

INSTITUT FÜR PHARMAKOLOGIE UND TOXIKOLOGIE

UNIVERSITÄT WÜRZBURG

VORSTAND: PROFESSOR DOKTOR HELGA STOPPER

**UNTERSUCHUNG DER NIERENSCHÄDIGUNG DURCH  
ALDOSTERON AM RATTENMODELL ÜBER DIE  
QUANTIFIZIERUNG VON SCHÄDIGUNGSMARKERN  
MITTELS REAL-TIME PCR-TECHNIK**

Inaugural - Dissertation

Zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Vorgelegt von

Timo Basali

Aus Neuenstein

Würzburg, Dezember 2016



# WIDMUNG

Meinen lieben Eltern, die mich zeitlebens geduldig unterstützten und ohne deren Grundsteinlegung für naturwissenschaftliches Denken und Handeln diese Arbeit in dieser Form nicht existieren würde.

# REFERENTEN

**Referent:** Priv. -Doz. Dr. rer. nat Nicole Schupp

**Korreferent:** Prof. Dr. Stefanie Hahner

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 11.07.2017

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

WIDMUNG.....	.....
REFERENTEN.....	.....
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Steroidhormon Aldosteron.....	1
1.1.1 Allgemein.....	1
1.1.2 Biochemische Wirkungsweise des Aldosteron-MR-Komplexes.....	2
1.1.3 Hyperaldosteronismus und Hypertonie.....	3
1.1.4 Hyperaldosteronismus als Induktor in der Tumorgenese.....	4
1.2 Die Wahl der Behandlungsgruppen.....	6
1.3 Die Wahl der zu untersuchenden Gene.....	7
1.3.1 Kidney Injury Molecule-1.....	8
1.3.2 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin.....	8
1.3.3 Osteopontin.....	9
1.3.4 Tenascin-C.....	10
2 ZIELSETZUNG.....	11
3 MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1 Material.....	12
3.1.1 Tierversuch.....	12
3.1.2 RNA-Isolierung.....	12
3.1.3 cDNA-Transkription.....	13
3.1.4 Reverse-Transkriptase PCR (qualitativ).....	13
3.1.5 Real Time quantitative Reverse-Transcriptase PCR (RTqPCR).....	13
3.2 Methoden.....	14
3.2.1 Tierversuch.....	14
3.2.2 RNA Isolierung.....	16
3.2.3 Transkription der RNA in cDNA mit reverser Transkriptase (RT).....	19
3.2.4 Real time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTqPCR).....	22
4 Ergebnisse.....	43
4.1 Die Effizienz.....	43
4.2 Die Zielsequenzen.....	44

4.2.1	Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1) .....	44
4.2.2	Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL).....	45
4.2.3	Osteopontin (OPN).....	46
4.2.4	Tenascin-C (TN-C) .....	47
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	48
5	Diskussion.....	50
5.1	Einführung.....	50
5.1.1	Zur Planung.....	50
5.1.2	Weitere Maßnahmen.....	51
5.2	Analyse möglicher Ursachen.....	51
5.2.1	Überblick.....	51
5.2.2	RTqPCR Ablauf.....	52
5.2.3	Die mRNA.....	55
5.2.4	Eventuelle Vorschädigung der Nieren <i>in vivo</i> unter Betrachtung der weiteren histologischen Untersuchungen.....	59
5.2.5	Die verschiedenen Rollen von DOCA in Nagetieren und Menschen ....	60
5.2.6	Einfluss der Stichprobenanzahl .....	62
6	Zusammenfassung .....	64
7	Literaturverzeichnis .....	65
8	Anhang .....	71
8.1	Tabelle 2: In diesem Versuch eingesetzte Nierenproben mit jeweiliger Beschriftung.....	71
8.2	Tabelle 3: Mit dem Nanodrop® ermittelte RNA-Konzentration. $C_{RNA}$ ist das arithmetische Mittel aus 3 Replikaten.....	72
8.3	Tabelle 4: RNA-Isolat ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und Wassermengen ( $\mu\text{l}$ ).....	72
DANKSAGUNG .....		

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Steroidhormon Aldosteron

### 1.1.1 Allgemein

Aldosteron hat als primär endokrin wirkendes Nebennierenrindenhormon eine zentrale Rolle in der Regulation des Elektrolythaushalts, des extrazellulären Volumens sowie des Blutdrucks und der Harnkonzentrierung. Es wird in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde über eine Reihe von Vorstufen mittels Enzymen aus der Cytochrom-P<sub>450</sub>-Familie synthetisiert (siehe Abbildung 1). Als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems wird es durch die Stimulation des Angiotensin II, ebenso wie aufgrund hoher Serum-Kalium Werte und als Wirkung des adrenokortikotropen Hormons des Hypophysenvorderlappens (ACTH), in die Blutbahn freigegeben [1, 2]. Von dort gelangt es zu den Zielzellen, welche hauptsächlich in den Nieren, dem Herzen und in den Gefäßwänden liegen, aber auch im Dickdarm, den Speichel- und den Schweißdrüsen vorkommen [1] und entfaltet seine Wirkungen durch die Bindung an den Mineralkortikoidrezeptor.

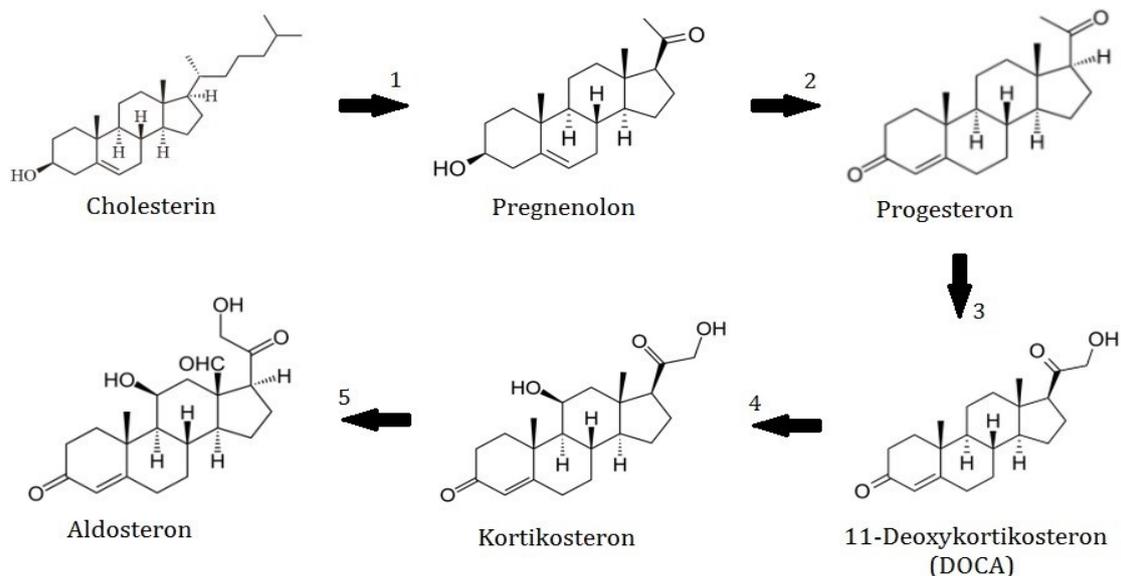


Abbildung 1: Aldosteronsynthese aus Cholesterin in der Nebennierenrinde. 1: 20,22-Desmolase (CYP11A1), 2: 3 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase sowie  $\Delta$ 4,5-Isomerase, 3: 21-Hydroxylase (CYP21), 4: 11 $\beta$ -Hydroxylase (CYP17), 5: 18-Hydroxylase sowie 18-Hydroxysteroid-Dehydrogenase (Aldosteron-Synthase, CYP11B2). Zeichnung mit Microsoft® Paint erstellt. Strukturformeln aus gemeinfreier Quelle. Weitere Quellen siehe [1, 2].

Es sind jedoch noch weitere, nicht den Elektrolythaushalt betreffende Wirkungen von Aldosteron entdeckt worden. So ist inzwischen hinreichend an Tiermodellen nachgewiesen worden, dass Aldosteron z.B. über proinflammatorische Mechanismen unter anderem über die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [3, 4] konzentrationsabhängig zum fibrotischen Umbau „remodeling“ von renalem und kardialem Gewebe führt [5-8] und Schäden am Gefäßsystem bewirkt [9]. Darüber hinaus liegen, wie im Weiteren besprochen, Hinweise auf potentiell mutagene und genotoxische Effekte vor [10-13]. Diese Erkenntnisse haben bereits in der tagtäglichen klinischen Anwendung Einzug gefunden und so konnte nachweislich durch die Anwendung von Mineralkortikoidrezeptorantagonisten die Mortalität z.B. von Herzinsuffizienzpatienten schon mit relativ geringen Dosierungen (25mg/d Spironolakton p.o.) auf ein relatives Risiko von 0,7 bei einem 95%-Konfidenzintervall von 0,60-0,82 im Vergleich zur Placebogruppe gesenkt werden (RALES-Studie) [14]. Außerdem hat sich die selektive Mineralkortikoidrezeptorantagonisierung bereits bei der Behandlung der chronischen Niereninsuffizienz bewährt [15].

Diese eindeutigen Ergebnisse, sowie die weiteren beobachteten Effekte von Aldosteron haben zu einem gesteigerten Interesse an der genauen Wirkungsweise des Aldosterons, sowie an darauf beruhendem möglichem weiteren therapeutischen Nutzen der Aldosteronantagonisierung bei bekanntem Hyperaldosteronismus geführt.

### **1.1.2 Biochemische Wirkungsweise des Aldosteron-MR-Komplexes**

Als Steroidrezeptor ist der Mineralkortikoidrezeptor genauso wie der Glukokortikoidrezeptor der Klasse der ligandengesteuerten Transkriptionsfaktoren angehörig. Er hat dabei zwei verschiedene Wirkmechanismen:

1. Von der DNA-Bindung abhängiger Mechanismus (genomisch vermittelt):  
Gemeinsam mit seinem Liganden, dem Mineralkortikoid, wandert der Rezeptor-Ligand-Komplex von seiner ursprünglichen Position im Zytosol in den Zellkern ein und bindet dort an spezifische Bindungsstellen in der DNA.

Dort bewirkt er die Modifizierung der Expression der mRNA für verschiedene Gene, unter anderem die Induktion der mRNA der Kinase SGK-1 (Serum und glukokortikoidinduzierte Kinase-1) [16], welche über weitere Zwischenschritte für die Natrium-retendierende Wirkung an den distalen Tubuluszellen verantwortlich ist. Dieser Mechanismus benötigt aufgrund der noch erfolgenden Transkription und Translation mindestens 30 Minuten ab der Ligandenbindung bis zum Wirkungseintritt, und über ihn wird ein Großteil der rezeptorvermittelten Wirkungen des MR initiiert [1, 16].

2. Von der DNA-Bindung unabhängiger Mechanismus (nicht-genomisch vermittelt): Unabhängig davon wirkt der Rezeptor-Ligand-Komplex hochwahrscheinlich zusätzlich noch über den klassischen Weg unter der Nutzung von Second-Messenger-Systemen [17, 18]. Die genaue Signalkaskade und insbesondere eine mögliche zusätzliche Position des Rezeptors (eventuell an der Membran) vor der Ligandenbindung sind jedoch noch nicht endgültig bekannt. Eindeutig ist aber, dass die Vermittlung der nichtgenomischen Wirkungen deutlich schneller abläuft als die genomischen, teilweise liegen diese unter einer Minute. Eben dieser schnelle Wirkungseintritt ist über den genomischen Mechanismus nicht realisierbar [1].

Für die schädliche Wirkung des Aldosterons werden jeweils Effekte aus beiden Signalwegen, dem genomisch vermittelten sowie dem nicht genomisch vermittelten verantwortlich gemacht.

### **1.1.3 Hyperaldosteronismus und Hypertonie**

Die Rolle des primären Hyperaldosteronismus als Ursache einer fixierten Hypertonie wurde lange unterschätzt [19]. Inzwischen ist mehrfach gezeigt worden, dass zwischen 8 und 15% der an arteriellem Hypertonus leidenden Patienten einen erhöhten Aldosteron-zu-Renin-Quotienten im Serum aufweisen,

und damit die Kriterien für den Hyperaldosteronismus erfüllen [20-22]. Aufgrund der inzwischen hinlänglich bekannten höheren Inzidenz von malignen Tumorerkrankungen [23, 24], und dabei im speziellen des Nierenzellkarzinoms bei Hypertoniepatienten, hat die weitere Erforschung der Ursache an Wichtigkeit gewonnen. Gezeigt wurde bisher eine wichtige Rolle des Aldosterons in höheren Konzentrationen bei der oxidativen Zellschädigung und somit möglicherweise auch bei der Tumorentstehung *in vitro* [11, 13] und *in vivo* [19] im Rattenmodell. Daneben werden auch weitere Ursachen der Kanzerogenese durch Aldosteron vermutet, u.a. die induzierte Hypertonie, die Induktion von proliferationsstimulierende Faktoren [25] und auch durch das oft ebenfalls erhöhte Angiotensin II [12, 26].

Mit einer Vorstufe des Aldosterons und gleichzeitig potenten Agonisten am Mineralkortikoidrezeptor 11-Deoxykortikosteron (DOCA) wurde auch auf der mRNA-Ebene die Schädigung des Nierengewebes von Ratten durch erhöhte Plasma-DOCA-Konzentrationen mittels Nierenschädigungsmarkern (siehe unten) nachgewiesen [10]. Dieser Nachweis steht für Aldosteron selbst noch aus und soll unter etwas abgewandelten Bedingungen in dieser Arbeit erbracht werden.

#### **1.1.4 Hyperaldosteronismus als Induktor in der Tumorgenese**

Unter anderem wurde bisher schon mehrfach gezeigt, dass bei manifester arterieller Hypertonie die Inzidenz für maligne Tumorerkrankungen erhöht ist [27, 28].

Bisher genannte Ergebnisse und weitere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass Aldosteron einen direkten genotoxischen Effekt auf die Nierenzellen und weitere Zellen haben könnte. So sind *in vitro* bereits mehrere Mechanismen der Induktion der oxidativen DNA-Schädigung nachgewiesen worden, so z.B. die Hochregulierung der Expression der NADPH-Oxidaseuntereinheiten, die Förderung der Freisetzung der NO-Synthase und die Inhibition der NADP<sup>+</sup>-Reduktion über die Aktivitätsverminderung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase [29].

Es ist zudem, unter anderem über eine vergleichende Betrachtung der Caspase-3-positiven Zellen, nachgewiesen worden, dass die gefundenen Effekte nicht auf die Zytotoxizität von Aldosteron, sondern auf dessen Genotoxizität zurück zu führen sind [11].

Als deutlicher Hinweis auf das mutagene Potential von Aldosteron auf Nierenzellen gilt die *in vivo* [10, 19] sowie *in vitro* [13] signifikant erhöht nachgewiesene Bildung der Basenmodifikation 8-oxo-7,8-dihydro-2'-Deoxyguanosin (8-oxodG) mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS/MS). Diese Basenmutation hat das Potential, an der genomischen DNA punktuell das Basenpaar G:C durch das Basenpaar A:T zu ersetzen. Einen erhöhten Anteil des Basenpaars A:T im Gesamtgenom wurde überdurchschnittlich häufig im Genom von Tumoren gefunden und ist mit einer erhöhten Tumorzinzidenz assoziiert [30].

Wie bereits eingangs erwähnt, wurde außerdem auch eine proinflammatorische Wirkung des Aldosterons nachgewiesen. Ausgelöst durch einen von DNA-Bindung abhängigen Mechanismus, wurde hierfür die Aktivierung des nukleären Faktors  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) verantwortlich gemacht [13], welches zusätzlich zur proinflammatorischen Wirkung eine zentrale Rolle in der Transformation zur Malignität und Tumorprogression hat [13, 31, 32]. Dabei hat möglicherweise gerade das durch NF- $\kappa$ B bewirkte, gesteigerte Überleben einer Zelle, bei gleichzeitiger Kombination mit genomischer Schädigung der Zelle z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des mutagenen Potentials von NF- $\kappa$ B, vorwiegend bei länger andauernder Aktivierung von NF- $\kappa$ B [13].

Diese genannten Effekte sollten nur beispielhaft die genomschädigende Wirkung von Aldosteron aufzeigen. Eine Vielzahl weiterer Nachweise hierfür wurde bereits geliefert (u.a. Queisser et al. [19]) und nun sollte in dieser Arbeit, in Analogie zum Vorversuch der mit DOCA [10] anstelle von Aldosteron behandelten Ratten, gezeigt werden, welche Auswirkung das Aldosteron auf die Expression bereits vorbekannter und untersuchter Nierenschädigungsmarker hat.

Hier ist es jedoch wichtig zu erwähnen, dass zwei nicht unerhebliche Unterschiede im vorher genannten Vorversuch mit DOCA zum Versuch mit Aldosteron bestehen.

So weicht zum einen die Wirkung des DOCA als Vorstufe des Aldosterons mit seiner deutlich direkteren Wirkung nicht unerheblich von der Wirkung des Aldosterons als endgültigem Effektorhormon auf die Nierenzellen ab (siehe Diskussion). Zum anderen wurden im DOCA-Versuch nur Tiere untersucht, die bereits vor der eigentlichen Versuchsdurchführung uninephrektomiert waren. Somit war die verbleibende Niere, welche dadurch schon vor der Versuchsdurchführung kompensatorisch wuchs, durch die zusätzliche hormonelle Behandlung einer größeren Belastung ausgesetzt. Durch diesen Versuchsaufbau wurde das Ziel erreicht, einen vorliegenden Effekt durch die Mineralkortikoidrezeptoraktivierung möglichst deutlich in Erscheinung treten zu lassen.

Im hier als Folgeschritt durchgeführten Versuch mit Aldosteron war vorgesehen, die Effekte unter realeren Bedingungen zu beobachten und zu untersuchen, inwieweit auch bei nicht-uninephrektomierten Tieren das Effektorhormon Aldosteron bereits eine schädliche Wirkung entfalten kann. Der erwartete schädliche Effekt von Aldosteron war somit im Vergleich zu DOCA von vornherein als Modell für den pathologisch vorkommenden Hyperaldosteronismus als deutlich schwächer ausfallend vermutet worden.

## **1.2 Die Wahl der Behandlungsgruppen**

In Analogie zu dem Versuch mit den mit DOCA [10] behandelten Ratten stand auch in diesem Versuch der Vergleich einer mit Aldosteron behandelten Gruppe von Tieren mit einer Gruppe von Tieren, die lediglich NaCl verabreicht bekamen, im Mittelpunkt. Dazu wurde, ebenso wie im DOCA-Versuch, eine weitere Gruppe von Tieren mit einer Kombination von Aldosteron und Spironolakton behandelt (genaues Schema siehe Methoden). Dadurch gelingt es nachzuverfolgen, ob ein eventueller Effekt von Aldosteron durch eine Intervention mit seinem Antagonisten am Mineralkortikoidrezeptor (MR, hier Spironolakton) wieder aufgehoben wird, und somit die Wirkung des Aldosterons spezifischer auf die Aktivierung des MR zurückgeführt werden kann. Eine weitere Behandlungsgruppe

wurde mit Aldosteron bei gleichzeitiger Intervention mit Tempol behandelt. Dessen Rolle als Sauerstoff-Radikalfänger und generellem Antioxidans in Zellen ist hinreichend bekannt [33, 34]. Durch einen eventuell protektiven Effekt des Tempols auf die Nierenzellen könnte somit nachgewiesen werden, dass freie Radikale an der Schädigung durch Aldosteron beteiligt sind. Dadurch würde eine weitere Genomschädigung durch die Aldosteronbehandlung wahrscheinlich. Eine letzte Behandlungsgruppe bekam zusätzlich zum Aldosteron Hydralazin verabreicht. Hydralazin ist ein Antihypertensivum, das seine blutdrucksenkende Eigenschaft isoliert über seine relaxierende Wirkung auf die glatte Muskulatur der Arterien und Arteriolen entfaltet [35] und somit keinen direkten, rezeptorvermittelten Einfluss auf die Signaltransduktion der Nierentubuluszellen hat. Hierdurch kann der Blutdruck effektiv gesenkt werden, ohne in den Wasser- oder Elektrolythaushalt der Versuchstiere direkt eingreifen zu müssen. Das hat den Vorteil, mögliche über die Hypertonie an sich hervorgerufene Effekte ausschließen zu können und würde im Fall einer Schädigung des Nierengewebes bei gleichzeitiger Behandlung mit Aldosteron und Hydralazin eindeutig auf eine direkt schädigende Wirkung des Aldosterons hinweisen und eine über den Blutdruck vermittelte Wirkung, entgegen früherer Vermutungen [25, 27], unwahrscheinlich machen.

### **1.3 Die Wahl der zu untersuchenden Gene**

Die in der klinischen Praxis bisher eingesetzten, auf der Grundlage der berechneten glomerulären Filtrationsrate sowie vor allem auf dem im Routinelabor bestimmten Serumkreatinin basierenden diagnostischen Mittel, sind zur sensitiven, spezifischen und vor allem raschen Diagnosestellung des akuten Nierenversagens relativ unbefriedigend. Diese Situation hat zur Entwicklung und Entdeckung einer Reihe neuartiger Nierenschädigungsmarker geführt [36], welche in Proteinform im Serum oder im Urin nachgewiesen werden können. Sie erlauben eine sensitivere, spezifischere und schnellere Diagnostik von Nierenzellschädigungen verschiedener Ätiologien. Auch wenn die klinisch-

praktische Reife noch aussteht, so sind diese Marker in der Forschung bereits länger Routine und aufgrund ihres diagnostischen Werts sind sie aus dem Forschungsalltag nicht mehr wegzudenken [36, 37].

Die bereits beschriebenen Veränderungen der Expression der mRNA in dem Vorversuch mit DOCA-behandelten Tieren ließen die Untersuchung von insbesondere vier verschiedenen Schädigungsmarkern für die hier durchgeführten Versuche mit Aldosteron interessant werden. Sie sollen im Folgenden eingeführt werden:

### **1.3.1 Kidney Injury Molecule-1**

Das kidney injury molecule-1 ist ein beim Menschen (KIM-1), ebenso wie bei Nagetieren (Kim-1), exprimiertes Zellmembran-Glykoprotein mit einer Immunglobulin-ähnlichen, und einer Muzin-Untereinheit [36], deren Ektodomäne beim Menschen [38] und bei Nagetieren [39] nach proximal-tubulärem Schaden *in vivo* in den Urin abgegeben und auch *in vitro* [40] von geschädigten Zellen exprimiert wird. Dabei zeigte sich, dass Kim-1 *in vivo* als diagnostischer Marker schneller als andere bisher bekannte Biomarker ansteigt [38, 39]. Auch die Sensitivität und Spezifität war im Vergleich zu bisher bekannten Markern unübertroffen [41]. Es wurde außerdem auch gezeigt, dass die KIM-1 Expression beim Menschen in Nierenbiopsiepräparaten mit einer erhöhten tubulointerstitiellen Fibrose und Inflammation korreliert [42]. Auch der direkte Nachweis der erhöhten mRNA-Expression in Nierengewebe ist bereits gelungen [36], wodurch Kim-1 insgesamt ein idealer Untersuchungsparameter für die hier durchgeführten Vergleiche der Behandlungsgruppen sein sollte. Ein zu beachtender Aspekt bleibt die nur temporäre Expression von Kim-1 im Verlauf der Nierenschädigung [36].

