nicht die Schwankung des Urinvolumens, welche nach Schädigung auch zunehmen kann. Die angenommene Eigenschaft einer invarianten (mi)RNA, eine stetige behandlungsunabhängige Sekretion oder Filtration aus dem Blut in den Urin, wurde bisher noch für keine miRNA nachgewiesen, sodass die in verschiedenen Studien identifizierten „invarianten“ miRNAs nie dieselben waren. Das Weglassen einer Normalisierung aufgrund von jeweils gleichen RNA Mengen in der PCR ist nicht zulässig, da nach Toxinverabreichung ein Anstieg der Gesamt-RNA Menge im Urin in den vorliegenden Studien wie auch von anderen beobachtet wurde (Konta et al., 2013; Yang et al., 2012).

Folglich, da diese Strategien z.T. nicht anwendbar und bei genauerer Betrachtung biologisch nicht nachvollziehbar waren, wurde ein neuer Ansatz für die Prozessierung und Normalisierung von Urin miRNA PCR-Daten entwickelt. Dieser basierte auf der Festlegung eines fixen Ct-Wertes für die ΔCt Berechnung, der gleichzeitig die Detektionsgrenze der PCR darstellt, der darauf folgenden Umwandlung logarithmischer Ct-Werte in lineare, welche die miRNA Level als

einheitslosen Wert repräsentieren, und zuletzt der Normalisierung auf den Creatiningehalt im Urin. Bei Protein-BM im Urin ist die Normalisierung mit Urin Creatinin (uCrea) etabliert und die Limitationen dieser Methode sind gut untersucht und bekannt (Waikar et al., 2010). Eine Normalisierung auf das gesamte Urinvolumen (uVol) kann optional bei starker behandlungsabhängiger Beeinträchtigung der glomerulären Filtrationsrate erwogen werden. Nichtsdestotrotz reflektiert uCrea (oder uVol) die endogene Variabilität im Urin und sollte deshalb auch für die Normalisierung von miRNAs im Urin geeignet sein. Obwohl miRNAs und uCrea ganz verschiedene Analyte darstellen, die auf ganz unterschiedliche Weisen gemessen werden, und obwohl die miRNA PCR-Daten für die uCrea Normalisierung zunächst linearisiert werden müssen, konnten die so gewonnenen Ergebnisse durch eine miRNA Quantifizierung mittels Standardkurve verifiziert werden. Aus miRNA PCR-Daten kann mittels Standardkurve eine absolute miRNA Menge im Urin, bezogen auf das eingesetzte Urinvolumen, errechnet werden. Diese Quantifizierung mit Standardkurve ist bisher die einzige akzeptierte Quantifizierungsmethode für miRNAs im Urin (Cheng et al., 2012; Wang et al., 2012b); für Profilierungsstudien ist sie jedoch viel zu zeit- und kostenintensiv. Die gute Korrelation der Ergebnisse, die sich aus der neu entwickelten Normalisierungsmethode und der Quantifizierung mittels Standardkurve ergaben, befürwortet einen Einsatz ersterer beim Screening großer Urin-miRNA PCR-Datensätze. Neuere Untersuchungen schlagen eine uCrea- oder uVol-Normalisierung auch bei Urin miRNA Messungen mittels Microarrays vor (Konta et al., 2013).

4.2.3 Evaluierung von microRNAs im Plasma als Toxizitäts-Biomarker

Das Blut bzw. das daraus resultierende Plasma oder Serum ist eine etablierte Quelle für diverse BM, vor allem im Hinblick auf die klinische Forschung und Routinediagnostik von Patienten. Aus diesem Grund wurden die ersten miRNA BM im Plasma identifiziert (Mitchell et al., 2008), gefolgt von einer Fülle vielversprechender Ergebnisse für unterschiedlichste physiologische und pathologische Zustände in Tier und Mensch. Dennoch sind bisher miRNAs im Plasma/Serum weder als BM qualifiziert noch validiert worden, was u.a. an einem fehlenden einheitlichen Normalisierungsansatz liegt.

Bei miRNAs im Plasma wie bei miRNAs im Urin existieren sehr viele unterschiedliche Normalisierungsansätze für PCR-Daten. Bei den in dieser Arbeit untersuchten miRNA Plasma PCR-Daten wurde wie bei Urin eine Normalisierung mit einem fixen Ct-Wert durchgeführt, welche für Plasma miRNAs auch bereits beschrieben wurde (Ji et al., 2009; Yamaura et al., 2012). Eine zusätzliche Normalisierung auf einen endogenen Faktor, wie bei Urin uCrea oder uVol, wurde nicht angewendet, da einerseits noch keine entsprechende endogene Kontrolle beschrieben wurde und da Blut im Vergleich zu Urin keine starken Volumenschwankungen aufweist. Die oben bei Urin miRNAs beschriebenen Normalisierungsansätze mit Spike-in miRNAs oder klei-

nen nicht-kodierenden RNAs wie U6 oder RNU43 wurden bzw. werden auch bei Plasma/Serum miRNA PCR-Daten angewendet (Farid et al., 2012; Starckx et al., 2013; Zhang et al., 2010a). Dass diese keine vorteilhaften Referenz-RNAs für Plasmaproben sind, wurde an einem Mausmodell anhand ausgebliebener Varianzverkleinerung nach Normalisierung dargestellt (Cui et al., 2011). Dagegen hatten die Autoren eine Normalisierung mit dem Mittelwert aller gemessenen miRNAs im Plasma empfohlen, eine Methode die in den untersuchten Datensätzen nicht erfolgreich war. Die Idee invarianter miRNAs im Plasma/Serum ist im Vergleich zu Urin vorstellbar, da das Blut selbst eine relativ konstante Zusammensetzung von Zellen aufweist und in allen Geweben im Körper zirkuliert, von wo miRNAs kontinuierlich passiv oder vielleicht auch aktiv ausgeschieden werden könnten. Dem folgend wurden in unterschiedlichen Studien unterschiedliche invariante miRNAs in den Datensätzen identifiziert und für die Normalisierung eingesetzt, wie z.B. miR-103 oder miR-132 (Suryawanshi et al., 2013; Wang et al., 2013b). Beide miRNAs zeigten in dem hier untersuchten Plasma einen MPy-behandlungsabhängigen Anstieg und waren daher als endogene Referenz nicht geeignet. Häufig wurde und wird miR-16 für die Normalisierung von Plasma miRNA PCR-Daten verwendet, basierend auf der ubiquitären Expression im Gewebe und im Plasma (Bala et al., 2012; Glowacki et al., 2013; Hu et al., 2013; Sukata et al., 2011). Da jedoch gezeigt wurde, dass miR-16 ebenso ubiquitär in Erythrozyten exprimiert ist und als Marker für hämolytische Plasmaproben dienen könnte, ist die Normalisierung mit miR-16 kritisch zu betrachten (Kirschner et al., 2011). Im Plasma von MPy-behandelten Ratten zeigten miR-16 und miR-451, eine weitere von Kirschner et al. identifizierte mit Hämolyse korrelierende miRNA im Plasma, ein paralleles Profil in allen Proben, sodass beim signifikant behandlungsabhängigen Anstieg auch eine teilweise Kontamination mit Erythrozyten-miRNAs nicht ausgeschlossen werden kann. Ferner tritt dabei eine weitere Problematik bei der Messung zirkulierender miRNAs zutage, die der adäquaten Aufarbeitung von Blutproben. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Aufarbeitung von Blutproben inklusive einer möglichen Hämolyse auf das miRNA Profil im Plasma auswirkt (Cheng et al., 2013; Kirschner et al., 2013), da viele der zirkulierenden miRNAs auch von Blutzellen exprimiert werden (Chen et al., 2008; Pritchard et al., 2012). Ebenso für die Wahl zwischen Serum und Plasma sowie die entsprechende Aufarbeitung konnte eine Auswirkung auf das miRNA Profil nachgewiesen werden, obwohl zwischen Serum und Plasma eine große Übereinstimmung der miRNA Profile herrscht (Blondal et al., 2012; Wang et al., 2012a).

Trotz der beschriebenen Problematik bei der Normalisierung von miRNAs aus Plasma, war es möglich im Plasma von Ratten mit NTS-induzierter Glomerulonephritis oder MPy-induzierter Hepatotoxizität signifikant veränderte miRNA Mengen nachzuweisen. Hervorzuheben ist miR-122, welche eine der ersten miRNAs im Plasma war, die als potentieller BM für Substanz-induzierte Leberschädigung identifiziert wurde (Laterza et al., 2009; Wang et al., 2009b). Wie

oben, erwähnt ist miR-122 leberspezifisch, was ihr größter Vorteil gegenüber dem traditionellen Leberbiomarker Alanin-Aminotransferase (ALT) ist, der neben Leberschädigung auch im Serum von Patienten mit Muskelschädigung oder von Ratten mit induzierter Muskelschädigung erhöht ist (Laterza et al., 2009; Zhang et al., 2010a). Im Plasma MPy-behandelter Ratten war miR-122 während der gesamten zweiwöchigen Behandlung erhöht, sowohl in den niedrig Dosis- wie auch in den hohen Dosisgruppen. Eine erhöhte ALT-Aktivität im Serum war zwar auch in den höher dosierten Ratten zu sehen, in den niedrig dosierten aber erst nach zweiwöchiger Behandlung. Daher könnte miR-122 nicht nur ein spezifischerer, sondern auch ein sensitiverer BM als ALT sein, da histologische und Genexpressions-Ergebnisse pathologische Veränderungen bereits nach viertägiger Behandlung mit der niedrigen MPy-Dosis bestätigten. Dies unterstreicht weiter das Potential von miR-122 im Plasma als Leberbiomarker. Insgesamt wurde miR-122 bisher im Plasma bzw. Serum von Ratten, Mäusen und Menschen als BM für diverse Lebererkrankungen beschrieben, wie Paracetamol-, MPy-, Tetrachlorkohlenstoff oder Ethanol-induzierter Hepatotoxizität, Fettleber, Hepatitis, Hepatitis-B-Virus Infektionen und Transplantationschäden (Bala et al., 2012; Farid et al., 2012; Hu et al., 2013; Starkey Lewis et al., 2011; Tryndyak et al., 2012; Zhang et al., 2010a). Zunächst widersprüchlich erschien der geringe Anstieg von miR-122 im Plasma von SD Ratten mit NTS-induzierter Glomerulonephritis, jedoch zeigte das Plasma von SD Ratten weitere erhöhte miRNAs, die nicht in WKY Ratten nach NTS-induzierter Glomerulonephritis, aber in MPy-behandelten Ratten erhöht waren. Neben miR-122 war miR-146a eine dieser miRNAs. Da in Mäusen mit Lipopolysaccharid- und CpG-induzierter Inflammation in der Leber diese beiden miRNAs im Plasma ebenfalls erhöht waren (Bala et al., 2012), könnte hier angenommen werden, dass die SD Ratten im Glomerulonephritismodell zusätzlich eine NTS-unabhängige Leberschädigung hatten. Leider wurden in der Studie weder die Lebern für histopathologische Untersuchungen entnommen noch etablierte Leber-BM im Serum gemessen, sodass diese Annahme mit keinen anderen Befunden verglichen werden konnte.

Dagegen zeigte die im Urin als potentieller Nieren-spezifischer BM identifizierte miR-192 im Plasma eindeutig erhöhte Mengen nach MPy-induzierter Leberschädigung. Dies entspricht der Expression von miR-192 in beiden Organen (Gatti et al., 2011; Liang et al., 2007; Saal and Harvey, 2009), die hier auch in der Niere und Leber von normalen Ratten mittels *in situ* Hybridisierung bestätigt wurde. Während der Glomerulonephritis konnte ein Anstieg der in Nierenkortex exprimierten miR-192 im Urin und Plasma nachgewiesen werden. Die MPy-induzierte periportale Nekrose in der Leber führte zu einem Anstieg von miR-192 nur im Plasma entsprechend der nachgewiesenen miR-192 Expression in der Leber im Glisson'schen Dreieck, d.h. im periportalen Feld. Demnach scheint ein miR-192-Anstieg im Urin spezifisch für Nierenschädigung zu sein, im Plasma aber nicht.

4 Diskussion

Dieses könnte mit einer Proteinassoziation oder Vesikelinkorporation zellfreier miRNAs zusammenhängen. Bei einer Nierenschädigung und dem „Auslaufen“ der miRNAs aus nekrotischen Zellen in den Urin, scheint die Art der zellfreien miRNAs primär nicht wichtig. Bei einer Leberschädigung und dem „Auslaufen“ der miRNAs in das Blut könnte jedoch die Art der zellfreien miRNAs darüber entscheiden, ob ein entsprechender Anstieg auch im Urin nachweisbar ist. Dafür müsste z.B. das miRNA assoziierte Protein kleiner als 80 kDa sein, um frei in den Glomeruli filtriert zu werden. Bisher wurden zwei Proteine beschrieben, an die zellfreie miRNAs gebunden waren, das ca. 96 kDa große Argonaut 2 (Arroyo et al., 2011) und das als Monomer ca. 40 kDa große Nucleophosmin 1 (Vladimirova et al., 2010; Wang et al., 2010c). Für die im Urin und Plasma erhöhten miRNAs nach NTS-Behandlung, miR-197, -130a, -138, -203 und -29a, können keine Vermutungen aufgestellt werden, ob einige in entsprechend kleinen Komplexe vorlagen, um eine Filtration aus dem Blut in den Urin zu ermöglichen. Für die zellfreie Form der zirkulierenden miR-192 nach MPy-Behandlung scheint die Blut-Harn-Schranke nicht passierbar zu sein, da miR-192 wie erwähnt in dieser Studie im Urin nicht nachweisbar war. Dieses würde vielleicht auch erklären, weshalb nach Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität in Ratten kein Anstieg der leberspezifischen miR-122 im Urin gemessen wurde (Yang et al., 2012). Ferner ist die zellfreie Form zirkulierender miRNAs scheinbar abhängig von der Art der Schädigung, da im Plasma von Mäusen miR-122 nach Ethanol-induzierter Hepatotoxizität in der Exosomen-Fraktion deutlicher angestiegen waren als in der Protein-Fraktion, während nach Paracetamol-induzierter Hepatotoxizität ein Anstieg in beiden Plasma Fraktionen gesehen wurde. Dieses führt weiterhin zur Hypothese miRNA-vermittelter Zellkommunikation über das Blut (Etheridge et al., 2013), sodass je nach Schädigungsart und -schwere nicht nur miRNAs in unterschiedlichen Komplexen „auslaufen“, sondern vielleicht auch aktiv in einer bestimmten Form aus den Zellen in das Blut abgegeben werden und so die Genexpression anderer Zellen nach der Aufnahme beeinflussen könnten. Vergleichbares konnte bisher nur *in vitro* nachgewiesen werden (Hergenreider et al., 2012).

Neben den identischen erhöhten miRNAs im Plasma nach NTS- und MPy-induzierter Schädigung konnten auch jeweils potentiell spezifische miRNAs identifiziert werden. Einige der spezifisch nach NTS-induzierter Schädigung erhöhten miRNAs waren in der Niere exprimiert, wie miR-27a, -215 und -203 (Pandey et al., 2008; Saal and Harvey, 2009; Sun et al., 2004), und könnten daher spezifische miRNA BM im Plasma für Nierenschädigung darstellen. MiR-197 war spezifisch nach NTS-Behandlung im Plasma von WKY aber nicht von SD Ratten erhöht. Da es als abundante miRNA in thrombozytenreichem Plasma identifiziert wurde (Willeit et al., 2013), könnte der miR-197-Anstieg entweder die in WKY Ratten stärkere Glomerulonephritis einhergehend mit Thrombozytenaktivierung oder ein Artefakt infolge unsauberer Plasmaherstellung darstellen. Viele der vermeintlich spezifisch nach MPy-induzierter Schädigung erhöhten miR-

NAs waren auch vereinzelt im Plasma einiger NTS-behandelter Ratten erhöht, jedoch waren sechs eindeutig nur nach MPy-Behandlung erhöht, wie miR-194, -125a-5p und -23b. miR-194 wird in der Leber exprimiert und wurde sogar als Marker für hepatische Epithelzellen beschrieben (Barad et al., 2004). Im Serum von Ratten mit Paracetamol-induzierter Leberschädigung und im Plasma von Patienten nach einer Lebertransplantation wurden ebenfalls erhöhte miR-194 Mengen nachgewiesen (Farid et al., 2012; Su et al., 2012). Eine Expression von miR-125a-5p in der Leber ist ebenso bekannt (Coppola et al., 2013) und erhöhte Mengen wurden im Plasma von Ratten mit induzierten Neoplasien in der Leber gemessen (Sukata et al., 2011). Somit könnte miR-125a-5p im Plasma nicht nur ein BM für Leberschädigungen sein, sondern vielleicht eher für neoplastische Veränderungen der Leber. Ähnlich könnte auch der Anstieg von miR-23b im Plasma gedeutet werden, da eine Assoziation von miR-23b mit der Leberstammzell-Differenzierung beschrieben wurde (Rogler et al., 2009).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die NTS-induzierte Glomerulonephritis wie auch die MPy-induzierte Leberschädigung zur Veränderung der miRNA-Profile im Plasma führten. Trotz vieler identischer miRNAs, konnten einige spezifische und somit potentielle BM identifiziert bzw. bereits beschriebene, wie miR-122, bestätigt werden.

4.3 Ausblick

Mittels Cp- und NTS-induzierter Nierenschädigung war es möglich miRNAs im Urin als potentielle neue BM für Nephrotoxizität zu identifizieren. Da jedoch an beiden untersuchten Zeitpunkten der NTS-induzierten Glomerulonephritis ebenso ein tubulärer Schaden vorhanden war, konnten die miRNA Urinprofile nicht entsprechend nur einer Schädigung zugeordnet werden.

Um ausgehend von diesen zwei Modellen miRNA BM im Urin identifizieren zu können, die spezifisch für proximal tubuläre oder glomeruläre Schädigung sind, müsste die NTS Studie mit früheren und mehr Messzeitpunkten wiederholt werden. Dadurch wäre es vielleicht möglich, einen Zeitpunkt mit nur glomerulärer ohne gleichzeitige tubuläre Schädigung zu erhalten. Dabei wäre der Einsatz von WKY im Sinne des 3R-Prinzipes (*Replacement* (Vermeidung), *Refinement* (Verfeinerung), *Reduction* (Verringerung)) ausreichend, da sich bei diesen im Vergleich zu SD Ratten eine sensitivere und einheitlichere Glomerulonephritis nach NTS-Verabreichung diagnostizieren ließ.

Zusätzlich könnten an den frühen Zeitpunkten auch Nieren für Genexpressionsanalysen entnommen werden, um so die zeitliche Entwicklung der Glomerulonephritis auf Genexpressionsebene besser nachvollziehen zu können.

Ferner sind auch Studien mit weiteren Modellsubstanzen für Nieren- und Lebertoxizität zur Identifikation bzw. Verifikation neuer miRNA BM im Urin und Plasma vorstellbar sowie auch die Ausweitung der Untersuchungen auf andere Organe, in denen ebenso Arzneimittel-induzierte

4 Diskussion

Toxizität auftritt. Mit den daraus gewonnenen Datensätzen könnte die neu entwickelte Normalisierungsmethode für Urin und Plasma miRNAs weiter untersucht werden, auch im Hinblick eines möglichen künftigen BM Validierungs- bzw. Qualifizierungsprozesses.

Basierend auf der vorliegenden Arbeit scheinen die miRNA BM zunächst degenerative BM darzustellen, d.h. sie treten nur bei Nekrose außerhalb der Zelle auf. Ob miRNAs auch bei anderen Schädigungen als BM eingesetzt werden könnten und so eine potentiell breitere Anwendung fänden, könnte durch die Messung von miRNAs in Plasmavesikel untersucht werden, die vielleicht aktiv von Toxin-beeinträchtigten Zellen sezerniert werden.

Zur Klärung der unerwarteten *in situ* Hybridisierungs-Ergebnisse bezgl. der Lokalisation von miR-10b und -100 in dem distalen Tubulusapparat, statt wie erwartet in den Glomeruli, müssten, neben einer Wiederholung der *in situ* Hybridisierungs-Versuche mit Nieren weiterer Ratten, auch die Nieren nach NTS-Behandlung erneut histologisch sowie immunhistochemisch mit Fokus auf die Differenzierung der geschädigten Tubu begutachtet werden. Außerdem würden miRNA Expressionsprofile und *in situ* Hybridisierungs-Experimente verschiedener anderer Organe zur Identifikation weiterer spezifischer miRNAs BM beitragen.

Hinsichtlich einer mechanistischen Analyse der Beteiligung bestimmter miRNAs an der Toxizitätsentwicklung könnten die identifizierten möglichen miRNA-mRNA Interaktionen z.B. mittels anti-sense miRNA *in vitro* Experimenten untersucht werden. Mit Hilfe von anti-sense miRNAs können entsprechend komplementäre endogene miRNAs gebunden und in Folge davon abgebaut werden, wodurch sie selbst dann nicht mehr an die mRNAs binden können, die sie normalerweise negativ regulieren. Daraufhin könnten die Expression dieser mRNAs und die ihrer kodierten Proteine sowie die Viabilität der Zellen nach Toxin-Behandlung in Abhängigkeit einer „ausgeschalteten“ miRNA untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Substanz-induzierte Organtoxizität in der präklinischen Entwicklung stellt eine große Herausforderung in der zeit- und kostenintensiven Arzneimittelentwicklung dar. Fast die Hälfte aller Arzneimittelkandidaten können aufgrund von diagnostizierter Organtoxizität in präklinischen Versuchstieren nicht weiterentwickelt werden. Die Beurteilung der Toxizität in *in vivo* Studien erfolgt durch die Messung etablierter Biomarker (BM) und durch die Histopathologie. Der Nachteil Letzterer liegt in der maximalen Invasivität dieser Untersuchungsmethode per se, während die Nachteile vieler etablierter BM in geringer Sensitivität und fehlender Organspezifität liegen. Demnach ist der Bedarf nach neuen nicht-invasiven, sensitiven und spezifischen BM groß, um die Belastung der Versuchstiere während behördlich vorgeschriebener Studien durch schnelleres Erkennen von Organtoxizität zu reduzieren und um Arzneimittel für Patienten durch effizientere Nebenwirkungs-Screening entwickeln zu können.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, zu einer Verbesserung der Detektion bzw. Vorhersage von Organtoxizitäten in präklinischen Studien beizutragen. Da Niere und Leber häufig von Arzneimittel-induzierter Toxizität betroffen sind, wurden mittels Ratten-Toxizitätsmodellen neu-qualifizierte Protein-BM im Urin für Nephrotoxizität re-evaluiert sowie das Potential einer neuen BM-Klasse, der microRNAs (miRNAs) in Urin und Plasma, untersucht. Die Modelle waren: Cisplatin (Cp)-induzierte proximal tubuläre Nierenschädigung, nephrotoxisches Serum (NTS)-induzierte Glomerulonephritis und Methapyrilen (MPy)-induzierte Leberschädigung. Parallel dazu wurde die Gen- und miRNA-Expression in Niere und Leber mechanistisch analysiert.

Die Messung neu-qualifizierter BM für Nephrotoxizität im Urin von Cp- und NTS-behandelten Ratten mittels zweier etablierter multiplex Plattformen zeigte, dass, obwohl mit beiden Plattformen ein eindeutiger behandlungsabhängiger BM-Anstieg im Urin messbar war, die absoluten Konzentrationen in den meisten Fällen nicht vergleichbar waren. Demnach konnten keine allgemeingültigen plattformunabhängigen Basallevel identifiziert werden. Jedoch konnten die Vorteile der BM bzgl. Sensitivität und Spezifität durch ihren relativen Anstieg im Vergleich zu den Kontrollen nachgewiesen werden, da 1) ein Anstieg aller BM in Urin vor der maximalen histologisch diagnostizierten Nekrose nach Cp Behandlung gemessen wurde, 2) die proximaler Tubulus spezifischen BM KIM-1 und α GST bereits am frühesten Untersuchungszeitpunkt nach Cp Behandlung im Urin anstiegen und somit früher als die etablierten Nieren-BM Blut-Harnstoff-Stickstoff und Serum Creatinin, 3) KIM-1 auch nach Verabreichung einer niedrigen, nur geringe Nekrose auslösenden, Cp Dosis im Urin anstieg und 4) kein Anstieg von KIM-1, α GST und anderen BM im Urin von Ratten mit MPy-induzierter Leberschädigung messbar war.