### **1.3.2 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin**

Das neutrophile Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) erhielt seinen Namen aufgrund seiner erstmaligen Entdeckung in neutrophilen Granulozyten, in denen es in Granula an Gelatinase gebunden vorlag [36]. NGAL kommt jedoch neben der Niere noch in einer Vielzahl von vorwiegend epithelialen Geweben vor [43] und es

wurde nachgewiesen, dass die Expression von NGAL allgemein bei inflammatorischen Prozessen in epithelialen Geweben erhöht ist [44]. Nichtsdestotrotz hat sich NGAL durch die mehr als 10-fache Expression bei ischämischem Nierenschaden im Mausmodell [45] als Schädigungsmarker für Nierenzellen etabliert. Außerdem wurde bereits 3 Stunden nach einer Gabe von Cisplatin ein Anstieg von NGAL im Urin und in im Nierengewebe von Mäusen nachgewiesen [46]. Diese Ergebnisse, sowie auch eine retrospektive Analyse bei Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom [47] zeigen den hohen Nutzen von NGAL als sensitivem Marker, jedoch auch seine beschränkte Aussagekraft für die spezifische Gewebe- bzw. Nierenschädigung. Für diese Arbeit ist er somit als sensitiver Marker in Kombination mit den anderen zu untersuchenden Genen von Bedeutung.

### **1.3.3 Osteopontin**

Noch nicht als Nierenschädigungsmarker etabliert [36], aber dennoch in zahlreichen Studien mit einer Vielzahl an nephrologischen Erkrankungen assoziiert, ist Osteopontin (OPN). Der Name geht auf den Ort der stärksten Expression, dem Knochengewebe, zurück, wo es eine wichtige Rolle bei der Regulation des physiologischen Knochenumbaus hat [48]. Osteopontin wird jedoch auch in vielen weiteren Geweben synthetisiert, so auch in der Niere, wo ihm eine Funktion als Inhibitor der Calciumoxalat-Steinbildung zugeschrieben wird [49]. Die Expression von Osteopontin ist somit in der Niere physiologisch. Eine Überexpression von Osteopontin ist in Biopsien renalen Gewebes jedoch mit einem pathologisch-fibrotischen Umbau und einer erhöhten Fibroblastenanzahl im Interstitium assoziiert [50]. So wurden z.B. bei der membranösen Glomerulonephritis, der Rasch-progredienten Glomerulonephritis (RPGN), der IgA Glomerulonephritis sowie bei der diffus-proliferativen Glomerulonephritis erhöhte Osteopontinexpressionen im betroffenen Nierengewebe nachgewiesen [51-53], ebenso erhöht war die Expression in durch verschiedenste nephrotoxische Substanzen (u.a. Cisplatin) geschädigtem Nierengewebe [48]. Weiterhin postuliert Johnston et al. [54] dass dem Osteopontin bei der Tumorgenese, -migration, -invasion und dem Tumorwachstum eine Rolle einnimmt und dass dessen

Überexpression in Tumorzellen häufig mit einer schlechteren Prognose für Tumorpatienten korreliere. Diese Entdeckungen und Untersuchungen machen, neben dem bereits bekannten Nutzen aus der Analyse der DOCA-Ratten [10], die Analyse der Osteopontinexpression als einen weiteren Indikator für die Nierenschädigung für diese Arbeit interessant.

#### **1.3.4 Tenascin-C**

Auch Tenascin-C (TN-C) hat einige bedeutende Eigenschaften, die es für die Untersuchung von Substanzen auf ihre onkogene Wirkung interessant macht. Als ein Adhäsion-modulierendes Molekül [55] der extrazellulären Matrix hat es eine direkte Wirkung auf die Bindung von Fibronectin an die Zellmembran [56] und beeinflusst darüber die Migration von Zellen, den Gewebeumbau und auch die Angiogenese [57]. Tenascin-C ist deshalb vorwiegend bei der Embryogenese in der extrazellulären Matrix in höherer Konzentration vorhanden. Aber auch bei Wundheilungsvorgängen, fibrotischem Gewebeumbau, Entzündungen und nicht zuletzt in Tumoren ist Tenascin-C in der extrazellulären Matrix in erhöhter Konzentration zu finden [55, 58]. Unabhängig davon wurde nachgewiesen, dass hohe Plasma-Tenascin-C-Spiegel mit einer erhöhten Mortalität und kardiovaskulären Erkrankungsrate bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz assoziiert ist [56]. Somit ist der Nachweis seiner Überexpression im behandelten Gewebe ein nicht zu verachtender Hinweis auf einen mit Zellmigration und -proliferation einhergehenden Umbau des Gewebes, und auch hier hat sich im Vorversuch in den mit DOCA behandelten Ratten bereits ein Hinweis auf die Beeinflussung der Expression in Nierengeweben durch die Behandlung ergeben, und nun soll auch hier die Wirkung mit der des Aldosterons verglichen werden.

## 2 ZIELSETZUNG

Ziel dieser Arbeit war es, wie oben erwähnt, den bereits nachgewiesenen schädlichen Effekt der Vorstufe des MR-Agonisten Aldosteron, von DOCA auf die Nierentubuluszellen, mit der natürlichen Endstufe Aldosteron zu vergleichen, in seiner Ausprägung zu messen [10] und so ein möglicherweise onkogenes Potential von Aldosteron *in vivo* nachzuweisen. Zur Beobachtung des Effekts wurde die relative Expression der mRNA im Nierengewebe von vier bereits im Vorversuch bewährten Zielgenen, welche auf die Schädigung von Nierentubuluszellen hinweisen, mittels RTqPCR untersucht. Diese Zielgene sind das Kidney injury molecule 1 (Kim-1), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), Osteopontin (OPN) und Tenascin-C (TN-C). Die Vorstellung ist dabei, dass die Niere, reaktiv auf die Exposition zur Noxe, in diesem Fall Aldosteron, die Expression der Schädigungsmarkerproteine erhöht, wodurch zwangsweise in einer Vorstufe die dafür codierende mRNA zuvor verstärkt exprimiert werden muss und dann nachgewiesen wird.

Zum Nachweis kam dabei die inzwischen bewährteste Methode für die Quantifizierung von mRNA-Expressionen, die Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion mit vorhergehender Transkription der mRNA in cDNA, zur Anwendung.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sollen dann in der Zusammenschau mit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen der in gleicher Weise behandelten Tiere mit anderen Methoden, z.B. der Immunhistochemie, der Einzelzellgelelektrophorese (comet assay), der  $\gamma$ -H2AX-Analyse und weiteren Methoden [19] verglichen und zusammengetragen werden, und eine gemeinsame Aussage über die Wirkung des Aldosterons auf die Nierentubuluszellen in Ratten im Vergleich zur Wirkung von DOCA getroffen werden.

## **3 MATERIAL UND METHODEN**

### **3.1 Material**

#### **3.1.1 Tierversuch**

Eingesetzt wurden 45 männliche Sprague-Dawley Ratten (RjHan:SD) (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich), nuchal und subkutan implantierte osmotische Minipumpen mit 2 ml Kapazität der Firma Alzet (Durect Corporation, Cupertino, Canada) sowie das Blood Pressure Analysis System BP 2000 (Visitech Systems, Apex, North Carolina, USA) zur noninvasiven caudalen Blutdruckmessung.

#### Chemikalien

0,9%ige NaCl-Lösung (Frisenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) sowie Deltadex 40 Dextranlösung mit 1% Procain-HCl (AlleMan Pharma, Rimbach, Deutschland) zur finalen Kreislaufperfusion der Tiere. Die im Tierversuch eingesetzten Wirkstoffe Aldosteron, Tempol, Hydralazin und Spironolakton wurden von Sigma Aldrich bezogen. Tierfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)

#### **3.1.2 RNA-Isolierung**

Hier kam das Qiagen Rneasy® Minikit 50 #74104 (Qiagen N.V. Hilden, Deutschland) und zur RNA-Gehaltsbestimmung das Nanodrop™ 2000c UV-Spektrometer (ThermoScientific, Rockford, USA) zum Einsatz.

#### Chemikalien

Mercaptoethanol, Chloroform und HCl Puffer pH 7,4 (T2663) von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland). Tris- H<sub>2</sub>O (DNase, RNase frei (T143.2)) und Diethyldicarbonat – H<sub>2</sub>O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

### 3.1.3 cDNA-Transkription

Zur cDNA-Transkription wurde das Fermentas RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit #K1651, K1652 (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet.

### 3.1.4 Reverse-Transkriptase PCR (qualitativ)

Für die qualitative PCR wurde eingesetzt: Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Hamburg)

Chemikalien

Agarose Gel 1,7% (NEEO 2267.2, Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Als DNA Polymerase wurde der OneTaq™ Hot-Start Quick-Load® Mastermix with Standardbuffer M0488S (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, USA) verwendet. Die jeweils eingesetzten Primer werden im folgenden Kapitel unter Real Time PCR aufgeführt.

### 3.1.5 Real Time quantitative Reverse-Transcriptase PCR (RTqPCR)

Entsprechend wurde für die Real Time quantitative PCR der LightCycler® 480 (Roche, Mannheim, Deutschland) als zentrales Analyseinstrument eingesetzt.

Chemikalien

Als Kombinationsreagenz für die Kettenreaktion, bestehend aus DNA-Polymerase, Fluoreszenzmarker, Nukleotidgemisch und Reaktionspuffergemisch, wurde Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix von ThermoScientific (Rockford, USA) eingesetzt. Die Primer wurden nach einem bereits bestehenden Protokoll mit dem Programm Primer3 [59] entworfen [10] und von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) erworben.

Alle weiteren nicht im Einzelnen aufgeführten Chemikalien sind entweder von Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) oder von Roth (Karlsruhe, Deutschland) erworben.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierversuch

Der Versuchsaufbau für die Behandlung der Tiere wurde bereits an anderer Stelle beschrieben [19]. 45 Sprague-Dawley Ratten wurden im Alter von 5-6 Wochen nach dem Zufallsprinzip in 6 Gruppen eingeteilt, wobei in der Cisplatingruppe nur 5, in allen anderen 8 Tiere vorlagen. Die Eingewöhnungsphase der Tiere an die Umgebung sowie an die zweimal wöchentlich stattfindende Blutdruckmessung betrug 2 Wochen. Die osmotischen Minipumpen (Alzet, 2ml) wurden allen Tieren, ausgenommen der Cisplatingruppe (Gruppe 6), nuchal subkutan implantiert. Mit der Implantation der Pumpen begann der Versuch. Den Gruppen 2-5 in Tabelle 1 wurden  $0,75\mu\text{g}/(\text{h}\cdot\text{kg})$  Aldosteron über die osmotische Pumpe für insgesamt 4 Wochen verabreicht, während die Negativkontrolle Gruppe 1 lediglich eine phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) erhielt. Alle Tiere wurden bei  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  gehalten und hatten freien Zugang zum Futter. Mit Ausnahme der Gruppe 6, wurde allen Gruppen zusätzlich 1% NaCl im Trinkwasser verabreicht. Die Gruppe 3 erhielt täglich zusätzlich  $25\text{mg}/\text{kg}$  Körpergewicht Spironolakton per Gavage, während Gruppe 4  $1\text{mM}$  Tempol und Gruppe 5  $20\text{mg}/\text{kg}$  Körpergewicht Hydralazin oral im Trinkwasser verabreicht bekamen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Behandlungsschema

	Benennung	n=	Pumpe	Trinkwasser (+Dosis/d)
Gr. 1	NaCl	8	0,9% PBS	1% NaCl
Gr. 2	Ald	8	$0,75\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ Ald	1% NaCl
Gr. 3	Ald/Spiro	8	$0,75\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ Ald	1% NaCl+ $25\text{mg}/\text{kg}$ Spironolakton
Gr. 4	Ald/Tempol	8	$0,75\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ Ald	1% NaCl+ $1\text{mM}$ Tempol
Gr. 5	Ald/Hydra	8	$0,75\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ Ald	1% NaCl+ $20\text{mg}/\text{kg}$ Hydralazin
Gr. 6	CP	5	unbehandelt	unbehandelt, 2d präfinal Cisplatin
		$\Sigma=45$		

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Union zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere, sowie mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt.

Für Spironolakton wurde eine subtherapeutische Dosis gewählt, sodass der durchschnittliche Blutdruck nicht signifikant absinkt, um nicht den Effekt des erniedrigten Blutdrucks als Confounder zu bekommen. Dafür wurde auf die Erfahrungsdaten aus vorherigen Versuchen mit der Aldosteronvorstufe DOCA [10], sowie auf Literaturdaten [60, 61] zurückgegriffen. Insgesamt wurden die Tiere 4 Wochen behandelt. Den unbehandelten Tieren aus Gruppe 6 wurde 48 Stunden vor Versuchsende Cisplatin in nephrotoxischer Dosis (2,5mg/kg) intraperitoneal als Positivkontrolle gespritzt. Nun wurden die Tiere unter Anästhesie mit 120 mg/kg Ketamin und 8 mg/kg Xylazin (intramuskulär) in Narkose versetzt und mit kalter 0,9%iger NaCl-Lösung, sowie mit Deltadex 40-Dextranlösung/1% Procain, über die Aorta abdominalis perfundiert. Anschließend wurden die Nieren entnommen. Die für diesen Versuch bestimmten Nierenanteile wurden bei -196°C schockgefroren, um die rasch einsetzende Degradierung der RNA möglichst gering zu halten. Aus der Cisplatingruppe Nr. 6 standen zwei, aus allen anderen Gruppen 1-5 jeweils sechs Nieren für diesen Versuchsteil zur Verfügung. Sie sind in Tabelle 2 im Anhang zusammengefasst dargestellt.

### 3.2.2 RNA Isolierung

#### 3.2.2.1 Schritt 1: Pulverisieren von tierischem Gewebe zur RNA-Isolierung

Die auf -80°C gefrorenen Nieren wurden im noch gefrorenen Zustand geviertelt, ein Viertel wurde weiterverarbeitet während der Rest wieder eingefroren wurde. Zur Vorbereitung wurden ein Mörser und ein Pistill mit Chloroform gründlich ausgespült, um RNase-Reste zu entfernen, sowie mit Flüssigstickstoff vorgekühlt. Das Nierenstück wurde mit dem Mörser und Pistill, unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>), fortwährend bis zur Homogenisierung zerkleinert. Dadurch wurde sichergestellt, dass das Gewebe zu keiner Zeit auch nur geringfügig antaute, da anderenfalls die stabile RNase direkt mit der Denaturierung der deutlich labileren RNA-Stränge beginnen würde. Das erhaltene Gewebepulver wurde in spezielle RNase freie, in Flüssigstickstoff vorgekühlte Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) gegeben, auf Portionen von jeweils ca. 30 mg (in etwa 3x3x3 mm Quader  $\hat{=}$  27 mm<sup>3</sup>) aufgeteilt, diese unverzüglich verschlossen und wieder in Flüssigstickstoff gelagert. Zwischen den verschiedenen Nierenproben wurde der Mörser jeweils erneut mit Chloroform ausgespült. Das gewonnene Gewebepulver (in Flüssigstickstoff gekühlt) stand nun für die folgende RNA-Isolierung zur Verfügung.

#### 3.2.2.2 Schritt 2: Extraktion der RNA mit dem Qiagen Rneasy® Mini Kit

Die im Folgenden neu erwähnten Chemikalien RLT-Puffer, RW1-Puffer und RPE-Puffer sind Teil des Qiagen Rneasy® Mini Kits.

Durch die vorherige Behandlung im Mörser sind die Zellwände weitgehend aufgelöst worden. Nun wurde das Gewebe weiter lysiert und homogenisiert. Mit dem Qiagen Rneasy® Mini Kit wurde dieser Schritt, genauso wie die spätere RNA-Isolierung, mittels mit Membranen versehenen Durchflusssäulen, die in Auffang-Tubes stehen, und welche dann gemeinsam zentrifugiert wurden, bewerkstelligt.

In Anlehnung an das Herstellerprotokoll von Qiagen wurden zum gefrorenen Gewebepulver 600 µl RLT-Puffer als Inaktivator der RNase und zur weiteren Lyse des Gewebes hinzugegeben. Zur Aktivierung des RLT-Puffers wurde zuvor 10µl β-Mercaptoethanol auf 1ml RLT-Puffer gegeben. Zur Homogenisierung der Suspension aus RLT-Puffer, β-Mercaptoethanol und dem Gewebe wurde sie auf eine QIAshredder® Säule mit Proberöhrchen überführt und 2 min in einer Mikrozentrifuge bei  $\geq 10000g$  zentrifugiert. Zum Durchfluss wurden 600µl Ethanol (70%) gegeben und die Suspension mit einer Pipettenspitze vorsichtig gemischt. Die QIASchredder®-Säule selbst wurde verworfen. Von der daraus erhaltenen Lösung wurden 700µl auf die RNA-Auffangssäule pipettiert und diese mit einem Probenröhrchen bei  $\geq 8000g$  für 30 sec. Zentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit der restlichen Gewebelösung wiederholt. Jetzt konnte der Inhalt des Proberöhrchens verworfen werden, die RNA ist in der Membran der RNA-Auffangssäule gebunden.

Im Anschluss musste die isolierte RNA aus der RNA-Auffangssäule aufgereinigt werden, bevor sie eluiert werden konnte. Dafür wurden 700µl RW1-Puffer, einer starken Waschlösung, welche nicht an die Membran gebundene organische Moleküle (z.B. Proteine, Fettsäuren) auslöst [62], auf die Säule gegeben, bei  $\geq 8000g$  für 30 sec. Zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurde die Aufreinigung mit 500µl RPE-Puffer, einer milden Auswaschlösung zur Entfernung von Salzspuren, zweimal wiederholt, wobei der letzte Zentrifugationsschritt für 2 min durchgeführt wurde. Hierdurch wurde sichergestellt, dass der Rest des

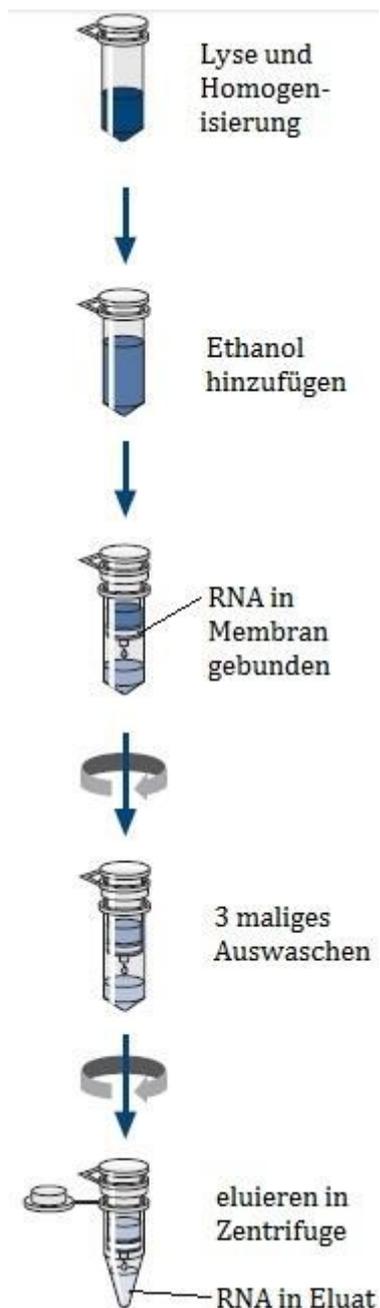


Abbildung 2: Schematische Darstellung der RNA Extraktion (Quelle:QIAGEN)

Ethanol sowie der Lysepuffer in der RNA-Auffangssäule minimiert werden und möglichst reine RNA vorliegt. Die in der Säulenmembran vorliegende RNA wurde anschließend in ein neues RNase-freies Probenröhrchen eluiert unter Verwendung von 40µl RNase-freiem Wasser. Dafür wurde das Wasser auf die RNA-Auffangssäule gegeben und noch einmal bei ≥8000g für 1 min zentrifugiert.

Die erwartete RNA-Menge betrug 20-30µg RNA pro Gewebeprobe, gelöst in 40 µl RNase-freiem Wasser, und stand für die Überführung in cDNA bereit.

Abbildung 2 zeigt noch mal die Zusammenfassung der einzelnen Schritte der RNA Extraktion. (Quelle: Qiagen) [62]

Potentiell vorhandene genomische DNA-Reste aus der RNA-Lösung wurden durch die Silikatmembran des Rneasy® Mini Kit suffizient eliminiert. Eine weitere Behandlung mit einer spezifischen DNase war nach dem Herstellerprotokoll dadurch nicht mehr nötig und wurde nicht durchgeführt. [62]

### 3.2.2.3 Schritt 3: Exakte Bestimmung des RNA-Gehalts

Die Bestimmung des RNA-Gehalts erfolgte photometrisch. Dabei wird die Tatsache genutzt, dass in Wasser gelöste RNA, bei konstantem pH-Wert, eine spezifisch hohe Lichtextinktion bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260\text{nm}$  hat. Das bedeutet, dass bei reinen RNA-Wasser-Lösungen der Extinktion  $A_{260}=1$  eine absolute RNA-Konzentration von  $40\mu\text{g}/(\text{ml}\cdot\text{cm})$  zugeordnet werden kann [62]. Da die Beziehung der optischen Dichte zur RNA-Konzentration linear ist, gestaltet sich die Berechnung der Konzentration  $C_{RNA}$  nach dem Lambert-Beerschen Gesetz wie folgt:

$$C_{RNA} \left[ \frac{\mu\text{g}}{\text{ml}} \right] = A_{260} * 40 \frac{\mu\text{g}}{\text{ml} * \text{cm}} * 1 \text{ cm}$$

Ein Zentimeter ist in diesem Fall die Breite der durchleuchteten Küvette und somit die Strecke des Lichts im RNA-Medium.

Um einen eventuellen Fehler durch Verunreinigung mit Proteinen auszuschließen muss zusätzlich der  $A_{260}/A_{280}$  – Quotient bestimmt werden. Dabei macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass Proteine ein anderes Lichtabsorbtionspektrum haben als RNA. Bei einem Absorbtionsquotienten  $A_{260}/A_{280} = 1,9-2,1$  liegt dabei die geringste RNA-Lösungsverunreinigung mit Protein vor [62].

Zu beachten war dabei die hohe Abhängigkeit des Absorbtionsquotienten  $A_{260}/A_{280}$  vom pH-Wert der Lösung: so korreliert zum Beispiel ein niedriger pH mit einem niedrigen Quotienten. Aus diesem Grund wurden die Konzentrations- und Quotientenbestimmungen nicht direkt in RNA-Wasser-Lösungen, sondern in TRIS-HCl-gepufferten Lösungen (10mM TRIS-HCl) durchgeführt [62].

Um möglichst genaue Werte zu erhalten wurden je RNA-Isolat 3 Proben entnommen, deren Absorption  $A_{260}$  sowie der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  an dem Spektrometer Nanodrop® 2000c bestimmt, und die Werte arithmetisch gemittelt. Die Berechnung der RNA-Konzentration nach oben genannter Formel die in Tabelle 3 im Anhang dargestellten Werte.

Der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  ergab für alle Proben Werte zwischen 1,98 und 2,11. Somit war ein hoher Reinheitsgrad der RNA für alle Proben gewährleistet.