Im Hinblick auf miRNAs als potentielle neue BM-Klasse konnte im Urin von Ratten mit Cp- oder NTS-induzierter Nephrotoxizität ein eindeutig verändertes miRNA-Profil nachgewiesen werden, welches hauptsächlich durch einen Anstieg vieler miRNAs gekennzeichnet war. Da keine etablierte Normalisierungsmethode für Urin miRNA PCR-Daten zu Verfügung stand, wurde eine entwickelt, welche den Urin Creatiningehalt als endogenen Parameter der biologischen Variabilität mit einbezieht. Der miRNA-Anstieg im Urin fand, im Vergleich zu etablierten BM, zeitlich früher und auch bei niedrigeren Cp oder NTS Dosen statt. Für die Mehrheit der miRNAs war eine Expression in der Niere bereits beschrieben. Dabei zeigten z.B. miR-21 und -192, die in der Niere von Maus, Ratte und Mensch konserviert exprimiert sind, einen frühen Anstieg nach Cp- und NTS-, aber nicht nach MPy-Behandlung. Aufgrund eines sekundären tubulären Schadens während der NTS-induzierten Glomerulonephritis konnten im Vergleich zur Cp-induzierten proximal tubulären Schädigung keine eindeutig kompartimentspezifischen miRNAs im Urin identifiziert werden. Für miR-10b und -100, welche für die NTS-induzierte Glomerulonephritis potentiell spezifisch waren, konnte eine Lokalisation in den distalen Tubuli identifiziert werden. Auch im Plasma von NTS- oder MPy behandelten Ratten wurde ein eindeutig verändertes miRNA-Profil identifiziert.

Insgesamt erschienen viele dieser extrazellulären miRNAs als potentielle BM geeignet zu sein, da sie früh nach der Schädigung in Urin oder Plasma anstiegen und bekannter Weise in der Niere bzw. Leber exprimiert sind. Ferner konnten unter den jeweils behandlungsabhängig deregulierten mRNAs in Niere oder Leber, solche mit im Vergleich zu bestimmten miRNAs entsprechend inversem Expressionsprofil identifiziert werden, deren Regulation durch diese miRNAs schon bekannt ist oder vermutet wird. Dies könnte auf ein Mitwirken der miRNAs an den jeweiligen Toxizitätsmechanismen hinweisen.

6 Summary

Drug-induced organ toxicity is one of the major challenges in the context of time and money-consuming drug development. Statistically, about one half of the drug candidates are discarded because of drug-induced organ toxicity in preclinical animal species. During *in vivo* studies toxicity is assessed by measurement of established biomarkers (BMs) and histological examination. The disadvantage of histological examination is the maximal invasive nature whereas the disadvantages of established BMs are related to low sensitivity and organ specificity. Thus, the need for non-invasive, sensitive and specific new BMs is high, in terms of both reducing the suffering of animals during regulatory studies by an earlier detection of organ toxicity and developing necessary drugs for patients including a more efficient screening for adverse effects.

Because kidney and liver frequently show drug-induced toxicity, the goal of this thesis was to re-evaluate new urinary protein BMs for nephrotoxicity and to evaluate the potential of microRNAs (miRNAs) in urine and plasma as BMs for nephro- and hepatotoxicity, respectively. Therefore, three rat toxicity models were conducted: cisplatin (Cp)-induced proximal tubular injury, nephrotoxic serum (NTS)-induced glomerulonephritis and methapyrilene (MPy)-induced liver injury. Additionally, gene and miRNA expression in kidney and liver were analyzed for mechanistic insight.

Two widely employed multiplex platforms were used for measurement of new protein BMs in urine from Cp- or NTS-treated rats. Although both were able to detect treatment-dependent increases in urine, the absolute concentrations measured were significantly different. Thus platform-independent basal levels could not be defined. With respect to their relative treatment-induced increase the advantages of new BMs concerning higher sensitivity and specificity could be confirmed based on 1) an increase of all new BMs before the maximum of histologically observed necrosis after Cp treatment, 2) an increase of the proximal tubular specific BMs KIM-1 and α GST at the earliest studied time point and thus before an increase of established BMs like BUN or serum creatinine, 3) an increase of KIM-1 after administration of a low Cp dose causing only very mild necrosis and 4) no detectable increase of KIM-1, α GST and others in urine after MPy-treatment.

Concerning miRNAs as potential new BM class, significantly changed, mostly increased, miRNA profiles were identified in urine from rats with Cp- or NTS-induced kidney injury. Because of a missing established normalization method for urinary miRNA PCR-data, a new one was developed including urinary creatinine as endogenous reference reflecting biological variability. Urinary miRNAs were found increased earlier and also after administration of lower toxin doses compared to classical BMs. For the majority of the increased miRNAs expression in the kidney was previously reported. Promising BMs are for example miR-21 and -192: They show conserved expression in the kidney in mice, rats and humans and were found here to be increased early in urine after Cp- or NTS-induced kidney injury but not after MPy-induced liver injury. Since NTS-induced glomerulonephritis also caused tubular injury, kidney-compartment-specific miRNAs could not be identified by comparison of urinary profiles from NTS- vs. Cp-treated rats. For miR-10b and -100, being potentially specific for NTS-induced glomerulonephritis, localization was identified in distal tubuli.

Significantly changed miRNA profiles were also found in plasma from rats with NTS-induced kidney injury or MPy-induced liver injury.

Overall most miRNAs appear as promising BM as they were previously reported to be expressed in liver and/or kidney and were shown here to be increased early after treatment.

Furthermore among the treatment-dependent deregulated mRNAs in kidney and liver, several could be identified showing an inverse expression compared to miRNAs which are known or predicted regulators of these mRNAs. This suggests a possible involvement of miRNAs in the molecular mechanisms of toxicity.

Literaturverzeichnis

Abbate, M., Zoja, C., Rottoli, D., Corna, D., Tomasoni, S., and Remuzzi, G. (2002). Proximal tubular cells promote fibrogenesis by TGF-beta1-mediated induction of peritubular myofibroblasts. *Kidney Int* 61, 2066-2077.

Adler, M., Hoffmann, D., Ellinger-Ziegelbauer, H., Hewitt, P., Matheis, K., Mulrane, L., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Suter, L., Fountoulakis, M.M., *et al.* (2010). Assessment of candidate biomarkers of drug-induced hepatobiliary injury in preclinical toxicity studies. *Toxicol Lett* 196, 1-11.

Aleksunes, L.M., Augustine, L.M., Scheffer, G.L., Cherrington, N.J., and Manautou, J.E. (2008). Renal xenobiotic transporters are differentially expressed in mice following cisplatin treatment. *Toxicology* 250, 82-88.

Amacher, D.E. (2010). The discovery and development of proteomic safety biomarkers for the detection of drug-induced liver toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 245, 134-142.

An, S., Zang, X., Yuan, W., Zhuge, Y., and Yu, Q. (2013). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) may play a protective role against rats ischemia/reperfusion renal injury via inhibiting tubular epithelial cell apoptosis. *Ren Fail* 35, 143-149.

Andrews, A.W., Fornwald, J.A., and Lijinsky, W. (1980). Nitrosation and mutagenicity of some amine drugs. *Toxicol Appl Pharmacol* 52, 237-244.

Argyropoulos, C., Wang, K., McClarty, S., Huang, D., Bernardo, J., Ellis, D., Orchard, T., Galas, D., and Johnson, J. (2013). Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PLoS One* 8, e54662.

Arici, M., Brown, J., Williams, M., Harris, K.P., Walls, J., and Brunskill, N.J. (2002). Fatty acids carried on albumin modulate proximal tubular cell fibronectin production: a role for protein kinase C. *Nephrol Dial Transplant* 17, 1751-1757.

Arroyo, J.D., Chevillet, J.R., Kroh, E.M., Ruf, I.K., Pritchard, C.C., Gibson, D.F., Mitchell, P.S., Bennett, C.F., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Stirewalt, D.L., *et al.* (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 5003-5008.

Auman, J.T., Chou, J., Gerrish, K., Huang, Q., Jayadev, S., Blanchard, K., and Paules, R.S. (2007). Identification of genes implicated in methapyrilene-induced hepatotoxicity by comparing differential gene expression in target and nontarget tissue. *Environ Health Perspect* 115, 572-578.

Bailly, V., Zhang, Z., Meier, W., Cate, R., Sanicola, M., and Bonventre, J.V. (2002). Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J Biol Chem* 277, 39739-39748.

Bala, S., Petrasek, J., Mundkur, S., Catalano, D., Levin, I., Ward, J., Alao, H., Kodys, K., and Szabo, G. (2012). Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 56, 1946-1957.

Barabas, K., Milner, R., Lurie, D., and Adin, C. (2008). Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications. *Vet Comp Oncol* 6, 1-18.

Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., Einav, U., Gilad, S., Hurban, P., Karov, Y., *et al.* (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14, 2486-2494.

Barroso-del Jesus, A., Lucena-Aguilar, G., and Menendez, P. (2009). The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. *Cell Cycle* 8, 394-398.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.

Baskerville, S., and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 11, 241-247.

Benes, V., and Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 50, 244-249.

Benjamini, Y., and Hochberg, B. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B* 57, 289-300.

Literaturverzeichnis

- Betton, G.R., Ennulat, D., Hoffman, D., Gautier, J.C., Harpur, E., and Pettit, S. (2012). Biomarkers of collecting duct injury in Han-Wistar and Sprague-Dawley rats treated with N-phenylanthranilic Acid. *Toxicol Pathol* 40, 682-694.
- Bhatt, K., Zhou, L., Mi, Q.S., Huang, S., She, J.X., and Dong, Z. (2010). MicroRNA-34a is induced via p53 during cisplatin nephrotoxicity and contributes to cell survival. *Mol Med* 16, 409-416.
- Blondal, T., Jensby Nielsen, S., Baker, A., Andreasen, D., Mouritzen, P., Wrang Teilum, M., and Dahlsveen, I.K. (2012). Assessing sample and miRNA profile quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods* 59, S1-6.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 10, 185-191.
- Boon, R.A., and Vickers, K.C. (2013). Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33, 186-192.
- Brady, H.R., Kone, B.C., Stromski, M.E., Zeidel, M.L., Giebisch, G., and Gullans, S.R. (1990). Mitochondrial injury: an early event in cisplatin toxicity to renal proximal tubules. *Am J Physiol* 258, F1181-1187.
- Brase, J.C., Wuttig, D., Kuner, R., and Sultmann, H. (2010). Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer* 9, 306.
- Breitenbach, J., and Fischer, D. (2013). Wandel und Herausforderung – die pharmazeutische Industrie. In *Die Pharmaindustrie*, J. Breitenbach, and D. Fischer, eds. (Berlin Heidelberg, Springer Verlag), pp. 1-51.
- Burchard, J., Zhang, C., Liu, A.M., Poon, R.T., Lee, N.P., Wong, K.F., Sham, P.C., Lam, B.Y., Ferguson, M.D., Tokiwa, G., *et al.* (2010). microRNA-122 as a regulator of mitochondrial metabolic gene network in hepatocellular carcinoma. *Mol Syst Biol* 6, 402.
- Carmell, M.A., and Hannon, G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat Struct Mol Biol* 11, 214-218.
- Ceman, S., and Saugstad, J. (2011). MicroRNAs: Meta-controllers of gene expression in synaptic activity emerge as genetic and diagnostic markers of human disease. *Pharmacol Ther* 130, 26-37.
- Chan, A.K., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. (2003). Cell-free nucleic acids in plasma, serum and urine: a new tool in molecular diagnosis. *Ann Clin Biochem* 40, 122-130.
- Chang, J., Nicolas, E., Marks, D., Sander, C., Lerro, A., Buendia, M.A., Xu, C., Mason, W.S., Moloshok, T., Bort, R., *et al.* (2004). miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biol* 1, 106-113.
- Chen, C., Ridzon, D.A., Broomer, A.J., Zhou, Z., Lee, D.H., Nguyen, J.T., Barbisin, M., Xu, N.L., Mahuvakar, V.R., Andersen, M.R., *et al.* (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 33, e179.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., *et al.* (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18, 997-1006.
- Chen, X., Higgins, J., Cheung, S.T., Li, R., Mason, V., Montgomery, K., Fan, S.T., van de Rijn, M., and So, S. (2004). Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. *Mod Pathol* 17, 1198-1210.
- Cheng, H.H., Yi, H.S., Kim, Y., Kroh, E.M., Chien, J.W., Eaton, K.D., Goodman, M.T., Tait, J.F., Tewari, M., and Pritchard, C.C. (2013). Plasma processing conditions substantially influence circulating microRNA biomarker levels. *PLoS One* 8, e64795.
- Cheng, Y., Wang, X., Yang, J., Duan, X., Yao, Y., Shi, X., Chen, Z., Fan, Z., Liu, X., Qin, S., *et al.* (2012). A translational study of urine miRNAs in acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 53, 668-676.
- Chiang, H.R., Schoenfeld, L.W., Ruby, J.G., Auyeung, V.C., Spies, N., Baek, D., Johnston, W.K., Russ, C., Luo, S., Babiarz, J.E., *et al.* (2010). Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 24, 992-1009.
- Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. (2008). Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 54, 482-490.

- Chiusolo, A., Defazio, R., Zanetti, E., Mongillo, M., Mori, N., Cristofori, P., and Trevisan, A. (2010). Kidney injury molecule-1 expression in rat proximal tubule after treatment with segment-specific nephrotoxics: a tool for early screening of potential kidney toxicity. *Toxicol Pathol* 38, 338-345.
- Cho, K.H., Park, J.H., Kwon, K.B., Lee, Y.R., So, H.S., Lee, K.K., Lee, S.Y., Moon, S.R., and Yang, S.H. (2014). Autophagy induction by low-dose cisplatin: The role of p53 in autophagy. *Oncol Rep* 31, 248-254.
- Chopra, S., Kaufman, J.S., Jones, T.W., Hong, W.K., Gehr, M.K., Hamburger, R.J., Flamenbaum, W., and Trump, B.F. (1982). Cis-diamminedichloroplatinum-induced acute renal failure in the rat. *Kidney Int* 21, 54-64.
- Chowdhury, F., Williams, A., and Johnson, P. (2009). Validation and comparison of two multiplex technologies, Luminex and Mesoscale Discovery, for human cytokine profiling. *J Immunol Methods* 340, 55-64.
- Chung, A.C., Dong, Y., Yang, W., Zhong, X., Li, R., and Lan, H.Y. (2013). Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF-beta/Smad3-regulated microRNAs. *Mol Ther* 21, 388-398.
- Ciarimboli, G., Ludwig, T., Lang, D., Pavenstadt, H., Koepsell, H., Piechota, H.J., Haier, J., Jaehde, U., Zisowsky, J., and Schlatter, E. (2005). Cisplatin nephrotoxicity is critically mediated via the human organic cation transporter 2. *Am J Pathol* 167, 1477-1484.
- Ciccharelli, R.B., Solomon, M.J., Varshavsky, A., and Lippard, S.J. (1985). In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication. *Biochemistry* 24, 7533-7540.
- Clements, P., Brady, S., York, M., Berridge, B., Mikaelian, I., Nicklaus, R., Gandhi, M., Roman, I., Stamp, C., Davies, D., *et al.* (2010). Time course characterization of serum cardiac troponins, heart fatty acid-binding protein, and morphologic findings with isoproterenol-induced myocardial injury in the rat. *Toxicol Pathol* 38, 703-714.
- Coppola, N., Potenza, N., Pisaturo, M., Mosca, N., Tonziello, G., Signoriello, G., Messina, V., Sagnelli, C., Russo, A., and Sagnelli, E. (2013). Liver microRNA hsa-miR-125a-5p in HBV chronic infection: correlation with HBV replication and disease progression. *PLoS One* 8, e65336.
- Correa-Rotter, R., Hostetter, T.H., Manivel, J.C., Eddy, A.A., and Rosenberg, M.E. (1992). Intrarenal distribution of clusterin following reduction of renal mass. *Kidney Int* 41, 938-950.
- Cortez, M.A., and Calin, G.A. (2009). MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 9, 703-711.
- Coulouarn, C., Factor, V.M., Andersen, J.B., Durkin, M.E., and Thorgeirsson, S.S. (2009). Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene* 28, 3526-3536.
- Craig, A., Sidaway, J., Holmes, E., Orton, T., Jackson, D., Rowlinson, R., Nickson, J., Tonge, R., Wilson, I., and Nicholson, J. (2006). Systems toxicology: integrated genomic, proteomic and metabolomic analysis of methapyrilene induced hepatotoxicity in the rat. *J Proteome Res* 5, 1586-1601.
- Creemers, E.E., Tijssen, A.J., and Pinto, Y.M. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circ Res* 110, 483-495.
- Cui, W., Ma, J., Wang, Y., and Biswal, S. (2011). Plasma miRNA as biomarkers for assessment of total-body radiation exposure dosimetry. *PLoS One* 6, e22988.
- Cummings, B.S., and Schnellmann, R.G. (2002). Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 8-17.
- Cunningham, M.L., Pippin, L.L., Anderson, N.L., and Wenk, M.L. (1995). The hepatocarcinogen methapyrilene but not the analog pyrilamine induces sustained hepatocellular replication and protein alterations in F344 rats in a 13-week feed study. *Toxicol Appl Pharmacol* 131, 216-223.
- Cunningham, P.N., and Quigg, R.J. (2005). Contrasting roles of complement activation and its regulation in membranous nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 16, 1214-1222.
- D'Alessandra, Y., Devanna, P., Limana, F., Straino, S., Di Carlo, A., Brambilla, P.G., Rubino, M., Carena, M.C., Spazzafumo, L., De Simone, M., *et al.* (2010). Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J* 31, 2765-2773.
- D'Souza, Z., McAdoo, S.P., Smith, J., Pusey, C.D., Cook, H.T., Behmoaras, J., and Aitman, T.J. (2013). Experimental crescentic glomerulonephritis: a new biconogenic rat model. *Dis Model Mech.* 6, 1477-1486.

Literaturverzeichnis

- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* 454, 56-61.
- Davoren, P.A., McNeill, R.E., Lowery, A.J., Kerin, M.J., and Miller, N. (2008). Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 9, 76.
- de Larco, J.E., and Todaro, G.J. (1978). Epithelioid and fibroblastic rat kidney cell clones: epidermal growth factor (EGF) receptors and the effect of mouse sarcoma virus transformation. *J Cell Physiol* 94, 335-342.
- Denby, L., Ramdas, V., McBride, M.W., Wang, J., Robinson, H., McClure, J., Crawford, W., Lu, R., Hillyard, D.Z., Khanin, R., *et al.* (2011). miR-21 and miR-214 are consistently modulated during renal injury in rodent models. *Am J Pathol* 179, 661-672.
- Dennis, E.H., Walker, G., Baker, A., and Miller, R.T. (2013). Opportunities and Challenges of Safety Biomarker Qualification: Perspectives from the Predictive Safety Testing Consortium. *Drug Development Research* 74, 112-126.
- Devireddy, L.R., Gazin, C., Zhu, X., and Green, M.R. (2005). A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and iron uptake. *Cell* 123, 1293-1305.
- Dieterle, F., Perentes, E., Cordier, A., Roth, D.R., Verdes, P., Grenet, O., Pantano, S., Moulin, P., Wahl, D., Mahl, A., *et al.* (2010a). Urinary clusterin, cystatin C, beta2-microglobulin and total protein as markers to detect drug-induced kidney injury. *Nat Biotechnol* 28, 463-469.
- Dieterle, F., and Sistare, F. (2010). Biomarkers of Acute Kidney Injury. In *Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health*, V.S. Vaidya, and J.V. Bonventre, eds. (Wiley & Sons, Inc.), pp. 237-263.
- Dieterle, F., Sistare, F., Goodsaid, F., Papaluca, M., Ozer, J.S., Webb, C.P., Baer, W., Senagore, A., Schipper, M.J., Vonderscher, J., *et al.* (2010b). Renal biomarker qualification submission: a dialog between the FDA-EMA and Predictive Safety Testing Consortium. *Nat Biotechnol* 28, 455-462.
- Drumm, K., Bauer, B., Freudinger, R., and Gekle, M. (2002). Albumin induces NF-kappaB expression in human proximal tubule-derived cells (IHKE-1). *Cell Physiol Biochem* 12, 187-196.
- Early, R.J., Yu, H., Mu, X.P., Xu, H., Guo, L., Kong, Q., Zhou, J., He, B., Yang, X., Huang, H., *et al.* (2013). Repeat oral dose toxicity studies of melamine in rats and monkeys. *Arch Toxicol* 87, 517-527.
- Eby, K.G., Rosenbluth, J.M., Mays, D.J., Marshall, C.B., Barton, C.E., Sinha, S., Johnson, K.N., Tang, L., and Pientpol, J.A. (2010). ISG20L1 is a p53 family target gene that modulates genotoxic stress-induced autophagy. *Mol Cancer* 9, 95.
- EFPIA (2013). *The Pharmaceutical Industry in Figures* (Brüssel, The European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations).
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Gmuender, H., Bandenburg, A., and Ahr, H.J. (2008). Prediction of a carcinogenic potential of rat hepatocarcinogens using toxicogenomics analysis of short-term in vivo studies. *Mutat Res* 637, 23-39.
- Ellinger-Ziegelbauer, H., Stuart, B., Wahle, B., Bomann, W., and Ahr, H.J. (2005). Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. *Mutat Res* 575, 61-84.
- Elmore, S.A., and Peddada, S.D. (2009). Points to consider on the statistical analysis of rodent cancer bioassay data when incorporating historical control data. *Toxicol Pathol* 37, 672-676.
- Elton, T.S., Khan, M., and Terentyev, D. (2011). MicroRNAs in cardiovascular disease. *F1000 Med Rep* 3, 10.
- EMA (2009). Final conclusions of the pilot joint EMA/FDA VXDA experience on qualification of nephrotoxicity biomarkers. *www.emea.europa.eu Doc.ref. EMEA/679719/2008 Rev. 1.*
- Endre, Z.H., Pickering, J.W., Walker, R.J., Devarajan, P., Edelstein, C.L., Bonventre, J.V., Frampton, C.M., Bennett, M.R., Ma, Q., Sabbisetti, V.S., *et al.* (2011). Improved performance of urinary biomarkers of acute kidney injury in the critically ill by stratification for injury duration and baseline renal function. *Kidney Int* 79, 1119-1130.
- Ennulat, D., Magid-Slav, M., Rehm, S., and Tatsuoka, K.S. (2010). Diagnostic performance of traditional hepatobiliary biomarkers of drug-induced liver injury in the rat. *Toxicol Sci* 116, 397-412.
- Etheridge, A., Gomes, C.P., Pereira, R.W., Galas, D., and Wang, K. (2013). The complexity, function and applications of RNA in circulation. *Front Genet* 4, 115.