### **3.2.3 Transkription der RNA in cDNA mit reverser Transkriptase (RT)**

Um eine präzise quantitative Auswertung der Expressionen zu ermöglichen ist es essenziell, die bisher dargestellte reine, aber dennoch relativ instabile RNA in eine stabilere Form zu überführen. Dafür wurde die RNA mithilfe des Enzyms reverse Transkriptase (RevertAid™ Premium Reverse Transkriptase) zu cDNA („complementary DNA“), entgegen der physiologischen Leserichtung, zurück transkribiert. Es handelt sich hierbei um eine thermisch stabile Polymerase ohne RNase-Aktivität. Sie ist, genauso wie alle weiteren benötigten Reagenzien, Bestandteil des Fermentas First Strand cDNA Synthese Kits. Nach dessen cDNA-Syntheseprotokoll für RTqPCR-Anwendungen wurde die Transkription durchgeführt [63].

Dafür wurden als Ausgangsmaterialien benötigt:

1. Das RNA-Isolat aus dem vorherigen Versuchsteil in fixer Stoffmenge
2. Primer, um Startpunkte für die Transkription zu definieren
3. Eine Nukleosidtriphosphatmischung (dNTP) als „Baustoff“ für die DNA
4. Nuklease-freies Wasser

Um möglichst die gesamte RNA zu transkribieren, wurde ein Primergemisch genutzt, das einerseits aus Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer, einem spezifischen Primer, sowie aus „random hexamer primer“, einem nach dem Zufallsprinzip bindenden Primer, besteht.

Der Oligo(dT)<sub>18</sub> Primer bindet spezifisch an den Poly-A-Schwanz der zellulären mRNA, während der „random hexamer Primer“ ein aus sechs Nukleinbasen bestehender Primer aus zufällig zusammengesetzten Sequenzen darstellt. Durch eine Vielzahl dieser Primer mit zufälliger Sequenz wurde die Bindung an multiple Positionen der RNA ermöglicht und somit sichergestellt, dass ein Großteil der RNA transkribiert wird.

Die Nukleosidtriphosphatmischung (dNTP) stellte die für die Strangsynthese der cDNA benötigten Basen Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin, in Lösung bereit.

Um möglichst effiziente Reaktionsabläufe zu erhalten wurde die Ausgangsmenge an RNA (RNA-Isolat) zur Transkription im vom Hersteller beschriebenen optimalen Bereich gewählt. Bei der hier vorliegenden Gesamt-RNA einer Zelle liegt dieser Wert für das Fermentas Kit bei 2µg RNA bei einem technisch möglichen Einsatzbereich von 1pg bis 5µg RNA. Da nun die Konzentrationen der einzelnen RNA-Isolate verschieden waren, musste, um jeweils genau 2µg RNA im Reaktionsgemisch zu erhalten, die entnommene Menge genauso wie das aufzufüllende Wasser angepasst werden. Die Gesamtmenge von RNA-Isolat und Wasser betrug dann 13,5 µl. Die jeweiligen Werte sind in Tabelle 4 im Anhang zu finden.

Aus den beiden Primertypen und den Nukleosidtriphosphaten wurde ein Mastermix mit den Anteilen 4µl dNTP-Mix auf 1µl Oligo(dT)<sub>18</sub> - Primer und 1µl random-hexamer-Primer hergestellt.

Der mitgelieferte RT-Puffer wurde entsprechend der Angaben des Herstellers verdünnt und diente der Adjustierung des pH-Wertes auf optimale Reaktionsbedingungen.

Abschließend wurden zusammengegeben:

1. 1,5µl Mastermix
2. 13,5µl RNA-Isolat, mit der entsprechenden Menge Wasser für genau 2µg RNA
3. 4µl RT-Puffer
4. 1µl RevertAid™ Premium Enzyme Mix (RT-Polymerase)

Während der gesamten Dauer lagen die Röhrchen auf Eis. Es wurden nur RNase freie Materialien verwendet.

Nach 10-minütiger Inkubation bei 25°C wurde das Gemisch in einem Thermocycler für 30 min. auf 50°C erhitzt. In dieser Phase fand die Transkription statt. Mit einer Erhitzung auf 85°C für 5 min wurde die Reaktion schließlich beendet.

Die erhaltene cDNA wurde bei -20°C gelagert, vorerst nicht benötigte Proben bei -80°C.

### 3.2.4 Real time quantitative Polymerasekettenreaktion (RTqPCR)

#### 3.2.4.1 Definitionen

In dieser Arbeit wurden folgende, am weitesten verbreitete Abkürzungen verwendet:

qualitative PCR: Endpunkt-PCR, ausgewertet auf einem Agarosegel,  
DNA-Nachweis mit Ethidiumbromid als Fluoreszenzmarker

RT-PCR: qualitative PCR mit cDNA, hergestellt aus vorheriger reverser  
Transkription aus RNA mittels reverser Transkriptase

qPCR: quantitative (real-time) PCR mittels Echtzeit-Fluoreszenzaufnahmen nach  
jedem PCR-Zyklus

RTqPCR: quantitative (real-time) PCR mit cDNA aus vorheriger reverser  
Transkription aus RNA

#### 3.2.4.2 Grundlagen der PCR

Die PCR ist eine seit den 1980er Jahren etablierte molekulargenetische Methode zur Replikation von in Lösung vorliegender DNA („Template“ genannt). Sie beruht auf den Prinzipien der Genomreplikation *in vivo*. Durch Bereitstellung der an der Amplifikation beteiligten Enzyme und Substrate lässt sich die DNA-Replikation auch *in vitro* durchführen. Die bei jedem Schritt notwendige Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen wird über erhöhte Temperatur erreicht. Durch eine serielle Replikation können dann sehr hohe DNA-Kopiezahlen synthetisiert werden. Es genügen dabei meist bereits äußerst geringe Ausgangsmengen an DNA-Template, da die Replikation bis zum Beginn der Sättigung exponentiell verläuft.

Im Vergleich zu anderen Verfahren, die RNA direkt nachweisen, z.B. der Northern-Blot-Analyse, ist die RTqPCR mit vorheriger Transkription der RNA in cDNA das deutlich sensitivere Verfahren [64]. Die theoretische Grundlage und der Nachweis, auch geringste Mengen RNA nach einer vorgeschalteten reversen Transkriptase-

Reaktion quantifizieren zu können, wurde durch Veres *et al.* Bereits 1987 gelegt [65].

Außer der cDNA wird für die Kettenreaktion folgendes benötigt: eine geeignete DNA-Polymerase, die auch bei höheren Temperaturen nicht denaturiert und somit nicht jeden Zyklus erneut hinzugegeben werden muss. Dafür eignet sich beispielsweise die auch hier verwendete Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq, erstmalig beschrieben von Innis *et al.* 1988 [66] ). Ihr Polymerisationsoptimum liegt bei 72°C und sie denaturiert erst bei Temperaturen über 100°C. Weiterhin müssen in der Lösung die verschiedenen Nucleosidtriphosphate (ATP, GTP, TTP, CTP) vorliegen, die als Grundsubstanz („Bausteine“) für die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen. Zuletzt werden genspezifische Primer (DNA-Oligonukleotide) benötigt, - eine kurze DNA-Nucleotidsequenz -, die an die komplementäre Nucleotidsequenz eines DNA-Einzelstrangs binden können. Diese stellen nun die Startpunkte für die DNA-Polymerase dar. Dadurch ist die selektive Genreplikation erst möglich. Von jedem Primer wird ein Primerpaar eingesetzt, der „forward“ Primer zur Hybridisierung („Annealing“) an den codierenden Strang und der „reverse“ Primer, zur Hybridisierung an den komplementären Strang, wodurch jeweils beide Stränge simultan amplifiziert werden. Die optimale Annealing-Temperatur hängt in hohem Maße vom Primerdesign, also seiner Basenzusammensetzung und seiner Länge ab. Im Allgemeinen gilt: Je niedriger die Annealing-Temperatur gewählt wird, desto höher ist die Affinität der Primer zu den komplementären Abschnitten und desto wahrscheinlicher wird allerdings auch die Hybridisierung von zwei komplementären Einzelsträngen zu vollständigen DNA-Doppelsträngen, sowie die Hybridisierung von Primern an nicht komplementäre Positionen. Je höher die Temperatur, desto wahrscheinlicher ist es, dass komplementäre Sequenzen der DNA-Abschnitte nicht von Primern besetzt werden. Auch die Art der Nucleotidzusammensetzung beeinflusst die optimale Annealing-Temperatur: so lagern sich GC-reiche Primer bei höheren Temperaturen, aufgrund der höheren thermischen Stabilität der CG-Bindung, stärker an komplementäre Abschnitte an als AT-reiche Primer, welche eine geringere thermische Stabilität aufweisen. Im

Allgemeinen, sowie auch für diesen Versuch, wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, die 5°C unter der Schmelztemperatur der Primer liegt. Die Schmelztemperatur  $T_m$  (50% der DNA liegt hier in Einzelstrangform vor) lässt sich dafür nach folgender vereinfachten Formel berechnen [64]:

$$T_m = 2^\circ\text{C} * (A + T) + 4^\circ\text{C} * (G + C)$$

Für diesen Versuch lag die Schmelztemperatur für die 10 verwendeten Primer im Bereich zwischen 57,9°C und 63,5°C und somit relativ gering gestreut, so dass als optimale Annealing-Temperatur 54°C für alle Primer angenommen wurde.

Außerdem wurden vom Hersteller  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen zur Lösung gegeben, da diese für die Aktivität der Polymerase förderlich sind.

### 3.2.4.3 Genereller Ablauf der PCR

Am Beispiel eines einzelnen DNA-Doppelstrangs soll der Ablauf schematisch verdeutlicht werden:

In einem ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang für 15 sec bei Temperaturen über 90°C hitzedenaturiert, d.h. er wird in zwei Einzelstränge aufgespalten. Bei dieser hohen Temperatur bleiben die Stränge isoliert, es hybridisieren also noch keine Primer oder komplementäre DNA.

Erst im folgenden, zweiten Schritt hybridisieren die Primer bei Absenkung der Temperatur auf 54°C. Nach 30 Sekunden kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der Primer hybridisiert hat, sie markieren somit die Startposition für die DNA-Polymerase. Eine Endposition gibt es nicht.

Als dritter Schritt folgt die Extension oder Elongation durch die Taq-Polymerase bei 72°C für 30 Sekunden. Beginnend bei den Primern am 3'-Ende einer Matrize, synthetisiert die DNA-Polymerase den komplementären Strang zum Template in Richtung 5'-Ende. Dieses erste Replikat geht über die Länge der gesuchten

Gensequenz hinaus. Erst ab dem zweiten Zyklus, bei dem die komplementären Stränge aus dem ersten Zyklus mit dem jeweils anderen Primer („reverse“ oder „forward“) als Vorlagematrize dienen, werden nur noch Gensequenzen der richtigen Länge synthetisiert. Unter den *in vitro* Bedingungen sind allerdings nicht annähernd die Amplifikatlängen zu erreichen, die *in vivo* üblich wären (maximal sind bei einer gewöhnlichen Taq-Polymerase ca. 5000 Basenpaare möglich), weshalb die gesuchten Gensequenzen nicht zu lang gewählt werden dürfen. Die in diesem Versuch verwendeten Gensequenzen waren alle unter 300bp lang. Nun liegt die ursprüngliche DNA-Doppelhelix als Teilstrang in zwei getrennten neuen DNA-Doppelhelices vor. Dabei wurden aufgrund des oben beschriebenen Ablaufs nur die mit Primern markierten Gensequenzen repliziert.

Der Vorgang kann jetzt von vorne beginnen und die beiden neuen Stränge als Vorlage für 4 weitere Doppelhelices in einem 2. Zyklus dienen. Damit liegt, zumindest für die ersten Zyklen, ein exponentielles Wachstum der Gensequenzreplikat vor. Je häufiger jedoch die Zyklen durchgeführt werden, desto weniger Nukleotidtriphosphate stehen zu Verfügung, und desto wahrscheinlicher sind Replikationsfehler. Diese kommen zwangsläufig bei jeder Replikation vor, weshalb, wenn z.B. eine Primerregion betroffen ist, das fehlerhafte Transkript nicht mehr als Ausgangsmatrize für weitere Replikationen dienen kann. So ergibt sich für den gesamten Vorgang eine Wachstumskurve mit typischen Verlauf: zu Beginn steigt die Kurve exponentiell an, bis sie ein Wachstumsmaximum (steilster Kurvenverlauf) erreicht. Von da an sinkt die Wachstumsrate wieder bis sie sich asymptotisch an Null annähert (wenn z.B. die Nukleotidtriphosphate aufgebraucht sind). Nach ca. 35-40 Zyklen ist, je nach Ausgangsmenge der DNA, Replikatlänge und Replikationsgeschwindigkeit, in den meisten Fällen das Plateau der maximalen Synthesemenge erreicht. Mathematisch gesehen beschreibt die Regressionskurve an die Koordinaten der DNA-Produktmenge ein logistisches Wachstum. (Siehe Abbildung 3)

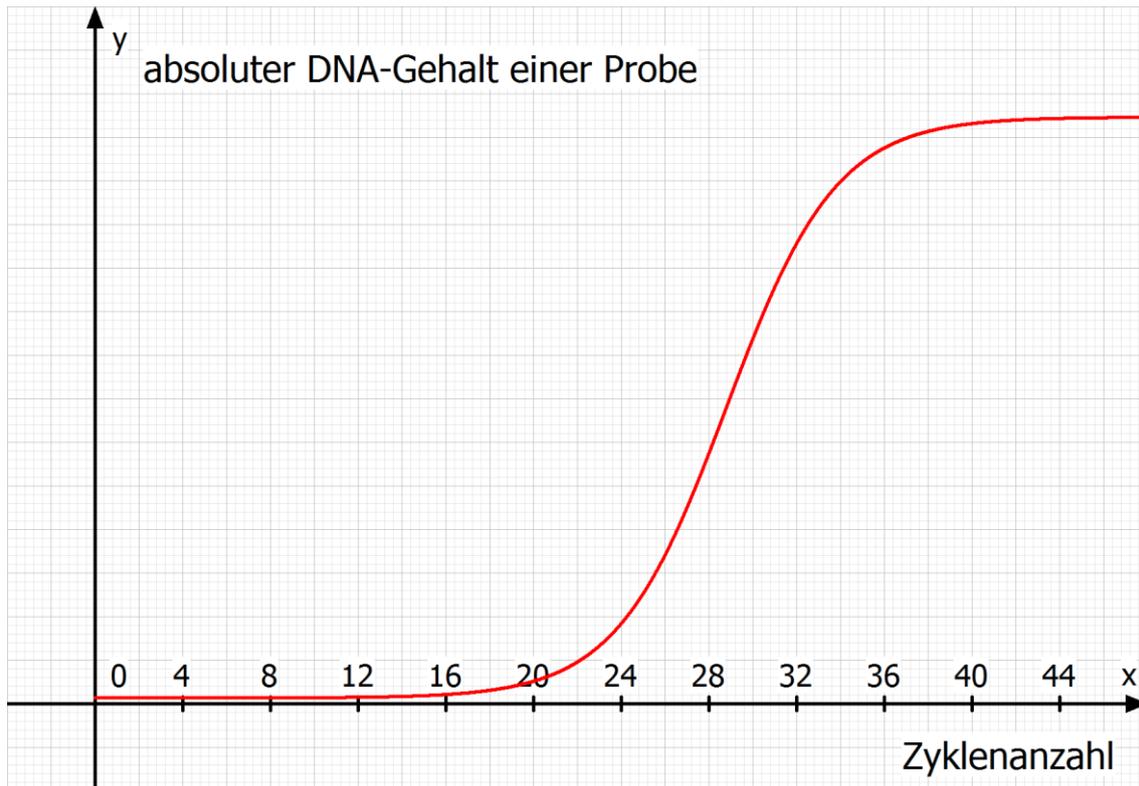


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklung des DNA-Gehalts einer Beispielprobe. Genau genommen handelt es sich nicht um einen kontinuierlichen Verlauf, sondern um diskrete Punkte, welche entlang der Kurve einer logistischen Funktion liegen. Y-Achsenskala ist linear. Zeichnung mit Mathegrafix® erstellt.

#### 3.2.4.4 Die Primer

Für diese Arbeit wurden insgesamt fünf verschiedene Gensequenzen (vier Zielgene und ein Referenzgen) untersucht. Sie werden im Folgenden erläutert.

##### 3.2.4.4.1 Primer für die Zielgene

Die hier verwendeten Zielgene („targets“) sind bereits mehrfach in der Literatur als Biomarker, insbesondere auch für nephrotoxische, ischämische und inflammatorische Schädigungen der tubulären und interstitiellen Zellen der Niere vorbeschrieben worden [10, 36, 37]. (Genauerer hierzu in der Einleitung)

Für folgende Zielgene wurden deshalb Primer für die RTqPCR, analog zum Versuch an DOCA-Ratten [10], geordert:

- Kidney injury molecule-1 (Kim-1)

- Neutrophil glutaminase associated lipocalin (NGAL)
- Osteopontin (OPN)
- Tenascin-C (TN-C)

Tabelle 5 zeigt die jeweiligen geordneten Sequenzen und Basenpaarlängen. Es war darauf zu achten, dass die Gesamtlänge der Produkte möglichst kurz gewählt wurde, um keine Ungenauigkeiten durch vorzeitige Strangabbrüche zu bekommen.

Um die Vergleichbarkeit zu gewähren, wurden die Primersequenzen für die einzelnen Zielgene entsprechend denen im Versuch mit DOCA-Salz hypertensiven Ratten [10] verwendeten Primern ausgewählt.

*Tabelle 5: Primersequenzen sowie die Gesamtlänge der gesuchten Zielsequenzen. Ebenso an anderer Stelle vorbeschrieben [10].*

	<b>Primersequenz vorwärts</b>	<b>Primersequenz rückwärts</b>	<b>Länge</b>
<b>Kim-1</b>	GGA ATG GCA CTG TGA CAT CCT	CTG CGG CTT CCT CAA AGG	73 bp
<b>NGAL</b>	GGA ATA TTC ACA GCT ACC CTC	TGG CAA ACT GGT CGT AGT	74 bp
<b>OPN</b>	AGC CAT GAC CAC ATG GAC GA	GAT TCG TCA GAT TCA TCC	94 bp
<b>TN-C</b>	TCT GTG GAT GGT ACA GTC AAG	ATG GGC TCA GGT CTG CCA	75 bp

#### 3.2.4.4.2 Primer für das Referenzgen

Das Referenzgen, auch endogene oder interne Kontrolle genannt, leistet einen entscheidenden Beitrag zum Gelingen des Versuchs. Sein Einfluss auf die Ergebnisse kann kaum hoch genug eingeschätzt werden, da bei der relativen Quantifizierung nur vergleichend Mengen betrachtet werden und somit jegliche Beeinflussung der Expression oder des Nachweises von Referenzgenen direkt auch die Ergebnisse beeinflussen. Es wird daher versucht, Gene mit von äußeren Faktoren möglichst unabhängiger Expression zu verwenden. Dafür hat sich bisher nur eine geringe Anzahl an Genen, die für den zwingenden Erhalt der Zellstruktur oder des Zellmetabolismus notwendig sind, bewährt (sogenannte Housekeeping-Gene). Unter anderen gehören dazu: das  $\beta$ -Aktin, ein am Aufbau des Zytoskeletts beteiligtes Protein, genauso wie auch Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

(GAPDH), ein an der Glycolyse beteiligtes Enzym und Porphobilinogen-Desaminase (PBGD) als essenzielles Protein zur Porphyrin-Synthese [67].

Nachdem  $\beta$ -Aktin bereits an anderer Stelle [10] am Rattenmodell erfolgreich als interne Kontrolle (Referenzgen) für die gesuchten Zielgene eingesetzt wurde, bot sich die erneute Verwendung in diesem Versuch an.

Die in der Ratte für  $\beta$ -Aktin kodierende Primersequenz ist in Tabelle 6 dargestellt:

*Tabelle 6: Primersequenz und Länge der Referenzsequenz auf dem  $\beta$ -Aktin-Gen*

	<b>Primersequenz vorwärts</b>	<b>Primersequenz rückwärts</b>	<b>Länge</b>
<b><math>\beta</math>-Aktin</b>	GCA GGA GTA CGA TGA GTC CG	ACG CAG CTC AGT AAC AGT	74 bp

Alle Primer wurden mit Hilfe der Primer3Plus Software generiert, bei MWG Biotech geordert und erworben, auf der Homepage des „National Center for Biotechnology Information“ mit dem Programm Primer-BLAST® validiert und mit mfold (<http://mfold.rna.albany.edu>) auf die Bildung sekundärer Strukturen untersucht.

#### 3.2.4.5 Qualitative PCR

Die unter 3.2.4.3 „Genereller Ablauf“ beschriebenen Schritte sind allen PCR-Formen gemeinsam. Um das Ergebnis in einer herkömmlichen PCR qualitativ auszuwerten, kann die erhaltene DNA elektrophoretisch aufgetrennt werden. Dazu wird die DNA-Lösung auf ein 1,7%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (1mg/ml Gel), einem Fluoreszenzmarker, aufgetragen und bei 100 V in einer Elektrophoresekammer aufgetrennt. Dabei wandert die negativ geladene DNA im elektrischen Feld in Richtung Pluspol. Je weniger Basenpaare ein DNA-Strang hat, desto geringer ist sein Widerstand im Gel und desto weiter bewegt er sich auf den Pluspol zu. Die Auswertung erfolgt dann unter UV-Bestrahlung in einer Dunkelkammer und einer Fluoreszenzkamera. Da das im Gel enthaltene Ethidiumbromid in den DNA-Strängen interkaliert, ergeben sich an den DNA-

dichten Positionen Banden. So können die PCR-Produkte, nach Basenpaarlänge sortiert, aufgetrennt dargestellt werden und es kann rückgeschlossen werden, welche Produkte amplifiziert wurden. Dafür ist es hilfreich, zusätzlich zu den PCR-Produkten jeweils eine Standardreihe mit DNA mit bekannter Basenpaarlänge auf das Gel mit aufzutragen (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas). So kann einerseits die Basenpaarlänge der Produkte abgeschätzt werden und somit überprüft werden, ob auch die gewünschten Produkte amplifiziert wurden, oder ob sich weitere unspezifische PCR-Produkte gebildet haben. Andererseits kann über die relative optische Intensität der Fluoreszenz der Produktbanden im Vergleich zur Intensität der Banden im GeneRuler™ die Endmenge der einzelnen DNA-Produkte abgeschätzt werden (semiquantitativ). Abbildung 4 zeigt die Aufnahme eines Agarosegels nach der Elektrophorese mit verschiedenen zu testenden Housekeepinggenen (Referenzgenen).



*Abbildung 4: Aufnahme eines Agarosegels nach der Elektrophorese mit einer Gammakamera. Rechts und links an den Rändern sind die Referenzbanden des GeneRuler™ zu erkennen. Die Banden sind jeweils in 100 Basenpaar-Schritte unterteilt, wobei die oberste 1000bp, und die unterste 100bp lang sind.*

Nur sehr eingeschränkt ist jedoch die quantitative Bestimmung der Endmenge der DNA-Produkte möglich, da dem Auflösungsvermögen der relativen Fluoreszenzintensitäten durch die Gammakamera enge technische Grenzen gesetzt sind. Hier liegen die Stärken der real-time PCR.

### 3.2.4.6 (Real-time) quantitative PCR

#### 3.2.4.6.1 Grundlagen

Das Prinzip der real-time quantitativen PCR unterscheidet sich, was die Replikation betrifft kaum von der qualitativen PCR. Der Hauptunterschied liegt in der Ergebnisauswertung, die aus einer kontinuierlichen („real-time“) Erfassung der PCR-Produktmenge nach jedem Zyklus, und deren Verlaufsbeobachtung besteht. Es werden somit die tatsächlichen Verlaufskurven der Produktmengen aufgezeichnet, deren Ablauf im Anschluss mathematisch auf die Verlaufsentwicklung analysiert werden kann. Diese Analyse lässt dann auf die vor Beginn der Replikation in der Probe vorliegende Ausgangsmenge der gesuchten Genabschnitte zurückschließen.

Im beschriebenen Versuch erfolgte der Nachweis nach jedem einzelnen Zyklus mittels direkter Fluoreszenzmessung. Der Fluoreszenzmarker SYBRGreen I® interkaliert in doppelsträngige DNA, und seine Fluoreszenzintensität ist proportional abhängig von der in Lösung befindlichen DNA-Konzentration. Es liegt somit eine lineare Beziehung zwischen der DNA-Produktmenge und der Fluoreszenzintensität vor, wodurch die Entwicklung der Produktmenge beobachtet werden kann.

Wie auch bei der qualitativen PCR wird die Spezifität für einen bestimmten Genabschnitt lediglich durch die selektive Amplifikation gegeben, da der Fluoreszenzfarbstoff in alle DNA-Produkte interkaliert.

Um die Spezifität der Ergebnisse zu erhöhen, wird im Anschluss an die letzte Replikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Da jedes DNA-Produkt, abhängig von Produktlänge und Basenpaarzusammensetzung, eine unterschiedliche Schmelztemperatur besitzt, ist es möglich, die nach der Replikation in Lösung vorliegenden Produkte über ihren Schmelzkurvenverlauf zu unterscheiden, und so die Qualität der quantitativen Auswertung zu beurteilen. (Genauere Erläuterung siehe: 3.2.4.6.3 Auswertung)

#### 3.2.4.6.2 Durchführung

Die qPCR wurde mit dem Roche LightCycler480®, Softwareversion 1.5, durchgeführt. Das PCR-Reaktionsgemisch wurde nach dem Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix-Protokoll [68] von ThermoScientific zusammengestellt. Für alle Proben wurden 96-Proben-Platten von Roche® verwendet, welche mit insgesamt 12,5 µl Reaktionsgemisch gefüllt wurden. Die Reduktion von der für die Proben vorgesehenen Menge von 25 µl auf 12,5 µl Reaktionsgemisch hat sich in vergleichenden Versuchen als nicht ergebnisrelevant erwiesen.

Zur Vorbereitung wurde ein Mastermix erstellt. Dieser bestand aus folgenden Komponenten:

- Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix (Vol.-Anteil: 50%)
- Forward Primer 3,3µM (Vol.-Anteil 4%)
- Reverse Primer 3,3µM (Vol.-Anteil 4%)
- PCR-geeignetes Wasser (Vol.-Anteil 38%)
- cDNA-Template 2µg (Vol.-Anteil 4%)

Gesamtvolumen je Probe: 12,5µl Reaktionsgemisch

Alle Komponenten lagen bei der Vorbereitung auf Eis, die ungekühlte Verweildauer wurde möglichst kurz gehalten. Der Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix von ThermoScientific enthält die Thermo-Start™ DNA Polymerase, das für die Replikation essenzielle MgCl<sub>2</sub> (3µM) in Lösung, Nukleotidtriphosphate(dNTPs) – wobei Uracil mit Thymin aufgrund der besseren Ergebnisqualität [68] – ersetzt ist, sowie SYBR® Green I als in die DNA interkalierenden Fluoreszenzmarker.

Die Thermo-Start™ DNA-Polymerase benötigt zur Funktionsfähigkeit einen Aktivierungsschritt vor Beginn der Replikationszyklen von 15 min bei 95°C. Dieser wird somit jeder Versuchsreihe vorangestellt.

Die Primerkonzentration von 3,3 µM für alle Primer wurde durch mehrere vergleichende Versuche bei bekannter cDNA-Konzentration als optimale Konzentration ermittelt, indem ein Kompromiss zwischen möglichst geringen Falschprodukten wie Primer-Dimeren (sichtbar in der Schmelzkurvenanalyse), bei gleichzeitig akzeptabel spätem Produktanstiegszyklus (C<sub>p</sub>) eingegangen wurde.

Nach Vorlage von 11,5µl des Mastermixes in die entsprechenden Wells, wurde durch die Zugabe von 1 µl cDNA der zu untersuchenden Niere das Reaktionsgemisch komplettiert. Dabei wurden die Primer für die zu untersuchende Zielgenesequenz und dazu als interne Referenz die Genesequenz für  $\beta$ -Aktin, an jeweils zwei Tieren für jede Behandlung, pro Versuchsdurchlauf gemeinsam auf einer Reaktionsplatte repliziert.

Pro Nierenprobe wurden für jede gesuchte Zielgenesequenz und die Referenzgenesequenz jeweils Triplets erstellt und deren Cp-Werte gemittelt.

Als Negativkontrolle wurde bei jeder Niere ein weiteres Reaktionsgemisch ohne DNA-Template angelegt, um eventuelle bis dahin entstandene Kontamination aufzudecken.

Von optimalen Replikationsbedingungen ausgehend, und auf die verschiedenen Primer optimiert, wurde folgendes Temperatur-Zyklus-Schema programmiert: (Beispiel mit 20 Replikationszyklen, siehe Abbildung 5)

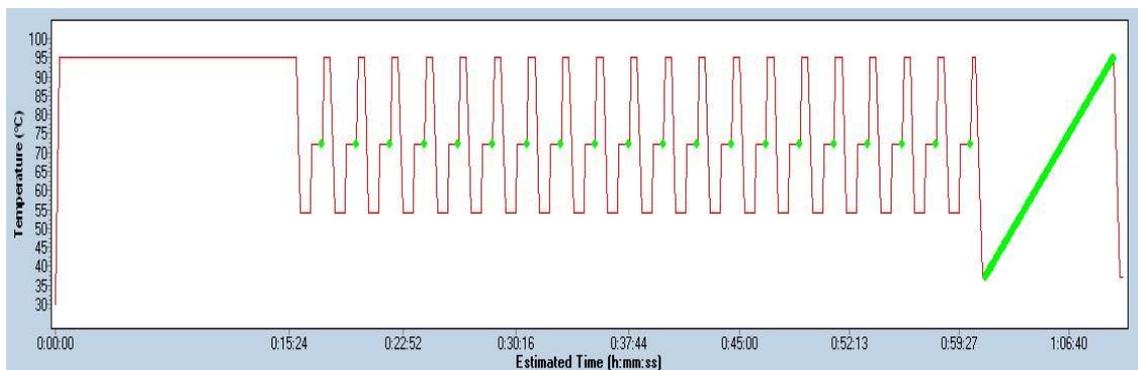


Abbildung 5: Temperatur-Zyklus-Schema der PCR. Beispiel mit 20 Zyklen. Der Temperaturverlauf ist rot dargestellt. Die jeweiligen Messpunkte sind grün. Initial sind 15 min bei 95°C für die Aktivierung der Polymerase notwendig, danach erfolgt das Annealing bei 54°C und die Replikation bei 72°C für jeweils 30 sec. Im direkten Anschluss folgt die Fluoreszenzmessung (grüner Punkt). Zum Schluss wird unter kontinuierlicher Temperaturerhöhung und ständiger Fluoreszenzmessung über 15 min der Schmelzkurvenverlauf generiert.

Dabei wurden die Temperatureinstellung, die Fluoreszenzmessung und die Datenspeicherung von der Software automatisch durchgeführt.

### 3.2.4.6.3 Auswertung

Bevor die quantitative Analyse durchgeführt werden kann, müssen die entstandenen DNA-Produkte qualitativ bewertet werden, um zum Beispiel die Bildung von Primer-Dimeren oder irregulär gebildete Nukleotidsequenzen als Fehlerquelle auszuschließen. Dafür wurde im Anschluss an die Replikation die bereits erwähnte Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Hierfür wurde nach dem letzten Replikationszyklus das Reaktionsgemisch erst auf 37°C abgekühlt, um möglichst alle komplementären Replikationsprodukte zusammen zu lagern. Danach wurde, unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung, die Temperatur über 15 Minuten linear bis auf 95°C erhöht. Die Fluoreszenz sinkt dabei typischerweise langsam weitgehend linear ab, um dann, beim Erreichen der Schmelztemperatur  $T_m$  eines Produktes, recht rasch abzufallen.

Da die DNA-Produkte abhängig von ihrer Länge und Zusammensetzung bei verschiedener Schmelztemperatur dissoziieren, lässt sich über den Schmelzkurvenverlauf zeigen, ob ein, oder mehrere verschiedene DNA-Produkte entstanden sind. Außerdem lässt sich aus der Position des steilsten Fluoreszenzabfalls die spezifische Schmelztemperatur  $T_m$ , und somit näherungsweise die Produktlänge abschätzen (siehe Abbildung 6).

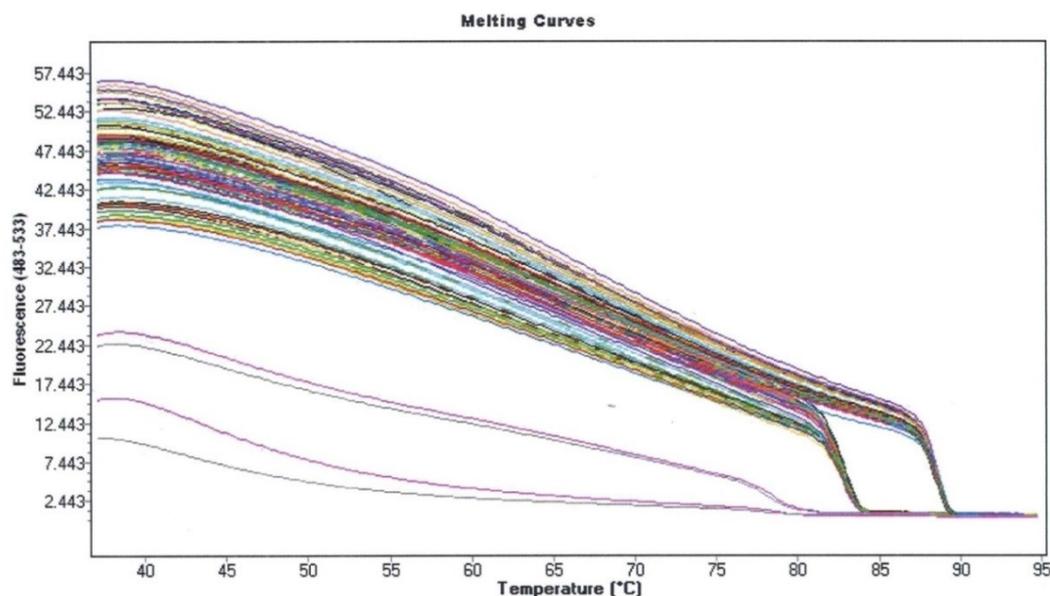


Abbildung 6: Beispiel eines Schmelzkurvenverlaufs von jeweils 13 Produkten der NGAL- und der  $\beta$ -Aktin-Sequenz, sowie vier Negativkontrollen. Blot mit Roche LightCycler® 480 Software erstellt.

Die exakte Bestimmung der jeweiligen Schmelztemperaturen  $T_{m,x}$  erfolgt durch die Auftragung der Änderungsgeschwindigkeit der Fluoreszenz nach der Temperatur ( $d/dT$ ), dargestellt in Abbildung 7. Sie ist dabei definiert als die Temperatur, bei der 50% der gesuchten DNA dissoziiert sind.

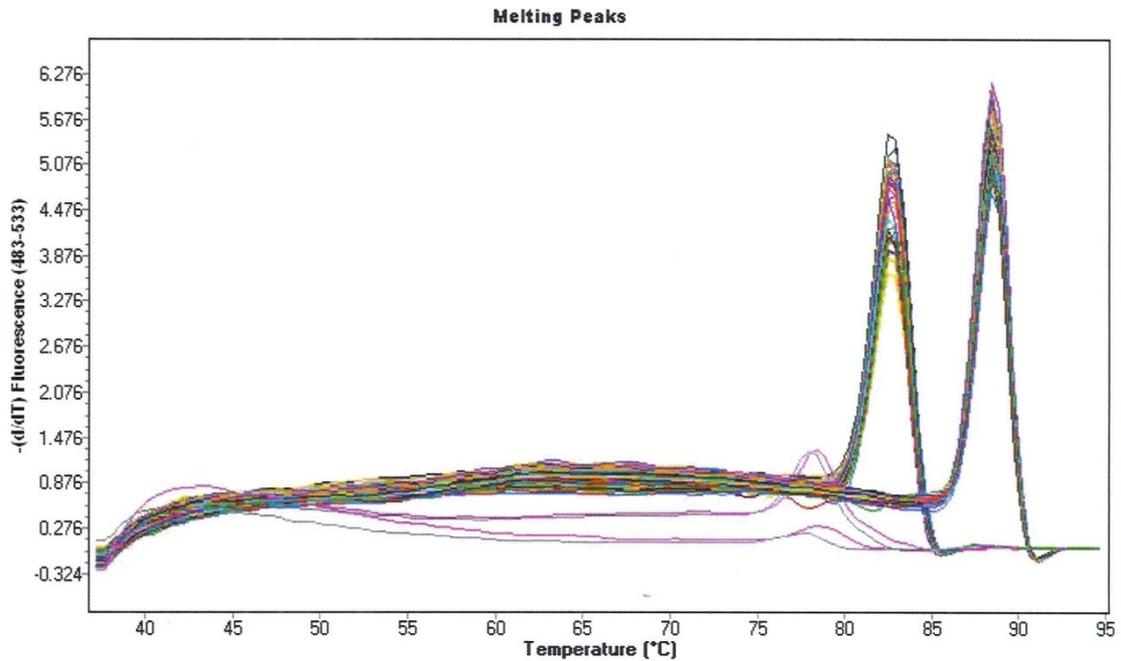


Abbildung 7: Ableitung ( $d/dT$ ) der Schmelzkurve aus Abbildung 6 nach der Temperatur. Die verschiedenen Maxima der Schmelzkurve für die Genomsequenzen von NGAL und  $\beta$ -Aktin bei ca.  $83^{\circ}\text{C}$  und  $88^{\circ}\text{C}$  sind gut zu erkennen.

Die geringen Maxima der Negativkontrollen sind durch die Bildung von Dimeren und Ketten aus Primern, welche sich bei vielen Zyklen und in Abwesenheit von DNA immer zu einem gewissen Anteil bilden, zu erklären. Sie haben in dem geringen Ausmaß, wie es im Beispiel zu erkennen ist, aufgrund ihrer relativen Konstanz über die Versuche hinweg, nur sehr geringe Auswirkungen auf das Ergebnis.

Mit der dadurch gewonnenen Gewissheit über die DNA-Produkte lässt sich die quantitative Auswertung durchführen.

Das Prinzip der quantitativen Analyse am Real-Time-PCR-Gerät beruht auf der vergleichenden Betrachtung der Fluoreszenzanstiege. So ist ein Anstieg in einem frühen Zyklus, bei sonst identischem Probeninhalt, gleichbedeutend mit einem höheren Template-Ausgangsgehalt als ein Anstieg in einem späten Zyklus. Da zu

Beginn der Amplifikation von einer Verdopplung des DNA-Gehalts in jedem Zyklus ausgegangen werden kann, lässt sich über den Anstiegszyklus auf die relative Anzahl an Zielgenen in der cDNA der verschiedenen Proben rückschließen. Im Idealfall folgt die Replikation zu Beginn der Formel:

$$N_x = N_0 * E^x$$

(Formel 1)

(Wobei  $N_x$  die Zielgensequenzmenge zum Zyklus  $x$ ,  $N_0$  die Zielgensequenz-Ausgangsmenge,  $x$  die Anzahl der Zyklen und  $E$  die Effizienz ist) [69]

Für eine jeweils um den Faktor 10 verdünnte cDNA Probenreihe mit 5 Proben ergibt sich dann beispielhaft das Bild in Abbildung 8. Durch die Umstellung der obigen Formel folgt daraus dann bei einer angenommenen idealen Effizienz  $E = 2$  (siehe unten) ein mittlerer Abstand von  $n = \frac{1}{\log(2)} \approx 3,319$  Zyklen für die Verzehnfachung der replizierten Sequenz.

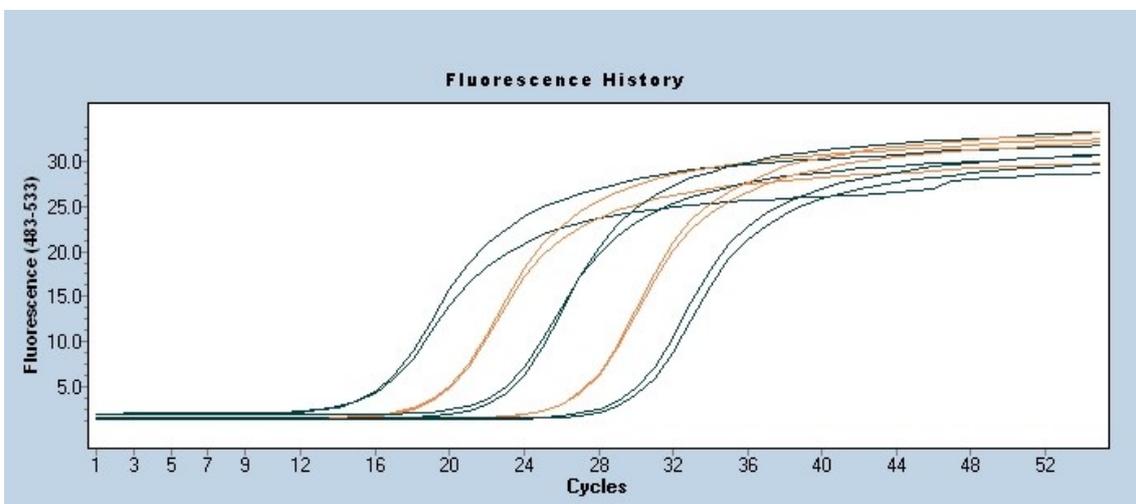


Abbildung 8: Beispiel einer cDNA Verdünnungsreihe mit  $\beta$ -Aktin als Zielgen im Verhältnis 1:1; 1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000. Die Reihe beginnt links mit 1:1. Die Fluoreszenzentwicklung nach der exponentiellen Phase bleibt für Verhältnisberechnungen irrelevant.

Dabei wurden die Konzentrationen der jeweiligen Zielsequenzen (NGAL, KIM-1, OPN und TN-C, in diesem Zusammenhang „Target“ genannt, allgemein

„Amplifikate“) nicht direkt zwischen behandelten und unbehandelten Nieren verglichen, sondern sie wurden mit einem „Housekeeping“ Gen, (hier „Reference“ genannt, in diesem Fall  $\beta$ -Aktin, siehe auch Abschnitt 3.2.4.4), das möglichst ubiquitär und unabhängig von Behandlungen exprimiert wird, in Relation gesetzt, und erst dieser sich ergebende Quotient der verschiedenen Proben, verglichen („Normalisierung“):

$$\text{normalisiertes Verhältnis} = \frac{\text{Konz.}(target,behandelt)}{\text{Konz.}(reference,behandelt)} \div \frac{\text{Konz.}(target,unbehandelt)}{\text{Konz.}(reference,unbehandelt)}$$

(Formel 2) [69]

Durch das Einfügen eines Referenzgens und der Bildung des Quotienten zu einer Probe eines unbehandelten Tieres wird es einerseits überflüssig, die vorliegenden absoluten Konzentrationen zu kennen, andererseits werden eine Reihe von Fehlerquellen eliminiert, wie z.B. unterschiedliche Ausgangsmengen an cDNA, mögliche Degradierung der RNA noch vor der Transkription, Unterschiede in der Probenqualität, Unterschiede bei der cDNA-Synthese.

Durch den Quotienten nicht eliminiert bleibt jedoch die Effizienz E [70]. Sie hat, je nach Stärke der Abweichung vom Idealwert 2, einen mehr oder minder großen Einfluss auf die Verhältnisberechnung. Der Einfluss ist bei geringen Abweichungen vom Wert 2 sehr klein bis vernachlässigbar, steigt jedoch bei größeren Abweichungen stark an [70, 71][siehe außerdem Formel (1)]. Sie muss daher für jede Zielsequenz individuell berechnet werden. Die sehr anschauliche Berechnung der Effizienz E mittels einer Standardreihe mit mindestens drei Verdünnungen um jeweils eine Zehnerpotenz, wie oben beschrieben, ist inzwischen von einer genaueren Methode abgelöst worden [70].

Nach Ramakers et al. [72] lässt sich die Effizienz aus der mittleren Steigung der Fluoreszenzkurve in der exponentiellen Phase berechnen. Diese wird durch den ersten Anstieg über die Hintergrundfluoreszenz „baseline“ und dem Maximum der zweiten Ableitung, welche auch den Cp-Wert darstellt (siehe unten), eingegrenzt. Aus der mittleren Kurvensteigung der Fluoreszenz lässt sich auf die mittlere Effizienz in der exponentiellen Phase der Replikation zurückrechnen (siehe Abbildung 9).

Zur Berechnung: Durch Logarithmieren der Formel (1) erhält man

$$\log N_x = \log N_0 + x * \log E$$

Nach dem Replikationszyklus  $x$  aufgelöst ergibt sich die Form

$$x = -\left(\frac{1}{\log E}\right) * \log N_0 + \frac{\log N_x}{\log E}$$

Der Replikationszyklus  $x$  ist somit eine lineare Funktion der Steigung

$$m = \frac{1}{\log E}$$

und, umgestellt, die Effizienz  $E$  somit über  $E = 10^{1/m}$  berechenbar [70]. Die Steigung  $m$  lässt sich graphisch durch die Bildung einer Tangente an die Fluoreszenzkurve auslesen (siehe Abbildung 9).