- Etheridge, A., Lee, I., Hood, L., Galas, D., and Wang, K. (2011). Extracellular microRNA: A new source of biomarkers. *Mutat Res* 717, 85-90.
- Eulalio, A., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2008). Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.
- Farid, W.R., Pan, Q., van der Meer, A.J., de Ruiter, P.E., Ramakrishnaiah, V., de Jonge, J., Kwekkeboom, J., Jansen, H.L., Metselaar, H.J., Tilanus, H.W., *et al.* (2012). Hepatocyte-derived microRNAs as serum biomarkers of hepatic injury and rejection after liver transplantation. *Liver Transpl* 18, 290-297.
- FDA (2010). Guidance for Industry Qualification Process for Drug Development Tools DRAFT GUIDANCE, U.S.D.o.H.a.H.S.F.a.D.A.C.f.D.E.a.R. (CDER), ed. (Silver Spring, <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidance/ucm230597.pdf>).
- Ferre, N., Camps, J., Cabre, M., Paul, A., and Joven, J. (2001). Hepatic paraoxonase activity alterations and free radical production in rats with experimental cirrhosis. *Metabolism* 50, 997-1000.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9, 102-114.
- Filipowicz, W., and Grosshans, H. (2011). The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential. *Prog Drug Res* 67, 221-238.
- Flo, T.H., Smith, K.D., Sato, S., Rodriguez, D.J., Holmes, M.A., Strong, R.K., Akira, S., and Aderem, A. (2004). Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432, 917-921.
- Fornari, F., Gramantieri, L., Giovannini, C., Veronese, A., Ferracin, M., Sabbioni, S., Calin, G.A., Grazi, G.L., Croce, C.M., Tavorari, S., *et al.* (2009). MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 69, 5761-5767.
- Freissmuth, M. (2012). Arzneimittelentwicklung und -zulassung – Arzneimittel in der Schwangerschaft. In *Pharmakologie & Toxikologie*, M. Freissmuth, S. Offermanns, and S. Böhm, eds. (Heidelberg, Springer Medizin Verlag), pp. 67-79.
- Fuchs, T.C., Frick, K., Emde, B., Czasch, S., Landenberg, F., and Hewitt, P. (2012). Evaluation of novel acute urinary rat kidney toxicity biomarker for subacute toxicity studies in preclinical trials. *Toxicol Pathol* 40, 1031-1048.
- Fuchs, T.C., and Hewitt, P. (2011). Preclinical perspective of urinary biomarkers for the detection of nephrotoxicity: what we know and what we need to know. *Biomark Med* 5, 763-779.
- Gao, W., Mizukawa, Y., Nakatsu, N., Minowa, Y., Yamada, H., Ohno, Y., and Urushidani, T. (2010). Mechanism-based biomarker gene sets for glutathione depletion-related hepatotoxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 247, 211-221.
- Gatanaga, H., Tachikawa, N., Kikuchi, Y., Teruya, K., Genka, I., Honda, M., Tanuma, J., Yazaki, H., Ueda, A., Kimura, S., *et al.* (2006). Urinary beta2-microglobulin as a possible sensitive marker for renal injury caused by tenofovir disoproxil fumarate. *AIDS Res Hum Retroviruses* 22, 744-748.
- Gatti, D.M., Lu, L., Williams, R.W., Sun, W., Wright, F.A., Threadgill, D.W., and Rusyn, I. (2011). MicroRNA expression in the livers of inbred mice. *Mutat Res* 714, 126-133.
- Gautier, J.C., Riefke, B., Walter, J., Kurth, P., Mylecraine, L., Guilpin, V., Barlow, N., Gury, T., Hoffman, D., Ennulat, D., *et al.* (2010). Evaluation of novel biomarkers of nephrotoxicity in two strains of rat treated with Cisplatin. *Toxicol Pathol* 38, 943-956.
- Giffen, P.S., Pick, C.R., Price, M.A., Williams, A., and York, M.J. (2002). Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity--its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat. *Toxicol Pathol* 30, 365-372.
- Glowacki, F., Savary, G., Gnemmi, V., Buob, D., Van der Hauwaert, C., Lo-Guidice, J.M., Bouye, S., Hazzan, M., Pottier, N., Perrais, M., *et al.* (2013). Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS One* 8, e58014.
- Graham, E.E., Walsh, R.J., Hirst, C.M., Maggs, J.L., Martin, S., Wild, M.J., Wilson, I.D., Harding, J.R., Kenna, J.G., Peter, R.M., *et al.* (2008). Identification of the thiophene ring of methapyrilene as a novel bioactivation-dependent hepatic toxicophore. *J Pharmacol Exp Ther* 326, 657-671.

Literaturverzeichnis

- Graichen, M.E., Neptun, D.A., Dent, J.G., Popp, J.A., and Leonard, T.B. (1985). Effects of methapyrilene on rat hepatic xenobiotic metabolizing enzymes and liver morphology. *Fundam Appl Toxicol* 5, 165-174.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 32, D109-111.
- Guengerich, F.P. (2011). Mechanisms of drug toxicity and relevance to pharmaceutical development. *Drug Metab Pharmacokinet* 26, 3-14.
- Hamadeh, H.K., Knight, B.L., Haugen, A.C., Sieber, S., Amin, R.P., Bushel, P.R., Stoll, R., Blanchard, K., Jayadev, S., Tennant, R.W., *et al.* (2002). Methapyrilene toxicity: anchorage of pathologic observations to gene expression alterations. *Toxicol Pathol* 30, 470-482.
- Hamaguchi, T., Iizuka, N., Tsunedomi, R., Hamamoto, Y., Miyamoto, T., Iida, M., Tokuhisa, Y., Sakamoto, K., Takashima, M., Tamesa, T., *et al.* (2008). Glycolysis module activated by hypoxia-inducible factor 1 α is related to the aggressive phenotype of hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 33, 725-731.
- Han, Y., Ma, F.Y., Tesch, G.H., Manthey, C.L., and Nikolic-Paterson, D.J. (2013). Role of macrophages in the fibrotic phase of rat crescentic glomerulonephritis. *Am J Physiol Renal Physiol* 304, F1043-1053.
- Harpur, E., Ennulat, D., Hoffman, D., Betton, G., Gautier, J.C., Riefke, B., Bounous, D., Schuster, K., Beushausen, S., Guffroy, M., *et al.* (2011). Biological qualification of biomarkers of chemical-induced renal toxicity in two strains of male rat. *Toxicol Sci* 122, 235-252.
- Hartner, A., Hilgers, K.F., Bitzer, M., Veelken, R., and Schockmann, H.O. (2003). Dynamic expression patterns of transforming growth factor- β (2) and transforming growth factor- β receptors in experimental glomerulonephritis. *J Mol Med (Berl)* 81, 32-42.
- Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horvevoets, A.J., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., *et al.* (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 14, 249-256.
- Hermeking, H. (2009). The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ* 17, 193-199.
- Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 12, 613-626.
- Heuer, J.C. (2009). Anatomie der Niere und eines Nephrons, N.u. Gegenstromprinzip, ed. (Pharmakologie Journal Just another WordPress.com weblog).
- Hidaka, S., Kranzlin, B., Gretz, N., and Witzgall, R. (2002). Urinary clusterin levels in the rat correlate with the severity of tubular damage and may help to differentiate between glomerular and tubular injuries. *Cell Tissue Res* 310, 289-296.
- Ho, J., Ng, K.H., Rosen, S., Dostal, A., Gregory, R.I., and Kreidberg, J.A. (2008). Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 19, 2069-2075.
- Hoffmann, D., Adler, M., Vaidya, V.S., Rached, E., Mulrane, L., Gallagher, W.M., Callanan, J.J., Gautier, J.C., Matheis, K., Staedtler, F., *et al.* (2010a). Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. *Toxicol Sci* 116, 8-22.
- Hoffmann, D., Bijol, V., Krishnamoorthy, A., Gonzalez, V.R., Frenzl, G., Zhang, Q., Goering, P.L., Brown, R.P., Wai-
kar, S.S., and Vaidya, V.S. (2012). Fibrinogen excretion in the urine and immunoreactivity in the kidney serves as a translational biomarker for acute kidney injury. *Am J Pathol* 181, 818-828.
- Hoffmann, D., Fuchs, T.C., Henzler, T., Matheis, K.A., Herget, T., Dekant, W., Hewitt, P., and Mally, A. (2010b). Evaluation of a urinary kidney biomarker panel in rat models of acute and subchronic nephrotoxicity. *Toxicology* 277, 49-58.
- Holt, M.P., and Ju, C. (2006). Mechanisms of drug-induced liver injury. *AAPS J* 8, E48-54.
- Hoy, A.M., and Buck, A.H. (2012). Extracellular small RNAs: what, where, why? *Biochem Soc Trans* 40, 886-890.
- Hu, J., Wang, Z., Tan, C.J., Liao, B.Y., Zhang, X., Xu, M., Dai, Z., Qiu, S.J., Huang, X.W., Sun, J., *et al.* (2013). Plasma microRNA, a potential biomarker for acute rejection after liver transplantation. *Transplantation* 95, 991-999.
- Huang, Q., Dunn, R.T., 2nd, Jayadev, S., DiSorbo, O., Pack, F.D., Farr, S.B., Stoll, R.E., and Blanchard, K.T. (2001). Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology. *Toxicol Sci* 63, 196-207.

- Huang, X.R., Tipping, P.G., Apostolopoulos, J., Oettinger, C., D'Souza, M., Milton, G., and Holdsworth, S.R. (1997). Mechanisms of T cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clin Exp Immunol* 109, 134-142.
- Ibanez-Ventoso, C., Vora, M., and Driscoll, M. (2008). Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* 3, e2818.
- Ichimura, T., Asseldonk, E.J., Humphreys, B.D., Gunaratnam, L., Duffield, J.S., and Bonventre, J.V. (2008). Kidney injury molecule-1 is a phosphatidylserine receptor that confers a phagocytic phenotype on epithelial cells. *J Clin Invest* 118, 1657-1668.
- Ichimura, T., Bonventre, J.V., Bailly, V., Wei, H., Hession, C.A., Cate, R.L., and Sanicola, M. (1998). Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury. *J Biol Chem* 273, 4135-4142.
- Iida, T., Fujinaka, H., Xu, B., Zhang, Y., Magdeldin, S., Nameta, M., Liu, Z., Yoshida, Y., Yaoita, E., Tomizawa, S., *et al.* (2013). Decreased urinary calbindin 1 levels in proteinuric rats and humans with distal nephron segment injuries. *Clin Exp Nephrol [Epub ahead of print]* DOI 10.1007/s10157-013-0835-3
- Ishii, A., Sakai, Y., and Nakamura, A. (2007). Molecular pathological evaluation of clusterin in a rat model of unilateral ureteral obstruction as a possible biomarker of nephrotoxicity. *Toxicol Pathol* 35, 376-382.
- Jain, K.K. (2010). Introduction - Classification of Biomarkers. In *The Handbook of Biomarkers*, K.K. Jain, ed. (New York, Springer Science+Business), pp. 1-23.
- Jansohn, M., and Rothhämel, S., eds. (2012). *Gentechnische Methoden*, 5 edn (Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag).
- Ji, X., Takahashi, R., Hiura, Y., Hirokawa, G., Fukushima, Y., and Iwai, N. (2009). Plasma miR-208 as a biomarker of myocardial injury. *Clin Chem* 55, 1944-1949.
- Jiang, M., Wei, Q., Wang, J., Du, Q., Yu, J., Zhang, L., and Dong, Z. (2006). Regulation of PUMA-alpha by p53 in cisplatin-induced renal cell apoptosis. *Oncogene* 25, 4056-4066.
- John-Baptiste, A., Viitsky, A., Sace, F., Zong, Q., Ko, M., Yafawi, R., and Liu, L. (2012). Comparison of 3 kidney injury multiplex panels in rats. *Int J Toxicol* 31, 529-536.
- Kacew, S., and Lee, B.-M. (2012). Toxicology of the Kidney. In *Lu's Basic Toxicology: Fundamentals, Target Organs, and Risk Assessment*, B.-M.L. Sam Kacew, ed. (informahealthcare), pp. 199-209.
- Kahl, R., Schmuck, G., and Vohr, H.-W. (2010). Toxikologie der Organe und Organsysteme. In *Toxikologie Band 1: Grundlagen der Toxikologie*, H.-W. Vohr, ed. (Weinheim, WILEY-VCH Verlag), pp. 95-106.
- Kalinina, E.V., Berozov, T.T., Shtil, A.A., Chernov, N.N., Glasunova, V.A., Novichkova, M.D., and Nurmuradov, N.K. (2012). Expression of genes of glutathione transferase isoforms GSTP1-1, GSTA4-4, and GSTK1-1 in tumor cells during the formation of drug resistance to cisplatin. *Bull Exp Biol Med* 154, 64-67.
- Kaminskas, L.M., and Boyd, B.J. (2011). Nanosized Drug Delivery Vectors and the Reticuloendothelial System In *Intracellular Delivery Fundamental Biomedical Technologies*, A. Prokop, ed. (Dordrecht Heidelberg London New York, Springer), pp. 155-178.
- Kamm, R.C., and Smith, A.G. (1972). Nucleic acid concentrations in normal human plasma. *Clin Chem* 18, 519-522.
- Kanno, K., Okumura, F., Toriumi, W., Ishiyama, N., Nishiyama, S., and Naito, K. (1998). Nephrotoxic serum-induced nephritis in Wistar-Kyoto rats: a model to evaluate antinephritic agents. *Jpn J Pharmacol* 77, 129-135.
- Kaushal, G.P., Kaushal, V., Hong, X., and Shah, S.V. (2001). Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney Int* 60, 1726-1736.
- Kawasaki, K., Yaoita, E., Yamamoto, T., and Kihara, I. (1992). Depletion of CD8 positive cells in nephrotoxic serum nephritis of WKY rats. *Kidney Int* 41, 1517-1526.
- Kawase, T., Ichikawa, H., Ohta, T., Nozaki, N., Tashiro, F., Ohki, R., and Taya, Y. (2008). p53 target gene AEN is a nuclear exonuclease required for p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 27, 3797-3810.
- Kees-Folts, D., Sadow, J.L., and Schreiner, G.F. (1994). Tubular catabolism of albumin is associated with the release of an inflammatory lipid. *Kidney Int* 45, 1697-1709.

Literaturverzeichnis

- Kelly, K.J., Meehan, S.M., Colvin, R.B., Williams, W.W., and Bonventre, J.V. (1999). Protection from toxicant-mediated renal injury in the rat with anti-CD54 antibody. *Kidney Int* 56, 922-931.
- Khan, A.H., Sattar, M.A., Abdullah, N.A., and Johns, E.J. (2007). Influence of cisplatin-induced renal failure on the alpha(1)-adrenoceptor subtype causing vasoconstriction in the kidney of the rat. *Eur J Pharmacol* 569, 110-118.
- Kim, T., Veronese, A., Pichiorri, F., Lee, T.J., Jeon, Y.J., Volinia, S., Pineau, P., Marchio, A., Palatini, J., Suh, S.S., *et al.* (2011). p53 regulates epithelial-mesenchymal transition through microRNAs targeting ZEB1 and ZEB2. *J Exp Med* 208, 875-883.
- Kimura, S.H., Ikawa, M., Ito, A., Okabe, M., and Nojima, H. (2001). Cyclin G1 is involved in G2/M arrest in response to DNA damage and in growth control after damage recovery. *Oncogene* 20, 3290-3300.
- Kirschner, M.B., Edelman, J.J., Kao, S.C., Valley, M.P., van Zandwijk, N., and Reid, G. (2013). The Impact of Hemolysis on Cell-Free microRNA Biomarkers. *Front Genet* 4, 94.
- Kirschner, M.B., Kao, S.C., Edelman, J.J., Armstrong, N.J., Valley, M.P., van Zandwijk, N., and Reid, G. (2011). Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 6, e24145.
- Konta, T., Ichikawa, K., Suzuki, K., Kudo, K., Satoh, H., Kamei, K., Nishidate, E., and Kubota, I. (2013). A microarray analysis of urinary microRNAs in renal diseases. *Clin Exp Nephrol [Epub ahead of print]* DOI 10.1007/s10157-013-0906-5.
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., and Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285, 17442-17452.
- Koufaris, C., Wright, J., Currie, R.A., and Gooderham, N.J. (2012). Hepatic microRNA profiles offer predictive and mechanistic insights after exposure to genotoxic and epigenetic hepatocarcinogens. *Toxicol Sci* 128, 532-543.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 39, D152-157.
- Kriegel, A.J., Liu, Y., Liu, P., Baker, M.A., Hodges, M.R., Hua, X., and Liang, M. (2013). Characteristics of microRNAs enriched in specific cell types and primary tissue types in solid organs. *Physiol Genomics* 45, 1144-1156.
- Krishnamoorthy, A., Ajay, A.K., Hoffmann, D., Kim, T.M., Ramirez, V., Campanholle, G., Bobadilla, N.A., Waikar, S.S., and Vaidya, V.S. (2011). Fibrinogen beta-derived Bbeta(15-42) peptide protects against kidney ischemia/reperfusion injury. *Blood* 118, 1934-1942.
- Kristensen, D.B., Kawada, N., Imamura, K., Miyamoto, Y., Tateno, C., Seki, S., Kuroki, T., and Yoshizato, K. (2000). Proteome analysis of rat hepatic stellate cells. *Hepatology* 32, 268-277.
- Kroh, E.M., Parkin, R.K., Mitchell, P.S., and Tewari, M. (2010). Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 50, 298-301.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet* 11, 597-610.
- Kuroda, T., Yoshida, Y., Kamiie, J., Kovalenko, P., Nameta, M., Fujinaka, H., Yaoita, E., Endo, T., Ishizuka, S., Nakabayashi, K., *et al.* (2004). Expression of MMP-9 in mesangial cells and its changes in anti-GBM glomerulonephritis in WKY rats. *Clin Exp Nephrol* 8, 206-215.
- Kutay, H., Bai, S., Datta, J., Motiwala, T., Pogribny, I., Frankel, W., Jacob, S.T., and Ghoshal, K. (2006). Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem* 99, 671-678.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
- Lakins, J., Bennett, S.A., Chen, J.H., Arnold, J.M., Morrissey, C., Wong, P., O'Sullivan, J., and Tenniswood, M. (1998). Clusterin biogenesis is altered during apoptosis in the regressing rat ventral prostate. *J Biol Chem* 273, 27887-27895.
- Lan, H.Y. (2011). Diverse roles of TGF-beta/Smads in renal fibrosis and inflammation. *Int J Biol Sci* 7, 1056-1067.

- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A.O., Landthaler, M., *et al.* (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129, 1401-1414.
- Lash, L.H. (2009). Toxicology of the kidney. In *Non-Clinical Testing for Toxicity of Pharmaceuticals: Regulatory and Practical Standards for Testing and Application*, J. Bussiere, ed. (London, The Biomedical & Life Sciences Collection, Henry Stewart Talks Ltd).
- Laterza, O.F., Lim, L., Garrett-Engele, P.W., Vlasakova, K., Muniappa, N., Tanaka, W.K., Johnson, J.M., Sina, J.F., Fare, T.L., Sistare, F.D., *et al.* (2009). Plasma MicroRNAs as sensitive and specific biomarkers of tissue injury. *Clin Chem* 55, 1977-1983.
- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., *et al.* (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 141, 672-675.
- Lee, C.T., Risom, T., and Strauss, W.M. (2006). MicroRNAs in mammalian development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 129-139.
- Lee, J.H., Koh, Y.A., Cho, C.K., Lee, S.J., Lee, Y.S., and Bae, S. (2005). Identification of a novel ionizing radiation-induced nuclease, AEN, and its functional characterization in apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 337, 39-47.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
- Lee, R.H., Song, J.M., Park, M.Y., Kang, S.K., Kim, Y.K., and Jung, J.S. (2001). Cisplatin-induced apoptosis by translocation of endogenous Bax in mouse collecting duct cells. *Biochem Pharmacol* 62, 1013-1023.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., *et al.* (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 21, 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 23, 4051-4060.
- Leibbrandt, M.E., Wolfgang, G.H., Metz, A.L., Ozobia, A.A., and Haskins, J.R. (1995). Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat renal proximal tubule cells. *Kidney Int* 48, 761-770.
- Lelongt, B., Bengatta, S., Delauche, M., Lund, L.R., Werb, Z., and Ronco, P.M. (2001). Matrix metalloproteinase 9 protects mice from anti-glomerular basement membrane nephritis through its fibrinolytic activity. *J Exp Med* 193, 793-802.
- Leon, S.A., Ehrlich, G.E., Shapiro, B., and Labbate, V.A. (1977). Free DNA in the serum of rheumatoid arthritis patients. *J Rheumatol* 4, 139-143.
- Leskov, K.S., Klokov, D.Y., Li, J., Kinsella, T.J., and Boothman, D.A. (2003). Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *J Biol Chem* 278, 11590-11600.
- Li, J.Y., Yong, T.Y., Michael, M.Z., and Gleadle, J.M. (2010). Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton)* 15, 599-608.
- Li, T., Cao, H., Zhuang, J., Wan, J., Guan, M., Yu, B., Li, X., and Zhang, W. (2011a). Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta* 412, 66-70.
- Li, Y., Jiang, Z., Xu, L., Yao, H., Guo, J., and Ding, X. (2011b). Stability analysis of liver cancer-related microRNAs. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 43, 69-78.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., and Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics* 8, 166.
- Lijinsky, W., Knutsen, G., and Reuber, M.D. (1983). Failure of methapyrilene to induce tumors in hamsters or guinea pigs. *J Toxicol Environ Health* 12, 653-657.
- Lijinsky, W., Reuber, M.D., and Blackwell, B.N. (1980). Liver tumors induced in rats by oral administration of the anti-histaminic methapyrilene hydrochloride. *Science* 209, 817-819.

Literaturverzeichnis

- Linsen, S.E., de Wit, E., de Bruijn, E., and Cuppen, E. (2010). Small RNA expression and strain specificity in the rat. *BMC Genomics* 11, 249.
- Liu, H., Baliga, M., and Baliga, R. (2002). Effect of cytochrome P450 2E1 inhibitors on cisplatin-induced cytotoxicity to renal proximal tubular epithelial cells. *Anticancer Res* 22, 863-868.
- Lund, E., Guttlinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
- Maguire, D.P., Turton, J.A., Scudamore, C.L., Swain, A.J., McClure, F.J., Smyth, R., Pereira, I.B., Munday, M.R., and York, M.J. (2013). Correlation of histopathology, urinary biomarkers, and gene expression responses following hexachloro-1:3-butadiene-induced acute nephrotoxicity in male Hanover Wistar rats: a 28-day time course study. *Toxicol Pathol* 41, 779-794.
- Mandel, P., and Metais, P. (1947). Les acides nucleiques du plasma sangin chez l'homme. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Paris* 142, 241-243.
- Marshall, C.B., Krofft, R.D., Blonski, M.J., Kowalewska, J., Logar, C.M., Pippin, J.W., Kim, F., Feil, R., Alpers, C.E., and Shankland, S.J. (2011). Role of smooth muscle protein SM22alpha in glomerular epithelial cell injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F1026-1042.
- McDonald, J.S., Milosevic, D., Reddi, H.V., Grebe, S.K., and Algeciras-Schimmich, A. (2011). Analysis of circulating microRNA: preanalytical and analytical challenges. *Clin Chem* 57, 833-840.
- McDuffie, J.E., Ma, J.Y., Sablad, M., Sonee, M., Varacallo, L., Loudon, C., Guy, A., Vegas, J., Liu, X., La, D., *et al.* (2013). Time course of renal proximal tubule injury, reversal, and related biomarker changes in rats following Cisplatin administration. *Int J Toxicol* 32, 251-260.
- McDuffie, J.E., Sablad, M., Ma, J., and Snook, S. (2010). Urinary parameters predictive of cisplatin-induced acute renal injury in dogs. *Cytokine* 52, 156-162.
- Megyesi, J., Safirstein, R.L., and Price, P.M. (1998). Induction of p21WAF1/CIP1/SDI1 in kidney tubule cells affects the course of cisplatin-induced acute renal failure. *J Clin Invest* 101, 777-782.
- Midorikawa, Y., Tsutsumi, S., Taniguchi, H., Ishii, M., Kobune, Y., Kodama, T., Makuuchi, M., and Aburatani, H. (2002). Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis. *Jpn J Cancer Res* 93, 636-643.
- Minchenko, O., Opentanova, I., and Caro, J. (2003). Hypoxic regulation of the 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase gene family (PFKFB-1-4) expression in vivo. *FEBS Lett* 554, 264-270.
- Miranda, K.C., Bond, D.T., McKee, M., Skog, J., Paunescu, T.G., Da Silva, N., Brown, D., and Russo, L.M. (2010). Nucleic acids within urinary exosomes/microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int* 78, 191-199.
- miRBase (2013). <http://mirbase.org/> (Faculty of Life Sciences at the University of Manchester with funding from the BBSRC, and was previously hosted and supported by the Wellcome Trust Sanger Institute).
- Mirsalis, J.C. (1987). Genotoxicity, toxicity, and carcinogenicity of the antihistamine methapyrilene. *Mutat Res* 185, 309-317.
- Mishra, J., Ma, Q., Prada, A., Mitsnefes, M., Zahedi, K., Yang, J., Barasch, J., and Devarajan, P. (2003). Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14, 2534-2543.
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., *et al.* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 10513-10518.
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., and Sanchez-Madrid, F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun* 2, 282.
- Miyaji, T., Kato, A., Yasuda, H., Fujigaki, Y., and Hishida, A. (2001). Role of the increase in p21 in cisplatin-induced acute renal failure in rats. *J Am Soc Nephrol* 12, 900-908.
- Mlcochova, H., Hezova, R., Stanik, M., and Slaby, O. (2013). Urine microRNAs as potential noninvasive biomarkers in urologic cancers? *Urol Oncol* 32, 41.e41-41.e49.

- Mraz, M., Malinova, K., Mayer, J., and Pospisilova, S. (2009). MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 1-4.
- Mulay, S.R., Thomasova, D., Ryu, M., and Anders, H.J. (2012). MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice. *Kidney Int* 81, 1199-1211.
- Muller, P.Y., and Dieterle, F. (2009). Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5, 1023-1038.
- Muralidharan-Chari, V., Clancy, J., Plou, C., Romao, M., Chavrier, P., Raposo, G., and D'Souza-Schorey, C. (2009). ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol* 19, 1875-1885.
- Murata, K., Yoshitomi, H., Tanida, S., Ishikawa, M., Nishitani, K., Ito, H., and Nakamura, T. (2010). Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12, R86.
- Nakasa, T., Miyaki, S., Okubo, A., Hashimoto, M., Nishida, K., Ochi, M., and Asahara, H. (2008). Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum* 58, 1284-1292.
- Nangaku, M., Alpers, C.E., Pippin, J., Shankland, S.J., Kurokawa, K., Adler, S., Johnson, R.J., and Couser, W.G. (1997). Renal microvascular injury induced by antibody to glomerular endothelial cells is mediated by C5b-9. *Kidney Int* 52, 1570-1578.
- NIH, N.I.o.H. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 69, 89-95.
- O'Brien, P.J., Slaughter, M.R., Polley, S.R., and Kramer, K. (2002). Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats. *Lab Anim* 36, 313-321.
- Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Ryo, A., and Lee, S.W. (2003). Modulation of p53 and p73 levels by cyclin G: implication of a negative feedback regulation. *Oncogene* 22, 1678-1687.
- Ozer, J.S., Dieterle, F., Troth, S., Perentes, E., Cordier, A., Verdes, P., Staedtler, F., Mahl, A., Grenet, O., Roth, D.R., *et al.* (2010a). A panel of urinary biomarkers to monitor reversibility of renal injury and a serum marker with improved potential to assess renal function. *Nat Biotechnol* 28, 486-494.
- Ozer, J.S., Reagan, W.J., Schomaker, S., Palandra, J., Baratta, M., and Ramaiah, S.K. (2010b). Translational Biomarkers of Acute Drug-Induced Liver Injury: the current state, gaps, and future opportunities. In *Biomarkers: In Medicine, Drug Discovery, and Environmental Health*, V.S. Vaidya, and J.V. Bonventre, eds. (Wiley & Sons, Inc.), pp. 203-227.
- Pabla, N., and Dong, Z. (2008). Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney Int* 73, 994-1007.
- Pandey, P., Brors, B., Srivastava, P.K., Bott, A., Boehn, S.N., Groene, H.J., and Gretz, N. (2008). Microarray-based approach identifies microRNAs and their target functional patterns in polycystic kidney disease. *BMC Genomics* 9, 624.
- Park, M.S., De Leon, M., and Devarajan, P. (2002). Cisplatin induces apoptosis in LLC-PK1 cells via activation of mitochondrial pathways. *J Am Soc Nephrol* 13, 858-865.
- Parrish, A.R., Chen, G., Burghardt, R.C., Watanabe, T., Morisseau, C., and Hammock, B.D. (2009). Attenuation of cisplatin nephrotoxicity by inhibition of soluble epoxide hydrolase. *Cell Biol Toxicol* 25, 217-225.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degan, B., Muller, P., *et al.* (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86-89.
- Pavlidis, P. (2003). Using ANOVA for gene selection from microarray studies of the nervous system. *Methods* 31, 282-289.
- Peltier, H.J., and Latham, G.J. (2008). Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 14, 844-852.
- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Wei, Q., Smith, R., Yin, X.M., and Dong, Z. (2008). Autophagy is cytoprotective during cisplatin injury of renal proximal tubular cells. *Kidney Int* 74, 631-640.

Literaturverzeichnis

- Pichler, R.H., Boer, I.H., Diaz, M.F.P., and Afkarian, M. (2013). Diabetic Kidney Disease In Clinical Decisions in Nephrology, Hypertension and Kidney Transplantation, E.V. Lerma, and M. Rosner, eds. (New York Heidelberg Dordrecht London, Springer), pp. 547-560.
- Pienta, R.J., Poiley, J.A., and Lebherz, W.B., 3rd (1977). Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int J Cancer* 19, 642-655.
- Pinches, M., Betts, C., Bickerton, S., Burdett, L., Thomas, H., Derbyshire, N., Jones, H.B., and Moores, M. (2012). Evaluation of novel renal biomarkers with a cisplatin model of kidney injury: gender and dosage differences. *Toxicol Pathol* 40, 522-533.
- Pisitkun, T., Shen, R.F., and Knepper, M.A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13368-13373
- Poste, G. (2011). Bring on the biomarkers. *Nature* 469, 156-157.
- Price, S.A., Davies, D., Rowlinson, R., Copley, C.G., Roche, A., Falkenberg, F.W., Riccardi, D., and Betton, G.R. (2010). Characterization of renal papillary antigen 1 (RPA-1), a biomarker of renal papillary necrosis. *Toxicol Pathol* 38, 346-358.
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., and Tewari, M. (2012). Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev Res (Phila)* 5, 492-497.
- Pusey, C.D. (2003). Anti-glomerular basement membrane disease. *Kidney Int* 64, 1535-1550.
- Quackenbush, J. (2001). Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* 2, 418-427.
- Ramachandran, K., Saikumar, J., Bijol, V., Koyner, J.L., Qian, J., Betensky, R.A., Waikar, S.S., and Vaidya, V.S. (2013). Human miRNome Profiling Identifies MicroRNAs Differentially Present in the Urine after Kidney Injury. *Clin Chem* 59, 1742-1752.
- Ramaiah, S.K. (2011). Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin Lab Med* 31, 161-172.
- Ramesh, G., and Reeves, W.B. (2002). TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity. *J Clin Invest* 110, 835-842.
- Ramesh, G., and Reeves, W.B. (2004). Inflammatory cytokines in acute renal failure. *Kidney Int Suppl*, S56-61.
- Ratra, G.S., Cottrell, S., and Powell, C.J. (1998a). Effects of induction and inhibition of cytochromes P450 on the hepatotoxicity of methapyrilene. *Toxicol Sci* 46, 185-196.
- Ratra, G.S., Morgan, W.A., Mullervy, J., Powell, C.J., and Wright, M.C. (1998b). Methapyrilene hepatotoxicity is associated with oxidative stress, mitochondrial dysfunction and is prevented by the Ca²⁺ channel blocker verapamil. *Toxicology* 130, 79-93.
- Ratra, G.S., Powell, C.J., Park, B.K., Maggs, J.L., and Cottrell, S. (2000). Methapyrilene hepatotoxicity is associated with increased hepatic glutathione, the formation of glucuronide conjugates, and enterohepatic recirculation. *Chem Biol Interact* 129, 279-295.
- Raychaudhuri, S., Stuart, J.M., and Altman, R.B. (2000). Principal components analysis to summarize microarray experiments: application to sporulation time series. *Pac Symp Biocomput*, 455-466.
- Raymond, C.K., Roberts, B.S., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Johnson, J.M. (2005). Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 11, 1737-1744.
- Reid, G., Kirschner, M.B., and van Zandwijk, N. (2011). Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 80, 193-208.
- Reynolds, J. (2011). Strain differences and the genetic basis of experimental autoimmune anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *Int J Exp Pathol* 92, 211-217.
- Reynolds, J., Mavromatidis, K., Cashman, S.J., Evans, D.J., and Pusey, C.D. (1998). Experimental autoimmune glomerulonephritis (EAG) induced by homologous and heterologous glomerular basement membrane in two sub-strains of Wistar-Kyoto rat. *Nephrol Dial Transplant* 13, 44-52.

- Reznik-Schuller, H.M., and Lijinsky, W. (1981). Morphology of early changes in liver carcinogenesis induced by methapyrilene. *Arch Toxicol* **49**, 79-83.
- Richardson, F.C., Horn, D.M., and Anderson, N.L. (1994). Dose-responses in rat hepatic protein modification and expression following exposure to the rat hepatocarcinogen methapyrilene. *Carcinogenesis* **15**, 325-329.
- Rogler, C.E., Levoci, L., Ader, T., Massimi, A., Tchaikovskaya, T., Norel, R., and Rogler, L.E. (2009). MicroRNA-23b cluster microRNAs regulate transforming growth factor-beta/bone morphogenetic protein signaling and liver stem cell differentiation by targeting Smads. *Hepatology* **50**, 575-584.
- Rosenberg, M.E., and Silkensen, J. (1995). Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations. *Int J Biochem Cell Biol* **27**, 633-645.
- Rothfuss, A., O'Donovan, M., De Boeck, M., Brault, D., Czich, A., Custer, L., Hamada, S., Plappert-Helbig, U., Hayaishi, M., Howe, J., *et al.* (2010). Collaborative study on fifteen compounds in the rat-liver Comet assay integrated into 2- and 4-week repeat-dose studies. *Mutat Res* **702**, 40-69.
- Rozell, B., Hansson, H.A., Guthenberg, C., Tahir, M.K., and Mannervik, B. (1993). Glutathione transferases of classes alpha, mu and pi show selective expression in different regions of rat kidney. *Xenobiotica* **23**, 835-849.
- Saal, S., and Harvey, S.J. (2009). MicroRNAs and the kidney: coming of age. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **18**, 317-323.
- Sadakata, T., Washida, M., Morita, N., and Furuichi, T. (2007). Tissue distribution of Ca²⁺-dependent activator protein for secretion family members CAPS1 and CAPS2 in mice. *J Histochem Cytochem* **55**, 301-311.
- Saikumar, J., Hoffmann, D., Kim, T.M., Gonzalez, V.R., Zhang, Q., Goering, P.L., Brown, R.P., Bijol, V., Park, P.J., Waikar, S.S., *et al.* (2012). Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol Sci* **129**, 256-267.
- Sasaki, D., Yamada, A., Umeno, H., Kurihara, H., Nakatsuji, S., Fujihira, S., Tsubota, K., Ono, M., Moriguchi, A., Watanabe, K., *et al.* (2011). Comparison of the course of biomarker changes and kidney injury in a rat model of drug-induced acute kidney injury. *Biomarkers* **16**, 553-566.
- Schnellmann, R.G. (2013). Toxic Response of the Kidney. In Casarett and Doull's *Toxicology - The Basic Science of Poison*, C.D. Klaassen, ed. (McGraw Hill education), pp. 639-690.
- Schöffski, O., Fricke, F.-U., and Guminski, W., eds. (2008). *Pharmabetriebslehre*, 2 edn (Berlin Heidelberg, Springer Verlag).
- Schultz, D.R., and Arnold, P.I. (1990). Properties of four acute phase proteins: C-reactive protein, serum amyloid A protein, alpha 1-acid glycoprotein, and fibrinogen. *Semin Arthritis Rheum* **20**, 129-147.
- Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* **5**, R13.
- Sheikh-Hamad, D., Cacini, W., Buckley, A.R., Isaac, J., Truong, L.D., Tsao, C.C., and Kishore, B.K. (2004). Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Arch Toxicol* **78**, 147-155.
- Shi, Q., Hong, H., Senior, J., and Tong, W. (2010). Biomarkers for drug-induced liver injury. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **4**, 225-234.
- Sieber, M., Hoffmann, D., Adler, M., Vaidya, V.S., Clement, M., Bonventre, J.V., Zidek, N., Rached, E., Amberg, A., Callanan, J.J., *et al.* (2009). Comparative analysis of novel noninvasive renal biomarkers and metabonomic changes in a rat model of gentamicin nephrotoxicity. *Toxicol Sci* **109**, 336-349.
- Siemens, H., Jackstadt, R., Hunten, S., Kaller, M., Menssen, A., Gotz, U., and Hermeking, H. (2011). miR-34 and SNAIL form a double-negative feedback loop to regulate epithelial-mesenchymal transitions. *Cell Cycle* **10**, 4256-4271.
- Silkensen, J.R., Agarwal, A., Nath, K.A., Manivel, J.C., and Rosenberg, M.E. (1997). Temporal induction of clusterin in cisplatin nephrotoxicity. *J Am Soc Nephrol* **8**, 302-305.
- Sorrentino, S. (1998). Human extracellular ribonucleases: multiplicity, molecular diversity and catalytic properties of the major RNase types. *Cell Mol Life Sci* **54**, 785-794.

Literaturverzeichnis

- Stahl, P.J., and Felsen, D. (2001). Transforming growth factor-beta, basement membrane, and epithelial-mesenchymal transdifferentiation: implications for fibrosis in kidney disease. *Am J Pathol* 159, 1187-1192.
- Starckx, S., Batheja, A., Verheyen, G.R., Jonghe, S.D., Steemans, K., Dijck, B.V., Singer, M., Bogdan, N., Snoeys, J., Vinken, P., *et al.* (2013). Evaluation of miR-122 and other biomarkers in distinct acute liver injury in rats. *Toxicol Pathol* 41, 795-804.
- Starkey Lewis, P.J., Dear, J., Platt, V., Simpson, K.J., Craig, D.G., Antoine, D.J., French, N.S., Dhaun, N., Webb, D.J., Costello, E.M., *et al.* (2011). Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* 54, 1767-1776.
- Steinbach, S., Weis, J., Schweighauser, A., Francey, T., and Neiger, R. (2014). Plasma and Urine Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Dogs with Acute Kidney Injury or Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med*.
- Strimbu, K., and Tavel, J.A. (2010). What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS* 5, 463-466.
- Su, Y.W., Chen, X., Jiang, Z.Z., Wang, T., Wang, C., Zhang, Y., Wen, J., Xue, M., Zhu, D., Su, Y.J., *et al.* (2012). A panel of serum microRNAs as specific biomarkers for diagnosis of compound- and herb-induced liver injury in rats. *PLoS One* 7, e37395.
- Sukata, T., Sumida, K., Kushida, M., Ogata, K., Miyata, K., Yabushita, S., and Uwagawa, S. (2011). Circulating microRNAs, possible indicators of progress of rat hepatocarcinogenesis from early stages. *Toxicol Lett* 200, 46-52.
- Sun, Y., Koo, S., White, N., Peralta, E., Esau, C., Dean, N.M., and Perera, R.J. (2004). Development of a micro-array to detect human and mouse microRNAs and characterization of expression in human organs. *Nucleic Acids Res* 32, e188.
- Suryawanshi, S., Vlad, A.M., Lin, H.M., Mantia-Smaldone, G., Laskey, R., Lee, M., Lin, Y., Donnellan, N., Klein-Patel, M., Lee, T., *et al.* (2013). Plasma microRNAs as novel biomarkers for endometriosis and endometriosis-associated ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 19, 1213-1224.
- Suter, L., Babiss, L.E., and Wheeldon, E.B. (2004). Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chem Biol* 11, 161-171.
- Swain, A., Turton, J., Scudamore, C., Maguire, D., Pereira, I., Freitas, S., Smyth, R., Munday, M., Stamp, C., Gandhi, M., *et al.* (2012). Nephrotoxicity of hexachloro-1:3-butadiene in the male Hanover Wistar rat; correlation of minimal histopathological changes with biomarkers of renal injury. *J Appl Toxicol* 32, 417-428.
- Swain, A., Turton, J., Scudamore, C.L., Pereira, I., Viswanathan, N., Smyth, R., Munday, M., McClure, F., Gandhi, M., Sondh, S., *et al.* (2011). Urinary biomarkers in hexachloro-1:3-butadiene-induced acute kidney injury in the female Hanover Wistar rat; correlation of alpha-glutathione S-transferase, albumin and kidney injury molecule-1 with histopathology and gene expression. *J Appl Toxicol* 31, 366-377.
- Szabo, G., and Bala, S. (2013). MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.10, 542-452
- Takashi, M., Zhu, Y., Miyake, K., and Kato, K. (1996). Urinary 28-kD calbindin-D as a new marker for damage to distal renal tubules caused by cisplatin-based chemotherapy. *Urol Int* 56, 174-179.
- Tam, F.W., Smith, J., Morel, D., Karkar, A.M., Thompson, E.M., Cook, H.T., and Pusey, C.D. (1999). Development of scarring and renal failure in a rat model of crescentic glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 14, 1658-1666.
- Tan, B., Piwnicka-Worms, D., and Ratner, L. (2000). Multidrug resistance transporters and modulation. *Curr Opin Oncol* 12, 450-458.
- Tang, S., Leung, J.C., Abe, K., Chan, K.W., Chan, L.Y., Chan, T.M., and Lai, K.N. (2003). Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 111, 515-527.
- Tang, Y., Zhang, Y.Q., and Huang, Z. (2007). Development of two-stage SVM-RFE gene selection strategy for microarray expression data analysis. *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform* 4, 365-381.
- Thompson, K.L., Afshari, C.A., Amin, R.P., Bertram, T.A., Car, B., Cunningham, M., Kind, C., Kramer, J.A., Lawton, M., Mirsky, M., *et al.* (2004). Identification of platform-independent gene expression markers of cisplatin nephrotoxicity. *Environ Health Perspect* 112, 488-494.
- Tian, Z., Greene, A.S., Pietrusz, J.L., Matus, I.R., and Liang, M. (2008). MicroRNA-target pairs in the rat kidney identified by microRNA microarray, proteomic, and bioinformatic analysis. *Genome Res* 18, 404-411.

- Tipping, P.G., and Holdsworth, S.R. (2006). T cells in crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17, 1253-1263.
- Tipping, P.G., and Timoshanko, J. (2005). Contributions of intrinsic renal cells to crescentic glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 101, e173-178.
- Tobiame, H., Kanzaki, S., Hida, S., Ono, T., Moriwake, T., Yamauchi, S., Tanaka, H., and Seino, Y. (1997). Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 2056-2061.
- Togashi, Y., Imura, N., and Miyamoto, Y. (2013). Urinary cystatin C as a renal biomarker and its immunohistochemical localization in anti-GBM glomerulonephritis rats. *Exp Toxicol Pathol* 65, 1137-1143.
- Togashi, Y., Sakaguchi, Y., Miyamoto, M., and Miyamoto, Y. (2012). Urinary cystatin C as a biomarker for acute kidney injury and its immunohistochemical localization in kidney in the CDDP-treated rats. *Exp Toxicol Pathol* 64, 797-805.
- Tonomura, Y., Tsuchiya, N., Torii, M., and Uehara, T. (2010). Evaluation of the usefulness of urinary biomarkers for nephrotoxicity in rats. *Toxicology* 273, 53-59.
- Townsend, D.M., Deng, M., Zhang, L., Lapus, M.G., and Hanigan, M.H. (2003). Metabolism of Cisplatin to a nephrotoxin in proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 14, 1-10.
- Townsend, D.M., Tew, K.D., He, L., King, J.B., and Hanigan, M.H. (2009). Role of glutathione S-transferase Pi in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biomed Pharmacother* 63, 79-85.
- Tryndyak, V.P., Latendresse, J.R., Montgomery, B., Ross, S.A., Beland, F.A., Rusyn, I., and Pogribny, I.P. (2012). Plasma microRNAs are sensitive indicators of inter-strain differences in the severity of liver injury induced in mice by a choline- and folate-deficient diet. *Toxicol Appl Pharmacol* 262, 52-59.
- Tsuruya, K., Ninomiya, T., Tokumoto, M., Hirakawa, M., Masutani, K., Taniguchi, M., Fukuda, K., Kanai, H., Kishihara, K., Hirakata, H., *et al.* (2003). Direct involvement of the receptor-mediated apoptotic pathways in cisplatin-induced renal tubular cell death. *Kidney Int* 63, 72-82.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., and Burwinkel, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 39, 7223-7233.
- Tuschl, G., Hrach, J., Hewitt, P.G., and Mueller, S.O. (2007). Application of Short- and Long-Term Hepatocyte Cultures to Predict Toxicities. In *Hepatotoxicity: From Genomics to in vitro and in vivo Models*, S.C. Sahu, ed. (John Wiley & Sons, Ltd.), pp. 141-174.
- Vaidya, V.S., Ozer, J.S., Dieterle, F., Collings, F.B., Ramirez, V., Troth, S., Muniappa, N., Thudium, D., Gerhold, D., Holder, D.J., *et al.* (2010). Kidney injury molecule-1 outperforms traditional biomarkers of kidney injury in preclinical biomarker qualification studies. *Nat Biotechnol* 28, 478-485.
- Vaidya, V.S., Waikar, S.S., Ferguson, M.A., Collings, F.B., Sunderland, K., Gioules, C., Bradwin, G., Matsouaka, R., Betensky, R.A., Curhan, G.C., *et al.* (2008). Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans. *Clin Transl Sci* 1, 200-208.
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9, 654-659.
- van Angelen, A.A., Gludemans, B., van der Kemp, A.W., Hoenderop, J.G., and Bindels, R.J. (2013). Cisplatin-induced injury of the renal distal convoluted tubule is associated with hypomagnesaemia in mice. *Nephrol Dial Transplant* 28, 879-889.
- van Rooij, E., Sutherland, L.B., Qi, X., Richardson, J.A., Hill, J., and Olson, E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science* 316, 575-579.
- van Timmeren, M.M., Bakker, S.J., Vaidya, V.S., Bailly, V., Schuur, T.A., Damman, J., Stegeman, C.A., Bonventre, J.V., and van Goor, H. (2006). Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 291, F456-464.
- Vasilescu, C., Rossi, S., Shimizu, M., Tudor, S., Veronese, A., Ferracin, M., Nicoloso, M.S., Barbarotto, E., Popa, M., Stanciulea, O., *et al.* (2009). MicroRNA fingerprints identify miR-150 as a plasma prognostic marker in patients with sepsis. *PLoS One* 4, e7405.

Literaturverzeichnis

- Verducci, J.S., Melfi, V.F., Lin, S., Wang, Z., Roy, S., and Sen, C.K. (2006). Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiol Genomics* 25, 355-363.
- Vickers, A.E., Rose, K., Fisher, R., Saulnier, M., Sahota, P., and Bentley, P. (2004). Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Toxicol Pathol* 32, 577-590.
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., and Remaley, A.T. (2011). MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13, 423-433.
- Vickers, K.C., and Remaley, A.T. (2012). Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* 23, 91-97.
- Vinken, M., Decrock, E., De Vuyst, E., Leybaert, L., Vanhaecke, T., and Rogiers, V. (2009). Biochemical characterisation of an in vitro model of hepatocellular apoptotic cell death. *Altern Lab Anim* 37, 209-218.
- Vinken, P., Starckx, S., Barale-Thomas, E., Looszoza, A., Sonee, M., Goeminne, N., Versmissen, L., Buyens, K., and Lampo, A. (2012). Tissue kim-1 and urinary clusterin as early indicators of Cisplatin-induced acute kidney injury in rats. *Toxicol Pathol* 40, 1049-1062.
- Visone, R., and Croce, C.M. (2009). MiRNAs and cancer. *Am J Pathol* 174, 1131-1138.
- Vladimirova, N.M., Lobanova, N.V., and Potapenko, N.A. (2010). State of oncomarker protein B23/nucleophosmin in HeLa cells. *Biochemistry (Mosc)* 75, 851-860.
- Vu, T.H., and Werb, Z. (2000). Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev* 14, 2123-2133.
- Wadey, R.M., Pinches, M.G., Jones, H.B., Riccardi, D., and Price, S.A. (2013). Tissue Expression and Correlation of a Panel of Urinary Biomarkers Following Cisplatin-induced Kidney Injury. *Toxicol Pathol*. 42, 591-602
- Waikar, S.S., Sabbiseti, V.S., and Bonventre, J.V. (2010). Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int* 78, 486-494.
- Wallace, K.B., Murphy, E., Rosenblum, I.Y., Herman, G., Metz, A.L., Rosen, M.R., York, M.J., Holt, G., MacGregor, J.T., Hausner, E., *et al.* (2001). NCSS Fact Finding Cardiotoxicity Expert Working Group (FDA), pp. PTT slides.
- Wang, D., and Lippard, S.J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 4, 307-320.
- Wang, G., Tam, L.S., Li, E.K., Kwan, B.C., Chow, K.M., Luk, C.C., Li, P.K., and Szeto, C.C. (2010a). Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 37, 2516-2522.
- Wang, G.K., Zhu, J.Q., Zhang, J.T., Li, Q., Li, Y., He, J., Qin, Y.W., and Jing, Q. (2010b). Circulating microRNA: a novel potential biomarker for early diagnosis of acute myocardial infarction in humans. *Eur Heart J* 31, 659-666.
- Wang, H., Xiao, W., Zhou, Q., Chen, Y., Yang, S., Sheng, J., Yin, Y., Fan, J., and Zhou, J. (2009a). Bystin-like protein is upregulated in hepatocellular carcinoma and required for nucleogenesis in cancer cell proliferation. *Cell Res* 19, 1150-1164.
- Wang, J., Gao, Y., Ma, M., Li, M., Zou, D., Yang, J., Zhu, Z., and Zhao, X. (2013a). Effect of miR-21 on Renal Fibrosis by Regulating MMP-9 and TIMP1 in kk-ay Diabetic Nephropathy Mice. *Cell Biochem Biophys*.67, 537-546
- Wang, K., Yuan, Y., Cho, J.H., McClarty, S., Baxter, D., and Galas, D.J. (2012a). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 7, e41561.
- Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L.E., and Galas, D.J. (2009b). Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 4402-4407.
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., and Galas, D.J. (2010c). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 38, 7248-7259.
- Wang, N., Zhou, Y., Jiang, L., Li, D., Yang, J., Zhang, C.Y., and Zen, K. (2012b). Urinary MicroRNA-10a and MicroRNA-30d Serve as Novel, Sensitive and Specific Biomarkers for Kidney Injury. *PLoS One* 7, e51140.
- Wang, Y., and Lee, C.G. (2009). MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med* 13, 12-23.