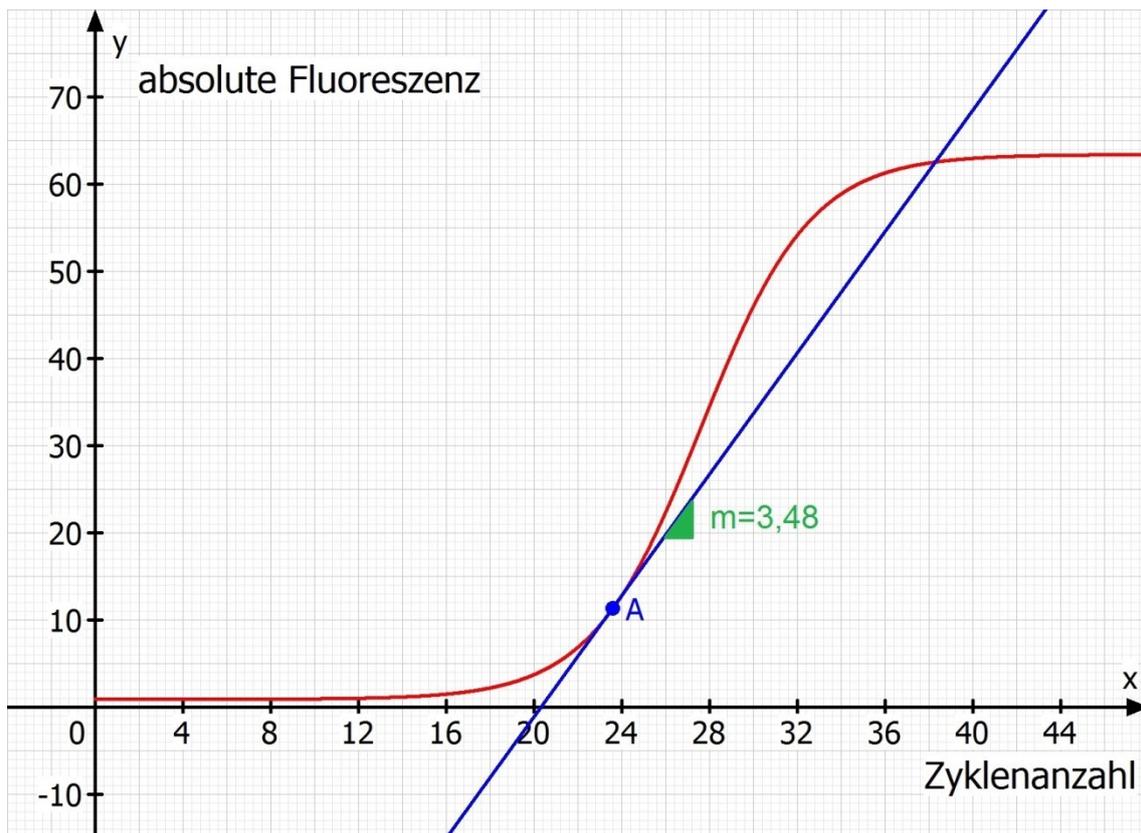


Abbildung 9: Beispielhafte Tangente (blau) an den Fluoreszenzverlauf durch den Punkt A mit der Steigung  $m= 3,48$ . Die Effizienz im Punkt A wäre hier nach  $E=10^{(1/m)} = 1,94$ . Zeichnung mit Mathegrafix® erstellt.

Die Mittelung der verschiedenen Werte für die Steigung  $m$  von vielen Tangenten im Bereich zwischen der Baseline und dem Maximum der 2. Ableitung der Fluoreszenzverlaufskurve ergibt dann die gesuchte mittlere Effizienz  $E$ .

Diese Effizienz  $E$  ist dabei maßgeblich von der Wahl der zu replizierenden Ziel- oder Referenzsequenz (durch die Primer definiert) abhängig, nicht jedoch z.B. von der cDNA-Ausgangsmenge oder von dem später berechneten  $C_p$ -Wert. [70]

Diese Methode ist deutlich weniger fehleranfällig als die Berechnung über eine Standardreihe, die z.B. durch Pipettierungenauigkeiten eine größere Streuung der Effizienzen bedingt. Außerdem werden probenspezifische Inhibitoren der PCR (z.B. Verunreinigungen mit genomischer DNA, Protein oder anderem organischen Material aus dem Aufreinigungsprozess wie z.B. Phenol) welche die Effizienz negativ beeinflussen, direkt in die Berechnung der Effizienz miteinbezogen. Die Methode der mittleren Steigung liefert deshalb nachgewiesenermaßen besser reproduzierbare Daten [70, 73]. Die Berechnung wurde mit dem Programm LinRegPCR [72, 74] durchgeführt.

Ein weiteres Problem stellt die exakte Festlegung des Anstiegszyklus ( $C_p$  – für crossing point) dar. Wurde in älteren Arbeiten noch ein Fluoreszenzschwellenwert (threshold) festgelegt, der überschritten werden musste (hier nicht dargestellt) [75, 76], oder als Weiterentwicklung der Methode, der Schnittpunkt der Tangente an der steilsten Verlauf der Kurve, mit dem Niveau der Hintergrundfluoreszenz, als  $C_p$  festgelegt, (Fit point-Methode, Abbildung 10) [76], so wird inzwischen häufiger, und so auch in dieser Arbeit, eine andere Definition für den Anstiegszyklus ( $C_p$ ) zugrunde gelegt: das Maximum der 2. Ableitung der Anstiegskurve („second derivative maximum“, Abbildung 11) [69, 73].

Diese Methode ist der Fit point-Methode insofern überlegen, als dass das Maximum der zweiten Ableitung nicht von einem festgelegten Fluoreszenzschwellenwert abhängt, sondern da liegt, wo der Kurvenverlauf am ehesten der Exponentialfunktion  $N_x = N_0 * E^x$ , und somit (idealerweise) der Verdopplung der DNA zu jedem Zyklus  $x$ , folgt. So bleiben störende Faktoren wie ungleiche oder über den Versuchsverlauf inkonstante Ausgangs- und/oder Hintergrundfluoreszenzen ohne Einfluss und die manuelle Abschätzung der

Hintergrundfluoreszenz, des Signal-Rausch-Verhältnisses und des Beginns der exponentiellen Phase, welche für die Berechnung der Fit points nötig ist, entfällt. Außerdem kann der Vorgang automatisiert durchgeführt werden [73, 77].

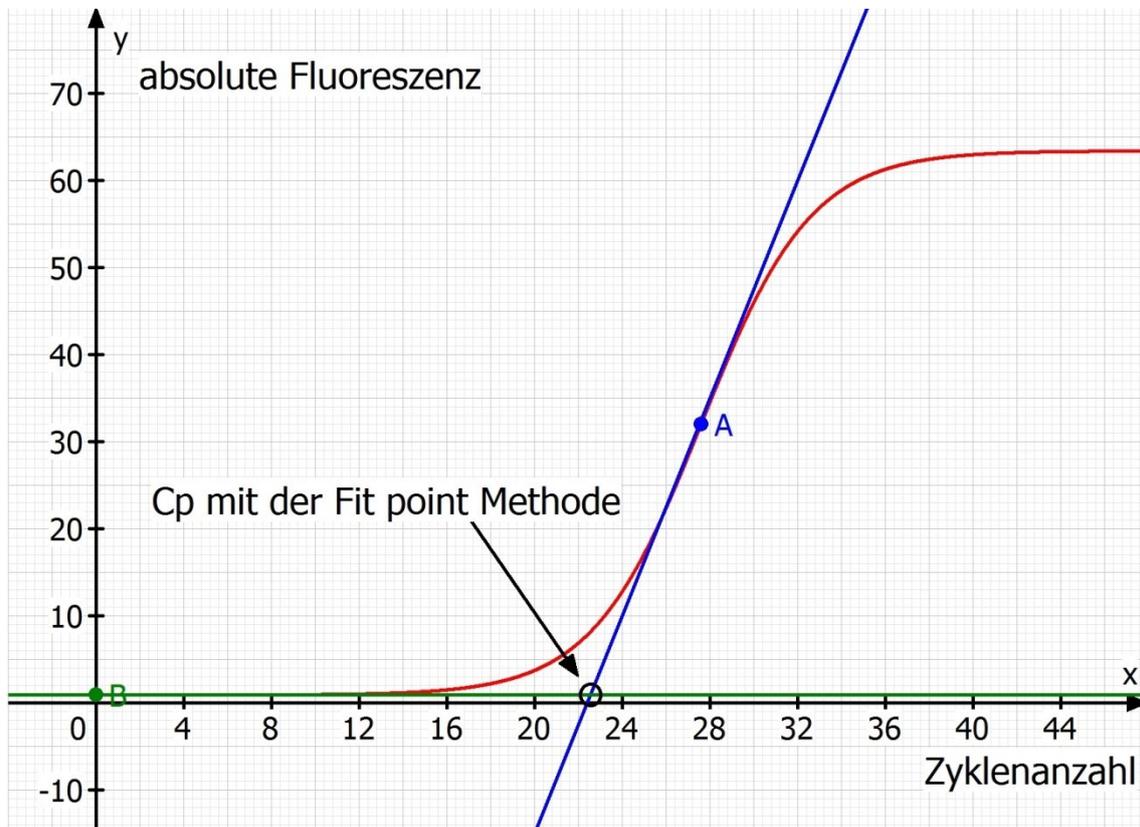


Abbildung 10: Ermittlung des Crossing points  $C_p$  mit der (alten) Fit point Methode. Schrittpunkt der blauen Tangente an die Wendestelle der Fluoreszenzkurve im Punkt A mit der grünen threshold-Linie. Zeichnung mit Mathegrafix® erstellt.

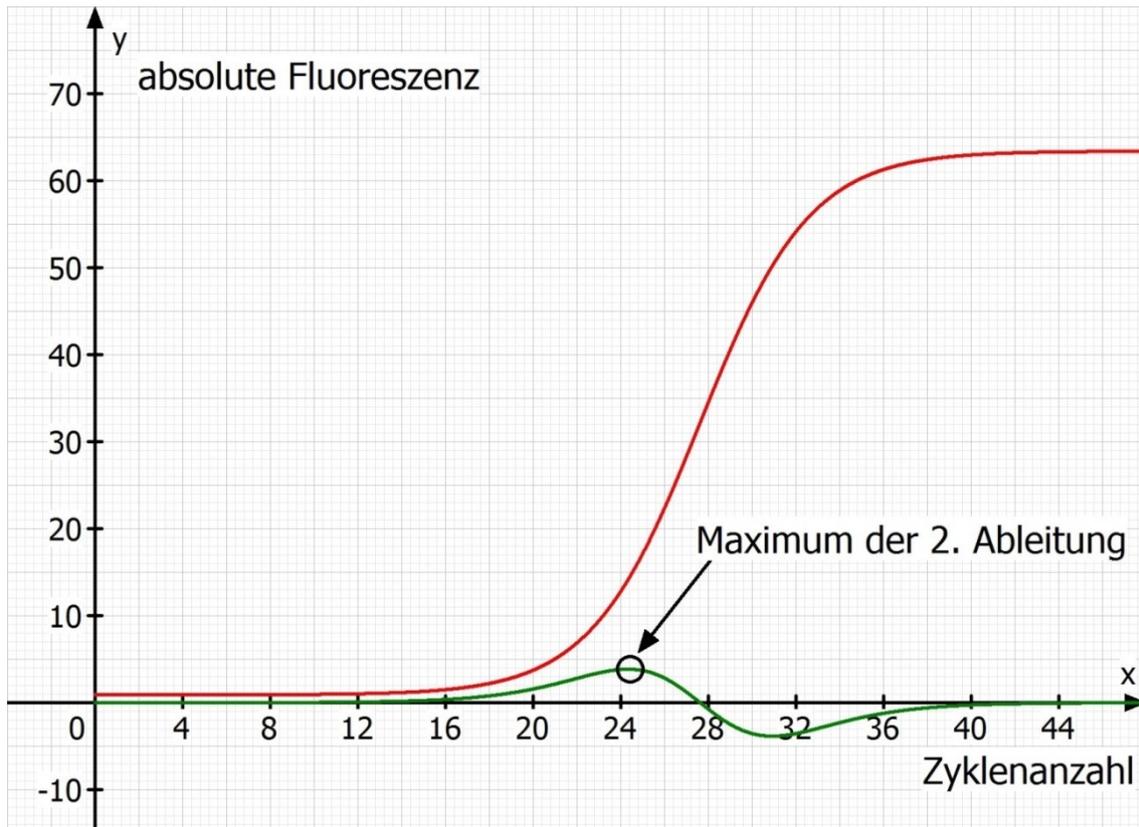


Abbildung 11: Bestimmung des Crossing point (Cp) mit der Methode „second derivative maximum“. Der Cp-Wert ist die Zyklusanzahl am Maximalwert der zweiten Ableitung des Fluoreszenzverlaufs. Grün: 2. Ableitung (zur besseren Darstellung in y-Richtung vierfach überzeichnet) der Fluoreszenzkurve (rot). Zeichnung mit Mathegrafix® erstellt.

Es ergibt sich somit aus den beiden oben genannten Formeln (1) und (2) die folgende Gesamtformel zur Berechnung der relativen Expression aus den Cp-Werten, wobei für die Effizienz E für jede Gensequenz der mit LinRegPCR errechnete Wert eingesetzt wurde:

$$\text{normalisiertes Verhältnis } R = \frac{E^{Cp(\text{target,behandelt})}}{E^{Cp(\text{reference,behandelt})}} \div \frac{E^{Cp(\text{target,unbehandelt})}}{E^{Cp(\text{reference,unbehandelt})}}$$

Das normalisierte Verhältnis R ist, wie oben beschrieben, durch die Bildung des Quotienten zum Referenzgen unabhängig von Variationen der cDNA-Ausgangsmenge oder der RNA-Ausgangsqualität der verschiedenen Proben.

Es ermöglicht als Ergebnis somit einen direkten Vergleich der Expression der mRNA-Vorstufen der vier untersuchten Schädigungsmarker KIM-1, NGAL, OPN und TN-C im Nierengewebe der Ratten.

Mindestens eine Negativkontrolle ohne cDNA wurde jedem Versuchsdurchlauf beigelegt, um versehentliche Kontamination des Mastermixes mit fremdem genetischem Material auszuschließen. Als Positivkontrolle diente die mit Cisplatin intraperitoneal und 2 Tage präfinal behandelte Gruppe 6 der Tiere.

Die Akquirierung der Rohdaten erfolgte durch die LightCycler® 480 Software. Ausgegeben wurde eine Tabelle mit den Fluoreszenzmesspunkten zu den jeweiligen Zyklen. Daraus wurden die Effizienzen mit LinRegPCR, Ver. 2015 [74] berechnet. Das Verhältnis Target/Reference und das normalisierte Verhältnis konnten daraufhin mit REST® 2009 von Pfaffl et al. [76] berechnet werden. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft® Excel 2010 (Microsoft Corporation).

#### 3.2.4.6.4 Statistische Auswertung

Die Effizienz wurde für jede Probe einzeln berechnet. Zur weiteren Berechnung wurden die Effizienzwerte für die jeweiligen Gruppen von Ziel- und Referenzsequenzen (ACTB, Kim-1, NGAL, OPN und TN-C) gemittelt, die Standardabweichung und der Standardfehler der Mittelwerte ermittelt.

Der statistische Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der Effizienzen innerhalb einer einzelnen Gruppe eines Amplifikats (Zielsequenz oder Referenzsequenz) ist so gering (siehe 4.1 Ergebnisse Effizienz), dass sie für die darauf folgenden weiteren Berechnungen vernachlässigt werden kann, und mit dem arithmetischen Mittel als Wert für die Effizienz im Allgemeinen gute Ergebnisse erzielt werden (empfohlene Vorgehensweise nach Karlen et al. 2007 [70]).

Von allen Geweben wurden, wie bereits erwähnt, 3 technische Replikate erstellt. Deren Cp-Werte wurden gemittelt und daraufhin mit der bereits berechneten Effizienz für jede Probe jeweils das normalisierte Verhältnis berechnet. Die daraus erhaltenen Werte wurden dann in Gruppen zum Vergleich der Kontrolltiere mit

den behandelten Tieren herangezogen und die Verteilung statistisch analysiert (empfohlene Vorgehensweise nach Schmittgen et al. 2008 [78])

Da für die Verteilung der normalisierten Verhältnisse („*ratio*“) keine Gauss'sche Normalverteilung vorausgesetzt werden kann [76, 79], genügt es nicht, einen herkömmlichen parametrischen Test wie z.B. den doppelten *t*-Test oder den F-Test anzuwenden um einen eventuell statistisch signifikanten Unterschied oder das 95% Konfidenzintervall einer Gruppe behandelter Tiere (mit Aldosteron, Ald/Spironolakton, Ald/Hydralazin, Ald/Tempol und Cisplatin) im Vergleich zur Kontrollgruppe festzustellen. Diese Tests gehen von einer Normalverteilung oder zumindest von einer bekannten Verteilung aus und haben zudem gleiche Standardabweichungen in den zu vergleichenden Gruppen zur Voraussetzung [80].

Es wurde deshalb in diesem Fall ein Randomisierungs- oder Permutationstest als nicht-parametrischer Test angewandt. Dieser läuft nach dem Prinzip der Stichprobenwiederholung („*resampling*“) ab und hat als einzige Voraussetzung die Unabhängigkeit der Stichprobendaten voneinander, was hier auch der Fall ist.

Über eine genügend hohe Wiederholung der Randomisierung der Daten („*iterations*“, für jede Berechnung wurden hier durch die Software (siehe unten) 10000 Wiederholungen durchgeführt) und den Vergleich der Grundgesamtheit der bei jeder Wiederholung durchgeführten statistischen Tests mit einem statistischen Test der Stichprobe, kann eine Aussage über das Signifikanzniveau und das 95% Konfidenzintervall auch bei nicht normalverteilten Daten getroffen werden [76]. Dieses Verfahren wird als Randomisierungstest („*randomization test*“, als ein Unterverfahren des „*resampling*“ bzw. der Stichprobenwiederholung) bezeichnet und ähnelt dem etwas bekannteren Verfahren des „*bootstrapping*“ für nicht normal verteilte Daten [81].

Hierauf basiert der hier angewandte Test, der von Pfaffl et al. Entwickelt und programmiert wurde („Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test®“ [76]). Die Berechnung wurde mit REST® 2009 (auch Pfaffl et al.) durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p \leq 0,05$  festgelegt.

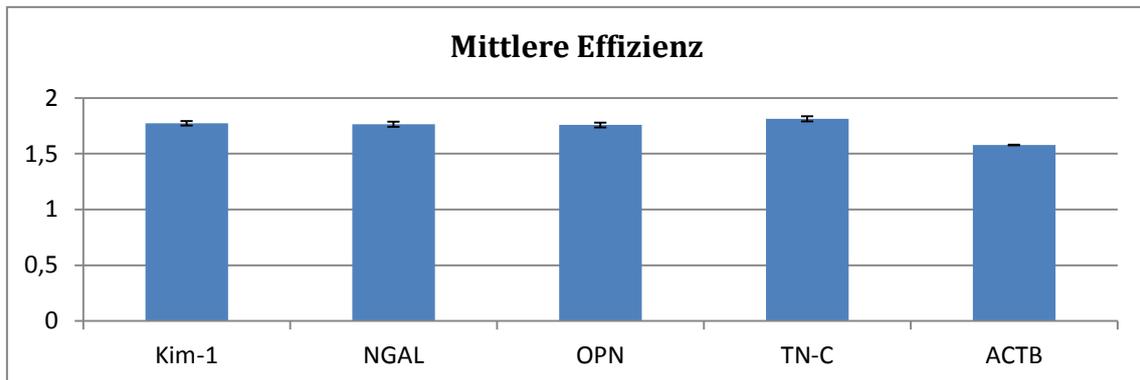
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Effizienz

Die Berechnung der Effizienzen für die einzelnen Amplifikate aus der mittleren Steigung der Fluoreszenzkurve in der exponentiellen Phase (siehe oben) ergab folgende in Tabelle 7 und Abbildung 12 zusammengefassten Ergebnisse:

*Tabelle 7: Mit LinRegPCR ermittelte mittlere Effizienz mit der Standardabweichung und dem Standardfehler der Mittelwerte, für jedes Amplifikat gruppiert berechnet.*

	<b>N =</b>	<b>Mittlere Effizienz</b>	<b>Standardabweichung</b>	<b>Standardfehler der Mittelwerte</b>
Kim-1	83	1,773	0,021	0,002
NGAL	57	1,765	0,023	0,003
OPN	93	1,758	0,021	0,002
TN-C	64	1,812	0,023	0,003
ACTB	290	1,579	0,003	0,0001



*Abbildung 12: Graphische Darstellung der Effizienzen aus Tabelle 7 mit eingezeichneter Standardabweichung als Fehlerindikator.*

Der Unterschied in der Anzahl n der einzelnen Effizienzen für die ersten vier Amplifikate ist durch das Auslassen von Ausreißern (definiert durch Abweichung >5% vom Median) in der Effizienz begründet. Dieses Vorgehen zur Berechnung der mittleren Effizienz ist nach Rujiter et al. [74] notwendig, da ein guter Mittelwert wichtiger ist, als die Abbildung jeder einzelnen Effizienz im Mittelwert.

Auch unter Einbeziehung der Ausreißer zeigt sich eine sehr hohe Konstanz der Effizienzen über alle Versuche hinweg für die einzelnen Amplifikate (Daten nicht gezeigt).

## 4.2 Die Zielsequenzen

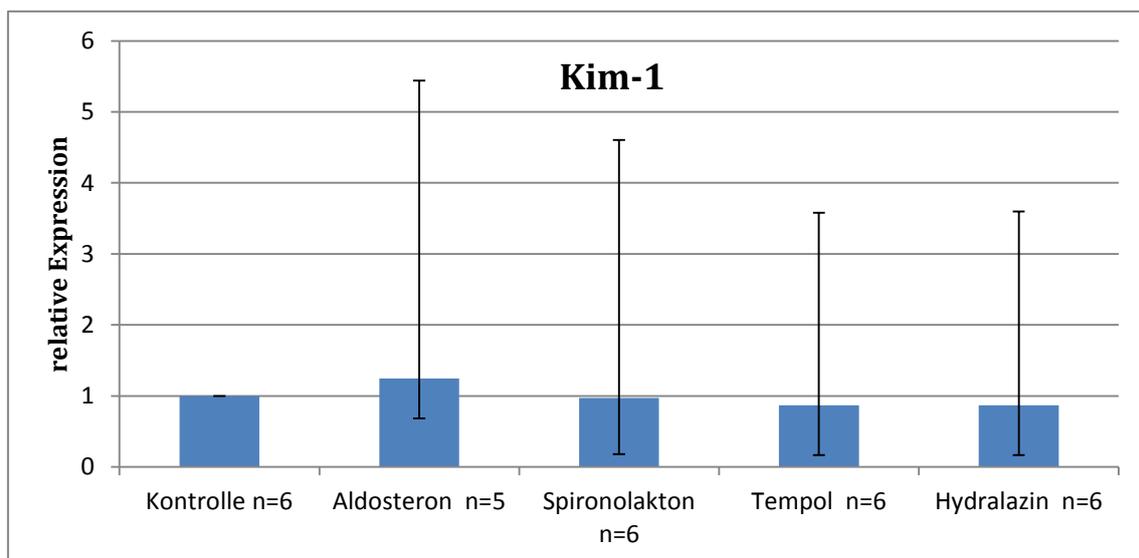
Die Auswertung der Versuche mittels der Roche LightCycler480® Software, Version 1.5, LinRegPCR Version 2015, REST® 2009 und Microsoft® Excel 2010 ergab die im Folgenden gezeigten Ergebnisse.