- Wang, Y., Tang, N., Hui, T., Wang, S., Zeng, X., Li, H., and Ma, J. (2013b). Identification of endogenous reference genes for RT-qPCR analysis of plasma microRNAs levels in rats with acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Appl Toxicol* 33, 1330-1336.
- Ware, L.B., Johnson, A.C., and Zager, R.A. (2011). Renal cortical albumin gene induction and urinary albumin excretion in response to acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol* 300, F628-638.
- Watanabe, T., Suzuki, T., Natsume, M., Nakajima, M., Narumi, K., Hamada, S., Sakuma, T., Koeda, A., Oshida, K., Miyamoto, Y., *et al.* (2012). Discrimination of genotoxic and non-genotoxic hepatocarcinogens by statistical analysis based on gene expression profiling in the mouse liver as determined by quantitative real-time PCR. *Mutat Res* 747, 164-175.
- Weber, J.A., Baxter, D.H., Zhang, S., Huang, D.Y., Huang, K.H., Lee, M.J., Galas, D.J., and Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 56, 1733-1741.
- Wei, Q., Dong, G., Franklin, J., and Dong, Z. (2007a). The pathological role of Bax in cisplatin nephrotoxicity. *Kidney Int* 72, 53-62.
- Wei, Q., Dong, G., Yang, T., Megyesi, J., Price, P.M., and Dong, Z. (2007b). Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Am J Physiol Renal Physiol* 293, F1282-1291.
- Weiland, C. (2007). Mechanistische Analyse der Nephrokarzinogenese mit Hilfe von Expressionsanalysen *in vivo* und *in vitro*. In Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät (Düsseldorf, Heinrich-Heine-Universität), pp. 176.
- Weisel, J.W. (2005). Fibrinogen and fibrin. *Adv Protein Chem* 70, 247-299.
- Weiskirchen, R., Moser, M., Weiskirchen, S., Erdel, M., Dahmen, S., Buettner, R., and Gressner, A.M. (2001). LIM-domain protein cysteine- and glycine-rich protein 2 (CRP2) is a novel marker of hepatic stellate cells and binding partner of the protein inhibitor of activated STAT1. *Biochem J* 359, 485-496.
- Wiemer, E.A. (2007). The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur J Cancer* 43, 1529-1544.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
- Willeit, P., Zampetaki, A., Dudek, K., Kaudewitz, D., King, A., Kirkby, N.S., Crosby-Nwaobi, R., Prokopi, M., Drozdov, I., Langle, S.R., *et al.* (2013). Circulating microRNAs as novel biomarkers for platelet activation. *Circ Res* 112, 595-600.
- Winter, J., and Diederichs, S. (2011). MicroRNA biogenesis and cancer. *Methods Mol Biol* 676, 3-22.
- Wolf, G., Schroeder, R., Ziyadeh, F.N., and Stahl, R.A. (2004). Albumin up-regulates the type II transforming growth factor-beta receptor in cultured proximal tubular cells. *Kidney Int* 66, 1849-1858.
- Xie, Y., Nishi, S., Iguchi, S., Imai, N., Sakatsume, M., Saito, A., Ikegame, M., Iino, N., Shimada, H., Ueno, M., *et al.* (2001). Expression of osteopontin in gentamicin-induced acute tubular necrosis and its recovery process. *Kidney Int* 59, 959-974.
- Xu, H., He, J.H., Xiao, Z.D., Zhang, Q.Q., Chen, Y.Q., Zhou, H., and Qu, L.H. (2010). Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development. *Hepatology* 52, 1431-1442.
- Xu, H.B., Gong, Y.P., Cheng, J., Chu, Y.W., and Xiong, S.D. (2005). CXCL16 participates in pathogenesis of immunological liver injury by regulating T lymphocyte infiltration in liver tissue. *World J Gastroenterol* 11, 4979-4985.
- Xu, L., Yang, B.F., and Ai, J. (2013). MicroRNA transport: a new way in cell communication. *J Cell Physiol* 228, 1713-1719.
- Yamada, K., Hori, Y., Hanafusa, N., Okuda, T., Nagano, N., Choi-Miura, N.H., Couser, W.G., Miyata, T., Kurokawa, K., Fujita, T., *et al.* (2001). Clusterin is up-regulated in glomerular mesangial cells in complement-mediated injury. *Kidney Int* 59, 137-146.
- Yamamoto, Y., Moore, R., Flavell, R.A., Lu, B., and Negishi, M. (2010). Nuclear receptor CAR represses TNFalpha-induced cell death by interacting with the anti-apoptotic GADD45B. *PLoS One* 5, e10121.
- Yamaura, Y., Nakajima, M., Takagi, S., Fukami, T., Tsuneyama, K., and Yokoi, T. (2012). Plasma microRNA profiles in rat models of hepatocellular injury, cholestasis, and steatosis. *PLoS One* 7, e30250.

Literaturverzeichnis

- Yang, X., Greenhaw, J., Shi, Q., Su, Z., Qian, F., Davis, K., Mendrick, D.L., and Salminen, W.F. (2012). Identification of urinary microRNA profiles in rats that may diagnose hepatotoxicity. *Toxicol Sci* 125, 335-344.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., and Nugent, K. (2007). Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci* 334, 115-124.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.
- Yin, C., Evason, K.J., Asahina, K., and Stainier, D.Y. (2013). Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *J Clin Invest* 123, 1902-1910.
- Yonezawa, A., Masuda, S., Nishihara, K., Yano, I., Katsura, T., and Inui, K. (2005). Association between tubular toxicity of cisplatin and expression of organic cation transporter rOCT2 (Slc22a2) in the rat. *Biochem Pharmacol* 70, 1823-1831.
- Yoshida, T., Kurella, M., Beato, F., Min, H., Ingelfinger, J.R., Stears, R.L., Swinford, R.D., Gullans, S.R., and Tang, S.S. (2002). Monitoring changes in gene expression in renal ischemia-reperfusion in the rat. *Kidney Int* 61, 1646-1654.
- Yu, Y., Jin, H., Holder, D., Ozer, J.S., Villarreal, S., Shughrue, P., Shi, S., Figueroa, D.J., Clouse, H., Su, M., *et al.* (2010). Urinary biomarkers trefoil factor 3 and albumin enable early detection of kidney tubular injury. *Nat Biotechnol* 28, 470-477.
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., *et al.* (2009). Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2, ra81.
- Zhang, Y., Jia, Y., Zheng, R., Guo, Y., Wang, Y., Guo, H., Fei, M., and Sun, S. (2010a). Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 56, 1830-1838.
- Zhang, Y., Liu, D., Chen, X., Li, J., Li, L., Bian, Z., Sun, F., Lu, J., Yin, Y., Cai, X., *et al.* (2010b). Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 39, 133-144.
- Zhao, X., Zhang, Y., Li, L., Mann, D., Imig, J.D., Emmett, N., Gibbons, G., and Jin, L.M. (2011). Glomerular expression of kidney injury molecule-1 and podocytopenia in diabetic glomerulopathy. *Am J Nephrol* 34, 268-280.
- Zhou, Y., Vaidya, V.S., Brown, R.P., Zhang, J., Rosenzweig, B.A., Thompson, K.L., Miller, T.J., Bonventre, J.V., and Goering, P.L. (2008). Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol Sci* 101, 159-170.
- Zoja, C., Morigi, M., Figliuzzi, M., Bruzzi, I., Oldroyd, S., Benigni, A., Ronco, P., and Remuzzi, G. (1995). Proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-1 on challenge with albumin and other proteins. *Am J Kidney Dis* 26, 934-941.
- Zweig, M.H., and Campbell, G. (1993). Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine. *Clin Chem* 39, 561-577.

Anhang

Anhang-Tabelle 1 Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Nieren von Ratten nach einmaliger Cisplatin (Cp) Verabreichung. Gelistet ist die Anzahl der Tiere mit entsprechenden pathologischen Veränderungen. Dosisgrupp pro Tag n=6; Scores: 1=minimal, 2=leicht, 3=moderat, 4=ausgeprägt, 5=massiv.

	Ktrl (0 mg/kg)				1 mg/kg Cp				3 mg/kg Cp			
	Tag 3	Tag 5	Tag 8	Tag 26	Tag 3	Tag 5	Tag 8	Tag 26	Tag 3	Tag 5	Tag 8	Tag 26
Cisplatin (Cp) n=6												
Tubuläre Nekrose												
1	0	0	0	0	1	4	0	0	6	0	0	0
2	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0
3	0	0	0	0	0	0	3	0	0	3	2	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Frühe tubuläre Degeneration												
1	0	0	0	0	6	0	0	0	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubuläre Regeneration												
1	0	0	0	0	0	1	2	0	0	3	0	0
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	2
3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	4
4	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hyaline Harnzylinder												
1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	6	0	5
2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Granuläre Harnzylinder												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mineralisation												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflammation												
1	0	0	0	0	0	1	3	1	0	5	1	1
2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	3	1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Einfache tubuläre Dilatation												
1	5	5	6	2	3	5	3	6	3	5	1	0
2	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	3	4
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nierenbecken Dilatation												
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Chronische Inflammation												
1	0	0	2	1	2	2	1	2	1	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tubuläre Basophilie												
1	0	0	1	0	3	2	0	2	1	0	0	2
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang

Anhang-Tabelle 2 Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Nieren von Ratten nach einmaliger Verabreichung von nephrotoxischem Serum (NTS). Gelistet ist die Anzahl der Tiere mit entsprechenden pathologischen Veränderungen. Wistar Kyoto (WKY) Ratten: Kontrollgruppe n=3, Dosisgruppen n=5; spragueDawley (SD) Ratte: n n=6; Scores: 1=minimal, 2=leicht, 3=moderat, 4=ausgeprägt, 5=massiv.

Nephrotoxisches Serum (NTS)	WKY (n=3-5) Tag 14				SD (n=6) Tag 14		
	Ktrl (0 ml/kg)	1 ml/kg NTS	2,5 ml/kg NTS	5 ml/kg NTS	Ktrl (0 ml/kg)	1,5 ml/kg NTS	5 ml/kg NTS
Interstitielle Fibrose							
1	0	0	0	0	2	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Zysten							
1	0	0	0	0	2	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Mesangiale Hyperzellulartät							
1	0	5	0	0	0	3	1
2	0	0	5	0	0	0	2
3	0	0	0	5	0	0	3
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Akkumulation der glomerulären Matrix							
1	0	4	0	0	0	2	1
2	0	0	5	0	0	0	2
3	0	0	0	5	0	0	3
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Hyperplasie der Bowman'schen Kapsel							
1	0	0	5	0	0	0	2
2	0	0	0	5	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Hyaline Harnzylinder							
1	0	0	5	0	0	0	3
2	0	0	0	5	0	0	2
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Tubuläre Degeneration/Regeneration							
1	0	2	1	0	0	4	0
2	0	0	4	0	0	0	1
3	0	0	0	5	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	0	0	0
Tubuläre Dilatation							
1	0	0	1	0	0	0	1
2	0	0	3	5	0	0	2
3	0	0	0	0	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Tubuläre Basophilie							
1	0	0	0	0	0	0	1
2	0	0	0	0	3	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Mononukleäre Infiltration							
1	0	0	2	1	0	0	2
2	0	0	2	4	0	0	3
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Nierenbecken Dilatation							
1	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0
Mesangial Matrix PAS							
1	0	4	0	0	0	3	0
2	0	0	5	0	0	2	1
3	0	0	0	5	0	0	2
4	0	0	0	0	0	0	3
5	0	0	0	0	0	0	0

Anhang-Tabelle 3 Ergebnisse der histologischen Untersuchung der Lebern von Ratten nach täglicher Methapyrilen (MPy) Verabreichung und zehn Tage nach behandlungs ende (Tag 26). Gelistet ist is Anzahl der Tiere mit entsprechenden pathologischen Veränderungen. Dosisgrupp pro Tag n=6; Scores: 1=minimal, 2=leicht, 3=moderat, 4=ausgeprägt, 5=massiv.

	Ktrl (0 mg/kg)				30 mg/kg MPy				80 mg/kg MPy			
	Tag 4	Tag 8	Tag 15	Tag 24	Tag 4	Tag 8	Tag 15	Tag 24	Tag 4	Tag 8	Tag 15	Tag 24
Methapyrilen (MPy) n=6												
Portale mononukleäre Inflammation												
1	0	0	0	1	1	3	4	1	2	4	2	1
2	0	0	0	0	0	3	0	0	0	1	2	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Microgranuloma												
1	2	3	5	4	1	1	1	1	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Periportale Nekrose												
1	0	0	0	0	1	1	5	0	5	2	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	4	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Periportale Vakuolisierung												
1	0	0	0	0	1	2	4	0	1	0	1	1
2	0	0	0	0	0	2	2	0	4	5	5	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gallengangs Hyperplasie												
1	0	0	0	0	1	2	5	6	1	2	3	3
2	0	0	0	0	0	0	0	0	5	3	2	3
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Portale Pigmentablagerungen												
1	0	0	0	0	0	0	1	6	0	0	5	6
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Erhöhte Mitosen												
1	0	0	0	0	1	0	0	0	2	3	2	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mittelzonen Degeneration												
1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Portale Degeneration												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anhang-Tabelle 4 Profil im Urin von 136 signifikant veränderten miRNAs nach Cisplatin Behandlung. Dargestellt ist das Verhältnis der miRNA-Menge nach Behandlung pro Tier relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden. Die Werte sind als Heatmap in Abb. 3.11 C visualisiert. rno=Ratten spezifisch

miRNA	3 mg/kg Cisplatin																		
	Tag 3				Tag 5				Tag 8				Tag 15				Tag 26		
miR-200a	3,51	4,66	4,53	6,75	22,63	39,48	13,28	20,80	0,86	1,47	0,29	-/-	0,01	1,10	0,02	1,37	1,11	-/-	1,09
miR-141	1,06	2,40	4,48	7,54	4,37	4,57	1,08	4,18	1,22	3,54	1,01	1,69	0,18	0,13	0,20	0,14	1,15	0,28	0,24
miR-200c	1,49	1,75	5,89	2,81	2,08	1,68	0,73	4,05	2,11	1,76	0,41	-/-	1,23	0,78	0,02	2,13	0,89	-/-	0,46
miR-494	5,14	11,33	8,88	12,80	4,00	15,90	6,67	4,15	1,50	5,95	6,06	2,08	0,67	4,61	2,00	2,09	0,04	2,14	2,45
miR-146b	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	1,10	2,55	0,91	1,52	2,71	6,60	3,81	5,22	3,84	1,39	1,72
miR-31	1,07	0,87	0,88	1,34	2,03	1,48	1,37	1,44	1,06	2,46	1,20	1,47	3,15	6,25	6,17	7,31	1,75	1,80	2,18
miR-708	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	3,87	5,82	2,74	6,35	2,28	3,79	3,88	7,16	4,35	3,23	2,94	2,63	3,32
miR-138	1,05	0,64	0,83	0,90	2,69	1,79	2,19	1,41	2,03	4,70	1,69	2,81	1,50	4,33	4,08	2,32	1,45	2,04	2,98
miR-363	1,07	0,87	0,88	1,22	2,28	1,66	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	3,05	1,73	4,22	1,92	1,87	2,04	1,46
miR-126-3p	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	9,63	4,26	6,49	2,74	6,35	2,28	3,79	-/-	6,46	2,43	6,45	1,15	1,35	2,93
miR-28	1,07	0,90	0,88	1,00	2,28	7,79	2,36	3,84	2,74	6,35	2,28	3,79	2,05	1,56	3,07	4,11	1,15	1,18	1,79
miR-125b-5p	1,38	0,80	1,15	1,38	3,34	10,17	3,49	5,02	1,88	4,35	1,56	2,60	2,47	2,16	1,92	4,72	1,53	1,51	1,43
miR-190b_rno	1,07	0,87	0,88	0,98	2,28	1,66	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	1,22	2,24	1,62	35,44	1,56	2,15	2,21
miR-125a-3p	1,07	0,87	0,88	0,69	2,30	2,31	2,51	2,52	2,67	6,19	2,22	3,70	1,07	0,80	1,21	8,16	2,44	1,18	0,99
miR-409-3p	1,07	0,87	0,88	0,69	3,11	2,34	1,44	1,82	2,74	6,35	5,80	6,89	1,58	0,67	1,02	1,24	2,84	1,09	1,74
miR-7a	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	4,41	2,66	2,26	2,74	6,35	2,28	3,79	0,87	2,42	1,60	0,67	3,62	2,80	-/-
miR-451	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	8,28	1,55	1,05	4,65	1,18	0,99
miR-23b	1,39	1,24	1,41	0,80	1,73	4,65	1,89	2,11	2,50	5,81	2,08	3,47	1,36	1,02	1,55	1,05	0,47	0,49	0,41
miR-34c	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	2,90	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-29b	1,07	0,91	0,88	0,69	2,28	2,90	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,13	1,16	0,98
miR-135b	1,07	0,87	0,88	1,27	2,28	3,54	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	0,88	0,91	0,76
miR-18a	1,07	0,87	0,88	0,69	2,35	4,34	2,84	4,69	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-135a	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	5,63	1,54	2,28	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-107	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	6,22	1,54	3,25	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-335-5p	1,07	0,87	0,88	0,69	4,26	2,58	3,61	2,68	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-148b	1,07	0,87	0,88	0,69	4,94	6,73	4,32	3,31	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-500	1,07	0,87	0,88	0,69	4,22	6,30	3,01	3,63	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-207_rno	1,93	1,88	2,27	2,15	6,35	5,07	4,24	5,14	1,89	5,19	3,70	-/-	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-125a-5p	3,17	1,96	1,79	2,82	1,73	5,21	2,40	3,91	2,53	5,88	2,11	3,51	1,17	2,23	3,11	4,50	1,11	0,91	1,88
miR-331-5p	2,10	2,71	1,39	1,05	7,60	5,60	2,81	2,56	1,33	24,34	17,04	11,17	2,17	1,33	1,50	1,56	1,67	1,95	0,98
miR-152	1,07	0,87	1,58	1,54	5,71	6,67	3,32	4,96	2,53	5,88	2,11	3,51	1,55	1,98	1,01	2,92	1,14	0,62	0,70
miR-139-5p	1,07	0,87	0,88	0,69	5,42	5,34	4,16	7,64	2,74	6,35	2,28	3,79	0,75	3,92	0,85	1,90	2,28	1,18	0,99
miR-532-3p	1,07	0,87	0,88	0,69	6,26	18,29	6,26	10,91	2,74	6,35	2,28	3,79	1,42	0,98	1,48	1,18	1,15	1,18	0,99
miR-499	1,07	0,87	0,88	0,69	10,72	14,21	6,22	14,23	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-505_rno	1,07	0,87	0,88	0,69	5,80	8,56	6,31	6,56	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-872	1,07	0,87	0,88	0,80	8,23	9,76	6,26	6,57	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,58	2,09	1,11	1,15	0,97
miR-340-5p	1,07	0,87	0,88	0,69	7,18	7,57	1,66	3,77	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-193	1,07	0,87	0,88	0,69	8,44	10,82	2,11	3,54	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-221	1,07	1,14	0,88	1,35	9,71	8,87	3,15	7,63	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-339-5p	1,07	0,87	0,88	1,39	5,39	7,59	4,19	6,42	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-126-5p	1,07	0,87	0,88	0,69	10,77	9,49	7,79	5,77	2,74	6,35	2,28	3,79	2,02	7,22	1,34	3,29	0,68	1,35	2,06
miR-215	1,07	0,87	0,88	0,69	12,61	9,71	6,42	9,69	2,47	18,42	2,05	3,41	1,08	2,23	0,75	5,61	0,66	2,38	0,57
miR-667	2,61	3,83	4,10	3,97	-/-	5,63	4,91	3,51	1,12	2,59	0,93	1,55	0,59	0,44	0,67	0,45	0,28	5,62	2,32
miR-150	2,13	1,53	0,94	1,83	3,68	7,67	3,87	4,42	0,96	2,23	0,80	1,33	0,83	2,71	1,22	2,64	2,02	1,04	1,31
miR-140	2,24	2,68	2,42	2,50	2,92	9,09	3,43	5,93	1,19	2,76	0,99	1,65	0,62	2,43	1,10	1,79	0,94	1,31	1,43
miR-27b	1,22	2,46	1,55	2,42	5,76	8,19	3,98	4,13	1,29	2,99	1,07	1,79	0,68	3,78	2,44	2,85	0,92	1,50	1,34
miR-145	1,53	1,59	1,40	2,21	4,81	5,33	4,65	5,19	0,94	2,81	1,60	1,30	0,39	3,40	1,27	1,22	0,36	2,39	1,97
miR-204	2,77	2,30	2,53	3,42	3,56	4,16	2,01	2,26	0,32	2,16	1,50	0,79	0,45	2,08	1,20	1,90	0,75	0,95	1,42
miR-196c_rno	2,56	3,16	2,29	1,59	1,52	5,54	1,86	2,92	1,32	3,07	1,10	1,83	0,30	1,75	0,90	2,36	0,69	1,09	1,77
miR-327_rno	1,07	0,94	0,88	0,84	4,94	6,29	3,75	4,86	2,74	6,35	8,58	3,79	0,17	1,75	0,20	2,60	3,47	18,90	5,66
miR-383	1,07	0,87	0,95	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	2,74	6,35	2,28	3,79	0,20	1,11	1,02	0,16	0,63	4,93	2,04
miR-410	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	2,74	6,35	2,94	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	17,99	0,99
miR-155	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	2,27	1,54	2,03	2,74	6,35	2,28	3,79	0,54	2,01	2,36	1,54	0,59	3,44	1,79
miR-411	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	1,81	4,20	2,32	2,51	0,46	3,16	1,48	1,34	1,59	4,79	2,30
miR-188-5p	2,71	2,28	3,89	4,57	1,36	0,98	0,36	0,34	1,85	5,54	1,81	4,22	0,90	1,82	1,44	1,48	0,98	0,80	0,81
miR-133a	4,13	3,79	1,84	6,46	0,26	0,31	0,17	0,18	0,06	1,01	1,36	0,66	0,39	3,81	1,61	1,43	1,00	1,90	2,26
miR-184	3,74	2,64	0,84	4,49	-/-	0,51	1,01	0,45	0,27	1,63	0,34	0,37	0,39	0,94	0,78	1,28	1,34	1,59	1,42
miR-133b	3,09	3,76	2,22	5,87	0,32	0,23	0,22	0,22	0,66	1,54	0,55	0,92	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-223	1,74	3,05	0,85	0,46	5,30	3,67	2,14	2,48	0,24	0,44	0,16	0,26	2,91	19,98	0,94	1,20	6,83	1,31	0,12
miR-24	2,18	1,90	1,64	2,09	9,51	13,79	10,46	9,82	0,38	0,44	0,32	0,14	1,42	3,01	2,34	2,94	1,38	1,71	1,75
miR-193b	4,63	1,74	2,39	2,15	6,83	9,53	3,93	8,31	1,00	0,72	0,25	0,42	3,80	5,21	5,96	4,00	2,32	-/-	1,42
miR-99b	3,11	2,00	1,09	2,80	2,33	9,23	2,35	4,61	0,69	-/-	0,34	0,51	1,92	2,36	3,20	3,90	2,12	1,02	1,95
miR-146a	2,50	1,64	1,07	1,32	2,33	4,87	3,25	5,33	0,66	1,53	0,55	0,91	11,00	20,03	5,30	8,66	8,20	4,67	5,05
miR-99a	1,07	0,87	0,88	0,69	2,28	1,66	1,54	1,59	0,48	0,75	0,24	0,39	1,13	-/-	1,99	5,49	7,90	4,33	7,71
miR-197	1,56	0,26	0																

miR-532-5p_rno	1,07	0,87	0,88	0,78	26,95	53,13	24,70	29,23	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-15b	1,07	0,87	1,13	0,70	34,63	61,06	21,87	30,97	2,51	5,81	2,08	3,47	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-128a	1,07	4,23	0,88	0,69	21,78	18,47	20,47	25,01	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-652	1,10	1,64	1,23	1,47	11,71	42,97	17,57	24,85	2,69	6,24	2,24	3,73	1,36	1,02	1,55	1,08	1,23	1,18	0,99
miR-15a	1,07	0,87	0,88	0,69	32,45	39,27	12,64	24,79	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-345-3p_rno	1,07	0,87	0,88	0,69	18,57	28,31	15,88	12,57	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-92a	4,90	4,33	3,58	3,42	40,94	47,08	27,02	30,60	1,14	19,75	13,34	17,19	1,58	2,68	2,23	2,18	1,45	2,80	1,28
miR-29c	2,50	5,80	4,03	5,54	72,91	113,48	39,73	48,29	2,19	5,08	1,82	3,03	1,10	3,22	2,02	2,06	0,91	1,89	2,29
miR-301b	1,81	4,26	1,92	3,98	58,54	103,39	47,28	51,25	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	3,24	2,69	5,14	1,21	1,18	2,10
miR-19a	2,72	4,99	2,72	3,41	50,22	112,19	28,37	43,66	1,79	4,15	1,49	2,48	2,84	5,87	3,39	5,09	3,05	1,23	2,25
miR-106b	1,56	3,57	1,81	3,76	58,60	64,53	-	34,59	2,41	5,58	2,00	3,33	1,92	5,61	2,82	2,71	3,43	2,12	1,63
miR-34b-3p	4,59	4,34	10,77	4,56	17,11	29,47	17,16	38,48	0,96	3,68	4,00	4,26	3,47	1,67	1,94	1,79	0,92	1,07	0,76
miR-185	-	2,88	3,64	3,47	38,18	84,97	36,30	37,20	2,74	6,35	2,28	3,79	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-328	3,05	2,65	2,35	2,38	47,21	34,25	29,02	28,36	4,57	3,31	1,71	3,27	3,00	2,43	3,11	3,09	1,59	0,65	1,29
miR-148a	0,87	3,76	5,84	3,01	13,42	13,75	9,79	10,54	2,74	6,35	2,28	3,79	2,78	2,20	-	1,24	1,99	1,01	0,34
miR-27a	1,34	1,91	1,63	1,15	8,32	8,59	6,78	8,09	1,63	3,05	1,09	1,82	1,19	4,35	0,45	2,66	2,46	1,61	0,42
miR-331-3p	3,09	2,74	2,24	3,09	8,26	22,89	8,55	11,70	1,37	2,57	0,92	1,53	1,91	3,88	3,01	6,55	1,44	1,12	1,99
miR-181a	2,65	3,41	2,57	3,36	3,78	13,26	3,17	4,98	1,11	2,57	0,92	1,53	1,58	4,51	3,22	2,48	1,73	2,08	1,58
let-7i	3,71	5,36	3,47	5,81	6,01	21,42	5,89	13,12	1,10	2,55	0,92	1,53	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-574-3p	3,88	3,14	2,29	2,13	11,63	13,68	8,35	7,73	0,82	2,09	0,68	1,13	1,08	1,18	1,22	1,85	1,32	1,03	1,12
let-7d	2,38	2,54	2,28	1,68	11,29	37,01	11,05	17,06	1,13	1,65	0,59	0,99	0,96	1,45	1,31	1,85	1,87	1,19	0,88
miR-194	5,71	6,89	5,71	6,11	8,16	38,59	5,30	10,67	0,57	3,36	0,45	0,36	0,34	1,07	0,77	1,21	1,00	1,32	1,28
miR-182	4,89	8,14	5,96	7,13	23,22	60,90	15,34	18,05	0,67	1,56	0,56	0,93	0,93	1,38	0,70	0,90	0,35	0,38	0,52
let-7e	4,52	3,65	3,98	2,22	9,11	30,41	7,77	11,46	1,87	2,43	0,87	1,45	1,36	1,02	1,55	1,05	1,28	0,14	0,12
miR-103	2,80	3,35	3,67	2,76	1,90	85,86	20,88	22,00	2,38	5,53	1,98	3,30	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-375	6,25	3,62	4,18	3,61	132,53	195,94	81,24	147,37	1,56	1,72	0,17	0,39	0,95	0,50	0,34	1,50	0,75	0,33	0,62
miR-365	2,19	1,78	1,27	2,02	93,55	105,28	62,12	95,56	1,64	3,79	1,36	2,27	0,63	0,47	0,71	5,58	1,15	-	1,04
miR-26b	3,01	5,37	4,28	3,28	67,33	152,06	41,38	59,13	0,91	2,12	0,76	1,26	0,64	1,50	0,72	1,38	0,98	0,79	1,07
miR-30d	2,96	2,75	2,50	2,43	92,09	105,02	67,21	81,30	1,18	2,73	0,98	1,63	0,94	2,21	1,54	2,66	1,28	1,85	1,53
let-7b	2,83	3,24	3,66	0,14	18,08	59,64	17,12	36,15	0,97	0,83	0,25	0,41	0,70	0,52	0,79	8,82	2,18	-	3,46
miR-200b	3,79	3,46	4,27	3,00	12,50	52,60	12,64	22,76	1,16	1,22	0,37	-	1,28	1,31	-	10,97	1,09	-	0,72
miR-30b	2,09	1,75	1,42	1,54	24,16	39,13	16,24	18,17	1,06	0,68	0,18	0,16	1,51	1,57	1,63	2,34	1,48	0,54	1,17
miR-30c	2,36	1,71	1,13	1,31	30,06	48,04	22,89	25,41	1,04	0,59	0,12	0,13	1,59	1,75	1,76	2,55	1,28	0,45	1,22
let-7c	2,33	2,12	-	2,26	18,33	56,77	-	28,24	1,38	1,04	0,39	0,29	1,12	1,32	0,92	2,53	1,35	0,99	1,33
miR-26a	2,06	2,75	2,16	1,99	22,15	63,30	18,89	26,37	0,60	0,34	0,25	0,25	0,82	1,59	1,10	1,73	1,08	1,11	1,18
miR-19b	10,95	17,30	10,63	13,39	72,76	125,22	48,98	79,93	0,35	0,43	0,28	0,23	3,89	5,15	3,80	6,11	3,01	1,29	2,24
miR-16	3,86	5,26	3,69	3,15	123,00	160,70	77,23	122,05	0,76	0,76	0,27	0,45	1,28	3,82	1,41	2,87	1,66	0,80	1,47
miR-20a	4,76	7,63	5,30	3,80	139,81	238,80	97,56	186,10	0,58	0,41	0,28	0,24	0,97	2,20	1,25	3,18	1,87	0,77	1,80
miR-191	5,63	5,69	3,74	5,11	57,41	98,40	45,94	57,33	0,75	0,67	-	0,16	1,76	4,24	3,48	2,88	1,53	1,07	1,65
miR-29a	4,19	9,91	6,98	12,26	54,90	86,12	35,65	43,69	0,43	0,79	0,33	0,47	0,85	3,42	2,50	2,71	0,92	2,63	1,97
miR-30a	3,02	4,37	3,28	3,92	51,28	62,99	34,91	39,14	0,66	0,97	0,64	0,41	0,99	2,20	1,67	2,06	1,15	1,37	1,72
miR-30e	3,73	4,99	4,12	4,99	45,56	53,56	26,16	31,17	0,39	0,80	0,47	0,25	0,77	2,16	1,47	1,70	1,00	1,11	1,55
miR-192	6,64	9,49	-	7,90	119,19	176,38	76,95	80,61	0,36	1,67	0,20	0,15	0,44	1,61	0,92	1,80	0,70	1,03	1,27
miR-203	2,87	3,70	2,19	10,80	50,40	81,76	38,04	40,63	0,51	1,36	0,18	0,23	0,62	1,18	1,07	2,84	0,94	0,67	1,22
miR-93	4,83	7,45	3,76	4,84	97,19	155,15	92,38	128,12	1,04	2,40	0,86	1,43	1,36	8,19	1,55	7,68	9,49	-	8,47
miR-342-3p	1,94	1,28	1,31	1,47	49,06	45,22	31,52	44,78	0,95	2,20	0,79	1,31	1,26	2,80	1,89	2,86	1,14	-	2,29
miR-186	5,53	-	4,48	3,68	23,08	61,19	25,76	26,89	0,74	1,72	0,61	1,02	0,91	3,31	2,32	2,73	1,02	0,75	1,48
miR-320	3,76	2,61	2,68	2,37	31,57	39,20	23,37	23,85	0,56	0,86	0,44	0,77	0,79	1,82	1,77	2,16	1,24	1,21	1,50
miR-218	7,58	5,16	3,48	5,84	37,19	75,96	17,01	27,08	1,22	2,83	1,01	1,69	0,93	1,88	1,41	2,96	1,55	1,14	1,75
miR-222	3,54	2,91	2,64	3,31	42,91	41,31	27,29	37,36	0,84	1,52	0,84	0,83	2,05	4,73	3,82	4,70	1,09	1,37	1,98
miR-744	3,31	4,18	3,31	4,50	39,35	93,23	42,80	39,05	0,76	1,76	0,63	1,05	1,36	5,76	3,82	5,08	1,43	1,69	1,66
miR-429	3,95	3,37	4,34	3,95	21,54	77,60	23,44	39,46	0,15	0,35	0,13	0,21	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-17	3,41	3,03	2,19	1,70	43,48	79,04	33,99	50,23	0,03	0,08	0,03	0,05	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-106a	3,32	2,91	2,34	2,04	41,79	76,80	39,64	56,32	0,03	0,07	0,02	0,04	1,36	1,02	1,55	1,05	1,15	1,18	0,99
miR-484	5,29	1,97	1,51	1,36	18,02	69,24	10,93	28,88	1,15	1,43	0,07	0,12	20,19	25,86	40,02	0,32	22,23	-	17,82
miR-21	4,69	6,72	5,18	8,59	57,37	88,02	53,47	71,19	1,27	2,23	0,31	0,48	15,48	50,39	22,04	52,56	2,05	1,52	3,46
miR-130a	5,35	7,72	5,80	9,88	170,53	214,99	116,06	146,24	0,71	1,31	0,47	0,78	11,07	32,44	25,70	28,56	4,57	-	9,01

Anhang-Tabelle 5 Profil im Urin von 74 signifikant veränderten miRNAs nach Behandlung mit nephrotoxischem Serum. Dargestellt ist das Verhältnis der miRNA-Menge nach Behandlung pro Tier relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden. Die Werte sind als Heatmap in Abb. 3.15 C visualisiert. WKY=Wistar Kyoto, SD=Sprague Dawley, rno=Ratten spezifisch

miRNA	5 ml/kg nephrotoxisches Serum																					
	Tag 8 WKY				Tag 14 WKY				Tag 8 SD				Tag 14 WKY									
miR-146a	4,14	3,34	5,21	10,79	3,68	4,36	4,91	5,65	4,33	7,80	2,65	5,61	2,94	1,90	2,21	2,72	2,96	2,94	5,67	4,70	4,59	4,10
miR-191	4,88	6,05	7,36	6,90	7,69	3,25	3,18	3,89	3,21	4,87	2,26	16,09	3,93	5,03	1,51	2,70	2,17	1,90	3,13	3,66	2,60	4,53
miR-193b	1,79	1,92	2,25	7,90	2,24	2,43	1,28	2,37	1,95	7,34	1,41	5,72	3,19	5,93	1,05	1,73	2,15	3,75	1,42	4,82	1,67	3,51
miR-145	3,15	1,12	3,96	3,80	2,80	2,25	2,62	7,59	2,01	3,90	5,29	3,88	3,45	3,28	1,07	1,47	1,67	2,85	0,81	4,32	1,65	5,74
miR-92a	4,13	2,68	7,30	3,44	6,79	2,48	1,99	3,69	2,17	3,58	4,87	4,95	3,14	4,72	0,94	1,06	1,71	3,05	1,61	4,30	1,51	4,26
miR-211	3,93	1,40	4,95	20,35	3,50</																	

Anhang

miR-19b	2,65	1,18	3,34	5,19	2,36	2,00	2,40	7,40	2,54	3,22	1,33	4,57	1,45	0,51	0,68	1,41	2,24	0,79	1,17	1,57	3,27	1,64
miR-192	2,69	1,45	1,60	3,17	1,13	2,16	2,40	4,90	1,80	2,34	1,90	5,96	2,45	1,54	0,64	1,12	2,00	0,67	2,07	1,64	3,80	2,45
miR-196c_rno	4,11	1,47	5,17	2,34	3,65	2,30	1,75	2,80	1,25	2,37	3,12	1,78	1,64	1,50	2,23	1,65	3,74	1,45	2,76	1,15	3,34	2,17
miR-23b	3,22	1,15	4,05	2,32	2,86	1,46	3,46	3,38	1,82	1,98	3,60	1,42	0,89	1,13	1,54	0,68	1,94	1,26	2,56	1,22	2,76	1,63
miR-27b	3,26	1,36	4,11	3,76	2,90	2,32	2,28	5,37	1,93	2,47	2,89	2,30	1,38	0,91	2,08	0,71	1,77	0,92	2,24	0,91	3,83	1,71
miR-140	3,57	1,43	4,50	2,56	3,18	1,39	1,03	2,86	1,41	1,22	2,53	1,44	1,21	0,92	1,43	1,03	0,96	1,13	1,80	1,12	2,50	1,50
miR-26b	4,13	1,47	5,19	1,89	3,67	1,38	1,97	4,20	1,15	1,81	2,40	2,40	1,70	0,86	1,76	0,84	0,88	0,95	1,41	0,87	3,70	1,16
miR-130a	3,91	1,39	4,92	2,11	3,47	1,68	2,94	5,53	1,65	2,27	3,55	3,35	1,97	1,11	1,65	1,08	1,07	1,01	1,54	1,00	2,80	1,33
miR-429	3,97	1,41	4,99	8,13	5,97	1,76	1,99	6,80	2,78	2,70	2,22	2,11	3,39	1,07	1,24	2,25	1,18	0,75	1,44	0,74	1,83	0,98
miR-27a	3,37	4,44	4,24	5,31	3,00	2,15	2,40	3,22	1,67	2,87	3,53	2,55	2,45	1,38	0,94	1,42	2,44	1,03	1,62	1,55	1,82	1,13
miR-30d	3,38	2,69	4,21	10,04	5,10	1,56	1,73	2,99	1,81	2,85	3,80	2,57	3,63	1,52	1,18	0,76	1,05	1,50	2,06	1,05	2,13	1,50
miR-186	3,93	2,19	4,95	4,95	3,49	2,62	1,75	3,59	2,67	3,21	1,31	2,85	1,31	1,46	0,86	2,06	1,46	1,61	1,94	2,51	2,15	1,56
miR-30b	2,74	3,22	3,41	4,91	4,31	2,73	3,41	4,79	2,99	3,17	1,67	1,41	1,03	1,16	1,02	0,90	1,97	1,69	1,64	1,19	2,83	1,55
miR-30c	2,92	5,04	4,98	6,66	5,95	2,64	3,33	3,45	2,56	2,76	1,66	1,88	1,15	1,36	1,16	1,05	2,23	1,59	1,76	1,32	2,77	1,74
let-7d	2,65	1,85	3,34	4,16	2,36	2,89	3,50	6,42	2,19	2,85	1,86	2,20	1,83	1,70	1,30	1,21	2,55	1,52	2,11	0,94	2,99	2,15
miR-26a	2,07	2,44	2,32	6,23	2,82	1,58	2,03	3,53	1,64	1,72	1,21	2,18	1,69	0,80	1,99	1,20	2,12	1,19	2,46	1,13	3,28	1,14
miR-20a	3,23	2,21	4,06	9,22	2,87	2,35	1,39	3,84	2,05	2,02	1,69	3,79	3,13	1,16	1,31	1,01	2,12	1,39	1,60	1,69	3,02	1,15
miR-30a	2,73	2,92	2,86	7,29	3,77	2,00	2,14	3,91	1,84	2,97	1,85	4,40	1,68	1,40	1,47	0,90	1,71	1,20	2,13	1,51	2,78	1,93
miR-138	2,99	1,80	3,76	2,78	2,66	1,04	1,25	1,14	1,06	0,89	1,22	0,93	1,33	0,38	1,79	0,84	2,14	0,93	2,91	0,80	2,61	0,97
miR-203	5,86	2,34	8,19	3,80	3,84	1,33	2,13	2,98	1,54	2,27	1,46	2,99	1,01	0,73	0,84	1,20	0,75	0,58	0,81	0,49	1,66	1,24
miR-574-3p	4,00	2,17	5,03	2,68	4,97	0,79	1,28	0,91	0,96	1,72	4,06	1,66	0,66	1,32	1,03	1,62	1,36	0,78	1,52	0,77	1,25	1,35
miR-222	5,63	1,89	9,89	2,25	7,67	0,57	0,96	1,62	2,06	2,09	6,23	0,64	1,64	4,35	0,09	1,17	1,17	1,90	0,48	2,91	0,76	3,93
miR-486	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	1,77	1,44	2,27	6,56	1,61	1,59	2,05	0,78	2,22	10,41	2,20	0,96	9,14	0,81	6,49
miR-200b	2,42	4,65	8,02	15,64	13,70	0,97	0,95	3,71	1,39	1,44	7,20	2,23	1,51	1,91	1,44	0,88	1,69	1,53	1,29	0,44	1,35	1,23
miR-200c	2,78	2,94	4,07	7,06	11,51	0,98	1,00	2,68	1,46	1,16	6,57	1,13	0,92	1,74	1,10	1,09	1,42	0,97	0,74	0,48	0,81	1,10
miR-29c	9,52	4,71	19,43	8,72	9,46	1,17	1,68	2,36	1,67	2,26	5,69	1,58	1,73	3,14	0,37	0,81	0,98	1,85	0,93	1,65	0,70	2,60
miR-207_rno	8,37	5,36	14,16	2,75	11,04	1,94	1,63	2,26	1,77	3,41	9,43	3,67	1,45	3,05	0,78	0,97	0,81	1,63	0,96	1,61	0,72	2,15
miR-99a	2,98	1,15	3,75	2,01	3,03	1,44	3,16	3,34	2,64	2,12	2,73	1,13	0,58	1,13	0,68	0,64	0,86	1,38	1,06	1,13	1,15	1,51
miR-100	3,33	1,19	4,20	1,69	2,96	1,50	2,24	3,92	1,71	2,03	4,09	1,45	0,75	2,45	0,83	0,60	0,70	1,40	0,82	1,39	1,00	1,85
miR-125b-5p	3,35	2,10	4,22	1,88	2,98	1,26	1,77	3,26	1,10	1,87	4,30	1,21	0,79	1,35	0,87	0,63	1,18	1,36	0,81	1,35	1,04	1,79
miR-10b	5,24	1,87	6,59	2,64	4,65	2,01	1,57	2,90	1,44	2,27	4,67	1,29	0,90	1,46	0,66	0,69	0,81	1,63	1,60	1,61	0,98	2,15
miR-99b	3,88	2,22	4,89	2,16	3,45	1,36	1,81	2,11	1,32	2,71	2,22	0,98	0,91	1,62	0,53	0,60	1,13	1,30	1,01	1,08	1,26	1,66
miR-375	4,00	3,13	4,04	2,13	9,88	2,36	1,92	3,01	2,68	2,53	6,25	2,21	1,28	3,16	0,69	0,60	1,62	1,59	0,92	1,04	0,70	2,23
miR-141	5,24	1,87	6,59	3,06	4,65	1,18	1,10	3,60	1,01	1,59	6,56	1,61	1,21	2,05	0,78	0,97	0,63	1,28	0,75	1,26	0,64	1,68
miR-146b	5,00	1,78	6,29	2,91	4,44	1,54	1,44	1,62	1,32	2,09	6,32	2,67	1,67	1,98	0,75	1,14	0,81	1,63	0,96	1,79	0,76	2,15
miR-126-3p	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	2,56	1,44	2,27	6,15	1,51	2,24	1,92	0,73	1,19	0,81	1,63	0,96	1,61	0,72	2,15
miR-451	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,31	1,23	3,63	1,13	1,78	6,56	1,61	1,21	2,05	0,78	0,97	1,06	1,63	0,96	1,61	0,72	2,15
miR-148a	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	3,01	1,44	2,27	5,64	1,39	1,04	1,77	0,67	0,83	0,78	1,58	0,93	1,56	0,70	2,08
miR-34b-3p	5,24	1,87	6,59	2,45	4,65	1,68	1,57	3,92	1,44	2,58	6,56	1,61	1,21	2,05	0,78	0,97	0,81	1,63	0,96	1,61	0,72	2,15
miR-218	4,38	1,56	5,52	2,98	3,90	2,17	1,57	3,64	2,72	2,61	3,45	2,95	1,69	1,10	0,57	1,17	0,90	1,25	0,73	1,24	1,43	1,65
miR-93	5,24	1,87	6,59	2,52	4,65	1,68	2,14	3,22	1,58	3,17	4,36	5,49	2,77	1,37	0,71	0,65	0,82	1,38	0,93	1,36	1,02	1,81
miR-182	4,90	1,75	6,17	1,81	4,36	1,58	2,08	5,10	1,56	2,10	5,23	4,51	2,44	1,64	1,26	1,20	1,15	1,34	1,00	1,33	1,40	1,77
miR-744	5,24	1,87	6,59	4,94	4,65	1,62	1,51	3,46	2,82	4,74	5,62	8,75	2,12	2,82	0,93	1,74	0,77	1,46	1,02	1,45	0,65	1,93
miR-210	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	1,77	1,44	8,65	6,56	10,78	3,57	2,05	0,78	0,97	0,81	1,63	0,96	1,61	0,72	4,05
miR-324-3p	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	1,77	1,45	5,73	6,56	11,29	2,75	5,49	0,78	0,98	0,81	1,63	1,43	1,61	0,72	2,15
let-7g	5,24	1,87	6,59	1,82	4,65	1,68	1,57	2,14	1,44	2,27	6,19	4,45	2,40	1,94	1,77	0,91	0,79	1,60	1,67	1,59	1,31	2,11
miR-152	4,29	1,53	5,39	3,39	3,81	1,57	0,94	3,05	1,01	1,61	6,12	4,53	2,34	1,28	2,16	0,94	0,85	1,13	1,25	1,11	1,63	1,48
miR-125a-5p	5,24	1,87	6,59	2,72	4,65	1,64	1,87	1,72	1,41	2,38	5,58	3,12	2,24	1,75	1,55	2,22	1,82	1,61	1,83	1,84	1,48	2,12
miR-17	2,58	4,01	9,74	5,50	4,91	0,93	1,50	2,88	1,97	3,15	5,25	4,54	2,70	2,48	0,90	1,83	1,39	1,75	2,17	1,60	1,88	2,50
miR-25	4,68	7,53	5,89	6,84	4,16	37,51	4,86	26,71	1,44	2,27	6,25	4,81	11,63	6,14	0,70	0,89	1,04	1,63	0,96	689,92	1,06	14,47
miR-337-5p	19,37	3,64	5,53	6,80	13,82	2,60	3,31	18,93	14,76	23,57	4,85	1,88	4,15	4,98	0,35	0,50	0,58	2,34	0,85	1,16	0,57	2,58
miR-328	24,09	15,52	31,59	6,24	18,08	5,09	3,58	4,38	3,97	6,91	22,87	7,95	2,49	13,76	1,20	1,87	2,00	7,22	1,85	6,35	1,33	12,40
miR-197	9,43	4,11	10,19	3,68	8,46	4,17	4,32	4,71	4,33	7,14	21,59	4,04	1,13	6,09	1,12	0,91	0,81	2,32	2,01	1,94	1,00	3,24
miR-320	5,24	5,35	9,27	4,14	5,88	7,88	5,83	2,46	5,90	10,34	4,62	8,45	3,65	6,73	0,89	1,49	1,47	5,01	2,81	3,20	1,44	4,12
miR-484	8,64	3,68	9,47	7,31	7,49	3,62	2,62	4,79	4,15	12,93	3,97	5,78	5,69	10,45	0,79	3,38	1,84	3,59	2,41	5,21	0,69	5,14

Anhang-Tabelle 6 Profil im Plasma von 29 signifikant veränderten miRNAs nach Behandlung mit nephrotoxischem Serum. Dargestellt ist das Verhältnis der miRNA-Menge nach Behandlung pro Tier relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden. Die Werte sind als Heatmap in Abb. 3.21 C visualisiert. WKY=Wistar Kyoto, SD=Sprague Dawley, rno=Ratten spezifisch

miRNA	5 ml/kg nephrotoxisches Serum										
	Tag 14 WKY					Tag 14 SD					
miR-455	0,15	0,26	0,15	0,16	0,18	0,94	0,53	0,50	0,93	0,40	1,10
miR-192	3,31	3,78	1,71	3,22	4,63	3,07	6,84</				

miR-30e	1,78	2,72	1,22	2,33	2,77	3,16	2,15	2,23	2,36	1,08	1,30
miR-130b	1,41	2,16	0,76	2,16	3,36	2,67	1,82	1,98	3,18	1,68	1,58
miR-532-5p_rno	1,66	3,66	0,89	1,60	2,76	2,56	2,79	1,52	3,18	1,60	1,18
miR-27a	0,83	1,91	1,42	1,97	2,02	2,81	2,35	2,07	3,07	1,57	1,63
miR-138	1,44	2,04	1,37	2,58	2,30	3,09	4,54	2,99	3,60	1,86	2,29
miR-223	1,18	2,34	1,27	3,46	3,16	2,81	2,92	1,07	4,18	2,22	1,52
miR-203	2,23	2,48	1,39	2,18	2,21	2,39	2,39	1,95	4,55	2,81	2,15
miR-29a	1,95	3,19	1,70	2,34	2,48	2,95	2,30	1,89	3,53	1,75	1,51