### 4.2.1 Kidney Injury Molecule 1 (Kim-1)

Für die relative Expression der mRNA des hoch sensiblen und spezifischen frühproximalen Tubuluszell-Schädigungsmarkers Kim-1 (Siehe 1.3.1.) ergaben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe die in Tabelle 8 und Abbildung 13 dargestellten Ergebnisse:

*Tabelle 8: Relative Expression von Kim-1 normalisiert auf die Kontrollgruppe (Expression der Kontrollgruppe = 1, SEM: Standardfehler der Mittelwerte, 95% K.I.: 95% Konfidenzintervall, P(H1): Wahrscheinlichkeit, trotz evtl. vorliegendem Nulleffekt fälschlicher Weise die Alternativhypothese anzunehmen.)*

Kidney injury molecule 1 (Kim-1)						
Behandlung	n=	Expression	SEM im Bereich	95% K.I.	P(H1)	Signifikanz
Kontrolle	6	1				
Aldosteron	5	1,246	0,685-5,439	0,143 – 8,557	0,782	-
Ald/Spiro	6	0,97	0,181-4,606	0,120 – 8,992	0,913	-
Ald/Tempol	6	0,869	0,168-3,577	0,119 – 8,749	0,727	-
Ald/Hydra	6	0,868	0,166-3,598	0,118 – 8,171	0,725	-



*Abbildung 13: Graphische Darstellung der relativen Expression von Kim-1 auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Fehlerindikatoren (schwarze Balken) geben den Bereich des Standardfehlers der Mittelwerte an.*

#### 4.2.2 Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)

Für die relative Expression der mRNA des Nierenschädigungsmarkers aus den proximalen Tubuluszellen, NGAL (Siehe 1.3.2.), ergaben sich im Vergleich zur Kontrollgruppe die in Tabelle 9 und Abbildung 14 dargestellten Ergebnisse:

Tabelle 9: Relative Expression von NGAL auf die Kontrollgruppe normalisiert (Expression der Kontrollgruppe = 1, SEM: Standardfehler der Mittelwerte, 95% K.I.: 95% Konfidenzintervall, P(H1): Wahrscheinlichkeit, trotz evtl. vorliegendem Nulleffekt fälschlicher Weise die Alternativhypothese anzunehmen.)

Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL)						
Behandlung	n=	Expression	SEM im Bereich	95% K.I.	P(H1)	Signifikanz
Kontrolle	6	1				
Aldosteron	6	0,482	0,122-1,618	0,054 - 7,147	0,266	-
Ald/Spiro	6	0,544	0,122-2,077	0,068 – 11,968	0,441	-
Ald/Tempol	6	0,857	0,134-5,046	0,060 – 11,525	0,769	-
Ald/Hydra	6	0,576	0,108-2,398	0,059 - 8,525	0,359	-

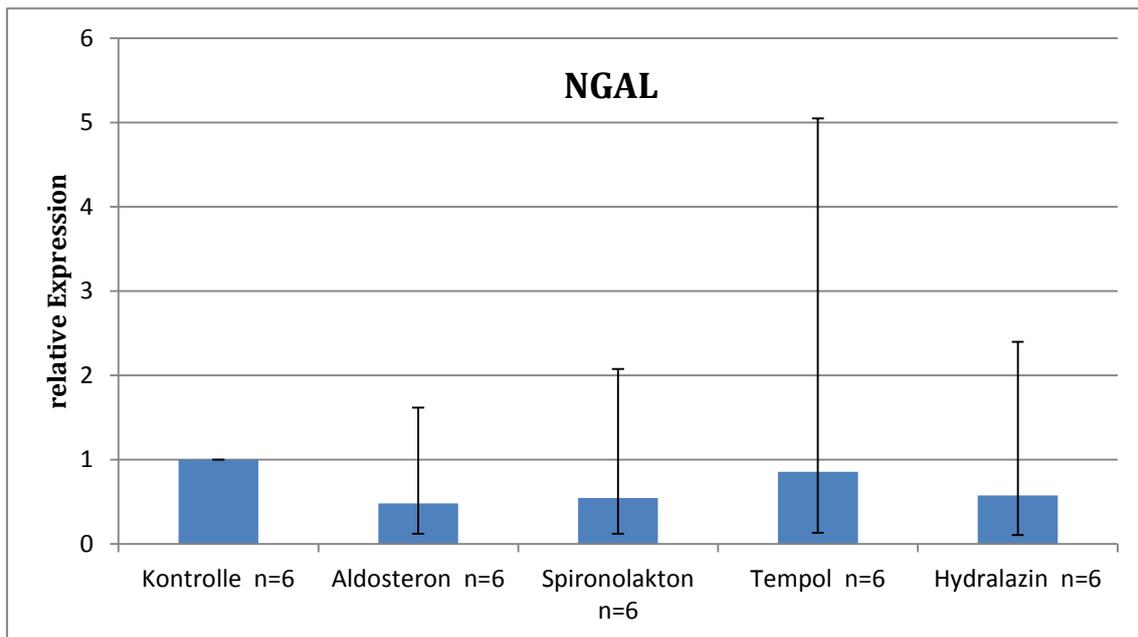


Abbildung 14: Graphische Darstellung der relativen Expression von NGAL auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Fehlerindikatoren (schwarze Balken) geben den Bereich des Standardfehlers der Mittelwerte an.

### 4.2.3 Osteopontin (OPN)

Für die relative Expression der mRNA des renalen Inflammations- und Fibrosemarkers Osteopontin (siehe 1.3.3.) im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich die in Tabelle 10 und Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse:

Tabelle 10: Relative Expression von Osteopontin auf die Kontrollgruppe normalisiert (Expression der Kontrollgruppe = 1, SEM: Standardfehler der Mittelwerte, 95% K.I.: 95% Konfidenzintervall, P(H1): Wahrscheinlichkeit, trotz evtl. vorliegendem Nulleffekt fälschlicher Weise die Alternativhypothese anzunehmen.)

Osteopontin (OPN)						
Behandlung	n=	Expression	SEM im Bereich	95% K.I.	P(H1)	Signifikanz
Kontrolle	6	1				
Aldosteron	6	1,362	0,971-1,784	0,808 – 2,150	0,045	+
Ald/Spiro	6	1,192	0,947-1,51	0,752 – 1,651	0,11	-
Ald/Tempol	6	1,087	0,787-1,428	0,641 – 1,717	0,511	-
Ald/Hydra	6	1,316	0,874-1,931	0,755 – 3,321	0,161	-

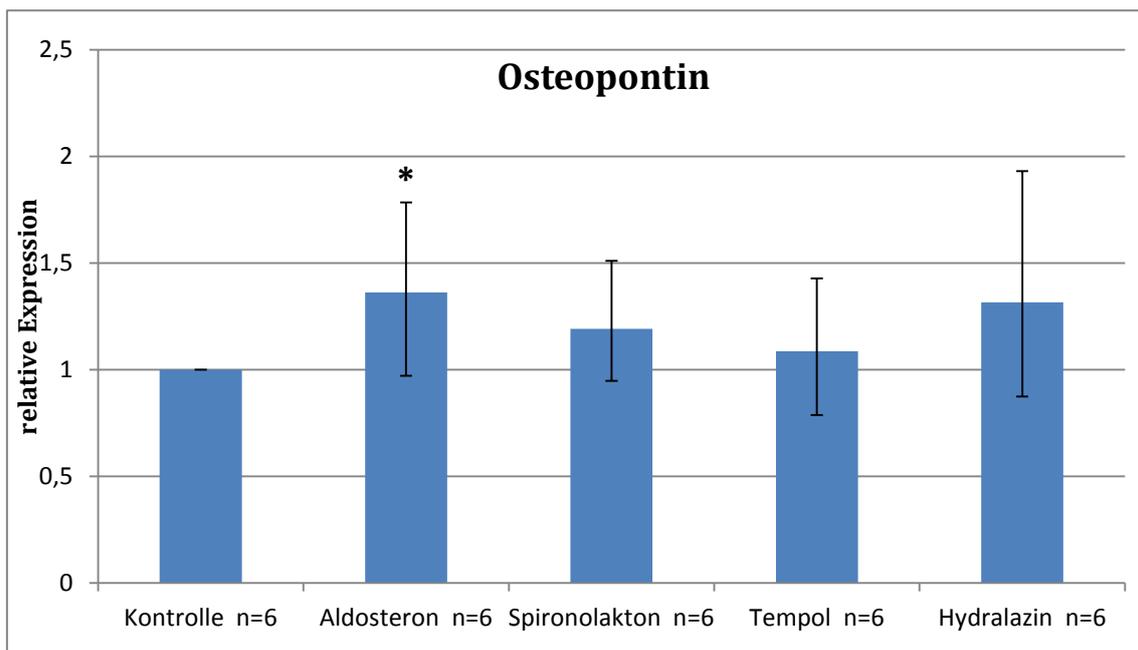


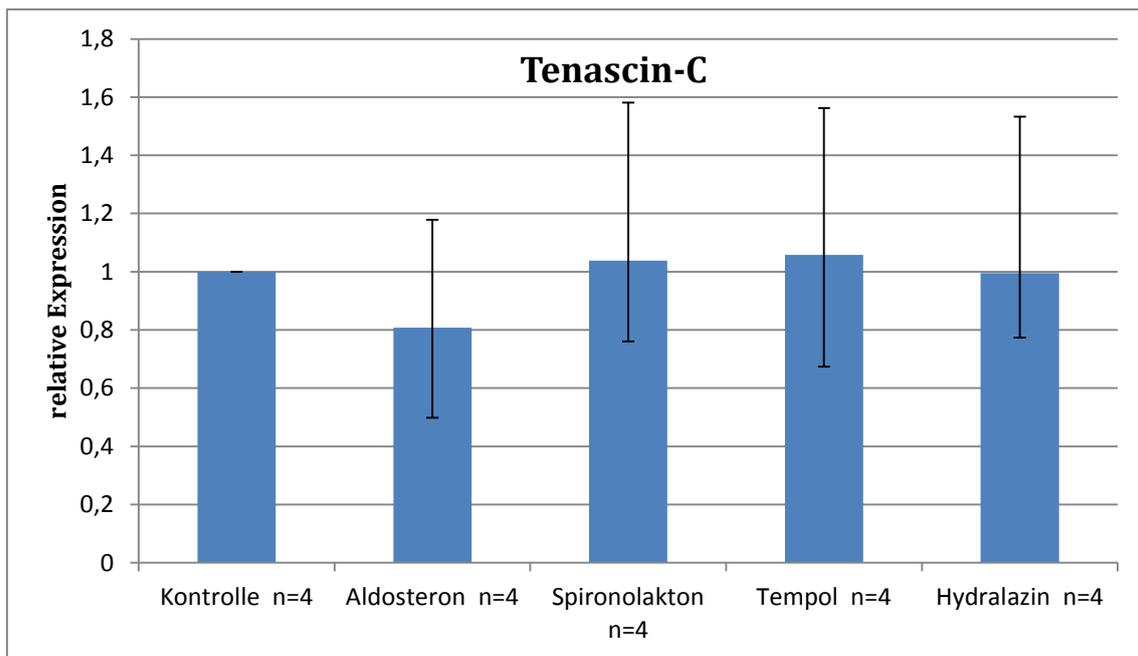
Abbildung 15: Graphische Darstellung der relativen Expression von Osteopontin auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Fehlerindikatoren (schwarze Balken) geben den Bereich des Standardfehler der Mittelwerte an. \*  $p \leq 0,05$  im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### 4.2.4 Tenascin-C (TN-C)

Für die relative Expression der mRNA des renalen Fibrose- und Gewebebaumarkers Tenascin-C (siehe 1.3.4.) im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich die in Tabelle 11 und Abbildung 16 dargestellten Ergebnisse:

*Tabelle 11: Relative Expression von Tenascin-C auf die Kontrollgruppe normalisiert (Expression der Kontrollgruppe = 1, SEM: Standardfehler der Mittelwerte, 95% K.I.: 95% Konfidenzintervall, P(H1): Wahrscheinlichkeit, trotz evtl. vorliegendem Nulleffekt fälschlicher Weise die Alternativhypothese anzunehmen.)*

Tenascin-C (TN-C)						
Behandlung	n=	Expression	SEM im Bereich	95% K.I.	P(H1)	Signifikanz
Kontrolle	4	1				
Aldosteron	4	0,808	0,498-1,178	0,413 – 2,170	0,47	-
Ald/Spiro	4	1,038	0,761-1,581	0,496 – 1,986	0,834	-
Ald/Tempol	4	1,058	0,674-1,562	0,610 – 2,170	0,792	-
Ald/Hydra	4	0,995	0,774-1,533	0,545 – 1,727	0,992	-



*Abbildung 16: Graphische Darstellung der relativen Expression von Tenascin-C auf die Kontrollgruppe normalisiert. Die Fehlerindikatoren (schwarze Balken) geben den Bereich des Standardfehlers der Mittelwerte an.*

Bei der Untersuchung auf Tenascin-C konnten im Gegensatz zu den anderen Amplifikaten Kim-1, NGAL und OPN aufgrund von technischem Datenverlust nur n=4 anstatt n=6 Tiere einbezogen werden.

### 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Signifikant verschieden von der Kontrollgruppe ( $P(H1) < 0,05$ ) ist in dem vorgestellten Versuch eine Gruppe: die Gruppe der mit Aldosteron behandelten Tiere, bei Betrachtung des Osteopontins (Tabelle 12).

*Tabelle 12: Darstellung der einzigen signifikant von der Kontrollgruppe verschieden exprimierten Gruppe, untersucht auf **Osteopontin**. (Expression der Kontrollgruppe = 1, SEM: Standardfehler der Mittelwerte, 95% K.I.: 95% Konfidenzintervall,  $P(H1)$ : Wahrscheinlichkeit, trotz evtl. vorliegendem Nulleffekt die Alternativhypothese anzunehmen.)*

Behandlung	n=	Expression	SEM im Bereich	95% K.I.	P(H1)
Aldosteron	6	1,362	0,971-1,784	0,808 – 2,150	0,045

Wie ursprünglich zu erwarten war (siehe 1.3.3.), ist Osteopontin in der Gruppe der mit Aldosteron behandelten Tiere signifikant höher exprimiert als in der Kontrolle. Der Effekt ist jedoch nicht sehr groß.

Die übrigen Ergebnisse bei der Betrachtung des Osteopontins, sowie die Ergebnisse der Betrachtungen von Kim-1, NGAL und Tenascin-C erreichen das Signifikanzniveau  $P(H1) < 0,05$  nicht, teilweise liegen sie sehr weit davon entfernt, bis hin zu  $P(H1) = 0,992$  in der Gruppe der mit auf Tenascin-C untersuchten und Hydralazin behandelten Tiere.

Die Ursache hierfür liegt in der breiten Streuung der Ergebnisse innerhalb einer Gruppe von behandelten Tieren, also der interindividuellen Streuung, kombiniert mit der Stichprobengröße, mit daraus resultierender hoher Standardabweichung, somit auch einem hohen Standardfehler der Mittelwerte und in der Folge einem breiten 95% Konfidenzintervall.

Abbildung 17 zeigt am Beispiel von NGAL die Streuung der Ergebnisse bei den einzelnen Tieren der mit Hydralazin behandelten Gruppe mit eingezeichnetem Standardfehler (SEM) der technischen Replikate. Zur Normalisierung wurde hier die einzelne Gewebeprobe N49K hinzugefügt.

Wichtig zu erwähnen ist hier, dass der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) der technischen Replikate, wie man in Abbildung 17 an den Fehlerindikatoren sieht, *nicht* der Ursprung für die hohe Varianz des Gesamtergebnisses ist. Diese beruht

vielmehr auf der Inhomogenität innerhalb einer Behandlungsgruppe von Tieren, wie hier gut zu erkennen ist.

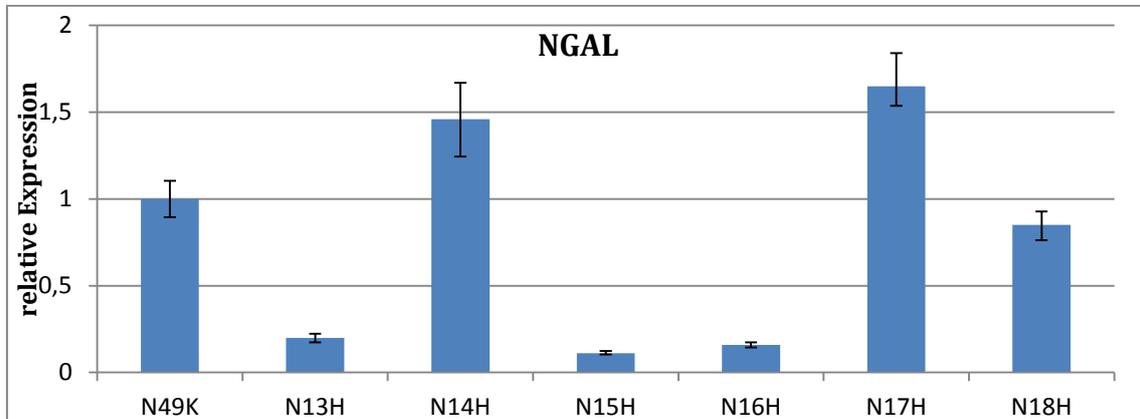


Abbildung 17: Varianz bzw. Inhomogenität der Ergebnisse innerhalb einer Gruppe von Tieren, hier Beispielhaft für die mit Hydralazin behandelte und auf NGAL untersuchte Gruppe. Ganz links ein Tier aus der Kontrollgruppe zur Normalisierung (rel. Expression = 1). Die Fehlerindikatoren geben hier, im Gegensatz zu den vorherigen Abbildungen, die Standardfehler der jeweiligen technischen Replikate an.

Ähnlich breit ist die Streuung auch bei den auf Kim-1 und Tenascin-C untersuchten Tiere durch alle Behandlungsgruppen hinweg.

Einzig bei Osteopontin blieb die Streuung der Ergebnisse für alle Gruppen in etwas engeren Grenzen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Einführung

Die hier präsentierten Ergebnisse sind notwendigerweise aufgrund der großen Standardfehler genauer zu betrachten. Eine einfache Interpretation mit offensichtlichem Ergebnis ist nicht erkennbar.

Gut erkennbar ist, dass größtenteils die Streuung auf die verschiedenen Ergebnisse innerhalb einer Behandlungsgruppe von Tieren zurück zu führen ist und nicht etwa, wie oben bereits erwähnt, auf die Streuung der technischen Replikate.

Es ist dadurch in den Gruppen Kim-1, NGAL und TN-C keine statistisch signifikante Aussage über Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe möglich. Auch innerhalb der Kontrollgruppe war die Streuung bei den untersuchten Genen groß. Lediglich für OPN sind grenzwertig signifikante Ergebnisse bei geringer Effektstärke feststellbar (siehe Ergebnisse Kap. 4.2.3).

Die zentrale Frage ist also die Frage nach der Ursache der großen Streuung innerhalb einer Behandlungsgruppe von Tieren. Sie lässt sich durch eine Reihe verschiedener Hypothesen, die im Folgenden aufgeführt werden, erörtern.

#### 5.1.1 Zur Planung

Zunächst einmal scheinen, aufgrund der hohen Standardfehler, entweder der nötige Stichprobenumfang unterschätzt, oder die vermutete Effektstärke überschätzt worden zu sein. Die Planung des Versuchs in der hier durchgeführten Form ist aber auf der Grundlage bekannter Publikationen gerechtfertigt, da der bereits vorbeschriebene analoge Versuch mit DOCA-behandelten Tieren [10] eine deutlich höhere Effektstärke (bis zu 400-fach) erwarten ließ. Unter den für diesen Versuch abgemilderten Bedingungen war die Effektstärke zwar geringer, jedoch in vergleichbarer Größenordnung erwartet worden. Die ursprüngliche Planung des Stichprobenumfangs war somit gerechtfertigt.

### 5.1.2 Weitere Maßnahmen

Um grobe Pipettierfehler oder andere bisher unerkannte Fehlerquellen z.B. bei der RNA-Isolierung oder der cDNA Replikation, oder unbemerkte eventuelle Verunreinigungen mit RNase auszuschließen, wurde stellvertretend für alle Amplifikate am Beispiel NGALs eine Versuchswiederholung des gesamten Versuchablaufs von der RNA-Isolierung bis hin zur RTqPCR-Auswertung durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Es zeigten sich hierbei Unterschiede nur im Größenbereich der Standardfehler der technischen Replikate. Die grobe Beeinflussung der Ergebnisse durch unerkannte oder andere, dem Zufall unterliegende Störfaktoren kann somit insgesamt als unwahrscheinlich angesehen werden.

## 5.2 Analyse möglicher Ursachen

### 5.2.1 Überblick

Es ist daher eine sorgfältige Überprüfung aller potentiellen Einflussfaktoren auf die Streuung der Ergebnisse zur Ermittlung der Ursache notwendig. Die folgenden Aspekte sollen genauer betrachtet und kritisch analysiert werden:

- RTqPCR Ablauf:
  - Wahl des Referenzgens
  - Anzahl der Referenzgene
  - PCR-Inhibitoren
- Die mRNA
  - Qualitätskontrolle der mRNA
  - mRNA und Proteinexpression
- Evtl. vorhandene Vorschädigung der Nieren mancher Tiere
- Die Rolle von DOCA im Vergleich zu Aldosteron
- Ist die Streuung der Ergebnisse normal?

## 5.2.2 RTqPCR Ablauf

### 5.2.2.1 Wahl des Referenzgens

#### 5.2.2.1.1 Mögliche Interaktionen

Das in diesem Versuch ausgewählte Referenzgen  $\beta$ -Aktin am Rattenmodell ist ein etabliertes Referenzgen in zahlreichen Publikationen seit dem Beginn der relativen Quantifizierung mittels qPCR. Als Strukturprotein aller eukaryotischer Zellen ist es essenzieller Bestandteil des Zytoskeletts und in seiner relativ hohen, sowie weitgehend Zellmetabolismus-unabhängigen Expression als Referenzgen immer wieder verwendet worden. Nichtsdestotrotz wird aber auch die  $\beta$ -Aktin-Expression dynamisch reguliert und kann von einer Behandlung oder Erkrankung beeinflusst sein. Die Eignung und Unabhängigkeit muss also für jede spezifische Behandlung aus Vorversuchen bekannt sein oder noch untersucht werden. So ist z.B. bereits bekannt, dass bei RTqPCR Untersuchungen von genetischem Material aus Zellkulturen (im Gegensatz zu Gewebeproben)  $\beta$ -Aktin als internes Referenzgen nicht geeignet ist, da seine Replikation in der RTqPCR durch das bei Zellkulturen verwendete Matrigel dosisabhängig inhibiert wird [82]. Zur Aufbereitung der hier verwendeten Gewebeproben wurde kein Matrigel verwendet.

Unabhängig hiervon können bei geringfügiger Kontamination der Probe mit genomischer DNA recht häufig  $\beta$ -Aktin-Pseudogene koamplifiziert werden, welche dann die  $\beta$ -Aktin Expression höher erscheinen lassen als sie ist [83].

Nachdem sich  $\beta$ -Aktin im Vorversuch mit DOCA-, und somit mit methodisch ähnlich behandelten Tieren bewährt hat [10], wurde es auch im hier beschriebenen Versuch eingesetzt. Außerdem bewegt sich die absolute Streuung der  $\beta$ -Aktin Expression über alle Versuche hinweg trotz der evtl. unterschiedlichen eingesetzten mRNA-Mengen, und somit cDNA Konzentrationen „nur“ im Bereich der 2,5-fachen Expression zwischen den Extremen, was bereits für sich ein guter Wert ist, somit kann sie die bis zu 20-fachen Expressionsunterschiede innerhalb einer Gruppe gleichbehandelter Tiere nicht erklären.

#### 5.2.2.1.2 Mögliche Sekundärstrukturen

Weiterhin muss beachtet werden, dass ein Referenz- oder Zielgen während der Replikation evtl. Sekundärstrukturen bilden kann, welche dann im darauf folgenden Zyklus die Effizienz der PCR beeinträchtigen können und die Expression geringer erscheinen lassen als sie ist.

Aber auch die mögliche Bildung von Sekundärstrukturen fällt hier nicht ins Gewicht, da diese sich gleichermaßen auf alle untersuchten Tiere einer Behandlungsgruppe auswirken würde. Sie gewinnt ihre Bedeutung erst bei der vergleichenden Betrachtung von Referenz und Zielgenen und ihr Einfluss auf die relative Expression wird über Effizienzberechnung ermittelt und korrigiert (siehe 3.2.4.6.2 Durchführung).