Anhang-Tabelle 7 Profil im Plasma von 97 signifikant veränderten miRNAs nach Methapyrilen Behandlung. Dargestellt ist das Verhältnis der miRNA-Menge nach Behandlung pro Tier relativ zur entsprechenden Kontrollgruppe. Die Verhältnisse basieren auf TaqMan Card Daten, die entsprechend der modifizierten ΔCt Methode prozessiert wurden. Die Werte sind als Heatmap in Abb. 3.21 B visualisiert. WK=Wistar Kyoto, SD=Sprague Dawley, rno=Ratten spezifisch

miRNA	80 mg/kg Methapyrilen																			
	Tag 4				Tag 8				Tag 15				Tag 24							
miR-24	2,50	3,21	0,00	2,49	1,38	0,00	1,24	1,38	0,63	1,83	0,00	1,27	0,00	0,97	0,99	0,59	0,42	0,47	0,55	0,50
miR-20b	1,90	1,76	0,02	2,35	0,02	0,03	0,43	0,81	0,25	0,51	0,91	0,65	1,45	0,58	1,28	0,67	0,17	0,39	0,32	0,44
miR-21	5,41	5,94	0,08	4,45	3,84	1,46	1,92	2,27	0,90	2,89	1,31	3,14	0,02	1,54	2,67	0,62	0,46	0,54	0,61	0,68
miR-25	1,73	2,36	0,12	3,20	0,12	0,05	0,39	0,65	0,26	0,40	0,30	0,31	0,00	0,51	1,00	0,63	0,13	0,38	0,36	0,43
miR-26a	15,41	17,53	0,07	13,74	0,07	0,01	0,98	1,61	0,39	1,61	0,01	2,15	0,01	2,28	3,34	0,52	0,17	0,56	0,54	0,43
miR-26b	6,48	6,66	0,27	5,04	0,27	0,08	0,88	1,12	0,48	1,24	0,05	2,17	0,05	1,81	2,64	0,47	0,21	0,41	0,45	0,06
miR-122	12,61	25,78	4,46	14,27	11,20	7,44	15,55	22,26	10,78	28,27	4,56	16,09	12,24	12,13	15,03	0,93	0,49	1,12	0,22	0,70
miR-31	15,40	9,64	4,95	12,77	14,28	3,29	6,29	7,90	3,49	9,61	5,77	19,12	10,55	8,73	10,80	0,86	0,59	1,15	1,42	0,62
let-7e	9,23	5,84	27,17	9,90	13,42	2,96	2,87	5,83	0,62	6,51	3,46	2,95	5,08	3,74	7,54	0,90	1,07	0,96	0,75	0,64
miR-15b	3,29	3,96	46,78	4,41	13,01	0,84	0,66	2,74	0,32	1,23	2,58	1,58	5,71	4,52	5,55	0,80	0,40	1,18	1,14	0,92
miR-200c	3,49	3,39	6,62	3,68	4,51	0,75	1,21	2,59	0,53	3,63	1,55	5,54	3,67	4,73	7,76	1,17	0,77	1,29	0,77	0,77
miR-532-3p	4,15	5,33	11,15	4,98	7,36	0,90	0,99	2,46	0,43	2,26	1,18	2,30	2,52	3,02	2,62	0,71	0,68	0,91	0,86	0,68
miR-200a	6,18	13,48	1,00	12,29	7,75	1,00	8,21	7,99	4,04	11,31	0,48	7,57	5,24	12,18	7,97	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
miR-667	2,89	12,58	3,84	9,05	5,26	1,00	3,26	4,33	1,00	6,36	0,65	4,19	3,92	9,72	3,73	0,95	0,95	0,95	0,95	0,95
miR-101a	7,52	9,54	3,26	8,51	8,62	4,41	4,95	7,62	6,73	8,37	2,92	5,89	3,78	2,89	4,46	0,68	0,38	0,67	0,42	0,61
miR-192	6,19	8,30	2,79	6,71	7,33	3,09	3,42	4,60	4,11	4,60	0,97	2,45	1,72	1,09	1,90	1,03	0,96	1,06	1,04	1,07
miR-182	3,03	3,50	3,13	2,59	1,00	0,98	2,51	2,78	1,05	2,76	2,79	28,30	8,54	4,09	18,70	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
miR-194	3,14	5,53	3,43	4,23	2,39	1,00	1,44	3,82	1,00	1,00	1,26	6,03	4,02	7,77	14,02	0,76	0,76	0,76	0,76	0,76
let-7d	6,53	4,67	0,20	6,38	8,83	1,42	0,83	2,36	0,37	1,82	2,24	2,88	4,20	3,13	5,94	1,54	0,41	1,49	1,16	1,10
miR-23b	2,26	3,00	1,00	2,41	1,00	0,66	0,90	2,31	0,66	2,04	0,91	2,71	7,51	2,80	3,14	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
miR-497	1,94	2,12	1,00	1,53	1,00	0,93	1,19	2,24	0,93	2,66	1,00	2,29	1,58	3,85	3,61	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
miR-99b	8,02	5,47	2,66	4,29	2,70	0,68	0,94	3,12	0,55	2,29	1,04	4,76	2,26	6,88	4,19	0,83	0,83	0,83	0,83	0,83
miR-532-5p_rno	3,95	5,24	3,15	4,44	2,44	0,60	1,18	1,79	0,60	1,46	0,78	2,41	1,92	2,48	2,23	0,69	0,69	0,69	0,69	0,69
miR-125a-5p	5,65	6,12	1,29	4,06	1,35	0,69	2,99	3,24	0,67	5,39	0,49	3,95	1,86	3,10	3,08	0,90	0,90	0,90	0,90	0,90
miR-200b	1,98	5,38	2,02	3,27	2,47	1,18	3,13	2,47	0,83	4,75	1,21	4,20	2,49	4,04	2,87	0,65	0,62	0,87	0,93	0,44
miR-126-3p	6,89	4,40	2,30	5,79	3,36	1,68	4,94	5,43	0,03	5,31	0,01	2,33	1,61	3,81	4,84	0,53	0,45	0,69	1,25	0,54
miR-29a	8,50	11,27	6,64	8,24	6,52	1,11	2,33	2,08	0,91	2,20	1,37	4,40	3,38	3,69	3,63	0,53	0,47	0,43	0,03	0,42
let-7b	5,08	4,90	6,59	5,30	4,53	1,97	2,21	3,34	0,77	4,05	1,38	4,38	3,71	3,78	6,35	0,56	0,12	0,03	0,52	0,36
miR-429	4,26	9,15	2,76	5,70	7,30	2,76	8,47	8,49	0,25	13,01	0,58	3,46	1,82	2,86	2,06	0,29	0,29	0,29	0,29	0,29
miR-204	7,31	8,01	1,86	4,09	0,61	0,56	2,90	3,05	0,56	3,73	0,22	1,73	1,09	1,73	0,95	0,24	0,24	0,24	0,25	0,24
miR-335-5p	6,29	11,29	1,40	4,32	0,66	0,62	6,09	3,18	0,62	5,26	0,13	3,11	1,21	1,42	0,94	0,21	0,21	0,21	0,21	0,28
miR-143	12,51	14,38	2,74	7,87	1,96	0,78	4,27	3,29	1,42	5,50	0,18	2,49	0,99	0,88	1,13	0,30	0,21	0,16	0,64	0,46
miR-145	7,63	8,57	2,78	4,33	1,24	0,57	2,38	2,39	0,83	2,80	0,18	2,36	1,11	0,95	0,90	0,37	0,18	0,21	0,37	0,54
miR-139-5p	3,07	3,50	2,72	2,55	1,63	0,76	1,81	1,82	0,06	2,10	0,36	1,41	0,97	1,58	1,60	0,56	0,33	0,51	0,74	0,52
miR-214	3,79	4,91	1,57	2,88	0,79	0,97	1,68	1,94	0,47	4,05	0,25	1,78	0,64	0,71	0,65	0,68	0,54	0,20	0,34	0,54
miR-130a	0,60	9,34	2,42	4,91	2,30	0,54	1,03	1,45	0,45	1,51	0,41	1,99	1,00	1,05	1,11	0,64	0,46	0,47	0,49	0,49
miR-152	3,46	4,32	1,80	3,66	2,18	0,90	1,36	1,64	0,69	2,90	0,55	1,44	0,83	0,93	1,11	0,50	0,54	0,38	0,50	0,41
miR-138	2,22	3,48	1,59	1,99	3,00	0,81	1,02	1,34	0,66	2,22	0,61	0,96	1,17	0,98	0,82	0,60	0,49	0,45	0,76	0,33
miR-146a	1,87	2,77	2,18	2,29	1,94	0,97	1,98	1,73	0,68	2,07	0,55	1,31	1,20	1,09	1,01	0,55	0,45	0,53	0,64	0,53
miR-29c	6,66	9,75	0,98	5,95	0,98	0,62	2,55	2,16	0,93	2,24	0,24	3,75	0,24	2,83	2,84	0,74	0,45	0,47	1,00	0,68
miR-125b-5p	3,64	7,92	1,52	3,74	1,67	0,83	1,50	2,19	0,95	3,99	0,59	1,56	1,00	2,10	1,30	1,17	0,36	1,10	2,00	0,70
miR-345-5p	2,57	8,59	1,82	3,70	0,61	1,00	1,11	1,00	1,00	2,43	1,05	3,07	0,94	2,63	3,42	0,74	0,74	0,74	0,74	0,74
miR-132	6,47	5,28	5,84	3,27	2,65	0,88	3,93	3,72	0,33	5,55	0,38	7,83	1,73	2,47	2,54	0,73	0,83	0,27	0,66	0,48
miR-335-3p	6,60	9,19	1,27	3,68	2,42	0,72	3,01	3,75	0,72	4,63	0,75	2,55	0,93	2,97	1,66	0,31	0,31	0,31	0,31	0,38
miR-199a-3p	3,87	4,13	1,88	3,34	1,32	0,86	1,70	1,90	0,87	4,39	0,90	3,22	1,27	1,76	1,33	0,64	0,53	0,27	0,51	0,59
miR-331-3p	3,99	4,10	2,86	3,32	2,76	1,36	1,90	2,59	0,79	3,93	0,87	3,44	2,35	2,15	2,12	0,59	0,31	0,54	0,66	0,60
miR-301b	1,49	1,48	4,38	1,89	2,61	0,87	0,34	0,66	0,21	0,46	0,52	0,53	0,80	0,54	0,03	0,70	0,13	0,41	0,42	0,47
miR-486	0,92	0,58	6,91	1,53	3,31	1,15	0,19	0,44	0,20	0,25	0,33	0,24	0,41	0,41	0,55	0,61	0,08	0,40	0,36	0,34
miR-210	1,79	2,84	5,58	2,55	0,07	0,94	0,46	0,83	0,39	1,30	0,65	0,61	0,98	0,91	1,46	0,43	0,22	0,67	0,42	0,38
miR-106b	1,35	1,16	5,23	1,90	0,11	1,01	0,52	0,76	0,31	0,56	0,54	0,44	0,65	0,62	0,90	0,50	0,21	0,35	0,42	0,43
miR-301a	1,49	1,35	3,49	1,66	0,34	1,05	0,34	0,73	0,33	0,52	0,61	0,54	0,77	0,56	0,90	0,66	0,13	0,38	0,40	0,54
miR-296-5p	0,71	0,57	1,85	0,54	1,28	0,57	0,57	0,57	0,57	0,57	0,58	0,40	0,41	0,40	0,50	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
miR-455	1,59	3,16	0,71	2,75	1,81	0,76	0,42	1,20	0,49	2,78	0,49	0,67	0,56	0,14	0,44	1,09	0,60	0,98	0,60	0,60
miR-215	0,74	1,70	1,55	1,99	1,16	0,87	1,06	1,04	1,00	0,84	0,47	0,73	0,34	0,25	0,33	0,52	0,52	0,51	0,66	0,42
miR-34b-3p	2,63	3,82	1,47	1,25	0,89	0,77	0,77	1,34	0,77	1,16	0,30	0,87	0,49	0,33	0,32	0,71	0,71	0,71	0,71	0,71
miR-19a	1,79	1,73	3,21	2,13	3,32	0,06	1,04	1,60	0,79	1,38	0,87	0,65	0,90	0,58	0,91	0,95	0,43	0,75	0,68	0,86
miR-328	1,7																			

Anhang

miR-222	2,10	2,50	6,45	2,50	2,94	0,97	1,17	1,50	0,62	1,92	0,49	0,85	0,99	1,61	1,53	0,53	0,33	0,44	0,70	0,36
miR-320	1,78	2,00	2,80	1,89	2,28	1,25	0,81	1,24	0,75	1,14	0,66	1,04	0,84	0,76	1,14	0,56	0,35	0,40	0,45	0,46
let-7c	5,60	5,64	7,53	4,94	4,12	0,90	1,06	1,71	0,36	1,80	0,76	2,29	1,62	0,02	2,48	0,69	0,15	0,71	0,68	0,56
miR-195	3,65	4,01	6,77	3,76	3,24	1,34	1,04	1,30	0,40	0,05	0,48	1,05	0,73	1,12	1,53	0,38	0,17	0,34	0,40	0,44
miR-16	4,87	4,67	22,66	8,42	14,50	1,17	0,62	0,87	0,38	0,73	0,54	0,52	0,68	0,75	1,37	0,51	0,14	0,40	0,38	0,32
miR-185	1,90	1,67	18,33	4,39	6,68	1,00	0,48	0,97	0,48	0,49	0,56	0,41	0,96	1,16	2,11	0,85	0,37	0,47	0,51	0,49
miR-18a	1,30	1,49	9,02	2,87	5,83	1,06	0,27	0,60	0,18	0,42	0,71	0,41	0,99	0,66	1,25	0,94	0,25	0,54	0,49	0,51
miR-451	1,11	1,04	6,90	2,45	5,44	0,92	0,30	0,56	0,21	0,34	0,47	0,35	0,47	0,87	1,24	0,65	0,13	0,47	0,46	0,43
miR-181a	1,82	3,56	12,98	3,25	4,80	0,65	0,52	1,33	0,49	0,98	1,55	0,75	2,58	1,45	1,71	0,85	0,85	0,89	0,90	0,85
miR-652	2,54	3,98	10,45	3,73	4,36	0,67	0,49	0,78	0,49	0,50	1,36	1,79	3,54	2,44	5,68	0,86	0,86	0,86	0,86	0,86
miR-128a	2,68	2,06	2,56	2,56	5,07	0,66	0,25	0,66	0,20	0,57	2,86	1,13	4,77	0,75	2,23	1,19	0,50	0,71	0,59	0,75
miR-142-3p	2,93	3,31	10,91	3,83	7,05	0,77	0,31	0,91	0,30	0,60	4,68	0,93	7,04	1,53	5,00	0,91	0,39	0,78	0,78	0,73
miR-103	2,43	2,64	0,49	3,66	4,74	0,81	0,49	0,90	0,41	0,93	1,07	1,33	1,37	1,48	2,44	0,59	0,20	0,39	0,35	0,21
miR-339-5p	6,66	9,48	5,89	5,31	7,38	0,89	0,41	0,86	0,15	1,01	1,72	2,39	4,76	1,73	3,02	0,68	0,16	0,30	0,24	0,34
let-7g	2,74	3,20	7,82	3,33	3,89	1,71	0,15	1,50	0,95	1,67	0,89	1,66	1,24	1,07	1,76	0,66	0,09	0,34	0,44	0,48
miR-221	3,81	6,17	8,90	5,56	3,60	0,69	1,22	1,36	0,50	1,68	0,58	1,61	1,55	1,21	1,72	0,45	0,11	0,11	0,64	0,27
miR-339-3p_mo	5,39	7,61	4,49	5,40	7,24	1,46	1,28	1,64	0,74	1,69	0,99	1,45	2,24	1,28	2,05	0,63	0,35	0,41	0,33	0,31
miR-148a	3,82	5,80	2,07	4,48	3,95	0,87	0,86	1,40	0,81	1,53	1,15	2,04	1,70	1,19	1,60	0,62	0,29	0,34	0,54	0,41
miR-365	3,68	5,82	2,81	3,90	3,47	1,26	1,24	2,09	0,99	2,86	0,78	2,43	1,53	1,05	1,66	0,66	0,24	0,51	0,47	0,48
miR-151-3p	2,85	2,24	3,82	2,74	3,35	0,99	0,76	1,25	0,46	1,59	0,98	2,02	1,50	1,18	1,94	0,72	0,20	0,54	0,44	0,43
miR-186	3,37	2,26	8,38	3,34	5,54	1,29	1,03	1,46	0,44	1,46	0,89	1,73	1,93	1,32	2,59	0,50	0,17	0,38	0,39	0,34
miR-30e	4,53	5,50	5,78	4,05	3,85	1,03	1,14	1,37	0,56	1,26	0,54	1,13	0,89	0,91	1,18	0,53	0,24	0,38	0,44	0,43
miR-324-3p	2,46	2,92	5,75	2,62	3,17	0,80	0,54	0,93	0,42	1,03	0,46	1,20	1,04	0,87	1,09	0,51	0,28	0,38	0,34	0,35
miR-223	2,20	2,09	1,97	2,09	3,42	0,68	0,68	0,79	0,30	0,81	1,26	0,00	2,21	0,71	1,62	0,64	0,32	0,46	0,46	0,41
let-7i	3,11	2,78	17,69	4,09	7,81	0,79	0,29	0,85	0,20	0,68	1,51	1,16	2,92	2,08	0,05	2,00	0,32	1,45	1,24	1,20
miR-484	3,59	0,92	17,45	3,96	8,21	0,52	1,17	1,19	0,14	0,26	1,32	0,31	0,51	0,41	0,01	1,05	0,28	0,62	2,89	0,84
miR-92a	11,65	11,64	22,67	11,16	22,15	0,00	0,29	0,52	0,29	0,41	0,62	0,66	0,98	0,50	0,93	0,74	0,18	0,50	0,41	0,43
let-7a	1,00	1,00	18,23	1,00	4,09	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	7,98	1,00	19,64	13,65	31,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
miR-17	1,91	1,62	6,20	2,28	4,36	0,91	0,00	0,75	0,28	0,56	0,87	0,64	1,36	0,69	1,58	0,69	0,17	0,40	0,38	0,45

Anhang-Tabelle 8 Deregulierte und kategorisierte Gene in der Rattenniere nach Cisplatin Behandlung. Die entsprechenden Werte sind als Heatmap in Abb. 3.24 C visualisiert. ↑= Hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ↓= Herunterreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tox-Kategorie	Cisplatin-abhängig deregulierte Gene										
(Oxidativer) Stress	↑	Egr1	Nr1d1	Pfkfb3	Sbno2	Clu					
Apoptose	↑	Aen	Bbc3	Bcl3	Bex1	Chac1					
Zellzyklus/ Proliferation	↑	Areg	Atf3	Cdt1	Egr2	Fos	Fosl2	Igfbp1	Junb	Lgals3	Myc
	↓	Nek6	Nrg1	Pir	Rasd1	Runx1	Tgjf1				
Detoxifikation	↑	Abcb1b	Abcc2	Akr1b8	Ces2l	Cyp1b1	Ephx1	Gpx2	Gstp1	Nqo1	Slc22a15
		Slc25a24	Srxn1	Ugt1a1	Ugt2b7						
DNA-Schädigung	↑	Btg2	Ccng1	Cdkn1a	Gdf15	Mdm2	Phlda3	Rprm	Enc1		
Inflammation	↑	Cp	Cxcl10	Fcgr2a	Fgb	Fgl2	Gpnmb	Kng1	Lcn2	Lsp1	Pla1a
	↓	Tnfrsf1a	Icam1								
Lipidmetabolismus & Metabolismus	↑	Ch25h	Ehhadh								
	↓	Afm	Anpep	Arntl	Bsnd	Cadps2	Calb1	Cdo1	Cyp2c11	Dhrs7	Dnajc6
Verlust der Gewebespezifität		Dpyd	Epha4	Fabp5	Gclc	Gclc	Gfra3	Hpcal1	Igfbp5	Irx1	Kcnab1
		Kcnj1	Klk1b3	Klk1l	Maf	Mep1b	Mthfr	Paq9	Pilp	Ppic	Ppic
		Ppp1r1a	Ppp2r2b	Prlr	Prps2	Psph	Rasd2	Rresp	Slc15a2	Slc16a7	Slc22a2
		Slc22a7	Slc22a9	Slc25a30	Slc5a2	Slco1a1	Slit2	Tff3	Tgm2	Tnfrsf11b	Tnpo3
Reduzierte Proliferation	↑	Cpne8	Gas5	Phlda2	S100a11	Tnfrsf12a					
	↓	Akr1c12	Egf	Fhit	Nrep	Plau					
Regeneration	↑	Bex4	Cd44	Cldn4	Cldn7	Ctps	Dmbt1	Fn1	Fxyd5	Gda	Itgb4
		Dlg5	Lox	Lsamp	Lxn	Map1b	Micall2	Npm1	Plk2	Plp2	Scyl2
	Slc17a3	Smoc2	Spp1	St6galnac2	Timp1	Tnc	Vnn1	Havcr1			
Signaling	↑	Arl4c	Gpr98	Rgs16	S100a6	S100g	Shisa3	Trpv6			
Strukturelle Umgestaltung	↑	Anxa2	Capg	Fblim1	Flna	Krt18	Krt19	Myo1g	Plec	Ppl	S100a10
		Tagln	Tln1	Tmsb10	Tpm2	Tubb6					
Gewebe Umorganization	↓	Capn6	Dgkg	Neb	Snta1	Tex14					
Andere	↑	Tmed6									
	↓	Pzp	Snca								

Anhang-Tabelle 98 Deregulierte und kategorisierte Gene in der Rattenniere nach Behandlung mit nephrotoxischem Serum (NTS). Die entsprechenden Werte sind als Heatmap in Abb. 3.25 C visualisiert. ↑= Hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ↓= Herunterreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Tox-Kategorie	NTS-abhängig deregulierte Gene				
(Oxidativer)Stress	↑	Egr1	Clu		
Apoptose	↑	Bcl3	Bik	Casp4	Fhl2
	↓	Ppm1k	Rgn		

Zellzyklus/ Proliferation	↑	Atf3 Kif15 Cdca7	Bcl2a1d Kif23 Cntf	Birc3 Mcm6 Ect2	Ccnb2 Mki67 Ltbp2	Cdk1 Nol3 Myc	Cks2 Runx1 Tgif1	Cyr61 Spbc24 Uhrf1	Egr2 Tacc3 Axl	Fos Ttk	Gda Ube2c
	↓	Dnase1	Eaf2	Igf1p3							
Detoxifikation	↑	Cyp1b1	Slc25a24								
DNA-Schädigung	↑	Phlda3									
Inflammation	↑	~CD33 Cd276 Eif3 Il24 Olr1 Sectm1b Tubb2c	A2m Cd53 Ephb6 Il7 Pik3cd Serpina10 Tyrobp	C1qa Cd68 Fcgr2a Kng1 Psmb8 Serpina3n Cp	C1qb Cebpd Fga Laptm5 Ptprc Serpine1 C2	C1qc Cfi Fgb Lbp Reg3b Slpi Fcgr2a	C4-2 Clcf1 Fgg Lcn2 RGD1564318 Tcrb Icam1	C6 Clec10a Fgl2 Lgals3bp RT1-Ba Tifa Lcp2	Ccl6 Clec7a Gpnmb Mcpt2 RT1-Bb Tmem176b Ccl21b	Ccr5 Clecsf6 Icsbp1 Mpeg1 RT1-Da Tnfrsf1a	Cd14 Crif1 Igha Msr1 RT1-Db1 Tnfrsf9
	↑	Apob	Apobec1	Cps1	Lrat						
	↓	Akr1c12 Gsta5 Osblp1a Slc22a9 Tnfrsf11b	Aldh1b1 Gtpbp4 Pde1a Slc23a3	Arhgap5 Gucy1b2 Prep Slc39a8	Asgr2 Id4 Rarres1 Slc4a4	Blvra Kitlg Resp18 Slco1a1	Cyp2c11 Klk1b21 Nog1 Snca	Enpp3 Klk1b3 Rresp St6gal1	Es22 Me1 Serpina3m Tfrc	Gcgr Mpp6 Slc16a7 Wisps3	Gldc Nlrp6 Slc22a2 Apcs
	↑	Brca1	Cdkn3	Dkk3	Inhbb	Rassf4	Tnfrsf12a	Tgfb2	Tgfb2	Rprm	
Regeneration	↑	Adamts1 Col5a2 Fn1 Pcolce Abca1	Angptl4 Col6a1 Fxyd5 Ptrz1 Col4a2	Cd44 Col8a1 Gja1 PVR Lamb3	Cdh11 Colec12 Gpx2 Pvri2 Lamc2	Clec9a Cpz Klf6 Pxdn Mmp9	Col15a1 Cthrc1 Lgals2 Slc34a2 Scel	Col1a1 Dcl1 Lox Spp1	Col1a2 Dsc2 Loxl1 Timp1	Col4a1 Efemp2 Map1b Tnc	Col5a1 Fbn1 Mfap4 Havcr1
	↑	Adra1d Ramp1	Arl4c Rgs10	Ccdc80 Rgs16	Cenpi Sctr Pthlh	Cpe Gpr34	Gpr34 Guca2a	Nfkbiz	Nfkbiz	Pkib	Prkcb
	↑	Actn1 Tmsb10	Coro1a Tpbp	Cttnbp2 Tpm1	Dn1 Tubb5	Dcdc2 Tubb6	Fblim1 Vim	Rnd1 Dnm3	Spag5 Ctsk	Tagln	Tekt1
Gewebe Umorgani- zation	↓	Epb4.113									
Andere	↑	Cygb	Hfe2								
	↓	Gc	Mlc1	Rbp4							