Die Bildung von Sekundärstrukturen bei den Primern noch vor der Replikation hätte größere Auswirkungen und würde die RTqPCR deutlich beeinträchtigen bis hin zur Verhinderung einer effektiven Replikation. Deshalb wurden sie gesondert darauf hin untersucht und für geeignet befunden (siehe 3.2.4.4.2 Primer).

#### 5.2.2.2 Anzahl der Referenzgene

Die kritische Rolle der Anzahl der Referenzgene wurde bereits mehrfach in der Literatur beschrieben. Es ist eine elegante Methode, bei Versuchen in denen die Behandlung die Expression eines Referenzgenes beeinflusst, eine feste Kombination aus Referenzgenen zu ermitteln, deren mittlere Expression dann einen relativ stabilen Wert annimmt und somit die erhaltenen Werte weitgehend unabhängig von einer eventuellen Beeinflussung durch die Behandlung sind [84-86]. Diese Kombinierung von Referenzgenen setzt sich immer häufiger gegenüber der Verwendung eines einzelnen Referenzgenes durch und ist vor allem für die exakte Bestimmung der absoluten Expression eines Zielgens von großer Bedeutung (z.B. im klinischen Umfeld bei der Bestimmung der Viruslast von z.B. HI-Viren im Blut).

Aber auch hier gilt, wie oben bereits beschrieben, dass damit die Varianz und Inhomogenität der Ergebnisse *innerhalb* einer Behandlungsgruppe nicht erklärt werden kann. Und genauso gilt auch hier, dass die Streuung der Expression des

Referenzgens über alle Versuche hinweg deutlich unter der Streuung der relativen Expression eines Zielgens innerhalb einer Gruppe liegt (siehe oben, 5.2.2.1.1.) und somit als Ursache für die breite Streuung der Zielgenexpression nicht in Frage kommt.

Auch nach den MIQE Guidelines (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) nach Bustin et al. 2009 [87] ist die Verwendung mehrerer Referenzgene im Fall einer gleichmäßigen Expression eines Referenzgens nicht notwendig, da somit gezeigt ist, dass die Behandlung keinen Einfluss auf die Expression der Referenzgene hatte.

### 5.2.2.3 PCR Inhibitoren

Eine Reihe von Stoffen, die sich zu Beginn der RTqPCR evtl. in der Probe befinden, können die Polymerase bei der Replikation mehr oder weniger stark beeinträchtigen, abhängig vom Stoff und von dessen Konzentration. Zu den Inhibitoren gehören vor allem Substanzen aus dem RNA-Aufreinigungsprozess, wie z.B. Phenole oder Salze, genauso wie biologische Reste aus dem Gewebe wie Harnstoff, Hämoglobin, Immunglobulin G oder auch genomische DNA [87-90]. Solche Inhibitoren, vor allem die biologischen, können prinzipiell in verschiedenen Gewebeproben auch in verschiedenen Konzentrationen vorliegen. Dadurch würde sich, im Gegensatz zu den beiden vorher genannten Einflussfaktoren, ein Unterschied innerhalb einer Behandlungsgruppe von Tieren erklären lassen. Dieser Unterschied wirkt sich jedoch, genauso wie die oben beschriebenen Sekundärstrukturen, primär auf die Effizienz der PCR aus. Unabhängig davon, dass diese später in der Berechnung des normalisierten Verhältnisses berücksichtigt wird, ist sie, auch wenn man die in Tabelle 7 nicht aufgeführten Ausreißer miteinbezieht, innerhalb einer Amplifikatgruppe durch alle Behandlungsgruppen hinweg sehr stabil (der Variationskoeffizient CV liegt zwischen 0,19% und 1,62%, der Determinationskoeffizient fällt für den stärksten Ausreißer nicht unter  $R^2 = 0,995$ ). Damit ist nachgewiesen, dass auch evtl. vorhandene PCR Inhibitoren nur zu einem eher geringen Anteil an der Varianz innerhalb einer Behandlungsgruppe von Tieren beteiligt sind.

Einen großen Einfluss haben Inhibitoren vor allem bei Versuchen mit dem Ziel, eine absolute Quantifizierung durch zu führen. Ebenso besteht ein Einfluss auf die relative Quantifizierung, wenn Effizienzberechnung auf einer vorher erstellten Kalibrierungsreihe (Standardreihe, siehe oben (PCR-Auswertung)) basiert, da die Effizienz dort „extern“ und nicht wie in diesem Versuch aus derselben Probe bestimmt wird. Bei einem Versuchsaufbau mit externer Kalibrierungsreihe müssten somit die Inhibitoren zuvor mit geeigneten Methoden entfernt werden [89]. In diesem Versuch konnte dieser Schritt aufgrund der internen Effizienzberechnung entfallen.

### **5.2.3 Die mRNA**

Die Herstellung der mRNA und die Messung der Endkonzentrationen für alle Versuchstiere wurden nach dem gleichen, oben dargestellten Protokoll durchgeführt. Dabei sind alle, für die einzelnen Versuchsschritte (Extraktion von mRNA aus gefrorenem Gewebe, Aufreinigung der mRNA, Transkription in cDNA) eingesetzten und von Fermentas und QIAGEN hergestellten Kits, explizit für die weitere Quantifizierung mittels RTqPCR geeignet.

#### **5.2.3.1 Die mRNA-Qualität und -Integrität**

Eine weitere bedeutende Rolle spielt die Qualität, Integrität und Reinheit der mRNA [90-92]. So sind Verunreinigungen z.B. mit genomischer DNA von großer Bedeutung, da diese die replizierbare Gendosis in einer Probe erhöhen würde. Die Rolle der RNA-Integrität ist jedoch differenzierter zu betrachten.

Grundsätzlich ist mit den oben beschriebenen Protokollen, wenn zusätzlich auf eine geschlossene Kühlkette geachtet, sowie die Kontamination mit RNasen penibel verhindert wird, die hohe Qualität und Reinheit der mRNA von genomischer DNA oder Proteinen, auch ohne DNase-Verdau gewährleistet [62, 63]. Dennoch kann nie zweifelsfrei ausgeschlossen werden, dass nicht doch z.B. eine Kontamination mit RNasen stattgefunden hat.

Die in diesem Versuch durchgeführte Bestimmung des Quotienten der optischen Dichte  $A_{280}/A_{260}$  mit dem Nanodrop® ist deswegen eine essenzielle Maßnahme [90]. Potentielle Verunreinigungen der mRNA mit Proteinen fallen genauso auf, wie Konzentrationsunterschiede, welche auf eine höhergradige Degradierung oder das Versagen der Extraktion eines Schrittes in der mRNA-Gewinnung hinweisen. Material für eine weitergehende Analyse, welche z.B. auch den 18S/28S rRNA Quotienten der mRNA in die Qualitäts- und Integritätskontrolle miteinbezieht [87, 91], z.B. durch die Systeme Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA) oder Experion (Bio-Rad, USA), stand nicht zur Verfügung.

Es ist jedoch durch Untersuchungen von Nolan et al. 2006 [93] und Schoor et al. 2003 [94] in vergleichenden Versuchen zum Einfluss der mRNA-Qualität und – Integrität auf die Ergebnisse, gemessen mit der 18S/28S rRNA-Methode, gezeigt worden: Bei Verwendung einer internen Referenz aus demselben RNA-Material sowie bei einer gleichzeitig maximalen Länge der Amplifikate von weniger als 250 Basenpaaren ist die relative Quantifizierung von Zielgenen mittels RTqPCR bei wenig degenerierter RNA (RNA integrity number (RIN) = 10) kaum verschieden zur Verwendung mittelgradig degenerierter RNA (bis hin zu RIN = 4) [93].

Die Beschränkung der Beurteilung der RNA-Integrität und Menge durch die Messung mit dem Nanodrop® stellt somit keinen Kompromiss dar, da hier beide Bedingungen, interne Referenzen und Produktlängen unter 250 Basenpaaren, erfüllt sind. Somit ist die Messung mit dem Nanodrop® für relative Quantifizierung der RNA-Menge ausreichend.

Unabhängig von den oben genannten Ursachen für die Degradierung der mRNA ist die teilweise noch bedeutendere Degradierung *in vivo*, da der Auf- und Abbau von mRNA bis zum Stoffwechselstillstand der Zelle einer dynamischen Regulation unterliegt. Diese Regulation entzieht sich dem Einfluss des Untersuchers und kann die Ergebnisse erheblich beeinflussen [87]. In diesem Fall kann auch *in vitro* nicht mehr degradierte mRNA in der darauffolgenden RTqPCR die Ergebnisse negativ beeinflussen [95].

### 5.2.3.2 mRNA und Proteinexpression

RTqPCR ist als Methode zur Quantifizierung der mRNA-Expression in der Forschung zur Routine geworden, immer häufiger wird die Methode als Ergänzung und Untermauerung von Ergebnissen anderer Methoden gewählt. Häufig, und genauso in dieser Arbeit, stellt sich die Frage nach der Ribonukleinsäurenexpression mit dem Hintergrund, daraus Aussagen zur Proteinexpression ableiten oder untermauern zu können [96].

Die Transkription und Proteinexpression unterliegt dabei jedoch noch weiteren regulatorischen Mechanismen, wie z.B. der posttranslationalen Modifikation, deren Ausmaß hauptsächlich von der Komplexität und Funktion des transkribierten Proteins in der Zelle abhängt [97]. Ebenso muss unterschieden werden, ob die eingesetzten Primer eine verschiedene Affinität zu prä-mRNA, mit noch erhaltenen Introns oder zu mRNA mit herausgespleißten Introns hat. In diesem Fall müssten die Auswirkungen auf die Proteinexpression genauer untersucht werden. In manchen, in der Literatur beschriebenen Fällen konnte sogar eine negative Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression beobachtet werden [97].

Ein weiterer beeinflussender Faktor ist die Existenz von microRNA (miRNA), welche sich zusätzlich auf die tatsächliche Proteintranslation auswirken kann [98].

Ein scheinbar widersprüchlicher Befund zwischen der mRNA-Expression und der Proteinexpression ist somit nicht gleichbedeutend mit einer Fehlbestimmung, sondern vielmehr Ausdruck der Komplexität der Regelung der Proteinexpression und bedarf weiterer Untersuchung.

Die genannten Aspekte sind von Bedeutung bei der weiteren Interpretation der Rolle der mRNA-Quantität der gesuchten Zielgene. Diese Aspekte sollten jedoch keinen Einfluss auf die Varianz der relativen Quantifizierungsergebnisse innerhalb einer Behandlungsgruppe haben, da für alle Tiere die gleichen Primer verwendet wurden und auch sonst gleiche Bedingungen vorlagen. Erst bei der Ableitung von Schlüssen zu entsprechender Wirkung auf die Proteinexpression müssen diese Unterschiede genauer untersucht werden.

### 5.2.3.3 Weitere Aspekte

Beim Vergleich zu dem in Referenz [10] genannten Vorversuch zur DOCA-Behandlung, muss erwähnt werden, dass neben der bereits genannten abweichenden Zielsetzung und dem deutlicheren Schädigungseffekt des ersten Versuches, eine Reihe von methodischen Unterschieden zwischen beiden Versuchen vorlagen. So wurde, aufgrund der Durchführung in einem anderen Labor, dort eine DNase (Desoxyribonuklease I digest) eingesetzt (in dem hier verwendeten QIAGEN-Protokoll nicht vorgesehen), die cDNA mit einem anderen Synthesekit transkribiert (ImProm-II Kit, Promega) und die RTqPCR mit Gegensatz zum hier beschriebenen Versuch (LightCycler 480 von Roche) mit dem ABI Prism 7700 Sequence Detector von Applied Biosystems durchgeführt [10]. Außerdem wurde im Vorversuch nicht mit SYBR Green als in die DNA interkalierendem Farbstoff, sondern mit spezifisch an die gesuchten PCR-Produkte bindenden TaqMan Proben gearbeitet.

Diese Unterschiede stellen im Ergebnis objektiv keine qualitative Differenz zueinander dar, allerdings ist eine Beeinflussung durch herstellerbedingte oder laborbedingte Unterschiede in der Methode, genauso wie Differenzen in den Durchführungsprotokollen immer möglich. Zwar kann auch hiermit die Varianz innerhalb der Behandlungsgruppen nicht erklärt werden, dennoch sollen diese Unterschiede für nachfolgende Interpretationen nicht unerwähnt bleiben.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, war nicht zuletzt auch die Behandlung der Tiere etwas modifiziert worden: Im Vorversuch mit DOCA wurden die Ratten vor Versuchsbeginn uninephrektomiert, während im hier vorgestellten Versuch mit Aldosteron den Tieren beide Nieren erhalten blieben. Die Belastung der Nieren war somit im Gegensatz zum Vorversuch auf beide Nieren aufgeteilt (siehe auch 1.1.4).

#### **5.2.4 Eventuelle Vorschädigung der Nieren *in vivo* unter Betrachtung der weiteren histologischen Untersuchungen**

Unabhängig von den bisher beschriebenen Einflussfaktoren muss ein weiterer Aspekt bei jedem Versuch bedacht werden: Prinzipiell ist, ohne weitere Untersuchungen (siehe unten), nicht auszuschließen, dass einzelne Tiere möglicherweise bereits vor der Behandlung nephrologisch vorgeschädigt waren. Dies würde sich im Idealfall durch ein gemeinsames Abweichen der Nierenschädigungsmarker Kim-1 und/oder NGAL eines oder mehrerer Nierenproben im Vergleich zum Kollektiv zeigen. Es kann jedoch nicht vorausgesetzt werden, dass sich dies deutlich zeigt, da sich der Übergang vom physiologischen zum pathologischen Zustand fließend gestalten kann und wahrscheinlich auch nicht von beiden Markern gleichermaßen erfasst wird.

Rückschlüsse auf solche Vorschädigungen lässt jedoch die genauere Betrachtung der Ergebnisse der Untersuchungen von Queisser et al. zu. So wurden weitere Gewebeproben des in dieser Arbeit untersuchten Nierengewebes (und somit identische Proben) auch auf ihre histologische Schädigung hin untersucht [19]. Hierfür erfolgten histopathologische Untersuchungen mithilfe der Messung des glomerulären Skleroseindex, des Mesangiolyseindex und des tubulointerstitiellen Skleroseindex, sowie mit den die Zellschädigung anzeigenden, immunhistochemischen Färbungen  $\gamma$ -H2AX, 3-Nitrotyrosin, anti-NF- $\kappa$ B p65 und anti-PADPR. Um apoptotische Zellen als Confounder auszuschließen wurden die Gewebeproben zusätzlich auf das Vorliegen der gespaltenen Caspase 3 hin untersucht. Weiterhin wurde der oxidative Stress der Zellen mit der Bestimmung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) zwischen den verschiedenen Gewebeproben verglichen [19].

Bei allen oben genannten Untersuchungen, und insbesondere auch bei der Untersuchung auf die gespaltene Caspase 3, liegen die Standardabweichungen für die verschiedenen Gewebeproben bei gleicher Behandlung in einem engen Bereich, nicht vergleichbar mit den in dieser Arbeit vorliegenden Standardabweichungen bei gleicher Behandlung. Diese Tatsache spricht gegen

eine Vorschädigung der Nieren einzelner Tiere in signifikantem Ausmaß als Ursache für die Streuung der Ergebnisse.

Lediglich die hohe Sensitivität der Marker [36, 39], bei welcher bereits eine geringe nephrologische Vorschädigung ohne Auswirkungen auf die Immunhistochemie für große Abweichungen genügt, wäre noch als Störfaktor denkbar. Gerade für NGAL ist außerdem bekannt, dass es, aufgrund seiner großen Verbreitung im Körper [37] sowie seiner Eigenschaft, – allgemein – bei Infektionen von betroffenem epithelialen Gewebe freigesetzt zu werden [36], relativ wenig spezifisch für Nierenschaden ist. Hierzu passt auch, dass die größte Streuung der Ergebnisse bei NGAL gefunden wurde. Ähnlich verhält es sich auch mit dem Tenascin, das als eher unspezifischer Marker auch andere Umbauwirkungen im Nierengewebe nachweisen könnte (siehe Einleitung).

Dennoch müsste, gerade auch bei der Betrachtung der Ergebnisse von Queisser et al. [19], zumindest überlagernd eine Tendenz zur vermehrten Schädigung der mit Aldosteron behandelten Tiere zu beobachten sein (siehe auch Abschnitt 5.2.5), was jedoch nur bei der Betrachtung des Osteopontins der Fall ist.

### **5.2.5 Die verschiedenen Rollen von DOCA in Nagetieren und Menschen**

Ziel des hier vorgestellten Versuchs war es, die mit der Vorstufe des Aldosterons, DOCA, gemachten Vorversuche [10] zu überprüfen und zu vergleichen, ob sich die hochsignifikanten Unterschiede in der Schädigungsmarkerexpression bei der Behandlung mit DOCA im Vergleich zu den unbehandelten Tieren, mit Aldosteron zumindest teilweise reproduzieren lassen, auch wenn deutlich geringere Effekte erwartet wurden (siehe oben).

Dies ist in vergleichenden Versuchen anhand einer Reihe Methoden, unter anderem der Analyse der Sauerstoffradikalbildung (ROS), der DNA-Doppelstrangbrüche in der Einzelzellgelelektrophorese und mittels Untersuchung der Antikörper gegen das phosphorylierte Histon H2AX, sowie in weiteren immunhistochemischen Untersuchungen, gezeigt worden [19] (siehe auch 5.2.4). Dabei wurde ebenso durch die Einführung einer vergleichenden vasodilatativen Behandlung mit Hydralazin und der Anwendung des Mineralkortikoid-

rezeptorblockers Spironolakton gezeigt, dass die nachgewiesenen Wirkungen nicht auf einen eventuell erhöhten Blutdruck zurückzuführen sind, sondern der Effekt hauptsächlich auf der genotoxischen Rolle des Aldosterons in der gewählten pathologischen Dosis beruht [19].

Dennoch gibt es eine Reihe von Unterschieden in der Rolle von DOCA beim Menschen und bei Nagetieren. So ist bei Nagetieren, im Gegensatz zum Menschen, DOCA gleichzeitig auch die direkte Vorstufe eines Hauptvertreterers der Glukokortikoide, dem Kortikosteron, welches in einem nicht geschwindigkeitsbestimmenden Schritt durch die 11- $\beta$ -Hydroxylase synthetisiert wird [1], wodurch eine veränderte direkte Wirkung auch auf den Glukokortikoidrezeptor (GR) gegeben ist [99]. Dieser könnte bei vollständiger Aktivierung ebenso für die beobachtete Genotoxizität verantwortlich sein, und seine Rolle und sein Einfluss auf das Ergebnis muss genauer untersucht werden.

Für eine immortalisierte, dem proximalen Tubulus ähnliche Zelllinie (LLC-PK1) vom Schwein wurde ein Einfluss durch die Aktivierung des Glukokortikoidrezeptors auf das Ergebnis durch die vergleichende Betrachtung mit dem selektiven Glukokortikoid- und Progesteronrezeptorblocker Mifepriston bereits ausgeschlossen [11]. Gleiches wurde nachgewiesen für eine dem distalen Tubulus ähnliche Zelllinie vom Hund (MDCK) [13].

Noch offen ist jedoch der Einfluss des GR *in vivo* bei Nagetieren. Außerdem beschreibt z.B. Gauer et al. die notwendige gleichzeitige Aktivierung des GR zusätzlich zum MR zur Mediation des profibrotischen Effekts von Aldosteron in mesangialen Zelllinien von Sprague Dawley Ratten [100], dieselben Tiere, die auch für die hier vorgestellte Arbeit verwendet wurden.

Unabhängig davon ist jedoch die inhibitorische Wirkung von Spironolakton auch auf den Glukokortikoidrezeptor nachgewiesen, wenn auch geringfügiger als am Mineralkortikoidrezeptor (GR:  $IC_{50} \approx 2,4\mu M$ , gegenüber MR:  $IC_{50} \approx 24nM$ ) [101]. Unter Berücksichtigung des Verteilungsvolumens im Körper der Ratte, und unter Berücksichtigung des ebenso aktiven Metaboliten von Spironolakton, Canrenon, führten die applizierten 25mg Spironolakton pro kg Körpergewicht zu einer Konzentration von  $60\mu M$  bzw.  $60\mu mol/l$ .

Diese fällt über die folgenden 24h mit der Ausscheidung der Ratte ab, liegt aber dennoch deutlich genug über der  $IC_{50}$  von Spironolakton am GR mit  $2,4\mu M$ , um eine effektive Blockade von Spironolakton am GR zu ermöglichen.

Für den Fall der Entfaltung der beobachteten genotoxischen Wirkung von DOCA über den GR *in vivo* würde somit Spironolakton auch als GR-Antagonist seine protektive Rolle entfalten können und deshalb im Umkehrschluss bei der Behandlung der Ratten mit Aldosteron anstelle von DOCA der beobachtete protektive Effekt von Spironolakton entsprechend deutlich geringer ausfallen.

Dies würde zumindest eine deutlich abgeschwächte Wirkung von Aldosteron und dessen Antagonisierung erklären. Jedoch ist durch weitere Methoden, insbesondere auch durch die der Real-time qPCR überlegenen, oben erwähnten histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von Queisser et al. [19] eine signifikante Wirkung auch von Aldosteron und dessen Antagonist Spironolakton *in vivo* bei Ratten eindeutig nachgewiesen worden.

Zum endgültigen Ausschluss eines Einflusses des GR müsste in weiteren Versuchen auch *in vivo* bei Ratten eine zusätzliche vergleichende selektive GR-Blockade durchgeführt, und somit dessen eventuelle Auswirkungen untersucht werden.

### **5.2.6 Einfluss der Stichprobengröße**

Abschließend ist noch eine weitere, ganz zentrale Möglichkeit der Erklärung zu betrachten: ein vorliegender, gering ausgeprägter Effekt wird in der gewählten geringen Stichprobengröße von der natürlichen Varianz der Ergebnisse so deutlich überlagert dass er sich aufgrund der geringen Effektstärke nur mit einer sehr viel größeren Stichprobengröße nachweisen lässt. Diese Möglichkeit würde auch mit der Erwartung übereinstimmen, dass die von DOCA verursachten Wirkungen die Wirkungen von Aldosteron deutlich übersteigen. Im Falle der Behandlung mit DOCA wäre dann der geringe Stichprobenumfang aufgrund der großen Effektstärke gerechtfertigt, wie bereits in 5.1.1 zur Planung erwähnt. Mit der bei Aldosteron nun eventuell vorliegenden, deutlich geringeren Effektstärke wäre ein signifikant ausfallender Nachweis der erhöhten Expression der mRNA für Nierenschädigungsmarker möglicherweise nur mit einem deutlich größeren

Stichprobenumfang möglich. (Dieses Ergebnis wäre vor allem bei der Interpretation der Ergebnisse für Tenascin-C naheliegend.)

In diesem Fall wäre die Streuung der interindividuellen mRNA-Expressionen für Nierenschädigungsmarker als natürliche Schwankung anzusehen und ein gering ausgeprägter Effekt bleibt bei dem gewählten Stichprobenumfang hinter dem „Hintergrundrauschen“ der natürlichen Schwankung der Ergebnisse verborgen.

Die Hypothese über die gesteigerte Expression der Nierenschädigungsmarker durch erhöhte Aldosteronspiegel kann in diesem Fall einer geringen Effektstärke weder gestützt noch widerlegt werden und bedarf zur endgültigen Aussage über den Effekt eines vergrößerten Stichprobenumfangs der untersuchten Tiere. Sie bleibt aber insbesondere auch bei der Betrachtung der histopathologischen Untersuchungen desselben Nierengewebes die nächstliegende Hypothese.

## 6 Zusammenfassung

Die Breite der Wirkungen von Aldosteron auf Nierenzellen wurde lange Zeit unterschätzt. Inzwischen zeigte sich ein nicht unerheblicher Anteil des Hyperaldosteronismus an arterieller Hypertonie und ebenso mehren sich die Hinweise auf damit assoziierter erhöhter Inzidenz für maligne Entartung von Nierengewebe. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Hyperaldosteronismus auf Nierenzellen von Ratten *in vivo* untersucht. Mittels real time quantitative PCR wurden die relative Expressionsveränderungen der mRNA von validierten Nierenschädigungsmarkern im Hyperaldosteronismusmodell kontrolliert beobachtet und statistisch ausgewertet. Anders als im analog durchgeführten Vorversuch mit DOCA an der Stelle von Aldosteron, ließ sich größtenteils kein über der natürlichen Streuung der Daten liegender, signifikanter Effekt der Nierenschädigung durch überhöhte Aldosteronspiegel nachweisen. Hierfür kommen vielfältige Gründe in Frage. Neben der technischen Variabilität, der Beschaffenheit der internen Kontrolle, potentiell vorhandenen Inhibitoren und der Qualität der mRNA, konnten eine Reihe von weiteren Gründen als Ursache für die Diskrepanz zu den Ergebnissen der mit DOCA behandelten Tiere ausgeschlossen werden. Neben der theoretischen Möglichkeit inter-methodischer Differenzen und sich daraus ergebender Variationen, sowie der noch weiter zu untersuchenden Rolle des Glukokortikoidrezeptors durch dessen variable gleichzeitige Aktivierung, ist die Interpretation im Sinne eines zu gering ausgeprägten Schädigungseffektes durch den Hyperaldosteronismus für den gewählten Stichprobenumfang naheliegend. Hiermit stimmt auch die Tatsache überein, dass der Effekt der Behandlung mit Aldosteron im Vergleich zur Behandlung mit DOCA von vorne herein deutlich geringer ausfallend erwartet wurde.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Aktories/Förstermann/Hofmann/Starke, *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 10 ed. 2009, München: Elsevier GmbH.
2. Löffler, G., P. Petrides, and P. Heinrich, *Biochemie und Pathobiochemie*. 8 ed. 2007, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg. 1263.
3. Remuzzi, G., D. Cattaneo, and N. Perico, *The aggravating mechanisms of aldosterone on kidney fibrosis*. *J Am Soc Nephrol*, 2008. **19**(8): p. 1459-62.
4. Epstein, M., *Aldosterone blockade: an emerging strategy for abrogating progressive renal disease*. *Am J Med*, 2006. **119**(11): p. 912-9.
5. Azibani, F., et al., *Aldosterone mediates cardiac fibrosis in the setting of hypertension*. *Curr Hypertens Rep*, 2013. **15**(4): p. 395-400.
6. Brown, N.J., *Contribution of aldosterone to cardiovascular and renal inflammation and fibrosis*. *Nat Rev Nephrol*, 2013. **9**(8): p. 459-69.
7. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces fibrosis, oxidative stress and DNA damage in livers of male rats independent of blood pressure changes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014. **280**(3): p. 399-407.
8. Nishiyama, A. and Y. Abe, *Molecular mechanisms and therapeutic strategies of chronic renal injury: renoprotective effects of aldosterone blockade*. *J Pharmacol Sci*, 2006. **100**(1): p. 9-16.
9. Skott, O., et al., *Rapid actions of aldosterone in vascular health and disease--friend or foe?* *Pharmacol Ther*, 2006. **111**(2): p. 495-507.
10. Schupp, N., et al., *Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats*. *FASEB J*, 2011. **25**(3): p. 968-78.
11. Schupp, N., et al., *Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists*. *Horm Metab Res*, 2010. **42**(6): p. 458-65.
12. Schmid, U., et al., *Angiotensin II induces DNA damage in the kidney*. *Cancer Res*, 2008. **68**(22): p. 9239-46.
13. Queisser, N., et al., *Aldosterone induces oxidative stress, oxidative DNA damage and NF-kappaB-activation in kidney tubule cells*. *Mol Carcinog*, 2011. **50**(2): p. 123-35.
14. Pitt, B., et al., *The Effect of Spironolactone on Morbidity and Mortality in Patients with Severe Heart Failure*. *New England Journal of Medicine*, 1999. **341**(10): p. 709-717.
15. Tylicki, L., et al., *Triple pharmacological blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in nondiabetic CKD: An open-label crossover randomized controlled trial*. *American Journal of Kidney Diseases*, 2008. **52**(3): p. 486-493.
16. Thomas, W., V. McEneaney, and B.J. Harvey, *Rapid responses to steroid hormones in the kidney*. *Nephron Physiol*, 2007. **107**(1): p. p1-9.

17. Boldyreff, B. and M. Wehling, *Rapid aldosterone actions: from the membrane to signaling cascades to gene transcription and physiological effects*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003. **85**(2-5): p. 375-81.
18. Good, D.W., *Nongenomic actions of aldosterone on the renal tubule*. Hypertension, 2007. **49**(4): p. 728-39.
19. Queisser, N., et al., *Blood pressure has only minor influence on aldosterone-induced oxidative stress and DNA damage in vivo*. Free Radic Biol Med, 2013. **54**: p. 17-25.
20. Rossi, G.P., et al., *A prospective study of the prevalence of primary aldosteronism in 1,125 hypertensive patients*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2293-300.
21. Gordon, R.D., et al., *Evidence that primary aldosteronism may not be uncommon: 12% incidence among antihypertensive drug trial volunteers*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1993. **20**(5): p. 296-8.
22. Calhoun, D.A., et al., *Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research*. Circulation, 2008. **117**(25): p. e510-26.
23. Moore, L.E., R.T. Wilson, and S.L. Campleman, *Lifestyle factors, exposures, genetic susceptibility, and renal cell cancer risk: a review*. Cancer Invest, 2005. **23**(3): p. 240-55.
24. Friis, S., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitors and the risk of cancer: a population-based cohort study in Denmark*. Cancer, 2001. **92**(9): p. 2462-70.
25. Meyer, P., *Increased intracellular calcium: from hypertension to cancer*. J Hypertens Suppl, 1987. **5**(4): p. S3-4.
26. Schupp, N., et al., *Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging*. Am J Physiol Renal Physiol, 2007. **292**(5): p. F1427-34.
27. Corrao, G., et al., *Hypertension, antihypertensive therapy and renal-cell cancer: a meta-analysis*. Curr Drug Saf, 2007. **2**(2): p. 125-33.
28. Grossman, E., et al., *Is there an association between hypertension and cancer mortality?* Am J Med, 2002. **112**(6): p. 479-86.
29. Marney, A.M. and N.J. Brown, *Aldosterone and end-organ damage*. Clin Sci (Lond), 2007. **113**(6): p. 267-78.
30. Nakabeppu, Y., et al., *Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids*. Biol Chem, 2006. **387**(4): p. 373-9.
31. Aggarwal, B.B., R.V. Vijayalekshmi, and B. Sung, *Targeting inflammatory pathways for prevention and therapy of cancer: short-term friend, long-term foe*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 425-30.
32. Papa, S., et al., *The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease*. Cell Death Differ, 2006. **13**(5): p. 712-29.
33. Krishna, M.C., et al., *Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. or as SOD mimics?* J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26026-31.

34. Wilcox, C.S., *Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress*. Pharmacology & Therapeutics, 2010. **126**(2): p. 119-145.
35. Harvey, R.A., P.A. Harvey, and M.J. Mycek, *Pharmacology*. 2<sup>nd</sup> ed. Lippincott's Illustrated Reviews. 2000, Philadelphia: Lipincott, Williams & Wilkins.
36. Vaidya, V.S., M.A. Ferguson, and J.V. Bonventre, *Biomarkers of acute kidney injury*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2008. **48**: p. 463-93.
37. Parikh, C.R. and P. Devarajan, *New biomarkers of acute kidney injury*. Crit Care Med, 2008. **36**(4 Suppl): p. S159-65.
38. Han, W.K., et al., *Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury*. Kidney Int, 2002. **62**(1): p. 237-44.
39. Vaidya, V.S., et al., *Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2006. **290**(2): p. F517-29.
40. Bailly, V., et al., *Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39739-48.
41. Dieterle, F., et al., *Qualification of biomarkers for regulatory decision making—a kidney safety biomarker project*. Toxicol. Off. J. Soc. Toxicol., 2007. **96**: p. 381.
42. van Timmeren, M.M., et al., *Tubular kidney injury molecule-1 (KIM-1) in human renal disease*. J Pathol, 2007. **212**(2): p. 209-17.
43. Cowland, J.B. and N. Borregaard, *Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans*. Genomics, 1997. **45**(1): p. 17-23.
44. Nielsen, B.S., et al., *Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases*. Gut, 1996. **38**(3): p. 414-20.
45. Mishra, J., et al., *Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(10): p. 2534-43.
46. Matthaeus, T., et al., *Co-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and matrix metalloproteinase-9 in the postischemic rat kidney*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**: p. 787A.
47. Trachtman, H., et al., *Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin in D+HUS: a novel marker of renal injury*. Pediatr Nephrol, 2006. **21**(7): p. 989-94.
48. Xie, Y., et al., *Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney*. Kidney Int, 2001. **60**(5): p. 1645-57.
49. Asplin, J.R., et al., *Contribution of human uropontin to inhibition of calcium oxalate crystallization*. Kidney Int, 1998. **53**(1): p. 194-9.
50. Thomas, S.E., et al., *Osteopontin expression, tubulointerstitial disease, and essential hypertension*. Am J Hypertens, 1998. **11**(8 Pt 1): p. 954-61.
51. Hudkins, K.L., et al., *Osteopontin expression in human crescentic glomerulonephritis*. Kidney Int, 2000. **57**(1): p. 105-16.

52. Mezzano, S.A., et al., *Overexpression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy*. *Kidney Int*, 2000. **57**(1): p. 147-58.
53. Okada, H., et al., *Tubular osteopontin expression in human glomerulonephritis and renal vasculitis*. *Am J Kidney Dis*, 2000. **36**(3): p. 498-506.
54. Johnston, N.I., et al., *Osteopontin as a target for cancer therapy*. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 4361-72.
55. Brellier, F., et al., *Tenascin-C triggers fibrin accumulation by downregulation of tissue plasminogen activator*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(6): p. 913-20.
56. Liabeuf, S., et al., *High circulating levels of large splice variants of tenascin-C is associated with mortality and cardiovascular disease in chronic kidney disease patients*. *Atherosclerosis*, 2011. **215**(1): p. 116-24.
57. Fluck, M., et al., *Mechano-regulated tenascin-C orchestrates muscle repair*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(36): p. 13662-7.
58. Orend, G., *Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. **37**(5): p. 1066-83.
59. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. *Methods Mol Biol*, 2000. **132**: p. 365-86.
60. Virdis, A., et al., *Spirolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress*. *Hypertension*, 2002. **40**(4): p. 504-10.
61. Ceron, C.S., et al., *Spirolactone and hydrochlorothiazide exert antioxidant effects and reduce vascular matrix metalloproteinase-2 activity and expression in a model of renovascular hypertension*. *Br J Pharmacol*, 2010. **160**(1): p. 77-87.
62. *RNeasy Mini Handbook*. fourth ed. 2010, Hilden, Germany: Qiagen 79.
63. *RevertAid I Premium First Strand cDNA Synthesis Kit*. Fermentas. 9.
64. Jansohn, M. and A. Aigner, *Gentechnische Methoden, eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor*. Vol. 4. 2007, München: Elsevier, Spektrum akademischer Verlag. 618
65. Veres, G., et al., *The molecular basis of the sparse fur mouse mutation*. *Science*, 1987. **237**(4813): p. 415-7.
66. Innis, M.A., et al., *DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988. **85**(24): p. 9436-40.
67. Janssens, N., et al., *Housekeeping genes as internal standards in cancer research*. *Mol Diagn*, 2004. **8**(2): p. 107-13.
68. *ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix*. Vol. AB-1158 / v6 / 0807. 2007, UK: ABgene®, Thermo Fisher Scientific Inc. 4.
69. CognitasGmbH, *LightCycler® 480 Instrument Operator's Manual*. V1.5. 2007. 395.
70. Karlen, Y., et al., *Statistical significance of quantitative PCR*. *BMC Bioinformatics*, 2007. **8**: p. 131.
71. Peccoud, J. and C. Jacob, *Theoretical uncertainty of measurements using quantitative polymerase chain reaction*. *Biophys J*, 1996. **71**(1): p. 101-8.

72. Ramakers, C., et al., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. *Neurosci Lett*, 2003. **339**(1): p. 62-6.
73. Tichopad, A., et al., *Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up*. *Nucleic Acids Res*, 2003. **31**(20): p. e122.
74. Ruijter, J.M., et al., *Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data*. *Nucleic Acids Res*, 2009. **37**(6): p. e45.
75. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(9): p. e45.
76. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(9): p. e36.
77. Meuer, S.W., C.; Nakagawara, K, *Rapid Cycle Real-time PCR: Methods and Applications*. 2001, Heidelberg: Springer.
78. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. *Nat Protoc*, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
79. Pfaffl, M.W. and Corbett Research Pty Ltd (QIAGEN Corp.), *REST 2009 Software User Guide*. 2009: QIAGEN GmbH. 26.
80. Rowe, P., *Statistik für Mediziner und Pharmazeuten*. 1. ed. 2012, Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA. 287.
81. Howell, D.C. *Resampling Statistics: Randomization and the Bootstrap*. Link: <https://www.uvm.edu/~dhowell/StatPages/ResamplingWithR/ResamplingR.html>. [Website] 2015 12.06.2015.
82. Selvey, S., et al., *Beta-actin--an unsuitable internal control for RT-PCR*. *Mol Cell Probes*, 2001. **15**(5): p. 307-11.
83. Raff, T., et al., *Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes*. *Biotechniques*, 1997. **23**(3): p. 456-60.
84. Andersen, C.L., J.L. Jensen, and T.F. Orntoft, *Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets*. *Cancer Res*, 2004. **64**(15): p. 5245-50.
85. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biol*, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
86. Cronin, M., et al., *Universal RNA reference materials for gene expression*. *Clin Chem*, 2004. **50**(8): p. 1464-71.
87. Bustin, S.A., et al., *The need for transparency and good practices in the qPCR literature*. *Nat Methods*, 2013. **10**(11): p. 1063-7.
88. Nolan, T., et al., *SPUD: A quantitative PCR assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations*. *Analytical Biochemistry*, 2006. **351**(2): p. 308-310.
89. Perch-Nielsen, I.R., et al., *Removal of PCR inhibitors using dielectrophoresis as a selective filter in a microsystem*. *Lab on a Chip*, 2003. **3**(3): p. 212-216.

90. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
91. Gingrich, J., *Effect of RNA degradation on data quality in quantitative PCR and microarray experiments*. Biorad Bulletin 5452, 2008.
92. Morrogh, M., et al., *Tissue preparation for laser capture microdissection and RNA extraction from fresh frozen breast tissue*. BioTechniques, 2007. **43**(1): p. 41-48.
93. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
94. Schoor, O., et al., *Moderate degradation does not preclude microarray analysis of small amounts of RNA*. Biotechniques, 2003. **35**(6): p. 1192-6, 1198-201.
95. Doma, M.K. and R. Parker, *RNA quality control in eukaryotes*. Cell, 2007. **131**(4): p. 660-8.
96. Gygi, S.P., et al., *Correlation between protein and mRNA abundance in yeast*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1720-30.
97. Schmidt, M.W., et al., *Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Mol Syst Biol, 2007. **3**: p. 79.
98. Landi, D., et al., *Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer*. Carcinogenesis, 2008. **29**(3): p. 579-84.
99. Vera, F., R.R. Zenuto, and C.D. Antenucci, *Differential responses of cortisol and corticosterone to adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in a subterranean rodent (Ctenomys talarum)*. J Exp Zool A Ecol Genet Physiol, 2012. **317**(3): p. 173-84.
100. Gauer, S., V. Segitz, and M. Goppelt-Struebe, *Aldosterone induces CTGF in mesangial cells by activation of the glucocorticoid receptor*. Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(11): p. 3154-9.
101. Fagart, J., et al., *A new mode of mineralocorticoid receptor antagonism by a potent and selective nonsteroidal molecule*. J Biol Chem, 2010. **285**(39): p. 29932-40.

## 8 Anhang

8.1 Tabelle 2: In diesem Versuch eingesetzte Nierenproben mit jeweiliger Beschriftung

Tiere	Nieren	$\Sigma$	Tiere	Nieren	$\Sigma$
<b>CP</b>	CP2	n = 2	<b>Ald/Tempol</b>	N21T	n = 6
	CP3			N22T	
<b>NaCl</b>	N45K	n = 6		N23T	
	N46K			N24T	
	N47K			N25T	
	N48K			N26T	
	N49K		<b>Ald/Hydra</b>	N13H	n = 6
N50K	N14H				
<b>Ald</b>	N37A	n = 6	N15H		
	N38A		N16H		
	N39A		N17H		
	N40A		N18H		
	N41A				
N42A					
<b>Ald/Spiro</b>	N29S	n = 6			
	N30S				
	N31S				
	N32S				
	N33S				
N34S					

**8.2 Tabelle 3: Mit dem Nanodrop® ermittelte RNA-Konzentration. C<sub>RNA</sub> ist das arithmetische Mittel aus 3 Replikaten.**

<b>Tiere</b>	<b>Nieren</b>	<b>C<sub>RNA</sub> in µg/ml</b>	<b>Tiere</b>	<b>Nieren</b>	<b>C<sub>RNA</sub> in µg/ml</b>
<b>CP</b>	CP2	0,406	<b>Ald/Tempol</b>	N21T	0,424
	CP3	0,345		N22T	0,514
<b>NaCl</b>	N45K	0,506		N23T	0,511
	N46K	0,382		N24T	0,323
	N47K	0,528		N25T	0,622
	N48K	0,892		N26T	0,632
	N49K	0,882	<b>Ald/Hydra</b>	N13H	0,522
N50K	0,617	N14H		0,576	
<b>Ald/(NaCl)</b>	N37A	0,543		N15H	0,845
	N38A	0,668		N16H	0,641
	N39A	0,449		N17H	0,517
	N40A	0,579		N18H	0,925
	N41A	0,471			
	N42A	0,985			
<b>Ald/Spiro</b>	N29S	0,437			
	N30S	0,629			
	N31S	0,704			
	N32S	0,709			
	N33S	0,561			
	N34S	0,698			

**8.3 Tabelle 4: RNA-Isolat (µg/ml) und Wassermengen (µl).**

<b>Nieren</b>	<b>C<sub>RNA</sub> *</b>	<b>2µg RNA in</b>	<b>Wasser</b>	<b>Nieren</b>	<b>C<sub>RNA</sub> *</b>	<b>2µg RNA in</b>	<b>Wasser</b>
CP2	0,406	4,93	8,57	N21T	0,424	4,71	8,79
CP3	0,345	5,80	7,7	N22T	0,514	3,89	9,61
N45K	0,506	3,95	9,55	N23T	0,511	3,91	9,59
N46K	0,382	5,23	8,27	N24T	0,323	6,19	7,31
N47K	0,528	3,78	9,72	N25T	0,622	3,22	10,28
N48K	0,892	2,24	11,26	N26T	0,632	3,17	10,33
N49K	0,882	2,27	11,23	N13H	0,522	3,83	9,67
N50K	0,617	3,24	10,26	N14H	0,576	3,47	10,03
N37A	0,543	3,68	9,82	N15H	0,845	2,36	11,14
N38A	0,668	2,99	10,51	N16H	0,641	3,12	10,38
N39A	0,449	4,45	9,05	N17H	0,517	3,22	10,28
N40A	0,579	3,45	10,05	N18H	0,925	2,16	11,34
N41A	0,471	4,25	9,25				
N42A	0,985	2,03	11,47				
N29S	0,437	4,56	8,94				
N30S	0,629	3,18	10,32				
N31S	0,704	2,84	10,66				
N32S	0,709	2,82	10,68				
N33S	0,561	3,57	9,93				
N34S	0,698	2,87	10,63				

## **DANKSAGUNG**

Zuallererst möchte ich mich bedanken bei Fr. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Nicole Schupp für die Einführung in das Thema, die durchgehende Unterstützung, ausgezeichnete Betreuung, Hilfe bei jeglichen Fragestellungen und nicht zuletzt für ihre Geduld.

Es war mir eine große Freude mit ihr zu arbeiten.

Weiterhin gilt mein Dank Fr. Dr. Nina Queisser, welche bei den alltäglichen Herausforderungen im Labor jederzeit tatkräftig und sachkundig zur Seite stand und der regelmäßige Austausch mit ihr eine große Hilfe war.

Ausdrücklich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Gholamreza Fazeli für seine exzellente Betreuung und Begleitung mit fundierten Kenntnissen und weiterführender Literatur.

Mein herzlicher Dank gilt zudem auch Fr. Elisabeth Stein, Fr. Miriam Kral, Fr. Silvana Wunram und Fr. Kathrin Happ für die Unterstützung mit wertvollen Hinweisen zur technischen Umsetzung bei Routinearbeit im Labor, sowie für die Weitergabe von Erfahrungen zu Methoden und Versuchsabläufen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bisher nicht erwähnten Mitarbeitern im Team von Fr. PD Dr. Schupp und allen weiteren Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die entgegengebrachte Hilfsbereitschaft herzlich bedanken.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit in vollem Umfang selbstständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form einzureichen.

Ich habe keine Doktorprüfung an einer anderen Hochschule abgelegt oder endgültig nicht bestanden.

Würzburg, den 23.09.2016

Timo Basali

# LEBENS LAUF

## ■ Werdegang

- 1988: Geboren in Schwäbisch Hall
- 1994: Umzug nach Kairo, Ägypten
- 1994-2002: Besuch der „Deutschen Evangelischen Oberschule Kairo“ (DEO) bis zur 8. Klasse mit deutschem Schulprogramm nach baden-württembergischem Lehrplan. Gleichzeitig ägyptisches Schulprogramm in den Fächern Arabisch und Gesellschaftskunde.
- 2002: Umzug nach Deutschland (Neuenstein im Hohenlohekreis, Baden-Württemberg)
- 2002-2007: Besuch des Hohenlohegymnasiums Öhringen, Abitur 2007 (Note 1,3)
- 2007-2008: Zivildienst im Diakonieklinikum Schwäbisch Hall
- 2008: 2 ½ monatiger „work-and-travel“ Auslandsaufenthalt in den USA (Rochester / NY)
- 2008-2013: Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
- 2013-2014: Praktisches Jahr in der Inneren Medizin, der Chirurgie und Frauenheilkunde jeweils am Universitätsklinikum Würzburg
- 2014: Examen und Approbation im Herbst 2014
- 2015: Niederschrift der Dissertation  
Seit August 2015 Anstellung als Assistenzarzt zur Weiterbildung im Fach Gynäkologie und Geburtshilfe bei Prof. Dr. Ulrich Karck, Stuttgart

Timo Basali