Anhang-Tabelle 90 Deregulierte und kategorisierte Gene in der Rattenleber nach Methapyriolen Behandlung. Die entsprechenden Werte sind als Heatmap in Abb. 3.28 C visualisiert. ↑= Hochreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe, ↓= Herunterreguliert im Vergleich zur Kontrollgruppe

Tox-Kategorie	Methapyriolen-abhängig deregulierte Gene										
(Oxidativer) Stress	↑ Csda Mt2A Mdm1	Apex1 Pgam5 Pold2	Btg3 Srxn1 Tmsb10	Egr1 Tmem120a Tp53inp2	Glrx3 Tnfrsf12a	Gmfb Vnn1	Hlg2 Ccng1	Hsp90aa1 Cdkn1a	Hspa9 Ddit3	Hspb8 Hmgb2	
	↑ Bax Ngfrap1	Casp12 Trib3	Casp4 Zdhhc2	Cdc42ep1	Cidea	Ctsl	Dap	Fas	Gas5	Lgals2	
Apoptose	↓ Cited2	Cxcl12	Ghr	Igf1	Rgn						
	↑ Bcar3 Polb Tubb5	Cbx3 Rfc3 Tubb6	Ccnd1 Rfc4 Wee1	Ciz1 Rmp Mybbp1a	Cks2 Smc2	Dynlt1 Smox	Hn1 Stmn1	Kifc3 Sugt1	Klf6 Tgif1	Mki67 Tra16	
Proliferation	↑ Cryl1 Nfkb2 Srm	Ddit4 Nrg1 St14	Fat1 Nucks1 Tusc3	Fgf21 Nupr1 Lrrfip1	Igf1p2 Ovca2	Itgb1 Pa2g4	Lgals3 Ppp2r1b	Map2k1 Rbm3	Nap111 Sh3bgrl3	Ndrgr1 Smad5	
	↓ Bmf	Hrsp12	Id4	Marveld1	Ndrq2	Rarres2	Dpt				
Detoxifikation	↑ Abcb1a Ggh	Abcc2 Gpx3	Adh7 Gstp1	Akr1b8 Akr1b1	Aldh1a1 Akr7a3	Cbr1 Gsta5	Ces2l	Cyp2c12	Cyp4b1	Cyp4f5	
	↑ Cd276	Cxcl16	Gpnmb	Neur3	Psme3	RT1-CE5	Ifngr2	Nolc1			
Inflammation	↓ Fetub	Mug1	Serpina4								
	↑ Acot1 Nagk Dci	Acot2 Pfkp Dctpp1	Acot4 Pla2g15	Adfp Ppap2c Hadhb	Agpat3 Ptgfrn Pck2	Asah1 Aadac	B4galt5 Acot2 Slc25a4	Fabp2 Acot7	Hexb Aldoa	Hsd12 B4galt6	
Verlust der Gewebespezifität	↓ ~Ddh1 Akr1c12 Aspg Ces3 Cyp2d3 Enpep Hal Khk Mdh1 Nox4 Pdk1 Pygl Serpina3m Slco1a1	Aadac Alcam Asrgl1 Cfb Cyp2f4 F10 Hao2 Kmo Mlc1 Ntf3 Pik3c2g Rbp1 Serpina3n Slco2a1	Abat Aldh6a1 Atp2a2 Cpb2 Cyp2j3 Fxyd1 Hsd11b1 Kng1 Mmd2 Oat Pik3c3 Rdh7 Slc10a1 Slc13a2 Slc2b1	Abac6 Amacr Atp2a2 Cpb2 Cyp2i1 Gabarapl2 Hsd17b2 Kynu Mpeg1 Olr59 Pklr Rnase4 Slc13a2 Snx18	Abcg5 Apcs Atrn Ctsc Cyp4f4 Gjb1 Hsd3b5 Lcat Mtmr7 Otc Podn RT1-S3 Slc22a17 Spink1	Acadslb Apmap Baat Ctsc Dao Gnm7 Ilgp1 Lrp5 Lin7a Nat1 Papss2 Ppp1r3b Sdc1 Slc22a8 Spink3	Acox2 C1r Ctsc Dcxr Gstm7 Inhba Lrp5 Nat8 Paqr9 Proc Scfd2 Slc2a5 St6gal1	Acs1 C4-2 Cyp2a1 Ddc Gucy1b2 Inhbc Lrp5 Nat8b Pc Ptms Sdc2 Slc33a1 St8sia3	Adhfe1 C9 Cyp2a2 Dhtkd1 Gulo Inmt Lrp5 Nat8b Pc Ptms Sdc2 Slc37a4 Sult1c2	Agt Asgr1 C9 Cyp2a2 Dhtkd1 Elov5 Hadh Ivd Maob Nduf3 Pde3b Ptms Sdf2l1 Slc37a4 Sult1c3	Asgr2 Cbs Cyp2c11 Elov5 Hadh Ivd Mbl1 Nii2 Pdia4 Pxmp2 Sds Slc6a13 Sult1c3

Anhang

		Sult1e1	Sycp3	Thrsp	Tmem37	Trim2	Ttpa	Ttyh2	Ust5r	Car3	S1pr1
		Pgcp	Hebp1	Tef	Lipc	Rnase4	Slco1b3	Afm	Fgl1	Col27a1	
Reduzierte Proliferation	↓	Ceacam1	Dpyd	Dpys	Egf	Enpp2	Hexim1	Igfals	Mst1	Nr3c1	Nrep
		Paics	Parp14	Upb1	Xdh						
Regeneration	↑	Aldh18a1	Anxa7	App	Arf6	Arfrp1	Arsb	Asl	Asns	Atic	Atp6v1d
		Ctps	Ddx21	Ddx39	Eef1g	Eif2b3	Eif3c	Eif3g	Eif4b	Eif4ebp1	Epcam
		Fkbp11	Fkbp5	Fkbp5	Gars	Ggt1	Hnrmpa1	Hsp70.3	Iars	Ica1	Ifrd1
		Impdh2	Ipo4	Ipo5	Ireb2	Lonp1	Lrrc59	Mrps2	Mrps31	Mrps6	Mrto4
		Ncl	Nhp2	Nme2	Nol8	Nolc1	Nop56	Nop58	Npm1	Nup210	Odc1
		Pelo	Pmm1	Ppil3	Prmt1	Prmt5	Rab30	Ran	Rangrf	Rcn2	Rpl14
		Rps15a	Rps19	Rps3	Rps5	Rpsa	Rrp9	Scarb2	Sdad1	Serpina7	Slc16a6
		Smn1	Spsb1	Timm8a1	Tomm20	Tomm40	Tspo	Umps	Wbp5	Yars	App
		Gar1	Pdgfra	Klf6	Cirh1a	Myo5b	Csrp2	S100a11			
		Adi1	Adra1b	Car3	Dak	Ero1b	Gckr	Vtn			
Signaling	↑	Anxa7	Gnb1	Gnb2l1	Minpp1	Plscr1	Ppp1r14b	Ppp2ca	Ptger3	Riok3	Srd5a3
	Srr										
Strukturelle Umgestaltung	↑	Anxa2	Anxa5	Basp1	Cdc42ep5	Cdc42se1	Cnksr3	Dpp7	Enc1	Ezr	Jub
	Krt18	Krt8	Map1lc3a	Myo1c	Myo1g	Pafah1b1	Plat	Rhoc	S100a10	Sorbs2	
	Tagln2	Tpm1	Tpm1	Vps36	Ppl	Rhub					
Mitochondriale Schädigung	↑	Atpif1									
	↓	Bdh1	Ppa2	Atpif1							
Tumorgenese	↑	Ctsz	Bysl	Cxadr	Dmbt1	Id1	Lgals3bp	Rgs5	Slc7a5	Tspan8	
Andere	↑	Pafah1b3	Slc20a1	Slc3a2							

Anhang-Tabelle 11 Identifizierte Ziel-mRNAs für die deregulierten miRNAs in der Rattenniere nach Cisplatin Behandlung mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA).

miRNA	miRNA - IPA Zuordnung	Ziel-mRNAs
let-7i	let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	Tpm2
miR-125a-3p	miR-125a-3p (miRNAs w/seed CAGGUGA)	Flna
miR-146b	miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	Paqr9
miR-195	miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)	Kl Prps2
miR-182	miR-182-5p (and other miRNAs w/seed UUGGCAA)	Cyp1b1 Fn1 Spsb4
miR-429	miR-200b-3p (and other miRNAs w/seed AAUACUG)	Immp2l Maf Nrep Psph Tnfrsf11b
miR-203	miR-203-3p (and other miRNAs w/seed UGAAAUG)	Gda Prps2
miR-21	miR-21-5p (and other miRNAs w/seed AGCUUUAU)	Tnfrsf11b
miR-31	miR-31-5p (and other miRNAs w/seed GGCAAGA)	Trpv6
miR-320	miR-320b (and other miRNAs w/seed AAAGCUG)	Ctps1 Plk2 Tagln
miR-328a	miR-328-3p (and other miRNAs w/seed UGGCCCU)	Cd44 Srxn1
miR-339-5p	miR-339-5p (and other miRNAs w/seed CCCUGUC)	Mdm2
miR-34a	miR-34a-5p (and other miRNAs w/seed GGCAGUG)	Calb1 Dpyd
miR-375	miR-375-3p (and other miRNAs w/seed UUGUUCG)	Cpne8
miR-382	miR-382-5p (miRNAs w/seed AAGUUGU)	Maf
miR-423-star	miR-423-5p (and other miRNAs w/seed GAGGGGC)	Cd44 Cdkn1a Slc52a3
miR-503	miR-503-5p (miRNAs w/seed AGCAGCG)	Cdkn1a Cxcl10
miR-363	miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC)	Dpyd

Anhang-Tabelle 102 Mittels Ingenuity Pathway Analysis (IPA) identifizierte Ziel-mRNAs für die deregulierten miRNAs in der Rattenniere nach Behandlung mit nephrotoxischem Serum.

miRNA	miRNA - IPA Zuordnung	Ziel-mRNAs
let-7g	let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	Adams1 Cd276 Col1a1 Col1a2 Col4a1 Col4a2 Cthrc1 Dkk3 Grik2 Myc Pxdn Slc25a24 Tagln Vim
miR-1	miR-1 (and other miRNAs w/seed GGAAUGU)	Slc38a3
miR-351	miR-125b-5p (and other miRNAs w/seed CCCUGAG)	Igfbp3 Slc4a4 St6gal1
miR-132	miR-132-3p (and other miRNAs w/seed AACAGUC)	Arhgap5 Kitlg Mmp9
miR-133b	miR-133a-3p (and other miRNAs w/seed UUGGUCC)	Col1a1 Elf3 Fam57a Fbn1 Ptprz1 Tgfb2
miR-20b	miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC)	Opcml Slc4a4
miR-181c	miR-181a-5p (and other miRNAs w/seed ACAUUCA)	Epb41f3 Kitlg Tnfrsf11b
miR-182	miR-182-5p (and other miRNAs w/seed UUGGCAA)	Col5a1 Cyp1b1 Fbn1 Fn1
miR-183	miR-183-5p (miRNAs w/seed AUGGCAC)	Abca1 Gpr34
miR-185	miR-185-5p (and other miRNAs w/seed GGAGAGA)	Ctsk
miR-188-5p	miR-188-5p (and other miRNAs w/seed AUCCUUU)	Pcdh9
miR-192	miR-192-5p (and other miRNAs w/seed UGACCUA)	Col5a1 Tifa
miR-193b	miR-193a-3p (and other miRNAs w/seed ACUGGCC)	Lamc2 Tgfb2
miR-196c	miR-196a-5p (and other miRNAs w/seed AGGUAGU)	Igfbp3 Opcml
miR-197	miR-197-3p (and other miRNAs w/seed UCACCAC)	Epb41f3 Igfbp3
miR-19a	miR-19b-3p (and other miRNAs w/seed GUGCAAA)	Arhgap5 Igfbp3

miR-200c	miR-200b-3p (and other miRNAs w/seed AAUACUG)	Abca1	Cdh11	Cyp1b1	Dcdc2	Fn1
miR-200c		Tubb				
miR-203	miR-203-3p (and other miRNAs w/seed UGAAAUG)	Fam198b	Lrat	Prkcb	Pxdn	Scel
		Tgfb2				
miR-204	miR-204-5p (and other miRNAs w/seed UCCCCUUU)	Cdh11	Ephb6			
miR-21	miR-21-5p (and other miRNAs w/seed AGCUUUAU)	St6gal1	Tnfrsf11b			
miR-218	miR-218-5p (and other miRNAs w/seed UGUGCUU)	Col1a1	Dcdc2	Fam198b	Grik2	Inhbb
miR-223	miR-223-3p (miRNAs w/seed GUCAGUU)	Arhgap5	Slc4a4	Snca		
miR-224	miR-224-5p (miRNAs w/seed AAGUCAC)	Klk1	Opcml	Slc4a4		
miR-23b	miR-23a-3p (and other miRNAs w/seed UCACAUU)	Abca1	Col4a1	Dnm3	Fbn1	Gja1
		Lrat	Mrc1	Pxdn	Tgfb2	Tgif1
miR-384-5p	miR-30c-5p (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	Adra1d	Cthrc1	Gja1	Rassf4	
miR-134	miR-3118 (and other miRNAs w/seed GUGACUG)	Angptl4				
miR-134	miR-3118 (and other miRNAs w/seed GUGACUG)	Cps1				
miR-134	miR-3118 (and other miRNAs w/seed GUGACUG)	Grik2				
miR-339-3p	miR-339-3p (miRNAs w/seed GAGCGCC)	Tubb				
miR-339-5p	miR-339-5p (and other miRNAs w/seed CCCUGUC)	Cd276	Tmem119			
miR-340-5p	miR-340-5p (miRNAs w/seed UAUAAAG)	Abca1	Adamts1	Egr1	Fam198b	Fbn1
		Fcgr2b	Fhl2	Ptprz1	Smtnl2	
miR-342-3p	miR-342-3p (miRNAs w/seed CUCACAC)	Col1a2	Dnm3	Gja1	Lamc2	Ccl21
		Fblim1				
miR-449a	miR-34a-5p (and other miRNAs w/seed GGCAGUG)	Igfbp3	Kitlg			
miR-365	miR-365-3p (and other miRNAs w/seed AAUGCCC)	Adamts1	Dcdc2			
miR-375	miR-375-3p (and other miRNAs w/seed UUGUUCG)	Grik2				
miR-376c	miR-376c-3p (and other miRNAs w/seed ACAUAGA)	Abca1	Cdh11	Tgfb2		
miR-382	miR-382-5p (miRNAs w/seed AAGUUGU)	Col1a1	Fbn1	Tagln	Vim	
miR-486	miR-486-5p (and other miRNAs w/seed CCUGUAC)	Fbn1				
miR-494	miR-494-3p (miRNAs w/seed GAAACAU)	Arhgap5	Opcml			
miR-499	miR-499-5p (and other miRNAs w/seed UAAGACU)	Pqlc3				
miR-503	miR-503-5p (miRNAs w/seed AGCAGCG)	Pcdh9	Slc4a4			
miR-532-5p	miR-532-5p (and other miRNAs w/seed AUGCCUU)	Cdk1				
miR-539	miR-539-5p (miRNAs w/seed GAGAAU)	Cd276	Fbn1	Lamc2	Tagln	Tnfrsf1a
miR-7a	miR-7a-5p (and other miRNAs w/seed GGAAGAC)	Slc4a4	Snca	Tfrc		
miR-9	miR-9-5p (and other miRNAs w/seed CUUUGGU)	Abca1	Col4a2	Col5a1	Colec12	Cthrc1
		Fbn1	Inhbb	Pxdn	Slc25a24	

Die vollständigen Genlisten sind auf Anfrage bei der Autorin erhältlich.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name Mira Pavkovic
Geburtsdatum 16. Februar 1986
Geburtsort Prijedor (BiH)
Staatsangehörigkeit deutsch

Bildungsweg

Okt 2010 – Dez 2014 Bayer Pharma AG, Wuppertal

Doktorandin in der Abteilung Investigative Toxikologie, Labor Mechanistische und molekulare Toxikologie von Frau Dr. Ellinger-Ziegelbauer
Betreuer: Herr Prof. Dr. Vohr (Heinrich Heine Universität und Bayer Pharma AG - Immuntoxikologie)

Okt 2005 – Sept 2010 Heinrich Heine Universität, Düsseldorf

Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologin
Diplomarbeit im Institut für Toxikologie über „*Molekulare Wirkungen von FOXO Transkriptionsfaktoren in humanen Krebszellen*“
Betreuer: Herr Prof. Dr. Wätjen und Frau Dr. Chovolou

Jul 1996 – Apr 2005 Görres Gymnasium, Düsseldorf

Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Publikationen

Pavkovic M., Riefke B., and Ellinger-Ziegelbauer H. (2014) *Comparison of the Mesoscale Discovery and Luminex multiplex platforms for measurement of urinary biomarkers in a cisplatin rat kidney injury model*. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. Vol 69, Issue 2, pp196-204

Pavkovic M., Riefke B., and Ellinger-Ziegelbauer H. (2014) *Urinary microRNA profiling for identification of biomarkers after cisplatin-induced kidney injury*. Toxicology doi: 10.1016/j.tox.2014.05.005.

Poster Präsentationen

Pavkovic M., Riefke B., Khan-Malek R., and Ellinger-Ziegelbauer H. *Proposed workflow for microRNA analysis in urine*. SOT Annual Meeting 2013

Riefke B., **Pavkovic M.**, Groeticke I., Frist A.-L., McDonald F., and Ellinger-Ziegelbauer H. *Urinary microRNA profiles after glomerular vs. proximal tubular injury*. SOT Annual Meeting 2013

Pavkovic M., Riefke B., Groeticke I., Frist A.-L., McDonald F., and Ellinger-Ziegelbauer H. *Urinary microRNA profiles induced by glomerular injury in rats*. DGPT Annual Meeting 2013

Pavkovic M., Riefke B., and Ellinger-Ziegelbauer H. *MicroRNAs in plasma and urine as new safety biomarkers for drug-induced tissue injury in rats*. SOT Annual Meeting 2012

Riefke B., Groeticke I., Frist A.-L., Gruendemann S., Raschke M., **Pavkovic M.**, McDonald F., Ellinger-Ziegelbauer H., Schaecke H., and McDonald F. *Multiplex-based nephrotoxicity biomarkers and NMR-based metabolomics in a model of glomerular nephritis in rats*. SOT Annual Meeting 2012

Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Vohr bedanken, der es mir überhaupt erst ermöglicht hat mein Dissertationsprojekt durchzuführen und mich bis zum Schluss unterstützt und interessiert begleitet hat. Auch danke ich Herrn Prof. Dr. Lammert für seine freundliche Mitbetreuung von seitens der Mat.-Nat.-Fakultät der Heinrich-Heine-Universität.

Dann danke ich Herrn Dr. von Keutz für die Möglichkeit mein Dissertationsprojekt im Institut der Toxikologie bei Bayer HealthCare in Wuppertal durchführen sowie an zahlreichen internen wie auch externen Meetings teilnehmen zu können. Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Steger-Hartmann für die Möglichkeit mein Dissertationsprojekt in der Abteilung für Investigative Toxikologie durchzuführen zu können.

Mein besonderer und größter Dank gilt Frau Dr. Ellinger-Ziegelbauer, die nicht nur die Vorort Betreuung im Labor für Mechanistische und Molekulare Toxikologie übernommen hat, sondern eine Mentorin für mich geworden ist. Ich danke ihr für den wissenschaftlichen aber auch menschlichen Austausch, ihr Interesse, ihre Unterstützung, ihr positives Feedback und ihre Förderung – ich habe viel gelernt, viele positive Erfahrungen gesammelt und werde die Zusammenarbeit sehr vermissen.

Bei Herrn Dr. Riefke bedanke ich mich für die Bereitstellung diverse klinischer Daten zu den untersuchten Studien, für seine fachliche Unterstützung sowie den stets freundlichen und erheiternden Austausch. Außerdem danke ich Herrn Dr. Rinke, Frau Dr. Bach, Frau Dr. Gutberlet und Frau Dr. Frisk für ihre freundliche und fachliche Unterstützung bei den unterschiedlichen pathologischen Fragestellungen. Diesbezüglich bedanke ich mich auch bei Frau Poschmann für ihre fachliche Hilfe, unendliche Geduld und ihren Enthusiasmus bei der Durchführung der *in situ* Hybridisierungs Experimente.

Herzlichst bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern in Dr. Ellingers Labor für ihre kompetente und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung meiner Experimente. Durch euch habe ich erst organisiertes, zielgerichtetes und dadurch erfolgreiches experimentelles Arbeiten gelernt. Ich habe mich in eurer Mitte immer wohl gefühlt und werde die gemeinsame Zeit sehr vermissen.

Ich danke Frau Michel-Kaulmann für die schöne Zeit Rücken an Rücken, für ihr stets offenes Ohr bei allen experimentellen wie auch privaten Problemen und das gemeinsame Lachen. Ich danke Frau Noklies für die vielen Tipps und Tricks im Labor, ihre unentbehrliche Hilfe bei allen Widrigkeiten des Bestellwesens und für die vielen heiteren Momente. Ich danke Frau Winter und Frau D'Acquisto für den herzlichen Empfang in der Zellkultur, ihre geduldige Einführung und die fröhlichen Stunden nicht nur an der Bench. Meiner Nachfolgerin Sabrina Heinz danke ich zunächst für ihre liebe Hilfe bei so mancher Layout-Frage und das Korrekturlesen, vor allem des weniger spannenden M&M-Teils meiner Dissertation; des Weiteren auch für die schöne gemeinsam verbrachte Zeit auch außerhalb 514.

Für die kurzweiligen Mittagspausen und das entspannende „Runden drehen“ danach bedanke ich mich bei Frau D'Acquisto und Frau Wingenroth sowie, ebenfalls für die nette Ablenkung während der Mittagszeit, bei Frau Rauh und Herrn Schaub.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen ehemaligen/jetzigen Doktorandinnen und Masterandinnen für die schönen Seminare und netten Tage in Berlin; im speziellen bei Dr. Anna Fischer-Beerenbein, Christina Stahl und Claudia Lüske.

Ein allgemeiner Dank gilt allen anderen lieben und hilfsbereiten Mitarbeitern, denen ich bei Bayer in Wuppertal begegnet bin. Sie alle haben durch das Schaffen einer kollegialen Atmosphäre auch zum Erfolg meiner Arbeit Vorort beigetragen.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meiner Familie und meinem Freund. Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende Unterstützung und Liebe: draga mama, dragi tata, hvala vam za vasu podršku i ljubav – bez vas ovo nikad ne bih uspijela. Puno vas volim! Meinem Bruder Nenad danke ich dafür, dass er immer für mich da ist und mir hilft, sogar noch bevor ich ihn darum bitte – du bist der Beste! Julia danke ich, dass sie sich immer Zeit für mich nimmt und mich immer wieder hübsch macht! Und meinem Marc danke ich unendlich für seine Hilfe bei der Formatierung und Formulierung unzähliger Arbeiten, seine Geduld und Rücksicht, seine jahrelange Unterstützung und vor allem für seine Liebe – volim te!!!

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ferner versichere ich, dass ich bisher noch keinen Promotionsversuch unternommen habe sowie dass die Dissertation weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung an einer in- oder ausländischen Fakultät vorgelegt wurde.

Düsseldorf, den _____